



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Estudios sobre la función de la malina y la laforina en la enfermedad de Lafora

PROGRAMA DE DOCTORADO:

Bioquímica y Biomedicina

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Marcos Lahuerta Ferreres

Dirigida por: Dra. Carmen Aguado Muñoz

Dr. Erwin Knecht Roberto

Dra. Eva Pérez Jiménez

Valencia, Mayo 2017



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

La Dra. **Carmen Aguado Muñoz**, Investigadora CIBER, el Dr. **Erwin Knecht Roberto**, Investigador CIPF y la Dra. **Eva Pérez Jiménez**, Investigadora IBV-CSIC

INFORMAN:

La memoria de Tesis Doctoral realizada por D. Marcos Lahuerta Ferreres, titulada “Estudios sobre la función de la malina y la laforina en la enfermedad de Lafora”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne a su juicio los requisitos necesarios para su calificación.

Valencia, 30 de mayo de 2017

Dra. **Carmen Aguado Muñoz** Dr. **Erwin Knecht Roberto**

Dra. **Eva Pérez Jiménez**

Para la realización de esta tesis doctoral llevada a cabo en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Marcos Lahuerta Ferreres ha sido beneficiario de una subvención para la Formación de Personal Investigador (FPI) asociada al Proyecto de Investigación BFU2011-22630, otorgada por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mis más sinceros agradecimientos al doctor Erwin Knecht por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por sus consejos en todos los ámbitos y por permitirme adquirir la experiencia y conocimientos que supone el trabajo experimental de laboratorio.

Mil gracias por todo a mi “madre del laboratorio”, la doctora Carmen Aguado, por su dedicación, ayuda y por tratarme lo mejor que se puede pedir desde el primer día que nos conocimos, haciendo posible llevar a cabo este trabajo de la mejor manera posible y en equipo. Ha sido para mí una gran mentora y amiga. También agradecer enormemente a la doctora Eva Pérez toda su ayuda y enseñanza durante todo este tiempo.

A los doctores Alihamze Fathinajafabadi y Mari Paz Rubio, los mejores compañeros de laboratorio que se pueden tener, por su interés y ayuda incondicional en todos los ámbitos.

A todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio I-08, con quienes he podido contar para todo y compartir buenos y grandes momentos, en especial a la doctora Maria Eugenia, Magda, Carmen, Salva y Rachid, así como a antiguos compañeros de laboratorio como Asun, Rafa, Silvia, Félix, Ghita y Elvira.

Y, sobre todo, a mis padres, por ser tan comprensivos, por su incesante apoyo y por ayudarme en todo lo que ha estado a su alcance.

Además, estoy muy agradecido por la gran cantidad de amigos que he tenido el privilegio de conocer durante mi trabajo en el CIPF como son Alberto, Jorge, Lolo, Estefanía, Laura, Pili, Fátima y Sonia, entre muchos otros.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XVII
INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedad de Lafora	3
1.1. Características y diagnóstico de la enfermedad de Lafora.....	3
1.2. Bases moleculares de la enfermedad de Lafora	5
1.2.1. Genes asociados.....	5
1.2.2. Posibles mecanismos responsables de la enfermedad	8
1.3. Tratamiento	11
2. El glucógeno.....	12
3. Sistemas de degradación intracelular de proteínas.....	13
3.1. Vías lisosomales y otros procesos relacionados.....	14
3.1.1. Autofagia	14
3.1.1.1. Mitofagia	18
3.1.2. Endocitosis	20
3.1.2.1. Endocitosis de fase fluida.....	21
3.1.2.2. Endocitosis mediada por receptor	23
3.1.2.2.1. Endocitosis mediada por clatrina.....	23
3.1.2.2.2. Endocitosis mediada por caveolas.....	25
3.2. Vías no lisosomales.....	26
3.2.1. Sistema ubiquitina-proteasoma.....	26
3.2.2. Las calpaínas	29
4. Transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma.....	30
4.1. Entrada al núcleo.....	31
A. NLSs clásicas.....	32
B. NLSs no-clásicas.....	32
4.2. Salida del núcleo	33

OBJETIVOS.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. Material.....	43
1.1. Cultivos celulares	43
1.2. Cepas bacterianas	45
1.3. Anticuerpos	45
1.4. Inhibidores de la proteólisis y otros inhibidores.....	48
1.5. Otros reactivos	48
1.6. Tampones y soluciones más habituales	49
1.7. Kits comerciales.....	51
1.8. Material de electroforesis.....	51
1.9. Plásmidos y clonaciones	52
1.10. Aparatos	54
1.11. Programas bioinformáticos.....	56
2. Métodos.....	57
2.1. Cuantificación de la concentración de proteínas	57
2.2. Expresión transitoria de proteínas recombinantes en células eucariotas....	57
2.3. Microscopía de fluorescencia.....	57
2.4. Western-blot.....	58
2.5. Estudio de la expresión de la laforina y de la malina mediante RT-qPCR.....	60
2.5.1. Extracción y purificación del RNA	60
2.5.2. RT-qPCR.....	60
2.6. Obtención de fracciones celulares.....	61
2.6.1. Aislamiento de una subfracción celular enriquecida en núcleos	61
2.6.2. Aislamiento de una fracción enriquecida en polisomas.....	62
2.7. Estudios sobre autofagia.....	64
2.7.1. Análisis de la actividad autofágica por fluorescencia con el marcador ptf-LC3.....	64
2.7.2. Estimación de la masa lisosomal	65
2.7.3. Análisis de la mitofagia	65

2.7.3.1. Citometría de flujo para la cuantificación de los niveles de MitoTracker Red	66
2.7.3.2. Western-blot para medir los niveles de LC3-II y de proteínas mitocondriales.....	67
2.7.3.3. Microscopía de fluorescencia para el estudio de la colocalización de mitocondrias y lisosomas	67
2.8. Estudio del transporte núcleo-citoplasma de la laforina.....	68
2.8.1. Entrada al núcleo.....	68
2.8.2. Salida del núcleo	69
2.9. Estudio de la endocitosis.....	70
2.9.1. Endocitosis de fase fluida	70
2.9.2. Endocitosis mediada por receptor	71
2.9.2.1. Dependiente de clatrina	71
2.9.2.2. Dependiente de caveolas.....	72
2.10. Ensayo de la actividad de calpaínas.....	73
2.11. Inmunoprecipitación	74
2.12. Cromatografía líquida y espectrometría de masas.....	75
2.13. Estudio de la vida media de la laforina.....	76
2.14. Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS)	76
2.15. Análisis estadístico	77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
1. Alteraciones en la autofagia y en otros procesos lisosomales y no lisosomales	81
1.1. Vía autofagia-lisosomas.....	81
1.1.1. Determinación de la actividad autofágica con el marcador ptf-LC3	81
1.1.2. Cuantificación de la masa lisosomal	83
1.1.3. Análisis de la mitofagia en los modelos celulares de LD	86
1.1.3.1. Estudio de la mitofagia en fibroblastos humanos control y de pacientes con LD.....	86

1.1.3.1.1. Los fibroblastos de pacientes con LD presentan una alteración en la formación de autofagosomas inducida con inhibidores mitocondriales	87
1.1.3.1.2. La degradación de las mitocondrias está reducida en fibroblastos de pacientes con LD tras el tratamiento con CCCP, FCCP u oligomicina y antimicina A	93
1.1.3.1.3. La colocalización de mitocondrias con lisosomas es menor en fibroblastos de pacientes con LD después del tratamiento con CCCP o con oligomicina y antimicina A... ..	101
1.1.3.2. Estudio de la mitofagia en astrocitos de ratones	104
1.1.3.2.1. Los astrocitos de ratones modelo de LD no tienen alterada la formación de autofagosomas	104
1.1.3.2.2. Los astrocitos de ratones control y de ratones modelo de LD no muestran diferencias en la colocalización de mitocondrias y lisosomas	105
1.2. Otras vías lisosomales y no lisosomales	108
1.2.1. Vía endocíticas	108
1.2.1.1. Endocitosis de fase fluida o macropinocitosis.....	109
1.2.1.2. Endocitosis mediada por receptor	111
1.2.1.2.1. Endocitosis mediada por clatrina.....	111
A. Endocitosis mediada por el receptor EGFR.....	111
A.1. Estudio de la internalización del EGFR	111
A.2. Análisis de los niveles de EGFR total y fosforilado.....	113
B. Endocitosis mediada por el receptor TfrR.....	116
1.2.1.2.2. Endocitosis mediada por caveolas.....	117
1.2.2. Actividad de las calpaínas	119
2. Estudio de la localización celular de la laforina y de la malina	121
2.1. Localización celular de la laforina y de la malina sobrepresadas.....	121
2.1.1. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina y de la malina	123

2.1.2. Efecto de otras condiciones de estrés sobre la localización de la laforina y de la malina.....	130
2.1.3. Localización de la laforina y de la malina cuando se sobreexpresan conjuntamente.....	133
2.1.4. Análisis de la sobreexpresión de la laforina y la malina mediante PAS.....	137
2.2. Localización celular de la laforina endógena.....	142
3. Entrada y salida de la laforina del núcleo.....	144
3.1. Entrada de la laforina al núcleo dependiente de glucosa y de la malina ...	145
3.1.1. Identificación de una NLS en la laforina y ensayos para verificar su funcionalidad.....	149
3.2. Salida de la laforina del núcleo dependiente de glucosa.....	153
3.2.1. Identificación y confirmación de una NES en la laforina.....	156
4. Experimentos para tratar de identificar posibles funciones de la laforina, sobre todo en relación con su localización nuclear junto a la malina.....	160
4.1. Identificación de proteínas que interaccionan con la laforina.....	160
4.1.1. Identificación de la laforina en una fracción enriquecida en polisomas.....	164
4.1.2. Colocalización de la laforina y la malina con gránulos de estrés y cuerpos P.....	166
4.2. Posibles funciones de la laforina en el núcleo.....	170
CONCLUSIONES FINALES.....	177
BIBLIOGRAFÍA.....	181

ABREVIATURAS

AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
Atg	Relacionado con autofagia
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CBD	Dominio de unión a carbohidratos
CCCP	Cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona
cDNA	DNA de cadena simple
CHX	Cicloheximida
CMV	Promotor del Citomegalovirus
CRM1	Proteína de mantenimiento cromosomal 1, también conocida como exportina 1
DAPI	4, 6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSP	Dominio fosfatasa con especificidad dual
EDC4	Proteína activadora de “decapping” del mRNA 4
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EPM2A/2B	Gen A/B de la epilepsia mioclónica progresiva tipo 2
EYFP	Proteína amarilla fluorescente mejorada
FBS	Suero bovino fetal
FCCP	Cianuro de carbonilo-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GBE	Enzima ramificadora de glucógeno
GDH	Glutamato deshidrogenasa

ABREVIATURAS

GFP	Proteína verde fluorescente
GP	Glucógeno fosforilasa
GS	Glucógeno sintasa
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2'-etanosulfónico
HRP	Peroxidasa de rábano
IgG	Inmunoglobulina G
KH	Medio de Krebs-Henseleit
KO	Knock-out
LAMP	Proteína de membrana asociada al lisosoma
LBS	Cuerpos de Lafora
LC3	Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 1A/1B 3
LD	La enfermedad de Lafora
LMB	Leptomicina B
NLS	Secuencia de importación nuclear
MEF	Fibroblasto embrionario de ratón
MEM	Medio mínimo esencial
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mTOR	Diana mecánica de la rapamicina
NES	Secuencia de exportación nuclear
OPA1	Atrofia óptica tipo 1
PABP	Proteína de unión a la cola poli-adenosina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PFA	Paraformaldehído
PINK1	Quinasa putativa inducida por PTEN1
PKI	Proteína quinasa dependiente de cAMP
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PTG	Proteína que direcciona hacia el glucógeno
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación
RFP	Proteína roja fluorescente
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SD	Desviación estándar
SDHA	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
TBS	Tampón tris salino
TBS-T	Tampón tris salino con 0,05 % Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TOM20	Traslocasa 20 de la membrana externa
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
ULK	Quinasa tipo Unc-51
VDAC1	Canal aniónico 1 dependiente de voltaje

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de cuerpos de Lafora en una biopsia de piel..... 5

Figura 2. Esquema de los principales dominios en las proteínas laforina y malina 6

Figura 3. Macroautofagia15

Figura 4. Mitofagia20

Figura 5. Endocitosis de fase fluida22

Figura 6. Endocitosis mediada por clatrina24

Figura 7. Endocitosis mediada por caveolas.....26

Figura 8. Poliubiquitinación y degradación de proteínas mediante proteasomas.....28

Figura 9. Modelo simplificado del transporte a través del poro nuclear de proteínas dependiente de Ran.....35

Figura 10. La fusión de los autofagosomas con lisosomas y/o endosomas no parece estar alterada en los fibroblastos de pacientes con LD.....82-83

Figura 11. Niveles de LAMP1 y LAMP2 en fibroblastos humanos control y de pacientes con LD84-85

Figura 12. Efectos del tratamiento con CCCP, FCCP o con oligomicina y antimicina A sobre la morfología mitocondrial en fibroblastos humanos88

Figura 13. Efecto del tratamiento con CCCP u oligomicina y antimicina A sobre los niveles de LC3-II en los fibroblastos control y de pacientes con LD89-90

Figura 14. Efecto del tratamiento con CCCP sobre la cantidad de vacuolas autofágicas en fibroblastos control y de pacientes con LD analizado mediante fluorescencia.....91-92

Figura 15. Cuantificación de los niveles de MitoTracker Red en fibroblastos humanos control y de pacientes con LD tras el tratamiento o no con CCCP94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 16. Niveles de las proteínas mitocondriales OPA1 y SDHA en fibroblastos humanos control y de pacientes con LD, tras el tratamiento con CCCP.	95-96
Figura 17. Niveles de las proteínas mitocondriales OPA1, SDHA, PDH, GDH y VDAC1 en fibroblastos humanos control y de pacientes con LD tras el tratamiento con oligomicina y antimicina A.....	98-100
Figura 18. Colocalización de mitocondrias y lisosomas en fibroblastos control y de pacientes con LD tras el tratamiento con CCCP.....	102
Figura 19. Colocalización de mitocondrias y lisosomas en fibroblastos control y de pacientes con LD tras el tratamiento con oligomicina y antimicina A.....	103
Figura 20. Efecto del tratamiento con CCCP sobre los niveles de LC3-II en los astrocitos de ratón controles y con LD y fibroblastos humanos control	105
Figura 21. Colocalización de mitocondrias y lisosomas en astrocitos tras el tratamiento o no con CCCP	106
Figura 22. Análisis mediante citometría de flujo de la internalización del FITC-dextrano en fibroblastos	110
Figura 23. Cuantificación de la internalización del complejo EGF-EGFR mediante citometría de flujo	112
Figura 24. Niveles de EGFR en los fibroblastos de pacientes con LD.....	113-114
Figura 25. Efecto del EGF sobre los niveles de pEGFR (Tyr845).....	115-116
Figura 26. Cuantificación de la internalización del complejo Tfr-TfrR mediante citometría de flujo	117
Figura 27. Cuantificación de la internalización del fluoróforo BodiPY FLC5 mediante citometría de flujo	119
Figura 28. Cuantificación de la actividad calpaína en fibroblastos control y de pacientes con LD mediante fluorescencia	120
Figura 29. Localización de la laforina y de la malina en células HeLa, HEK293T y COS-7, analizada mediante inmunofluorescencia....	122-123

Figura 30. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina y de la malina en células HeLa y COS-7, analizada mediante inmunofluorescencia.....	125
Figura 31. Efecto de la re-adición de glucosa a células previamente incubadas en ausencia de ésta sobre la localización de la laforina, analizada mediante inmunofluorescencia	126
Figura 32. Efecto del tipo de conjugado empleado para marcar la laforina y la malina sobre la localización de estas dos proteínas en las células incubadas en presencia o en ausencia de glucosa, analizada mediante inmunofluorescencia	128
Figura 33. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina en varias subfracciones celulares aisladas de MEFs, analizadas mediante Western-blot.....	129
Figura 34. Efecto de dos condiciones diferentes de estrés, un tratamiento con peróxido de hidrógeno o de una incubación en un medio empobrecido en nutrientes, KH, sobre la localización de la laforina y de la malina, analizado mediante inmunofluorescencia	131
Figura 35. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina y de la malina en células incubadas en KH, analizada mediante inmunofluorescencia.....	132
Figura 36. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina y de la malina cuando las dos proteínas se sobreexpresan conjuntamente, analizada mediante inmunofluorescencia.....	133
Figura 37. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina y de la malina en varias subfracciones celulares cuando las dos proteínas se sobreexpresan conjuntamente, analizadas mediante Western-blot.....	134-135
Figura 38. Efecto de la coexpresión de la laforina junto a otras proteínas sobre su localización, analizada mediante inmunofluorescencia.....	137
Figura 39. La sobreexpresión de la laforina pero no de la malina produce la formación de acúmulos de laforina en el citoplasma.....	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 40. Los acúmulos producidos en la sobreexpresión de la laforina son PAS-positivos	139-140
Figura 41. Los acúmulos PAS-positivos producidos en la sobreexpresión de la laforina son sensibles a la diastasa	141
Figura 42. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina endógena en fracciones subcelulares aisladas de fibroblastos humanos y de células HeLa, analizada mediante Western-blot.....	143
Figura 43. Efecto del péptido Bimax2 sobre la localización citoplasma/núcleo de la laforina en células HT-1080 incubadas en presencia o no de glucosa.....	148
Figura 44. Localización mediante fluorescencia de la secuencia candidata a actuar como NLS en la laforina conjugada con EYFP	152
Figura 45. Cuantificación del efecto del KPT-185 en la localización de la laforina conjugada con RFP en presencia o no de glucosa, analizada mediante la determinación de la fluorescencia en el citoplasma y en el núcleo.....	154
Figura 46. Localización mediante fluorescencia del tándem EYFP conjugado a las secuencias candidatas a actuar como NES en la laforina, en presencia o no de KPT-185.....	157-158
Figura 47. Interacción de la laforina con la malina.....	161
Figura 48. Análisis mediante Western-blot de diferentes fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial y en gradiente	166
Figura 49. Colocalización de la laforina y la malina con un marcador de cuerpos P (EDC4).....	168
Figura 50. Colocalización de la laforina y la malina con un marcador de gránulos de estrés (PABP)	169
Figura 51. Vida media de la laforina	172
Figura 52. Análisis cuantitativo de la expresión de la laforina y la malina en presencia o no de glucosa.....	173
Figura 53. Vida media de la laforina en presencia o no de glucosa.....	174

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fibroblastos humanos utilizados en los experimentos realizados para esta tesis doctoral.....44

Tabla 2. Listado de anticuerpos primarios utilizados en los diferentes experimentos realizados para esta tesis doctoral.....46-47

Tabla 3. Listado de anticuerpos secundarios utilizados en los diferentes experimentos realizados para esta tesis doctoral.....47

Tabla 4. Listado de proteínas identificadas que interaccionan con la laforina 162-163

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Lafora

La enfermedad de Lafora (LD, OMIM254780, ORPHA501), también conocida como epilepsia mioclónica progresiva de tipo 2 o epilepsia mioclónica de Lafora [1, 2], fue descrita por primera vez en 1911 por el neuropatólogo español Gonzalo Rodríguez Lafora al descubrir unos gránulos intraneuronales anómalos en el tejido nervioso *post mortem* de un paciente que había sufrido series de crisis epilépticas [3]. Sus estudios mostraron que estos gránulos eran positivos para la tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) y que estaban formados principalmente por glucógeno. Posteriormente se les denominó cuerpos de Lafora (LBs) en honor a su descubridor. Como entonces, sigue siendo controvertido si estos gránulos de glucógeno, que ahora se sabe que en esa situación corresponden a un tipo de glucógeno mal ramificado, son los responsables directos de la enfermedad o son una consecuencia de ella.

LD es una enfermedad de herencia autosómica recesiva catalogada como enfermedad rara o minoritaria debido a su baja prevalencia en la población mundial (1-9/1.000.000). La enfermedad se distribuye por todo el mundo, pero es especialmente común en el sur de Europa, norte de África, India, centro de Asia y en poblaciones con un elevado porcentaje de consanguinidad [4, 5].

1.1. Características y diagnóstico de la enfermedad de Lafora

LD es un trastorno neurodegenerativo fatal, en el que los primeros signos clínicos que manifiesta el paciente aparecen durante su adolescencia o poco después (6-20 años), siendo éstos principalmente dolores de cabeza, ausencias, mioclonías y convulsiones espontáneas, entre otros. Pero a medida que transcurre el tiempo y progresa la enfermedad, los primeros síntomas empeoran, apareciendo mioclonías más severas, ataques generalizados de tipo tónico-clónico y crisis epilépticas convulsivas que cada vez se hacen más frecuentes [3, 6, 7]. Posteriormente se produce un declive cognitivo y una degeneración progresiva del sistema nervioso en el paciente, lo que se traduce en alteraciones en la marcha, afectación de los

músculos y de los nervios, fotosensibilidad, alucinaciones visuales, pérdida de la visión y ceguera cortical, mioclonías continuas, demencia, apraxia, afasia y psicosis [8-12]. Finalmente, el enfermo se vuelve incapaz de moverse, de hablar y de alimentarse por sí mismo y se llega a un estado vegetativo de dependencia total hasta el fatal desenlace [13, 14]. Los enfermos generalmente fallecen unos 10 años después de la aparición de los primeros signos neurológicos [1, 15].

La característica histopatológica principal de esta enfermedad es la progresiva formación, agregación, precipitación y acumulación de poliglucosanos, formando depósitos denominados LBs [16, 17]. Los poliglucosanos son moléculas de glucógeno mal formadas que poseen cadenas de glucosa excesivamente largas, poco ramificadas y altamente fosforiladas, que causan la pérdida de la esfericidad en la molécula de glucógeno y provocan su insolubilidad [18-23]. Alrededor del 90 % de la masa de los LBs la constituye una forma de glucógeno que es similar a la amilopectina del almidón de las plantas [24]. Además, estos agregados contienen un 6 % de proteínas [25], muchas de ellas ubicuitinadas [26, 27]. Los LBs están presentes en las dendritas, pero no en los axones, de neuronas de cerebro (fundamentalmente del tálamo y cerebelo) y en el citoplasma de células de otros tejidos, especialmente de aquéllos con un elevado metabolismo de glucosa, como son el corazón, el hígado y el músculo esquelético [28]. Sin embargo, los LBs no parecen ser patogénicos fuera del cerebro [29] o al menos no lo son antes de que el paciente fallezca debido a los síntomas neurológicos [3, 7, 22]. Se ha descrito la existencia de una correlación de la cantidad de LBs con el porcentaje de muerte de las células neuronales y también con la frecuencia de convulsiones [18]. Tanto el glucógeno normal como los poliglucosanos se tiñen con ácido peryódico de Schiff (PAS). Sin embargo, a diferencia del glucógeno, los poliglucosanos son resistentes a la digestión con α -amilasa (diastasa) y, dado que no se pueden digerir, se acumulan en forma de cuerpos de inclusión insolubles y densamente empaquetados que, a la larga, parecen ser patogénicos para las células, en especial para las neuronas [29, 30].

El primer diagnóstico de la enfermedad se realiza en base a los síntomas clínicos manifestados por el paciente y se confirma después mediante la realización de varias pruebas adicionales. Éstas incluyen la observación de biopsias de piel axilar para detectar la posible presencia de LBs (**Fig. 1**) debido a que estas estructuras son especialmente abundantes en células de las glándulas sudoríparas. Concretamente, se encuentran sobre todo en células epiteliales y mioepiteliales de los acinos secretores de las glándulas sudoríparas apocrinas y en células del conducto de las glándulas sudoríparas ecrinas [16, 31-33].

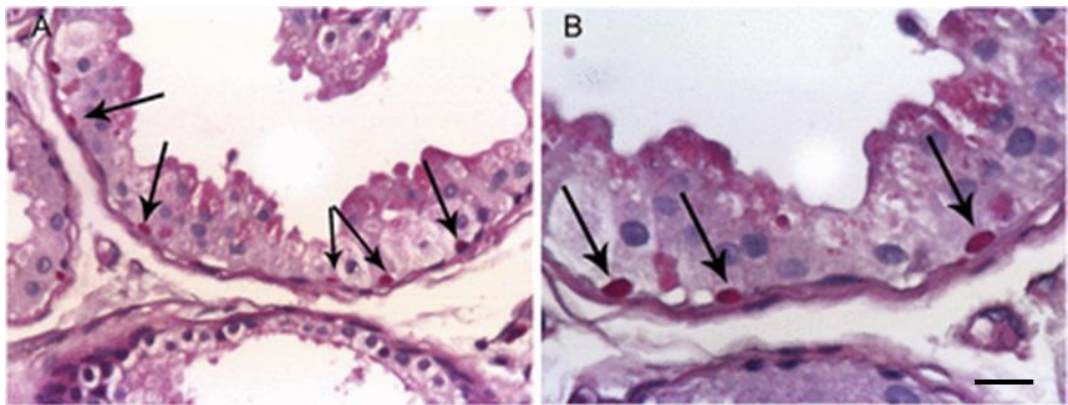


Figura 1. Imágenes de cuerpos de Lafora en una biopsia de piel. (A) La tinción de PAS de una biopsia de piel procedente de la región axilar revela la presencia, en el citoplasma de las células mioepiteliales y acinares de las glándulas sudoríparas, de unas inclusiones PAS positivas, que son resistentes a un tratamiento con diastasa y que corresponden a los LBs. (B) Imagen ampliada dos veces de A. Las flechas indican algunos de los LBs observados en la preparación. Barra 20 μ m. Adaptada de [34].

Finalmente, para evitar falsos positivos en la biopsia de piel, se recomienda un estudio genético que demuestre la existencia de mutaciones en uno de los dos genes conocidos causantes de la enfermedad.

1.2. Bases moleculares de la enfermedad de Lafora

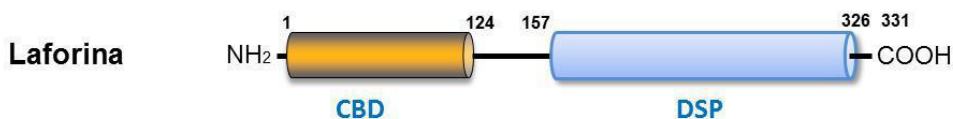
1.2.1. Genes asociados

LD está causada mayoritariamente (más del 90 % de todos los casos) por mutaciones en uno de dos genes, *EPM2A* (OMIM 607566) o *EPM2B* (OMIM 608072), aunque existen también evidencias de un tercer *locus* muy minoritario [35]. El gen *EPM2A* es el más frecuentemente mutado y es el

responsable de, aproximadamente, el 50 % de los casos de LD en todo el mundo [36, 37]. Hasta la fecha, han sido descritas más de 60 mutaciones patogénicas diferentes de este gen en más de 100 familias [10, 26, 36-48]. La mayoría de ellas son mutaciones puntuales, de parada o de cambio de aminoácido. En España y Francia las mutaciones en el gen *EPM2A* son responsables de la gran mayoría de los casos de LD identificados [44, 46].

El gen *EPM2A* [36, 37], localizado en el brazo largo del cromosoma 6 (en 6q24), está formado por 4 exones que, mediante "splicing" alternativo, dan lugar a 7 isoformas diferentes de la proteína codificada, a la que se conoce como **laforina** [49]. De estas siete, dos son las mayoritarias y corresponden a las isoformas 1 (NP_005661.1) y 2 (NP_001018051.1) de la proteína [36, 37, 39, 50, 51]. El transcrito más largo (NM_005670.3) codifica para la isoforma 1 o canónica, compuesta de 331 aminoácidos, con una masa molecular de 38 kDa y que se considera que se encuentra localizada en el citosol. La laforina (**Fig. 2A**) posee un dominio de unión a carbohidratos (CBD) en el extremo NH₂-terminal y un dominio fosfatasa con especificidad dual (DSP) en el extremo COOH-terminal [10, 22, 26, 50, 52].

A



B

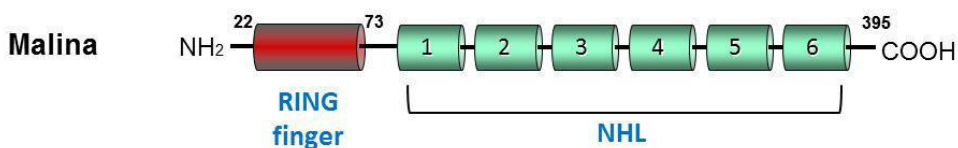


Figura 2. Esquema de los principales dominios en las proteínas laforina y malina. Se muestra la localización en las correspondientes secuencias de aminoácidos de los principales dominios (ver texto) de las proteínas laforina (**A**) y malina (**B**). En A: CBD, dominio de unión a carbohidratos; DSP, dominio fosfatasa con especificidad dual. En B: NHL 1-6, dominios con repeticiones NHL; RING finger, dominio de dedo de zinc RING (Really Interesting New Gene). Adaptada de [53].

La isoforma 2 por su parte, de 317 aminoácidos, se ha localizado en el núcleo y no posee actividad fosfatasa, no siendo por eso capaz de reemplazar funcionalmente, al menos en cuanto a esa actividad, a la isoforma 1 [42]. Ambas isoformas, 1 y 2, comparten los dominios CBD y DSP y sólo difieren en el extremo COOH-terminal de la proteína, que en el caso de la isoforma 2 sería la porción de la proteína responsable de dirigirla al núcleo [50].

Aunque la laforina no existe en la mayoría de organismos invertebrados, sí que está conservada en todos los vertebrados [54]. En humanos existen alrededor de 40 fosfatasas duales diferentes, capaces de defosforilar fosfotirosinas, fosfotreoninas y fosfoserinas en proteínas. La laforina, a través de su DSP, es capaz de defosforilar *in vitro* tanto a fosfotirosinas como a fosfoserinas/fosfotreoninas en diferentes sustratos [50]. Sin embargo, la laforina es la única fosfatasa que existe en el reino animal que posee un dominio CBD, lo que le permite unirse y defosforilar moléculas de polisacáridos como el glucógeno [20, 52, 55, 56].

El otro gen relacionado con LD es el *NHLRC1*, también conocido como *EPM2B* [35]. Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (en 6p22), está compuesto por un único exón y codifica para una E3 ubiquitina ligasa, llamada **malina (Fig. 2B)**, de 395 aminoácidos, 42 kDa y localización algo controvertida. La malina posee en el extremo NH₂-terminal un dominio “RING-finger”, que se traduciría por “dedo de zinc RING” y donde el acrónimo RING corresponde a la primera letra de cada palabra de la denominación inglesa de los genes de ese grupo “Really Interesting New Gene”. Además, la malina tiene hacia la porción COOH-terminal seis dominios con repeticiones NHL (acrónimo correspondiente a la primera letra de tres proteínas con ese dominio), que al parecer están implicados en interacciones proteína-proteína [57-60]. El dominio “RING-finger” de la malina es característico de uno de los dos tipos más abundantes de E3 ubiquitina ligasas y actuaría como soporte estructural para facilitar la transferencia directa de la molécula de ubiquitina desde la enzima E2 al

sustrato, participando así en la cascada de ubiquitinación de sustratos [57, 61, 62]. El gen *EPM2B* es responsable aproximadamente del 40 % de los casos de LD en todo el mundo [57, 60] y hasta ahora se han descrito más de 60 mutaciones patogénicas diferentes en este gen en más de 125 familias. En la mayoría de casos, se trata de mutaciones puntuales de cambio de aminoácido [43, 44, 46, 60, 63-67], afectando principalmente al dominio “RING-finger” de la proteína [46, 60, 63, 67].

Se puede ver un resumen de las diferentes mutaciones descritas en los genes *EPM2A* y *EPM2B* en <http://projects.tcag.ca/lafora/> [44, 68]. Se suele considerar que mutaciones en cualquiera de los dos genes producen manifestaciones clínicas semejantes y, por tanto, fenotipos prácticamente indistinguibles, lo que sugiere que ambas proteínas podrían estar involucradas en procesos comunes [7, 12, 63, 67]. De hecho, se ha descrito por diversos autores que la laforina y la malina forman un complejo funcional donde la malina interaccionaría con la laforina a través de los dominios NHL [57, 61, 69, 70]. En dicho complejo, la laforina funcionaría, por ejemplo, como molécula adaptadora y se encargaría de reclutar sustratos específicos para ser ubiquitinados por la malina. Existen, sin embargo, algunas evidencias que sugieren que los pacientes con LD con mutaciones en el gen *EPM2B* presentan una progresión de la enfermedad más lenta y una supervivencia ligeramente superior a la de los pacientes con mutaciones en el gen *EPM2A* [63, 64, 67], aunque también existen algunas excepciones a esto [65, 71].

1.2.2. Posibles mecanismos responsables de la enfermedad

En la actualidad existe cierta controversia en torno a las alteraciones que conducen a LD. Existen dos planteamientos principales en cuanto a los mecanismos responsables de la enfermedad y que se exponen a continuación.

El primero de ellos considera que la laforina y la malina estarían relacionadas con desequilibrios entre la síntesis, la ramificación y la defosforilación del glucógeno. La laforina sería una fosfatasa que se

encargaría de defosforilar el glucógeno [72, 73], permitiendo así su correcta ramificación y previniendo la formación de LBs. En ausencia de laforina, los grupos fosfato se acumularían en el glucógeno, impidiendo su correcta ramificación y alterando su estructura esférica. Esto conduciría a la insolubilidad, precipitación y acumulación de un glucógeno anómalo, que daría lugar a los LBs [23]. Según este planteamiento, la malina se encargaría de degradar a la laforina, manteniendo regulados de esta manera sus niveles intracelulares y, además, ayudaría a la laforina a disociarse del glucógeno. Así, en ausencia de malina la laforina quedaría retenida en el glucógeno en una forma inactiva y, por tanto, con las mismas consecuencias que en su ausencia [53, 57, 74]. Sin embargo, coincidiendo con el inicio de la aparición de los LBs, se ha visto que en ratones deficientes en malina (*Epm2b*^{-/-}) existen niveles significativamente elevados de la laforina con actividad fosfatasa, lo que sugiere que esta actividad por sí sola no es suficiente para prevenir la formación de los LBs [75]. De hecho, un mutante en el dominio fosfatasa de la laforina fue capaz de revertir la formación de los LBs en los ratones *Epm2a*^{-/-}, lo que indicaría que la actividad fosfatasa no es esencial para esa reversión ni siquiera en presencia de la malina [76].

Dentro de este primer planteamiento en torno a un defecto en el metabolismo del glucógeno, se ha sugerido también que habría un desequilibrio en determinadas enzimas del metabolismo del glucógeno y que la laforina y la malina actuarían como complejo regulador de la degradación de esas enzimas. Entre los sustratos del complejo se incluirían la glucógeno sintasa (GS), la glucógeno fosforilasa (GP), la enzima desramificadora de glucógeno (GDE) y proteínas reguladoras como la proteína que recluta la GS al glucógeno (PTG) y la R6. Así, la laforina actuaría de molécula adaptadora, reconociendo e interaccionando con esos sustratos que serían degradados por los proteasomas tras su poliubiquitinación por la malina [61, 69, 74, 77-81]. Al faltar la laforina o la malina, se incrementarían los niveles de sus sustratos, ocasionando un aumento en la síntesis del glucógeno, pero sin aumentar la actividad de la enzima ramificadora de glucógeno (GBE), generándose así un desequilibrio entre la elongación y la ramificación del glucógeno que llevaría, en último término, a la formación de los

poliglucosanos y a su acumulación en los LBs [29, 79, 82]. Sin embargo, otros autores no han encontrado diferencias significativas en los niveles o en la actividad de las principales enzimas del metabolismo del glucógeno (GS, GBE y GP) entre ratones deficientes en laforina (*Epm2a*^{-/-}) con elevados niveles de glucógeno y LBs en diferentes tejidos, con respecto a los ratones control [22, 83]. Unos resultados similares se obtuvieron también en ratones deficientes en malina (*Epm2b*^{-/-}), lo que no apoyaría que estas enzimas del metabolismo del glucógeno se degraden por un mecanismo que dependa exclusivamente de la malina [84, 85].

El segundo planteamiento sugiere que la enfermedad y la acumulación de poliglucosanos se deben a un defecto en los sistemas de degradación intracelular de proteínas, como ocurre con mucha frecuencia en otras enfermedades neurodegenerativas, algunas con una elevada prevalencia [86, 87]. Con respecto a una posible relación entre los defectos en los sistemas de degradación intracelular de proteínas y LD, son relevantes dos puntos. En primer lugar, cuando alguno de los sistemas de eliminación del material intracelular se encuentra afectado, se produce la acumulación en las células de ese material sin degradar, en forma de depósitos insolubles de diferente naturaleza pero parecidos morfológicamente a los LBs y que suelen comprometer la supervivencia celular. Además, y en segundo lugar, conviene recordar que la autofagia, que es uno de los principales mecanismos de degradación intracelular de proteínas (ver más adelante), es también capaz de degradar glucógeno mediante las enzimas procedentes de los lisosomas [88-90]. Según este planteamiento, la laforina y la malina estarían implicadas en la regulación de alguno de los sistemas de degradación intracelular de proteínas, que cuando faltase alguna de ellas funcionaría defectuosamente. En ese sentido, se ha descrito en LD un aumento en el estrés oxidativo del retículo endoplásmico y mitocondrial, junto a una menor actividad del sistema ubiquitina-proteasomas [91, 92]. También se ha descrito un defecto en la autofagia en esta enfermedad [15, 75, 93-95] y que la expresión de la laforina regula la autofagia a través de mTOR [93]. Incluso, en los experimentos llevados a cabo por Criado *et al.* [75], se encontró que el defecto autofágico parecía

anterior a la aparición de alteraciones neurológicas y a la formación de LBs. Sin embargo y en contraposición a esto último, en los experimentos llevados a cabo en modelos de LD por Duran *et al.* [96], cuando se inhibía la síntesis del glucógeno se conseguía no sólo eliminar los LBs sino también restablecer la autofagia defectuosa. Esto sugiere que sin la acumulación de poliglucosanos no habría alteración de la autofagia en LD y que, según estos autores, esa acumulación en los LBs sería la causante y no una consecuencia de la neurodegeneración y del defecto en autofagia en LD [97].

1.3. Tratamiento

Actualmente no existe una cura efectiva para LD. Los tratamientos disponibles con fármacos antimioclónicos y antiepilépticos (valproato sódico y clonazepam, entre otros) son puramente paliativos y se administran con el fin de evitar las crisis y mejorar la calidad de vida del paciente. Aunque, como se ha comentado arriba, se ha descrito que el defecto en autofagia precede a la formación de LBs [75], el empleo de tratamientos que estimulan la autofagia no han dado los resultados esperados [98], quizás por lo que se menciona en [96] y [97], donde la acumulación de LBs precedería al defecto en autofagia y a la neurodegeneración. Por otro lado, ya que se ha demostrado una relación entre la acumulación de los LBs y la neurodegeneración y otras consecuencias funcionales que acontecen en LD, otra parte de los esfuerzos realizados en las investigaciones para encontrar un tratamiento para esta enfermedad se han centrado en terapias que tienen como objetivo la prevención de la formación de LBs a través de la regulación de la síntesis del glucógeno [96]. Por ejemplo, mediante la inhibición parcial de la GS se ha intentado disminuir la síntesis, tanto del glucógeno como de los LBs [99]. En humanos, la completa eliminación de la GS no parece una opción adecuada, ya que se han descrito patologías relacionadas con el almacenamiento y utilización del glucógeno cuando se producen mutaciones en alguno de los genes que la codifican, como es el caso de la isoforma 1 que se expresa en músculo y muchos otros tejidos [100, 101]. Pero la reducción parcial de la GS, junto a una activación de la glucógeno fosforilasa (GP), podría funcionar como terapia. Por tanto, los compuestos conocidos capaces de inhibir

parcialmente la GS o la PTG, o las aproximaciones genéticas que utilicen oligonucleótidos antisentido contra ellas, podrían tal vez frenar la progresión de la enfermedad [29, 74, 102].

En relación con esto, la metformina, un fármaco antidiabético utilizado comúnmente en el tratamiento y prevención de la diabetes mellitus tipo 2, ha sido designada por la Agencia Europea del Medicamento como medicamento huérfano para el tratamiento de LD, en base a los resultados obtenidos durante su administración a ratones KO para la malina y que se describen en Berthier *et al.* [98].

2. El glucógeno

El glucógeno es un polisacárido compuesto por un esqueleto de moléculas de glucosa unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos α -1,4, y con ramificaciones mediante enlaces glucosídicos α -1,6 cada 8-12 moléculas de glucosa. Esta estructura para almacenar la glucosa permite reducir la presión osmótica que la glucosa libre ocasionaría en la célula [103]. Por eso, el glucógeno es la principal forma de reserva de la glucosa en células animales. Se localiza y almacena en el citoplasma, principalmente en las células hepáticas y musculares, formando unos gránulos de 10-40 nm de diámetro [104]. La estructura altamente ramificada que tiene este polisacárido permite, por una parte, aumentar su solubilidad y mantener una estructura esférica [105] y, por otra, a causa de la gran cantidad de extremos accesibles de los que dispone, facilita la rápida liberación de las moléculas de glucosa que podrán ser utilizadas en el metabolismo energético [106]. Sin la existencia de estas ramificaciones, las cadenas de glucosa se vuelven más largas provocando que la molécula de glucógeno se vuelva insoluble, tendiendo a precipitar y a cristalizar [107]. Por otra parte, el glucógeno se encuentra poco fosforilado, ya que la incorporación de un grupo fosfato a la glucosa es poco frecuente [108, 109]. Se desconocen los mecanismos por los que se produce la fosforilación del glucógeno, pero se baraja la hipótesis de que la propia enzima encargada de sintetizarlo, la GS, podría en ocasiones incorporar un grupo fosfato como resultado de un error catalítico [72].

Básicamente, el glucógeno es sintetizado mediante la acción conjunta y coordinada de dos enzimas: la GS, encargada inicialmente de la elongación de la cadena, y la GBE, encargada de su posterior ramificación. Por otra parte, la degradación del glucógeno es llevada a cabo mediante la GP y la GDE. La proteína PTG, unida a la proteína fosfatasa de tipo 1 (PP1), actúa indirectamente a la vez como un activador de la GS y como un inhibidor, tanto de la GP como de la quinasa activadora de la GP (GPK), mediando así en la defosforilación de cada una de estas tres enzimas a través de la fosfatasa PP1. Todo esto tiene como resultado el aumento de la síntesis de glucógeno y la inhibición de su degradación [110].

3. Sistemas de degradación intracelular de proteínas

La degradación intracelular de proteínas es llevada a cabo por las numerosas proteasas de la célula que hidrolizan los enlaces peptídicos en las proteínas hasta liberar sus aminoácidos constituyentes [111-113]. Este proceso se produce de forma continua en la célula y es esencial para la proteostasis y homeostasis celular. La degradación intracelular de proteínas está muy regulada y responde tanto a factores que actúan dentro de la célula como a otros del medio extracelular. Es esencial, por ejemplo, en situaciones en las que se necesita de una rápida respuesta celular a una determinada señal extracelular (por ejemplo, el glucagón) o en condiciones en las que exista una baja disponibilidad de energía en la propia célula, ya que los aminoácidos liberados pueden ayudar a proporcionarla [114]. Además, dado su importante papel en multitud de procesos celulares como son, entre otros, el ciclo celular, el control del tráfico de componentes de la célula, la diferenciación celular, el envejecimiento o la muerte celular por apoptosis o necrosis, es lógico que se hayan descrito alteraciones en su funcionamiento en un gran número de enfermedades [115-118]. Los sistemas de degradación intracelular de proteínas se suelen dividir, clásicamente, en dos grandes grupos, las vías lisosomales, por ejemplo y sobre todo las autofagias, y las vías no lisosomales, por ejemplo y sobre todo la vía ubiquitina-proteasomas [112, 114].

3.1. Vías lisosomales y otros procesos relacionados

Los lisosomas son unos orgánulos muy heterogéneos, tanto en su forma y dimensiones como en su contenido. Se encuentran presentes en el citoplasma de las células eucariotas y están delimitados por una membrana. Su interior se mantiene a pH ácido (aproximadamente entre 4,5 y 5) debido a la acción de una bomba de protones situada en su membrana. En el interior de los lisosomas existen una gran cantidad de enzimas hidrolíticas cuyo pH óptimo es también ácido. Los lisosomas están implicados en la degradación, por su elevado contenido en muchos tipos de hidrolasas, de una gran variedad de moléculas, tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc. Este material entra a los lisosomas a través de dos vías principales: la endocitosis y la autofagia. Mediante la endocitosis se degrada material procedente tanto del exterior de la célula como el que forma parte de la membrana plasmática internalizada cuando no se recicla de vuelta a la misma. Mediante la autofagia lo que se degrada es el material de la propia célula. Estos dos procesos permiten reabastecer a la célula con los componentes básicos procedentes de la degradación de las diferentes macromoléculas o de otras moléculas más pequeñas para poder sintetizar, a partir de ellos, nuevas moléculas esenciales para la célula o para poder obtener energía tras su catabolismo [119, 120]. Un gran número de enfermedades, conocidas como enfermedades de almacenamiento lisosomal, se han asociado a alteraciones en la función de estos orgánulos. En ellas se observa acumulación de material, de naturaleza variable, sobre todo en el interior de los lisosomas por su incapacidad de degradar dichos sustratos, pero también en el exterior de los lisosomas al verse alterada la incorporación a estos orgánulos de ese material [121].

3.1.1. Autofagia

La autofagia es el proceso responsable de la degradación y el reciclaje de los componentes intracelulares mediante su secuestro en el interior de los lisosomas y la posterior acción de las hidrolasas ácidas que contienen. Las tres clases de autofagia mejor estudiadas son la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas [122].

La macroautofagia es una vía masiva de degradación intracelular de proteínas, responsable de la eliminación de orgánulos enteros y de la de otros componentes celulares. Este proceso es llevado a cabo mediante la formación de unas vacuolas de doble membrana llamadas autofagosomas. Una vez formados, los autofagosomas siguen un proceso de maduración hasta su fusión con endosomas y/o con los lisosomas para formar autolisosomas, donde se lleva a cabo la degradación de su contenido (**Fig. 3**).

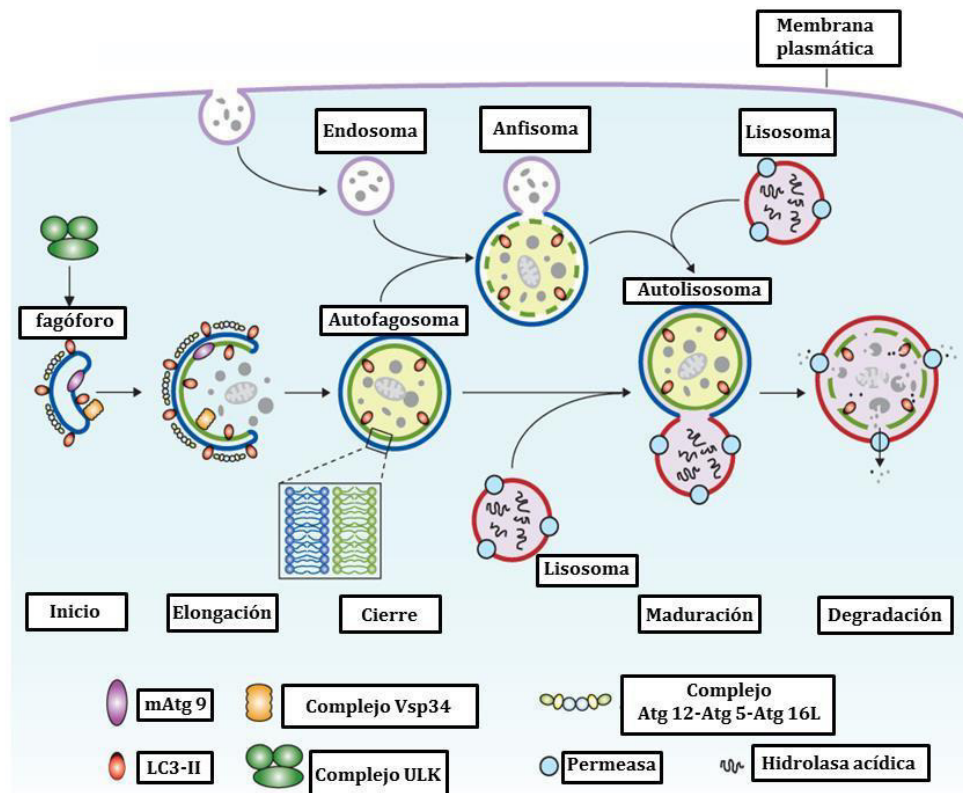


Figura 3. Macroautofagia. La macroautofagia se inicia con la formación del fagóforo, seguida por la elongación y expansión de la doble membrana del fagóforo hasta su cierre, formando así el autofagosoma. Durante la fase de inicio, el complejo ULK actúa como inductor en el reclutamiento de otros complejos proteicos como son el complejo Vsp34 y el complejo Atg12-Atg5-Atg16L. Estos dos últimos, a su vez, facilitan la inserción de la proteína LC3-II en la membrana de fagóforo. Por otro lado, la proteína integral de membrana mAtg9 se encarga de proporcionar más membrana lipídica al fagóforo en expansión hasta completar el cierre del autofagosoma. El autofagosoma ya formado puede fusionarse directamente con los lisosomas o, de forma indirecta, formando anfisomas mediante su fusión con endosomas. Los productos del proceso de degradación llevado a cabo por las hidrolasas ácidas son liberados al citoplasma, muchas veces mediante permeasas de la membrana lisosomal. Adaptada de [123].

La macroautofagia es el principal proceso responsable de proveer a las células de nutrientes en situación de ayuno, que serán catabolizados para la producción de ATP o serán utilizados para volver a sintetizar determinadas macromoléculas esenciales para la supervivencia celular. Además, entre otras funciones, la macroautofagia puede actuar como un mecanismo de defensa frente a diferentes patógenos y es una vía de eliminación de orgánulos dañados y de proteínas mal plegadas [124-127].

En mamíferos, la macroautofagia está regulada por diferentes factores, como son, entre otros, los nutrientes (por ejemplo, la glucosa o los aminoácidos), las hormonas (por ejemplo la insulina o el glucagón) y los factores de crecimiento (por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico o el factor de crecimiento neuronal). Estos estímulos regulan la macroautofagia mediante el control de la actividad de dos proteínas clave para la formación de los autofagosomas, las quinasas mTOR y AMPK, que a su vez regulan la fosforilación de las quinasas ULK1/2 que forman parte del complejo ULK esencial para la iniciación de la macroautofagia. El complejo ULK está formado por las proteínas ULK1, ULK2, FIP200, Atg13 y Atg101 [128, 129].

La falta de algunos nutrientes, como los aminoácidos, o de algunos factores de crecimiento, o de energía, activan el proceso macroautofágico mediante un conjunto de fosforilaciones y también defosforilaciones de las proteínas ULK1/2 a través de la interconexión entre AMPK, mTOR y ULK1/2 [130, 131]. En dichas condiciones, las proteínas ULK activadas activan a su vez la proteína Beclina1, que es uno de los componentes del complejo Vsp34 iniciador de la nucleación del fagóforo, formado por las proteínas p150 (Vps15), Atg14L y fosfatidilinositol 3 quinasa (PtdIns3K) de clase III (Vps34) [132]. Este complejo, cuando es activado, se recluta en el lugar de inicio para la formación de la membrana de los autofagosomas.

El material lipídico acumulado en el lugar de inicio de la macroautofagia es conocido como fagóforo, y sobre esta estructura se activa la formación del autofagosoma. Durante este proceso, la proteína PtdIns3K

de clase III fosforila al lípido fosfatidilinositol que se encuentra en la superficie del fagóforo para formar otro lípido allí, el fosfatidilinositol 3-fosfato [133]. Después, el fosfatidilinositol 3-fosfato actúa como punto de anclaje para otras proteínas, entre ellas WIPI2 (proteína con dominios WD repetidos que interacciona con fosfoinosítidos), que a su vez interacciona y forma un complejo con la proteína Atg16L [134]. A este heterodímero se unirán las proteínas Atg5 y Atg12 que, por la acción de Atg7 y Atg10, formarán un complejo que permitirá la expansión de la doble membrana lipídica para la posterior formación del autofagosoma [135]. Este gran complejo proteico recluta a la proteína Atg3 en la membrana del fagóforo donde catalizará, junto a Atg7, la unión covalente de la proteína LC3-I al lípido fosfatidiletanolamina para formar LC3-II (**Fig. 3**), una proteína muy importante para determinar los niveles de autofagia en las células, como veremos después, permitiendo así el cierre de la vesícula autofágica tras la captación de la carga y formación del autofagosoma.

La proteína LC3 se sintetiza inicialmente de forma no procesada como pro-LC3, la cual rápidamente es escindida por la acción de Atg4, generándose la forma activa LC3-I en el citosol. En la membrana del autofagosoma, la proteína LC3-II se une a la proteína p62, que a su vez reconoce y se une a los sustratos destinados a su degradación en los lisosomas [136, 137]. Una vez formados los autofagosomas, éstos experimentan un proceso de maduración durante el que adquieren otras proteínas, como la UVRAG (proteína codificada por el gen asociado a la resistencia a radiación ultravioleta) que actúa unida a otro complejo de la Beclina1, las SNAREs (receptores de proteínas de fijación soluble de la NSF) y otras muchas proteínas, de tipo Rab por ejemplo, que ayudarán en la fusión de los autofagosomas con lisosomas o con endosomas para madurar y formar autolisosomas [138, 139]. En los autolisosomas tendrá lugar la degradación del contenido de los autofagosomas mediante la acción de las hidrolasas ácidas lisosomales.

3.1.1.1. Mitofagia

Las mitocondrias son orgánulos esenciales en el control de la homeostasis energética de la célula y desempeñan un importante papel en la muerte celular programada. Al igual que ocurre con los restantes orgánulos celulares, las mitocondrias sufren un progresivo desgaste y necesitan ser renovadas. La eliminación selectiva mediante macroautofagia de las mitocondrias dañadas se conoce como mitofagia. El correcto funcionamiento del proceso mitofágico es esencial para la supervivencia de las células y las alteraciones en este proceso tienen consecuencias patológicas que derivan, entre otras causas, de la acumulación de mitocondrias alteradas en la célula, del aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de un descenso en la producción de ATP, como se ha observado en un gran número de enfermedades neurodegenerativas [140-142].

La activación de la macroautofagia y el marcaje de las mitocondrias dañadas para su degradación selectiva por esta vía son dos procesos esenciales en la mitofagia [143]. Situaciones como la hipoxia o la despolarización de la membrana mitocondrial desencadenan la mitofagia. Por ejemplo, la despolarización de la membrana mitocondrial causa, por un lado, una disminución en la producción de ATP por las mitocondrias y, por otro, un aumento en los niveles de ROS [144]. La disminución en los niveles de ATP aumenta la relación AMP/ATP. Esto activa a la proteína AMPK, que actúa como sensor energético y que, a su vez, inactiva a la proteína mTOR a través de otras proteínas. En esas condiciones, la inactivación de mTOR, tanto por la activación AMPK como por el aumento de ROS, tiene como consecuencia la activación de los procesos generales de macroautofagia, en particular la formación de los autofagosomas (**Fig. 4A**) [131, 145].

La vía mitofágica más conocida es la dependiente de las proteínas PINK1 y Parkina. PINK1 tiene una secuencia de localización mitocondrial, por lo que, en condiciones normales, PINK1 entra a la mitocondria a través del complejo TOM-TIM y se transloca a la membrana mitocondrial interna donde es procesada mediante cortes proteolíticos por los enzimas PARL y

MPP. Estos cortes provocan su liberación al citosol y su posterior degradación por el proteasoma. De forma que, en mitocondrias sanas, PINK1 es rápidamente degradada y eliminada de la membrana mitocondrial. Sin embargo, cuando se produce un daño mitocondrial, por ejemplo por despolarización de la membrana mitocondrial, la quinasa PINK1 no puede ser procesada ni degradada, y por tanto, se acumula y estabiliza en la membrana externa mitocondrial donde recluta a una E3 ubiquitina ligasa llamada Parkina [146-148]. La fosforilación de la Parkina por PINK1 activa su actividad E3 ubiquitina ligasa, ubiquitinando así algunas proteínas de la membrana externa mitocondrial, como por ejemplo VDAC1 (canal aniónico 1 dependiente de voltaje) y las Mfn 1 y 2 (mitofusinas 1 y 2) [149-152]. Estas proteínas de la membrana externa mitocondrial, al estar poliubiquitinadas reclutan a la proteína adaptadora p62, permitiendo que ésta establezca un puente de unión con la proteína LC3-II de la membrana de los autofagosomas. Esta interacción favorece que, tras el cierre de la membrana autofagosomal, se produzca la captación y secuestro de las mitocondrias alteradas, que, tras la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, serán degradadas (**Fig. 4B**) [153-155].

Existen otros procesos de degradación selectiva de las mitocondrias dañadas que son independientes de PINK1 y Parkina. En estos procesos, algunas proteínas de la membrana externa de las mitocondrias dañadas inducen la mitofagia mediante su interacción directa con la proteína LC3-II (éste es el caso de las proteínas FUNDC1, NIX y BNIP3) [154, 156-158] o mediante poliubiquitinación de sustratos proteicos en la membrana externa mitocondrial a través de otras E3 ubiquitina ligasas como la Smurf1 (**Fig. 4C**) [159].

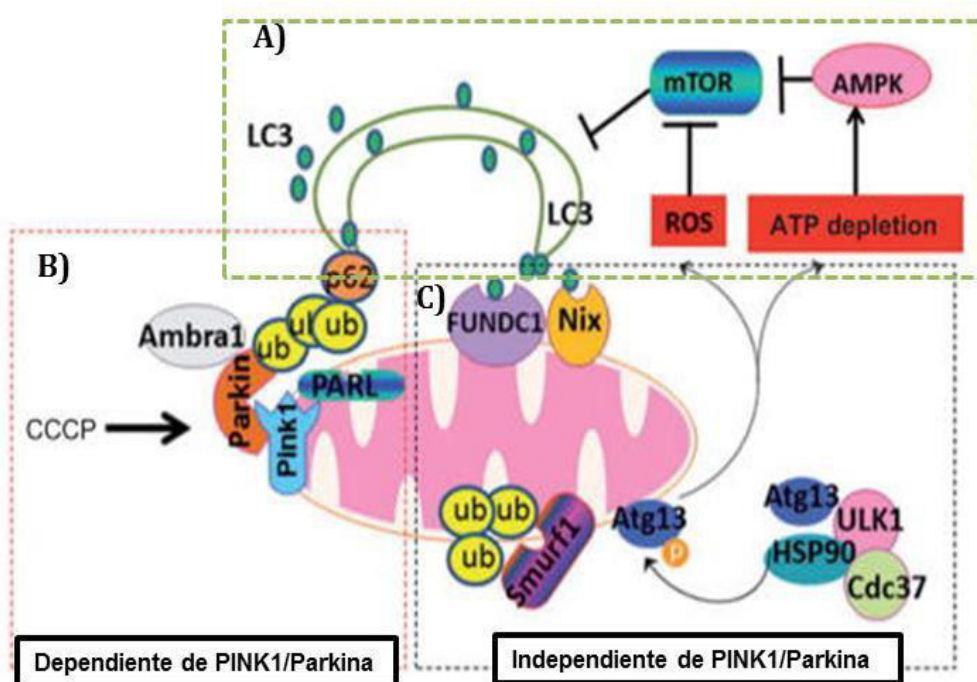


Figura 4. Mitofagia. El proceso mitofágico consta de dos pasos principales, la activación de la macroautofagia que lleva a la formación de los autofagosomas (A), y el marcaje de las mitocondrias dañadas mediante la ruta dependiente (B) o independiente (C) de PINK1 y Parkina. La despolarización de la membrana externa mitocondrial causa un aumento en la producción de ROS y una disminución en los niveles de ATP, activando así la formación de autofagosomas. Durante el proceso de marcaje de las mitocondrias dañadas, algunas de las proteínas de la membrana externa se poliubiquitinan (por Parkina o por Smurf1) y actúan como señal de reconocimiento para la degradación de la mitocondria a través de la mitofagia. En otros casos, las proteínas FUNDC1 y Nix, localizadas en la membrana externa de las mitocondrias dañadas, se unen directamente a la proteína LC3-II y así dirigen la captación de las mitocondrias dañadas por los autofagosomas. En el caso de la proteína Atg13, su fosforilación mediante la proteína ULK-1 causa su separación del complejo citoplásmico HSP90-Cdc37. La proteína Atg13 fosforilada se une a la membrana externa de las mitocondrias y activa la mitofagia mediante un mecanismo todavía desconocido. Adaptada de [153].

3.1.2. Endocitosis

La endocitosis es un proceso que comprende un número variado de vías de internalización de la membrana plasmática mediante las que las células captan moléculas extracelulares o de la propia membrana, generalmente para su posterior degradación en los lisosomas. El proceso comienza con la internalización de la membrana plasmática rodeando el

material que va a entrar en la célula, formando una estructura que termina por cerrarse y liberarse como una vesícula al citosol. Allí, la vesícula es transportada a través del citoesqueleto mientras sufre procesos de fusión y fisión y va modificando su composición, formando primero endosomas tempranos y, posteriormente, endosomas tardíos. Durante este transporte el pH del interior de la vesícula desciende gradualmente. Este proceso es esencial para el funcionamiento eficaz de las enzimas hidrolíticas y para la desnaturalización de los sustratos, que quedan así más accesibles a esas enzimas. Finalmente, mediante la fusión con el lisosoma, el contenido de la vesícula endocítica se degrada hasta sus moléculas más elementales [160, 161]. La endocitosis no es simplemente un mecanismo para incorporar material extracelular, sino también para regular diferentes procesos, como por ejemplo la captación de nutrientes, la composición de lípidos y de proteínas de la membrana plasmática, algunas cascadas de señalización intracelular y la captación y procesamiento de las proteínas foráneas para la presentación de antígenos, permitiendo así a la célula responder a estímulos muy diversos de su entorno [162-164].

Las vías de endocitosis se pueden clasificar en dos tipos principales: la fagocitosis, llevada a cabo por células especializadas como los macrófagos, y la pinocitosis, mucho más extendida [165]. Aunque existe controversia en la clasificación de la de pinocitosis, ésta se puede subdividir, por ejemplo, en endocitosis de fase fluida (llamada a veces macropinocitosis) y endocitosis mediada por receptor, dependiente o independiente de clatrina [166].

3.1.2.1. Endocitosis de fase fluida

La endocitosis de fase fluida es un tipo de endocitosis para la entrada no selectiva de líquidos y de pequeñas moléculas del medio exterior a la célula. Capta principalmente moléculas solubles, nutrientes y antígenos (en el caso de células del sistema inmunitario). La formación de las vesículas ocurre en zonas de la membrana plasmática ricas en colesterol y asociadas a la red de actina. La polimerización y despolimerización de la actina permite cambios en el citoesqueleto de microfilamentos y la formación de grandes extensiones de la membrana plasmática que se proyectan hacia el exterior

celular para, posteriormente, retraerse hacia su interior y formar la vesícula endocítica o macropinosoma (**Fig. 5**) [167, 168].

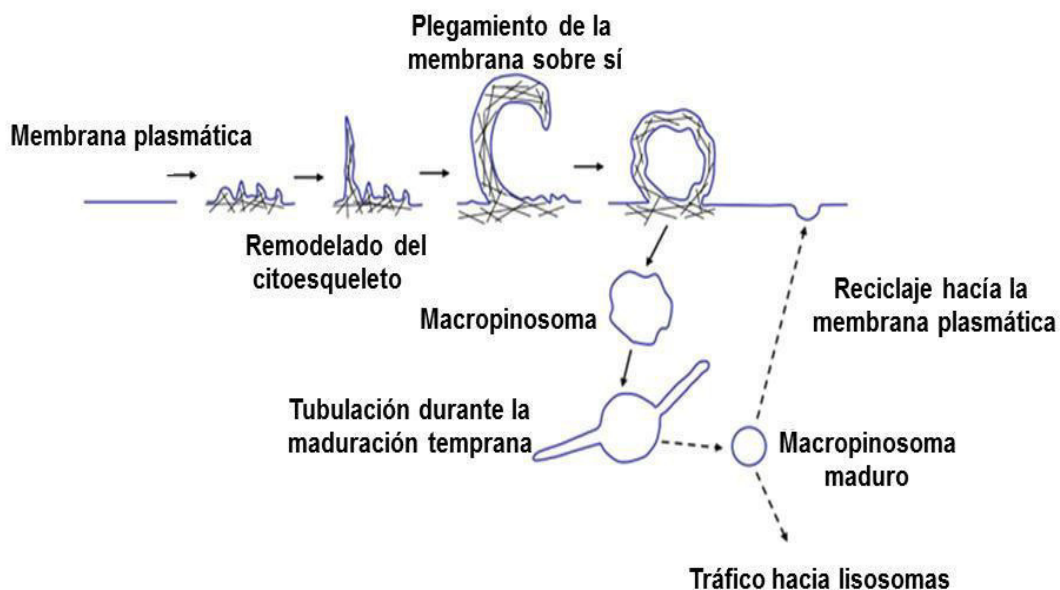


Figura 5. Endocitosis de fase fluida. Ciertas señales extracelulares, como algunos factores de crecimiento, activan cambios en la estructura de los filamentos de actina mediante su despolimerización y repolimerización, justo por debajo de la membrana plasmática. Se generan así rugosidades en la membrana que van creciendo hacia el espacio extracelular dirigidas por el citoesqueleto de actina. De esta manera se capta material extracelular de manera inespecífica hasta formar una vesícula endocítica completa o macropinosoma. Posteriormente, porciones de las vesículas pueden reciclarse hacia la membrana plasmática o llegar hasta los lisosomas a través de su fusión con el sistema endosomal. Adaptada de [169].

Aunque el contenido de las vesículas es captado de manera inespecífica, el proceso parece que depende de señales extracelulares y, por ejemplo, se estimula por algunos factores de crecimiento, como el factor-1 estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o por sustancias tumorigénicas como el forbol [169, 170].

3.1.2.2. Endocitosis mediada por receptor

En la endocitosis mediada por receptor, un ligando o sustrato extracelular se une específicamente a un receptor específico situado en la membrana plasmática para después entrar a la célula en una vesícula.

3.1.2.2.1. Endocitosis mediada por clatrina

El tipo de endocitosis donde participa la clatrina es un tipo de endocitosis mediada por receptor. Se caracteriza porque, tras la unión específica del ligando con el receptor correspondiente, se forma en la membrana plasmática una estructura en forma de hoyo. Esta estructura es la precursora de la vesícula endocítica que se formará después y que se encuentra recubierta en su superficie citosólica por una malla de la proteína clatrina (**Fig. 6**) [171].

Durante su transporte por el interior de la célula, el pH interno de la vesícula endocítica experimenta un progresivo descenso, formándose el endosoma temprano que pierde la malla de clatrina. El descenso de pH provoca un cambio conformacional en los receptores internalizados por esta vía y la consiguiente liberación del ligando [171, 172]. Receptores como el de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o el de la transferrina son reciclados y devueltos a la superficie de la membrana plasmática mediante estructuras tubulares que se separan de los endosomas tempranos y acaban fusionándose con la membrana plasmática. En cambio, receptores como el del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pasan también a formar parte, junto a los ligandos y el resto de proteínas de membrana plasmática, de los endosomas tardíos [173, 174]. Éstos tienen un pH aún menor que el de los endosomas tempranos y acaban fusionándose con los lisosomas para degradar su contenido. Esta endocitosis es clave en muchos procesos, tales como el control de los niveles de colesterol en sangre, la señalización intracelular mediada por factores de crecimiento y la obtención de iones férricos, entre otros muchos [175].

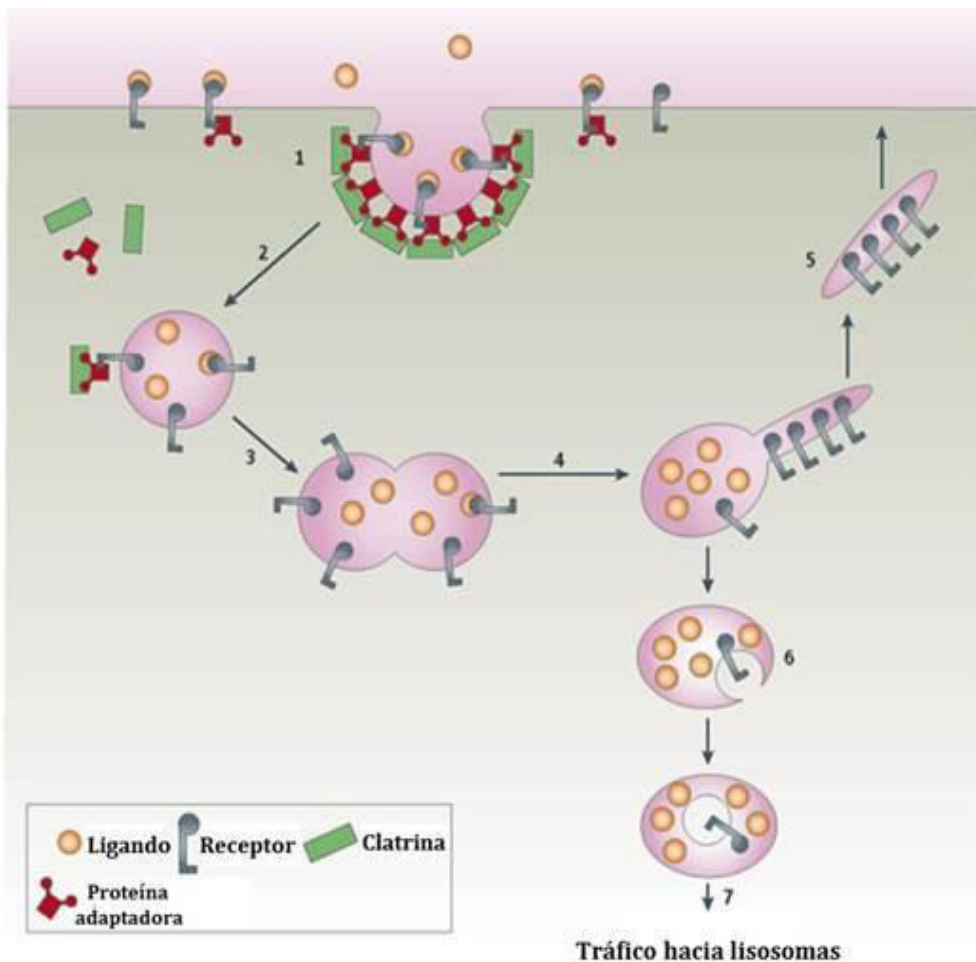


Figura 6. Endocitosis mediada por clatrina. La unión del ligando extracelular a su receptor, situado en la membrana plasmática de la célula, provoca un cambio conformacional en el dominio citosólico del receptor, permitiendo la unión de la proteína adaptadora a este dominio. Después, la clatrina se recluta en las vesículas en formación, mediante su unión a la proteína adaptadora, constituyendo una malla (1). Este ensamblaje causa la internalización de la vesícula endocítica en formación hacia el citosol hasta formar la vesícula endocítica cerrada (2). La acidificación del interior de la vesícula causa, por un lado la disociación del ligando del receptor y, por otro, la separación de las proteínas adaptadoras y clatrininas de la superficie citosólica de la vesícula. Esto da paso a la unión de proteínas SNAREs en el exterior de la vesícula, un paso necesario para que la vesícula pueda fusionarse con otras vesículas intracelulares y formar parte de los endosomas tempranos (3). Mediante el tráfico vesicular desde los endosomas tempranos hasta la membrana plasmática, la mayor parte de los receptores se reciclan y se localizan de nuevo en la membrana plasmática para poder comenzar así un nuevo ciclo de endocitosis (4 y 5). El resto de receptores se internalizan formando los cuerpos multivesiculares (6) que van madurando hasta que, finalmente, se fusionan con los lisosomas (7). Adaptada de [171].

3.1.2.2.2. Endocitosis mediada por caveolas

Existen diversos tipos de endocitosis mediada por receptor que son independientes de clatrina, de entre todas ellas, la endocitosis mediada por caveolas es una de las principal vía. Las caveolas son un tipo especial de balsa lipídica (“lipid raft”) y constituyen internalizaciones de la membrana plasmática, altamente hidrofóbicas y muy ricas en colesterol y en esfingolípidos [176]. Se caracterizan además de por esa composición lipídica tan particular, por la presencia de unas proteínas llamadas caveolinas (1, 2 y 3, según tipo celular [177]). Estas proteínas se encuentran asociadas a la membrana plasmática por su superficie citosólica y son necesarias para la formación de las caveolas. Las caveolinas interactúan con el colesterol y con los esfingolípidos de las caveolas y también sirven como proteínas de ensamblaje para reclutar e interactuar con otras proteínas intracelulares, dando lugar así a unos dominios altamente favorables para la formación de las vesículas endocíticas.

La endocitosis mediada por caveolas es a veces capaz de evitar a los lisosomas, mediante el transporte de las vesículas a los llamados caveosomas, desde donde pueden dirigirse a otros compartimentos de la célula, como el retículo endoplásmico o el complejo de Golgi. Los caveosomas son unos compartimentos vesiculares que contienen también caveolina en su superficie [178], por lo que ciertos virus utilizan esta vía para no ser degradados (**Fig. 7**). Algunos ligandos internalizados mediante caveolas son el ácido fólico, la albúmina, la lactosil ceramida, la subunidad B de la toxina B del cólera y el SV40 [177, 179, 180].

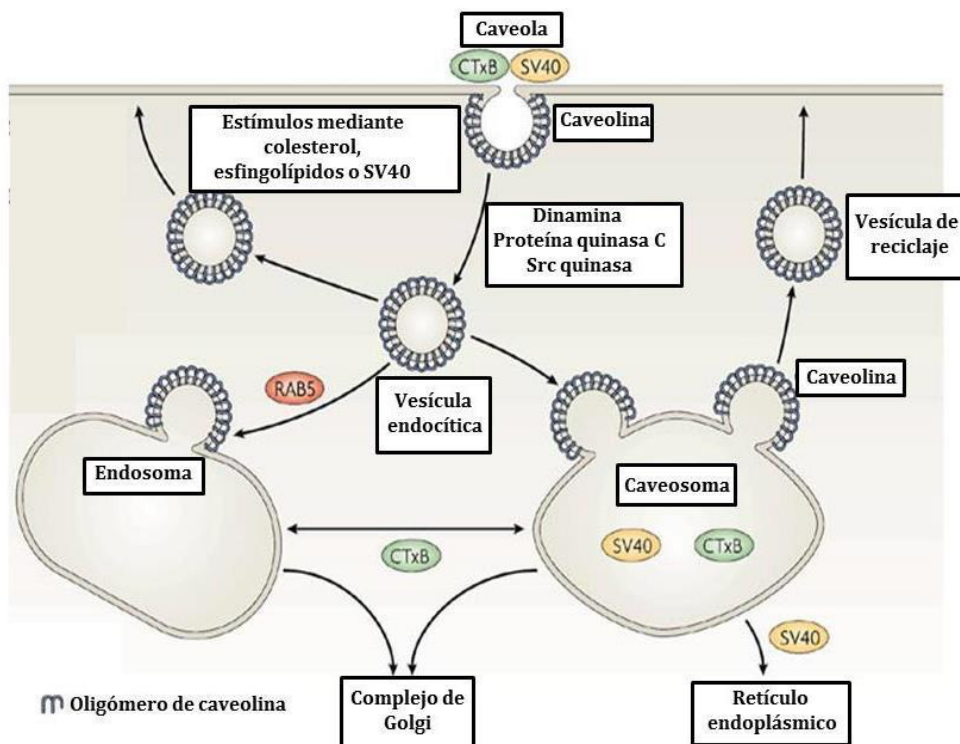


Figura 7. Endocitosis mediada por caveolas. La internalización de la toxina B del cólera y del SV40 se desencadena por su unión a glicoesfingolípidos y al colesterol de las caveolas localizadas en la membrana plasmática y que tienen unas proteínas, las caveolinas, en su superficie citosólica. Otras proteínas como la dinamina, la quinasa C y la quinasa Src ayudan de diversas maneras en el control de la formación de la vesícula endocítica de tipo caveolar, mientras que las GTPasas del tipo Rab intervienen en el control de la especificidad del tráfico vesicular, tanto en éste como en otros tipos de endocitosis. Una vez formada, la vesícula puede unirse a los endosomas tempranos o a los caveosomas. En los caveosomas, parte del contenido de la vesícula original puede reciclarse por transporte vesicular, reinsertándose en porciones de la membrana lipídica asociadas con caveolinas para comenzar un nuevo ciclo de endocitosis. En el caso de la endocitosis de la toxina B del cólera, ésta se transporta al complejo de Golgi, tras su paso por el endosoma temprano y el caveosoma, mientras que en el SV40, el virus se transporta desde el caveosoma al retículo endoplásmico. Adaptada de [181].

3.2. Vías no lisosomales

3.2.1. Sistema ubiquitina-proteasoma

El papel principal en la degradación intracelular de proteínas por vías no lisosomales lo llevan a cabo los diferentes proteasomas localizados tanto en el citosol como en el núcleo. Los proteasomas son complejos proteicos encargados de la degradación de proteínas defectuosas, incluidas las proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico y en otras

localizaciones, pero también de muchas proteínas reguladoras perfectamente funcionales, de gran importancia y de vida media muy corta [111, 182, 183]. Estos complejos supramoleculares degradan sobre todo, aunque no exclusivamente, aquellas proteínas que se encuentran marcadas mediante cadenas de poliubiquitina con una determinada topología [184-187]. Mediante una degradación tan específica como esta, es posible controlar en el tiempo y en diferentes situaciones la concentración de determinadas proteínas. Esto permite regular eficazmente diferentes y muy variados procesos intracelulares, como son, entre otros, la señalización a través de receptores en la membrana plasmática, la transcripción génica, el ciclo celular, la inflamación y la apoptosis [188-190]. Los proteasomas constituyen, junto a la macroautofagia, los dos principales sistemas de degradación intracelular de proteínas, ya que llevan a cabo la mayor parte de toda la proteólisis que ocurre dentro de las células.

Como ya se ha dicho, la degradación de proteínas a través del proteasoma es un proceso altamente específico y regulado. Gran parte de esa especificidad proviene de la que tienen unas enzimas, las ubiquitina ligasas (E3), hacia sus sustratos. En cuanto a la regulación, los sustratos que se degradan sufren cambios post-traduccionales asociados a la activación de diferentes rutas de señalización intracelular, como por ejemplo fosforilaciones, que son reconocidos por las E3 ubiquitina ligasas [191].

El proteasoma 26S/30S está formado por una o por dos partículas reguladoras 19S y por un núcleo catalítico, 20S, con forma cilíndrica (**Fig. 8**). Las partículas reguladoras 19S están formadas por 19 proteínas, de las que 10 forman la base de unión al anillo α exterior del núcleo 20S. Las otras 9 proteínas forman la tapa, encargada de reconocer las cadenas de poliubiquitinas de los sustratos. Seis de las proteínas que forman la base tienen actividad ATPasa para facilitar el desplegamiento de la proteína poliubiquitinada y su entrada al núcleo catalítico del proteasoma. Existen también tres subunidades con actividad desubiquitinasa, dos en la tapa y una en la base [192, 193].

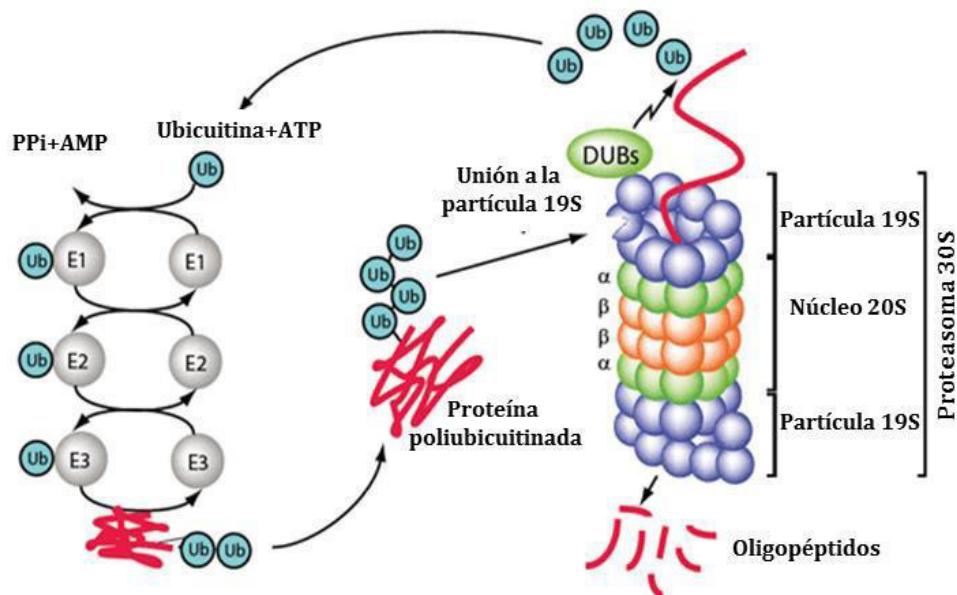


Figura 8. Poliubiquitinación y degradación de proteínas mediante proteasomas.

Para poder ser reconocidos y degradados por el proteasoma 26S o por el 30S los sustratos necesitan ser previamente poliubiquitinados (en la mayoría de los casos, pero no siempre ni mucho menos, mediante cadenas con la K48 de la ubiquitina, ver abajo). El proceso de ubiquitinación consta de 3 pasos principales: activación, conjugación y ligación. Durante el proceso de activación la enzima E1 (hay dos codificadas en el genoma humano) se une a una molécula de ubiquitina (una proteína pequeña de 8,5 kDa) mediante la hidrólisis de una molécula de ATP. Durante el proceso de conjugación, la enzima E1 transfiere la molécula de ubiquitina a la enzima E2 (hay 35 codificadas en el genoma humano) y ésta finalmente se incorpora, mediante la enzima E3 (hay varios centenares codificadas en el genoma humano), al sustrato. La enzima E3 es una ubiquitina ligasa que, en el proceso de ligación, une covalentemente, mediante un enlace isopeptídico, el extremo carboxilo-terminal de la molécula de ubiquitina procedente de su G76 al sustrato, en la inmensa mayoría de los casos a través de algún residuo específico de lisina en este. Las siguientes moléculas de ubiquitina se unen de forma consecutiva a alguno de los siete residuos de lisina que existen en la ubiquitina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) o a su extremo N-terminal de su M1 hasta formar una cadena de poliubiquitina con formas variadas en función de los residuos empleados. Algunas proteínas poliubiquitinadas serán reconocidas por la partícula reguladora 19S. Una vez unidas a ella, las proteínas se desubiquitinan mediante desubiquitininas y, mediante la actividad ATPasa de la porción basal de la partícula 19S, se despliegan para entrar al canal central del proteasoma, donde serán degradadas. Adaptada de www.biomol.com/ubiquitin-and-proteasome-research.

El proteasoma 20S puede unirse también a otras partículas reguladoras, como la 11S (REG) para formar el proteasoma PA28. La partícula reguladora 11S carece de subunidades con actividad ATPasa o

deubiquitinasa, por lo que los proteasomas PA28 sólo son capaces de degradar pequeños péptidos que pueden unirse al complejo principal de histocompatibilidad de clase I, jugando un papel clave en la respuesta inmunitaria. El núcleo catalítico 20S está formado por 4 anillos apilados entre sí y cada anillo, a su vez, está compuesto por 7 subunidades distintas. Los dos anillos exteriores son idénticos en su composición y están formados por 7 subunidades α , de naturaleza estructural. Los dos anillos internos son también idénticos y están formados por subunidades β donde se localizan los 3 sitios activos responsables de la actividad catalítica del proteasoma 20S, concretamente la proteína $\beta 1$ tiene actividad proteolítica tipo caspasa, la proteína $\beta 2$ tiene actividad tipo tripsina y la $\beta 5$, actividad tipo quimotripsina [193, 194].

En determinadas situaciones, las tres subunidades catalíticas son reemplazadas por otras 3 subunidades catalíticas, llamadas $\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$ (la "i" es por ser inducibles) y los proteasomas resultantes se conocen como inmunoproteasomas. Éstos tienen una especificidad algo diferente a la del proteasoma 20S [195].

3.2.2. Las calpaínas

Las calpaínas también forman parte de los sistemas de degradación intracelular de proteínas. Éstas son tiol-proteasas (también conocidas como cisteína-proteasas) que conforman una superfamilia de proteasas citoplasmáticas y no lisosomales, cuya actividad de tipo papaína depende de calcio y es óptima a pH neutro, lo que las distingue de las catepsinas del tipo tiol-proteasas [196-198]. La actividad de las calpaínas *in vivo* se encuentra altamente regulada por la calpastatina, proteína que las inhibe específicamente sin afectar a la actividad de otras tiol-proteasas [199]. Por eso, el sistema proteolítico de las calpaínas incluye tanto a las calpaínas como a la calpastatina [199, 200].

Las calpaínas 1 y 2 (llamadas μ - y m-calpaínas, respectivamente) fueron las primeras en identificarse y por eso son las más conocidas y estudiadas de este grupo de unas catorce proteasas. Son heterodiméricas y

su subunidad menor, de unos 30 kDa, es idéntica en ambos tipos y tiene una función reguladora, mientras que la subunidad mayor, de unos 80 kDa, es diferente en ambos tipos y tiene actividad catalítica de tipo papaína. Las subunidades de 80 kDa de las calpaínas 1 y 2 difieren en las concentraciones de calcio requeridas para su activación. De ahí procede el prefijo μ - y m -, que se refiere a requerimientos micromolares o milimolares, respectivamente, de calcio [201, 202]. El calcio puede unirse a los extremos C-terminales de cada subunidad, ya que tienen dominios de tipo calmodulina capaces de unirse a él.

En mamíferos se han descrito alrededor de 14 tipos diferentes de calpaínas, de las que algunas (1, 2, 5, 7, etc.) se encuentran presentes en todos los tejidos y el resto se encuentran, sólo o principalmente, en determinados tejidos como el útero, el testículo o el tracto digestivo [199, 203]. Aunque se desconocen las secuencias de aminoácidos específicas que reconocen las calpaínas, se cree que estas enzimas catalizan la hidrólisis de una variedad de proteínas implicadas en diversas funciones, tales como el anclaje de diferentes proteínas a la membrana, el remodelamiento del citoesqueleto, la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Por ello, se han encontrado alteraciones en las calpaínas, o en su regulación por las calpastatinas, en muchas patologías tales como diabetes [204], diversas formas de distrofias musculares, como la de Duchenne y la de la cintura y extremidades tipo 2A [205, 206], enfermedades desmielinizantes, como la esclerosis múltiple, e incluso en el cáncer y en las enfermedades de Parkinson, Alzheimer [207] y otras neurodegenerativas [208, 209].

4. Transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma

En las células eucariotas, la inmensa mayoría del material genético se encuentra en el interior de un orgánulo, el núcleo, rodeado por una doble membrana o envoltura nuclear que lo separa del citoplasma. A lo largo de la envoltura nuclear existen un gran número de orificios, denominados poros nucleares, que comunican y permiten el paso regulado de macromoléculas, sobre todo proteínas y RNAs, entre el citosol y el núcleo, evitando así que difundan libremente entre ambos compartimentos [210]. Cada poro nuclear

está compuesto por cerca de 30 proteínas diferentes conocidas como nucleoporinas [211, 212], formando un gran complejo con estructura simétrica octogonal en forma de cesta de baloncesto [213, 214]. Los poros nucleares actúan como canales abiertos, permitiendo difundir iones y pequeñas moléculas solubles por transporte pasivo. Sin embargo, debido al diámetro del poro, existe un límite en el tamaño del material que puede atravesarlo por transporte pasivo. Aunque existe bastante controversia en torno a dicho tamaño, éste se establece en torno a los 30 kDa para las proteínas [215-217]. Por tanto, las proteínas que tienen un tamaño superior no pueden difundir libremente a través del poro nuclear y precisan de su apertura y aumento en su diámetro mediante un proceso que requiere energía. Como veremos, este transporte activo está estrictamente controlado en uno u otro sentido.

4.1. Entrada al núcleo

El transporte activo a través del complejo del poro nuclear de la mayoría de las proteínas se lleva a cabo con la participación de una familia de factores de transporte, evolutivamente conservados, denominados carioferinas β [218, 219]. En humanos, esta familia se compone de, al menos, 22 miembros distintos, que intervienen en ese transporte activo y regulado. Las carioferinas β funcionan como importinas, transportando proteínas dentro del núcleo, pero también pueden hacerlo como exportinas, transportando proteínas fuera del núcleo [220-223]. La mayoría de las carioferinas β se unen directamente a secuencias específicas de reconocimiento en las proteínas a transportar, aunque en ocasiones lo hacen a través de proteínas adaptadoras [217, 224].

Las secuencias de localización nuclear (NLSs) [225-227] son secuencias de aminoácidos reconocidas por las importinas que determinan las proteínas que pueden ser importadas al núcleo celular. Existe una considerable variabilidad tanto de NLSs como de carioferinas que las reconocen [228]. Las NLSs pueden ser de dos tipos:

A) NLSs clásicas, que son reconocidas por carioferinas o importinas α [220]. Las importinas α actúan como proteínas adaptadoras entre la proteína a transportar con una NLS y otra proteína, la importina β , que mediará en el transporte al núcleo de la proteína. Además, la propia importina α posee su propia NLS que es reconocida específicamente por la importina β [229, 230]. Las NLSs clásicas pueden ser además clasificadas como de secuencia única o de secuencia bipartita. Las de secuencia única [231], descubiertas por primera vez en el virus SV40 [232], contienen una sola secuencia corta expuesta en la superficie de la proteína y que está formada por aminoácidos básicos y, por tanto, cargados positivamente. Su secuencia consenso es K-K/R-X-K/R. Las bipartitas contienen dos secuencias cortas de aminoácidos básicos, que están separadas entre sí por entre 10 y 12 aminoácidos cualesquiera (X10-12). Su secuencia consenso es (K/R)(K/R)X10-12(K/R)3/5 y su última parte ((K/R)3/5) se refiere a que en la segunda secuencia, 3 de 5 aminoácidos corresponden a K o a R [233]. Un ejemplo muy conocido de NLS bipartita es la que tiene la nucleoplasmina [234, 235].

Se han descrito dos péptidos, Bimax1 y Bimax2, que funcionan como inhibidores selectivos de la vía clásica de entrada al núcleo mediada por importinas α/β en mamíferos. Las secuencias Bimax1 y Bimax2 fueron generadas mediante estudios de mutagénesis dirigida a partir de NLSs conocidas y de estudios de afinidad por la importina α . Se obtuvieron así dos NLSs con una elevada afinidad de unión a la importina α , capaces de competir por la importina α con el resto de proteínas que utilizan esta vía de entrada al núcleo. Bimax1 y Bimax2 sólo se unen a la importina α y no a la importina β [236, 237].

B) NLSs no-clásicas, que son reconocidas directamente por la correspondiente importina β , sin intervención de ninguna importina α o proteína adaptadora. Muchas de las NLSs no-clásicas son reconocidas por la importina β 1, como ocurre con el dominio ácido M9 de la proteína hnRNP A1 (ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1) [238]. Además, se

ha descubierto dentro de este grupo otra clase de NLS, denominada PY-NLS debido a que tiene prolina y tirosina. La PY-NLS es reconocida por la importina $\beta 2$ también conocida como transportina-2 o carioferina $\beta 2B$ [239, 240].

Las NLSs no se cortan por proteólisis limitada tras el transporte como suele ocurrir en el transporte de proteínas a otros orgánulos, como por ejemplo las mitocondrias. Numerosas proteínas cambian continuamente su localización entre el núcleo y el citoplasma, atravesando el poro en ambos sentidos. Una misma proteína puede estar saliendo y entrando continuamente al núcleo, al no eliminarse la señal de transporte. Esto es útil para diferentes tipos de proteínas, como por ejemplo los factores de transcripción que deben entrar al núcleo en un determinado momento y sólo entonces. Para que esto pueda ocurrir, la señal de transporte nuclear suele estar enmascarada por otra proteína o por otros muchos mecanismos y el transporte sólo se produce cuando esa proteína se separa o es degradada y la NLS, que estaba oculta, queda expuesta.

4.2. Salida del núcleo

Las secuencias de exportación nuclear (NESs), que tienen la función opuesta a las NLSs, son reconocidas por exportinas y dirigen a las proteínas que las poseen fuera del núcleo. Aunque se han identificado otras posibles secuencias de exportación nuclear, la NES clásica es la mejor caracterizada [241].

La NES clásica, que es reconocida por la exportina 1 o CRM1, está formada por una secuencia corta de 8 a 15 aminoácidos con 4 residuos hidrofóbicos, generalmente leucinas, separados con una pauta bastante regular [242-244]. En algunos casos, al igual que ocurría con la importina β , la NES no es reconocida directamente por CRM1, sino que lo hace mediante una proteína adaptadora [245, 246]. Las primeras NES fueron identificadas en la proteína Rev del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) [247, 248] y en el péptido inhibidor de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKI) [249]. Esto permitió identificar NESs adicionales en otras

proteínas y a postular la secuencia consenso L-X2-3-L-X2-3-L-X-L, en la que L es un residuo hidrofóbico (normalmente leucina) y X cualquier aminoácido [250-252]. Por otra parte y puesto que no todas las proteínas que poseen una NES clásica son constitutivamente exportadas desde el núcleo, existen una regulación adicional de este transporte a través de cambios conformacionales que muestran u ocultan la NES [253, 254], fosforilaciones [255, 256] e, incluso, formación de enlaces disulfuro como resultado de una oxidación [257-259].

El fungicida leptomicina B (LMB) actúa inhibiendo la exportación nuclear de proteínas mediada por CRM1 [250, 260]. La CRM1 humana tiene una cisteína, la Cys528, localizada en el surco de unión a la NES, a la que se une irreversiblemente y de forma covalente la LMB, de forma que se bloquea el acceso de la NES a su sitio de unión [261, 262]. El compuesto KPT-185 es también un inhibidor selectivo de la CRM1. Por eso y al igual que ocurre con la LMB, su adición provoca la acumulación en el núcleo de las proteínas transportadas por la vía dependiente de CRM1 [263].

Además, de las proteínas mencionadas anteriormente que participan directamente en el transporte activo y específico a través del poro nuclear, existen otras que intervienen también en este proceso a un nivel más general. Entre ellas destaca la proteína Ran, que es una proteína pequeña con actividad GTPasa que une GTP, esencial para el transporte a través del poro nuclear. Al igual que otras GTPasas, Ran se puede encontrar de dos formas distintas, unida a GTP o a GDP, distribuida asimétricamente entre el núcleo y el citoplasma. Este gradiente de las dos formas de Ran se mantiene mediante proteínas reguladoras específicas localizadas en el núcleo y en el citoplasma [264]. Las carioferinas reconocen una secuencia específica en la proteína a transportar y se unen a ella. Las carioferinas unidas a la proteína, median su paso a través del poro nuclear mediante su interacción con las nucleoporinas, que en última instancia provoca el aumento del diámetro del poro nuclear, y con Ran [265]. La **figura 9** muestra un modelo simplificado del transporte nuclear dependiente de Ran.

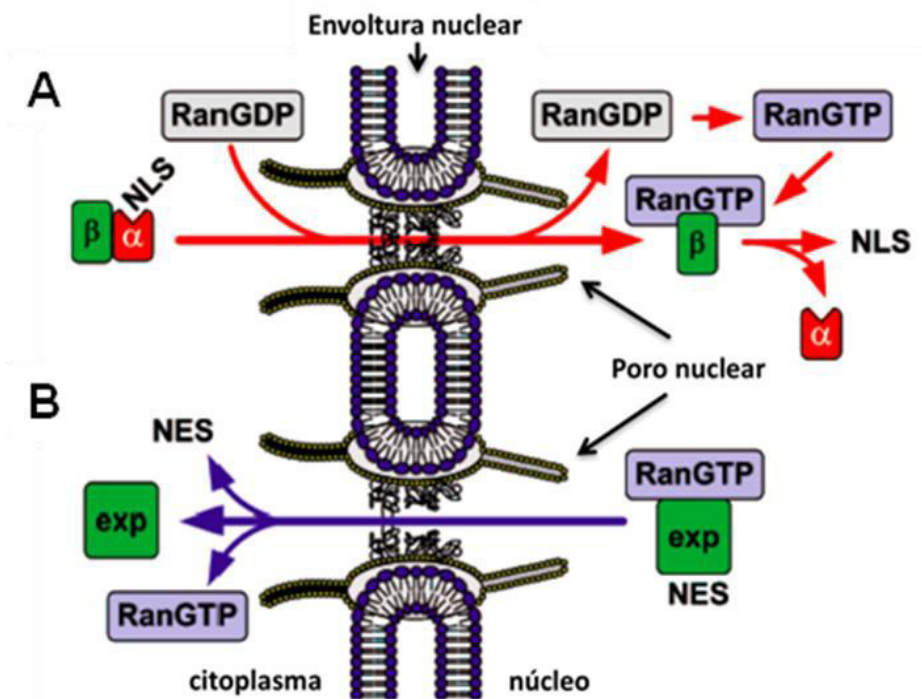


Figura 9. Modelo simplificado del transporte a través del poro nuclear de proteínas dependiente de Ran. **A.** El transporte de una proteína a través del poro nuclear consta de varios pasos que incluyen su reconocimiento, su transporte hasta el complejo del poro nuclear, su translocación a través del poro nuclear, su liberación y el reciclaje de los factores del transporte. Entrada al núcleo de una proteína mediante la vía clásica dependiente de importina α/β . La NLS de la proteína es reconocida por la importina α (α). La importina β (β) reconoce a la importina α unida a la proteína (NLS) y se une a ésta formando un complejo (NLS- α - β). Este complejo se une a Ran-GDP (Ran unida a GDP) y establece interacciones con el poro nuclear, promoviendo su apertura y el paso del complejo al núcleo. En el núcleo, Ran-GDP pasa a Ran-GTP, provocando una disminución en la afinidad de la importina β por la proteína transportada con su consiguiente liberación en el núcleo. La importina β unida a Ran-GTP vuelve al citosol donde el GTP se hidroliza a GDP causando un cambio conformacional en Ran que reduce su afinidad por la importina β , causando su liberación (no mostrado en la imagen). **B.** Muestra la salida hacia el citoplasma de la proteína con la secuencia NES (NES) inicialmente localizada en el núcleo. La exportina (exp) unida a Ran-GTP (el Ran-GTP aumenta la afinidad de la exportina) reconoce la NES de la proteína y se une a ésta. La exportina interacciona con el complejo del poro nuclear, provocando la apertura del poro y posibilitando su salida al citoplasma. En el citoplasma, el GTP se hidroliza a GDP (hidrólisis no mostrada), provocando un cambio conformacional en Ran que ocasiona el desensamblaje del complejo de exportación y consiguiente liberación de la proteína. Tanto las carioferinas como las proteínas Ran se reciclan para comenzar un nuevo ciclo de transporte. Adaptada de [266].

OBJETIVOS

Pese a los numerosos estudios realizados para determinar las bases moleculares de los defectos genéticos que originan la enfermedad de Lafora, quedan todavía numerosas cuestiones por resolver. Así, por ejemplo, todavía quedan por conocer bien todas las funciones que desempeñan en la célula las dos principales proteínas relacionadas con la enfermedad, la laforina y la malina.

El objetivo inicial de esta tesis doctoral era aportar nuevos datos que permitieran ayudar a resolver alguna de esas cuestiones que quedaban aún por averiguar. En concreto, se pretende aquí profundizar sobre dos aspectos de la enfermedad de Lafora. Por un lado, puesto que diferentes laboratorios habían mostrado en diferentes modelos de la enfermedad alteraciones en la vía ubiquitina-proteasomas y sobre todo en la macroautofagia, tratamos de verificar si otros procesos relacionados con la degradación de proteínas estaban también alterados en la enfermedad. Por otro lado, pretendíamos también aportar nuevos datos que permitieran proponer posibles funciones para la laforina y la malina. Para ello se enunciaron, al comienzo de esta tesis doctoral, tres objetivos concretos en relación con esos dos aspectos, dirigidos a abordar uno el primero de ellos y los otros dos el segundo.

- **Objetivo 1:** Determinar si en la enfermedad de Lafora existen alteraciones en otras vías de degradación de proteínas que no habían sido estudiadas aún.
- **Objetivo 2:** Estudiar la localización intracelular de la laforina y de la malina y sus posibles cambios en determinadas condiciones metabólicas.
- **Objetivo 3:** Identificar proteínas que interaccionan con la laforina.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

1.1. Cultivos celulares

En este trabajo se han empleado fibroblastos humanos (ver **Tabla 1**), fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), astrocitos de ratones control y de ratones KO para la laforina o la malina y diferentes líneas celulares establecidas (HeLa, HEK293T, SH-SY5Y, HT-1080 y COS-7). Todos los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de semiconfluencia, lo cual se corresponde con densidades celulares en torno a un 80-90 % de confluencia.

Los **fibroblastos** humanos se hicieron crecer en medio MEM (Minimum Essential Medium de Eagle) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 15 % (v/v), L-glutamina 2 mM, aminoácidos esenciales MEM 1x, aminoácidos no esenciales MEM 1x, vitaminas MEM 1x, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml. Todos estos reactivos procedían de Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.). Los fibroblastos control utilizados y recogidos en la **tabla 1** fueron seleccionados para que coincidiesen en sexo y edad aproximada con los enfermos. Todos los pacientes presentaban las características clínicas de LD. Los experimentos se llevaron a cabo con cultivos que habían sido sometidos, con anterioridad al experimento, a un número de pases igual o menor de quince para evitar efectos debidos al envejecimiento de los cultivos primarios.

Los **MEFs** fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. S. Rodríguez de Córdoba (CIB-CSIC, Madrid) y se hicieron crecer en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Dulbecco y Freeman 1959; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) suplementado con FBS al 15 % (v/v), L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales MEM 1x, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml, piruvato sódico 1 % y β-mercaptoetanol 10^{-4} M.

En cuanto a los **astrocitos** aislados de ratones C57Bl6 fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. P. Sanz (IBV-CSIC, Valencia). Se

hicieron crecer en DMEM suplementado con FBS inactivado, al 10 %, anfotericina B 1 % penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, L-glutamina 2 mM y dibutiril cAMP 0,27 mM (Sigma-Aldrich).

Tabla 1. Fibroblastos humanos utilizados en los experimentos realizados para esta tesis doctoral.

	Sexo	Nombre	Gen mutado	Proteína mutada	Mutación/es identificadas	Dominio de la mutación	Referencia catálogo	Origen
Control	H	C-1	-	-	-	-	GM 03349B	Coriell Institute ¹
Control	M	C-2	-	-	-	-	GM 01582	Coriell Institute ¹
Paciente	M	L-1	<i>EPM2A</i>	Laforina	Tyr86Stop	CBD	-	Hospital La Paz ²
Paciente	M	L-2	<i>EPM2A</i>	Laforina	Arg241Stop	DSP	-	Hospital La Paz ²
Paciente	M	L-3	<i>EPM2A</i>	Laforina	Tyr112Stop Asn163Asp	DSP	-	Hospital Valle de Hebrón ³
Paciente	H	M-1	<i>EPM2B</i>	Malina	Pro129His	NHL	GM 08935	Coriell Institute ¹

¹Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, EE.UU.), ²Hospital La Paz (Madrid) y ³Hospital Valle de Hebrón (Barcelona).

Las líneas celulares establecidas procedían de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE.UU.). Las líneas **HeLa** (células epiteliales de adenocarcinoma cervical humano, CCL-2), **HEK293T** (células embrionarias de riñón humano, CRL-1573), **HT-1080** (células de fibrosarcoma humano, CCL-121) y **COS-7** (células de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*, CRL-1651) se hicieron crecer en medio DMEM y las células **SH-SY5Y** (células de neuroblastoma humano, CRL-2266) en medio DMEM 1:1 Ham's F12 (Gibco), suplementados con FBS inactivado al 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Para la diferenciación de las células SH-SY5Y, éstas se cultivaron en medio DMEM suplementado con FBS al 0,5 % (v/v) y ácido retinoico 10 µM (Sigma-Aldrich, R2625) durante 36 h.

Nos referiremos en lo sucesivo a todos los medios anteriores y con la composición indicada como medio completo para su respectivo tipo celular. Todas las líneas celulares se hicieron crecer en un incubador TC2323 Shel Lab. de Sheldon Manufacturing Inc. (Cornelius, OR, EE.UU.) a 37 °C en una atmósfera con un 80 % de humedad relativa y un 5 % (v/v) de CO₂/aire. La manipulación de los cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar Bio II A de Telstar Industrial (Terrassa, España). Para determinar las densidades y las viabilidades celulares se han utilizado, respectivamente, una cámara de recuento de Neubauer y la tinción con azul de tripano (Sigma-Aldrich, T8154) por métodos estándar.

1.2. Cepas bacterianas

Para llevar a cabo la clonación y la amplificación de los plásmidos empleados en este trabajo, se ha utilizado la cepa bacteriana DH5 α de *Escherichia coli*. Las bacterias competentes se transformaron por choque térmico y se dejaron crecer a 37 °C en medio de Luria-Bertani (LB: triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l) suplementado con kanamicina 30 μ g/ml o con ampicilina 100 μ g/ml (ambas de Sigma-Aldrich), según el caso, para seleccionar las bacterias portadoras del plásmido de interés. La obtención y transformación de células competentes, la purificación de plásmidos, el aislamiento de los fragmentos de DNA obtenidos y las clonaciones se han realizado según la metodología descrita en el libro “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (Sambrook and Russell, 2001).

1.3. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados para detectar las proteínas indicadas y que se comentan en el apartado de Resultados, la procedencia de esos anticuerpos y la dilución empleada en los diferentes experimentos de inmunofluorescencia o inmunotransferencia (Western-blot) se resumen a continuación (ver **Tabla 2**). Todos los anticuerpos reconocen antígenos de la especie humana y los utilizados con otros tipos celulares reconocen además antígenos de otras especies (ratón y mono).

Los anticuerpos secundarios utilizados, su procedencia, el marcador conjugado y la dilución empleada se resumen también, a continuación de la tabla de anticuerpos primarios, en la **tabla 3**.

Tabla 2. Listado de anticuerpos primarios utilizados en los diferentes experimentos realizados para esta tesis doctoral.

Proteína/péptido Reconocido	Especie y dilución	Procedencia	Referencia
ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA INMUNOFLUORESCENCIA			
EDC4/Gc-1	Conejo/1:100	Cell Signaling ³	2548
eIF4E	Conejo/1:100	Abcam ¹	ab1126
FLAG	Ratón/1:500	Sigma-Aldrich	F3165
HA	Ratón/1:100	Abcam ¹	ab18181
LAMP2	Ratón/1:100	Abcam ¹	ab25631
LC3B	Conejo/1:100	Novus Biologicals ⁶	NB100-2220
PABP	Conejo/1:100	Abcam ¹	ab21060
TOM20	Conejo/1:300	Santa Cruz Biotechnology ⁷	sc11415
ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA WESTERN -BLOT			
Actina-β	Raton/1:10.000	Sigma-Aldrich	A5441
Calnexina	Conejo/1:1.000	Abcam ¹	ab10286
Catalasa	Ratón/1:1.000	Sigma-Aldrich	C0979
Ciclina D1	Conejo/1:800	Santa Cruz Biotechnology ⁷	Sc-753
EGFR	Rata/1:1.000	Abcam ¹	ab231
pEGFR (Tyr845)	Conejo/1:1000	EMD Millipore ⁴	07-820
FLAG	Ratón/1:5.000	Sigma-Aldrich	F3165
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	Ratón/1:5.000	Dr. E. Knecht (CIPF, Valencia, España)	---
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	Ratón/1:5.000	Dr. E. Knecht (CIPF, Valencia, España)	---
HA	Ratón/1:1.000	Abcam ¹	ab18181
Histona H3	Conejo/1:2.000	Cell Signaling ³	9715
Laforina	Ratón/1:1.000	EMD Millipore ⁴	MABN606
LAMP1	Rata/1:1.000	Abcam ¹	ab25245

Proteína/péptido Reconocido	Especie y dilución	Procedencia	Referencia
ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA WESTERN -BLOT			
LAMP2	Ratón/1:100	Abcam ¹	ab25631
LC3B	Conejo/1:1.000	Novus Biologicals ⁶	NB100-2220
p62/SQSTM1	Ratón/1:2.000	Abcam ¹	ab56416
Piruvato deshidrogenasa (PDH)	Ratón/1:1.000	Molecular Probes ⁵	21325
OPA1	Ratón/1:1.000	BD Biosciences ²	612606
RPS3	Conejo/1:2.000	Cell Signaling ³	2579
Succinato deshidrogenasa (SDHA)	Conejo/1:1.000	Abcam ¹	ab139181
Tubulina- α	Rata/1:5.000	Abcam ¹	ab6160
VDAC1	Conejo/1:1.000	Abcam ¹	ab15895

¹Abcam (Cambridge, Reino Unido), ²BD Biosciences (San José, CA, EE.UU.), ³Cell Signaling (Beverly, MA, EE.UU.), ⁴EMD Millipore (Billerica, MA, EE.UU.), ⁵Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU.), ⁶Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.) y ⁷Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EE.UU.).

Tabla 3. Listado de anticuerpos secundarios utilizados en los diferentes experimentos realizados para esta tesis doctoral.

ANTICUERPOS SECUNDARIOS					
Proteína	Especie reconocida/ dilución	Especie de origen del anticuerpo	Conjugado	Casa comercial	Referencia
IgG	Ratón/ 1:10.000	Cabra	HRP	Sigma-Aldrich	A-4416
IgG	Conejo/ 1:10.000	Cabra	HRP	Sigma-Aldrich	A-6154
IgG	Rata/ 1:10.000	Cabra	HRP	Sigma-Aldrich	A-9037
IgG	Ratón/ 1:400	Cabra	Alexa Fluor 488	Invitrogen ¹	A11001
IgG	Conejo/ 1:400	Cabra	Alexa Fluor 488	Invitrogen ¹	A11008
IgG	Ratón/ 1:400	Cabra	Alexa Fluor 594	Invitrogen ¹	A11005
IgG	Conejo/ 1:400	Cabra	Alexa Fluor 594	Invitrogen ¹	A11012

Invitrogen (Waltham, MA, EE.UU.)

1.4. Inhibidores de la proteólisis y otros inhibidores

La leupeptina (4041) y la lactacistina (4368-V) procedían de Peptide Institute Inc. (Osaka, Japón). El MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-aldehído, PI-102) de Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, EE.UU.). El cloruro de amonio (NH_4Cl , 1145) de Merck & Co (Kenilworth, NJ, EE.UU.). El fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, P7626), la pepstatina A (P5318), la aprotinina (A6279), el ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA, E5134), la cicloheximida (CHX, C6255), la bafilomicina A1 (B1793), el fluoruro sódico (NaF , S7920), el ortovanadato sódico (Na_3VO_4 , S6508), el pirofosfato sódico ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, P9146), la leptomicina B (L2913), la antimicina A (A8674) y la oligomicina (O4876), la metil- β -ciclodextrina (C4767), el clorhidrato de clorpromazina (C8138) y la filipina III (F9765) procedían de Sigma-Aldrich. El KPT-185 (S7125) era de Selleckchem (Houston, TX, EE.UU.)

1.5. Otros reactivos

Las células se trataron además con otros reactivos. Así, se han utilizado en este trabajo: isotiocianato de fluoresceína conjugado con dextrano de ~40 kDa (FITC-dextrano, FD40S), cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (CCCP, C2759), cianuro de carbonilo-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, C2920), peróxido de hidrógeno (solución al 30 % v/v en agua, H1009), Nonidet P-40 (Sinónimo: Igepal, CA-630), Tritón X-100 (93443), arsenito sódico (35000-1L-R), solución de tripsina/EDTA (T4049), α -amilasa o diastasa (A3176), hematoxilina (H3136) y el reactivo de Schiff (3952016), todos ellos de Sigma-Aldrich. El medio de montaje para histología DPX y el ácido peryódico eran de VWR (Radnor, PA, EE.UU.) y el GelRed™ (41003) de Bioitum, Inc (Fremont, CA, EE.UU.). Como medio de montaje para la microscopía de fluorescencia se usó también el FluorSave™ (345789) de EMD Millipore. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) conjugado al fluoróforo AF488 (AF488-EGF, E13345), la transferrina (Tfr) conjugada al fluoróforo AF488 (AF488-Tfr, T13342), el BodiPY FLC5 (D3521), el yoduro de propidio (IP, R37169) y el MitoTracker Red CMXRos (M7512) eran de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.). Para marcar los núcleos celulares para microscopía de fluorescencia se han utilizado el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, D9542)

o el colorante Hoechst (H33342 o H33258), todos de Sigma-Aldrich. La DNA ligasa T4 (10481220001) y la RNasa A (10109142001) procedían de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza). Las enzimas de restricción con sus tampones correspondientes y la DNA polimerasa “Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase” (M0530L) procedían de New England BioLabs (Ipswich, MA, EE.UU.). La otra polimerasa utilizada en este trabajo fue la “DreamTaq DNA Polymerase” (EP0702) suministrada por Thermo Fisher Scientific.

Otros reactivos, como la albúmina de suero bovino (BSA), el desoxicolato de sodio, la agarosa, el ácido tricloroacético (TCA), la glicina, el cloruro de guanidinio, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el glicerol, el paraformaldehído, el rojo Ponceau S, el dodecilsulfato sódico (SDS), el Tween-20, el xilol, el isopropanol, etc., fueron de la mejor calidad analítica disponible y procedían de Merck & Co, Roche Diagnostics, Sigma-Aldrich, Panreac Química S.A. (Barcelona, España) y Riedel-de Hæn (Seelze, Alemania).

Finalmente, en los diferentes apartados de la sección de Métodos se indica la procedencia de reactivos adicionales empleados con fines más específicos.

1.6. Tampones y soluciones más habituales

Para la realización de los diferentes experimentos se han utilizado, sobre todo, los siguientes tampones y soluciones:

- Cóctel de inhibidores de proteasas: PMSF 1 mM, aprotinina 1 µg/ml, EDTA 2 mM, pepstatina A 1 µg/ml y leupeptina 1 µg/ml. Todas las concentraciones son las finales en la solución correspondiente.

- Medio de Krebs-Henseleit (KH): NaCl 118,4 mM, KCl 4,75 mM, KH₂PO₄ 1,19 mM, MgSO₄·7H₂O 2,54 mM, CaCl₂·2H₂O 2,44 mM, NaHCO₃ 18,5 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, ajustado todo a pH 7,4. El KH se utiliza para incubar las células en condiciones que induzcan una proteólisis intracelular

más elevada en comparación a la que ocurre cuando las células se incuban en su medio completo.

- Solución de dilución del anticuerpo primario para Western-blot: BSA 2 % y azida sódica 0,01 % en TBS-T.

- Solución de dilución del anticuerpo secundario para Western-blot: leche desnatada al 2 % en TBS-T.

- Solución de bloqueo para Western-blot: leche desnatada (Central Lechera Asturiana, Siero, España) al 5 % en TBS-T.

- Solución de Lowry A: Na_2CO_3 40 g/l y NaOH 8 g/l.

- Solución de Lowry B: tartrato sódico-potásico 0,4 g/l y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l.

- TAE 50x: Tris base (Trizma®) 2 M y Na_2EDTA 50 mM, ajustado a pH 8,3 con ácido acético glacial.

- Tampón de carga para SDS-PAGE (Laemmli 2x): Tris-HCl 125 mM, glicerol 20 % (v/v), SDS 5 %, 2-mercaptoetanol 10 % (v/v) y azul de bromofenol 0,002 %, pH 6,8.

- Tampón de lisis para inmunoprecipitación: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1 %, leupeptina 100 μM , PMSF 1 mM, pepstatina A 1 μM , aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$, EDTA 5 mM, NaF 50 mM y $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 30 mM, ajustado todo a pH 7,4.

- Tampón de elución para inmunoprecipitación: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0,1 %, glicerol 15 %, EDTA 0,2 mM, pH 7,4.

- Tampón de lisis para la detección de proteínas fosforiladas: Tris-HCl 50 mM, NaCl 10 mM, Nonidet P-40 1 % y glicerol 20 %, conteniendo además

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 20 mM, Na_3VO_4 2 mM, NaF 100 mM, leupeptina 100 μM , PMSF 1 mM y ajustado todo a pH 7,4.

- Tampón de transferencia húmeda: Tris base 25 mM y glicina 192 mM, pH 8,3.

- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 136,9 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 16 mM, KH_2PO_4 1,47 mM y KCl 2,68 mM, ajustado a pH 7,2-7,4.

- Tampón RIPA: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1 %, Nonidet P-40 1 %, desoxicolato de sodio 0,5 %, leupeptina 100 μM y PMSF 1 mM, ajustado todo a pH 8,0.

- Tampón Tris salino (TBS): Tris base 50 mM y NaCl 150 mM, ajustado con ácido clorhídrico a pH 7,4.

- TBS-Tween (TBS-T): TBS con Tween al 0,05 %.

1.7. Kits comerciales

Para el revelado por Western-blot se utilizaron los kits de quimioluminiscencia “Lumi-Light Western Blotting Substrate” de Roche Diagnostics y “ECL Select Western Blotting Detection Reagent” de GE Healthcare Life Sciences (Pittsburgh, PA, EE.UU.).

Para la extracción del DNA de los geles de agarosa se utilizó un kit de extracción de Qiagen (Hilden, Alemania). Para la obtención de DNA plasmídico se utilizaron los kits de extracción “Genopure Plasmid Midi o Maxi Kit” de Roche Diagnostics.

1.8. Material de electroforesis

Los geles de poliacrilamida se prepararon por procedimientos estándar utilizando acrilamida:bisacrilamida en proporción 29:1, TEMED y persulfato amónico procedentes de Bio-Rad Laboratories (Richmond, VA, EE. UU.). Los marcadores de peso molecular de proteínas empleados fueron:

“BenchMark™ Protein Ladder” (10747012) y “EZ-RUN Protein Standards” (BP3603-1) de Thermo Fisher Scientific.

En los geles de agarosa se utilizó tampón TAE 1x y agarosa de Sigma-Aldrich. Como marcador de peso molecular de DNA se empleó el “2-Log DNA ladder” de New England BioLabs.

1.9. Plásmidos y clonaciones

Los principales plásmidos empleados en este trabajo fueron:

- **pFLAG-CMV₂TM-6b-laforina**: derivado del vector pFLAG-CMV₂TM-6b (Sigma-Aldrich, E2025). Contiene el cDNA de la isoforma 1 de la laforina (NM_005670.3) entre los sitios de restricción BamHI y KpnI. Cedido por el Dr. P. Sanz (IBV-CSIC, Valencia).
- **pFLAG-CMV₂TM-6b-malina**: derivado como el anterior del vector pFLAG-CMV₂TM-6b (ver arriba). Contiene el cDNA de la malina (NM_198586.2) entre los sitios de restricción BglII y BamHI. Cedido por el Dr. P. Sanz.
- **pCMV-HA-laforina**: derivado del vector pCMV-HA (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU., #K6003-1). Contiene el cDNA de la isoforma 1 de la laforina (NM_005670.3) entre los sitios de restricción Sall y KpnI. Cedido por el Dr. P. Sanz.
- **pCMV-HA-malina**: derivado también del vector pCMV-HA (ver arriba). Contiene el cDNA de la isoforma 1 de la malina (NM_198586.2) entre los sitios de restricción BglII y NotI. Cedido por el Dr. P. Sanz.
- **pEAK-10-FLAG-GFP**: derivado del vector pEAK-10 que contiene el cDNA de la proteína verde fluorescente (GFP). Este plásmido fue cedido amablemente por el Dr. A.T. Ting (Mount Sinai School of Medicine, New York, EE.UU.).

- ptfLC3: este plásmido expresa la proteína LC3 fusionada al tándem fluorescente mRFP y EGFP (#21074) y se compró a Addgene (Teddington, Reino Unido).
- Los plásmidos ptagRFP-C1 (Evrogen, Moscow, Russia), pEYFP-C1 (BD Biosciences) y sus variantes pEYFP-EYFP-NLS y pEYFP-EYFP-NLS-PKI fueron cedidos por la Dra. Y.M. Chook (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, EE.UU.). La secuencia completa de la isoforma 1 y las secuencias candidatas NLS y NES de la laforina se generaron a partir de su cDNAs (NM_005670.3).

Las clonaciones realizadas para los experimentos de transporte núcleo-citoplasma emplearon los plásmidos indicados y fueron las siguientes:

- ptagRFP-laforina: el cDNA de la isoforma 1 de la laforina se clonó en el plásmido ptagRFP-C1 entre los sitios de restricción EcoRI/BamHI mediante los siguientes cebadores:
 - Directo MfeI (5'-ATACAATTGTCGCTTCCGCTTTGGG-3')
 - Reverso BamHI (5'-GGTGGATCCCTACAGGCTACACACAGAAGAACG-3')
- pEYFP-EYFP-NLS(laforina): la secuencia del cDNA que codifica para una NLS candidata de la laforina (FLMAKRPAVYIDEEALARAQEDFFQKFGKV), se clonó en el plásmido p(EYFP)2-NLS entre los sitios de restricción BglII/HindIII en sustitución de la secuencia NLS del virus SV40, utilizando los siguientes cebadores:
 - Directo BglII (5'-ATAGATCTTTCCTCATGGCCAAGAG-3')
 - Reverso HindIII (5'-TTAAAGCTTAACCTTCCCAAATTTCTGG-3')
- pEYFP-EYFP-NLS-NES(laforina): las secuencias del cDNA que codifican para las tres NES candidatas de la laforina (NES-1: QVEHVTIKIKHELGI, NES-2: VQMLPQAVCLLHALL y NES-3: YVMGWNLRKVQYFLM) se clonaron en el plásmido p(EYFP)2-NLS-NES(PKI) entre los sitios de restricción

BamHI/XhoI en sustitución de la secuencia NES del inhibidor de la quinasa dependiente de cAMP (PKI), empleando los siguientes cebadores:

- Directo NES-1 BamHI/XhoI (5'-GATCCCAGGTGGAACATGTAACCATCAA
AAACTGAAGCATGAATTGGGGATTTGAC-3')
 - Reverso NES-1 BamHI/XhoI (5'-TCGAGTCAAATCCCCAATTCATGCTT
CAGTTTGATGGTTACATGTTCCACCTGG-3')
 - Directo NES-2 BamHI/XhoI (5'-GATCCGTACAGATGCTGCCCCAGGCGG
TGTGCCTGCTGCATGCGCTGCTGTGAC-3')
 - Reverso NES-2 BamHI/XhoI (5'-TCGAGTCACAGCAGCGCATGCAGCAG
GCACACCGCCTGGGGCAGCATCTGTACG-3')
 - Directo NES-3 BamHI/XhoI (5'-GATCCTATGTGATGGGCTGGAATCTGA
GGAAGGTGCAGTATTTCCCTCATGTGAC-3')
 - Reverso NES-3 BamHI/XhoI (5'-TCGAGTCACATGAGGAAATACTGCAC
CTTCCTCAGATTCCAGCCCATCACATAG-3')
- pEYFP-Bimax2: la secuencia del cDNA que codifica para este péptido (GSRRRRRRKRKREWDDDDPPKRRRLD) se clonó en los sitios de restricción HindIII/BamHI mediante los siguientes cebadores, que incluían la secuencia completa de éste:
- Directo HindIII/BamHI (5'-AGCTTATGGTAGTAGAAGAAGAAGAAGA
AGAAAAAGAAAAAGAGAATGGGATGAT GATGATGATCCACCAAAGAA
GAGAAGAAGACTTGATTGAG-3')
 - Reverso HindIII/BamHI (5'-GATCCTCAATCAAGTCTTCTTCTTCTTCTT
TGGTGGATCATCATCATCATCCCATTCTCTTTTTCTTTTTCTTCTTCTTCTT
TTCTTCTACTACCATA-3')

1.10. Aparatos

Para los cultivos celulares se empleó un incubador TC2323 Shel Lab. de Sheldon Manufacturing Inc., una campana de flujo laminar Bio II A de Telstar Industrial (Terrassa, España) y un microscopio invertido Axiovert 25 de Carl Zeiss (Oberkochen, Alemania).

Para tomar imágenes de microscopía de fluorescencia se utilizó un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, Reino Unido) o un microscopio Zeiss Observer Z1 acoplado a una cámara fotográfica AxioCam MR Rev3 de Carl Zeiss (Oberkochen, Alemania).

Para la homogeneización de las células en cultivo para obtener después subfracciones celulares se empleó una bomba de cavitación de nitrógeno con vaso de disrupción modelo 4639 de Parr Instruments Co. (Moline, IL, EE.UU.).

Los experimentos de citometría de flujo se llevaron a cabo con un citómetro FACSCalibur de BD Biosciences.

Las medidas espectrofotométricas, fluorimétricas y luminométricas se realizaron con un espectrómetro M5/SpectraMax de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EE. UU.). Para medidas de pequeño volumen se utilizó un NanoDrop modelo 1000 de Thermo Fisher Scientific.

Las sonicaciones se realizaron en un sonicador Microson Ultrasonic (QSonica, LLC, Newtown, CT, EE.UU.).

Las ultracentrífugas, los rotores y los tubos utilizados eran todos de Beckman Coulter (Brea, CA, EE.UU.).

Para las PCRs se utilizaron los termocicladores “GeneAmp® PCR System 9700” y “The StepOne™ Real-Time PCR System”, ambos de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.).

Las densitometrías se realizaron con un escáner Amersham Imager de GE Healthcare Life Sciences.

Otros equipos (microscopios, estufas, baños, neveras, congeladores, agitadores, centrífugas de mesa, balanzas, equipos de electroforesis y de

transferencia, pH-metros, etc.) fueron los habituales en un laboratorio de biología celular y molecular.

1.11. Programas bioinformáticos

Para predecir secuencias de importación nuclear (NLSs) en proteínas reconocidas por importina α , se consultaron los siguientes servidores de acceso libre:

- NLSMapper
(http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) [267].
- NLStradamus
(<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>) [268].
- NucPre
(<http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>) [269].
- SeqNLS
(<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS>) [270].

Para predecir secuencias de exportación nuclear (NESs) en proteínas reconocidas por la exportina 1 (CRM1), se consultaron los siguientes servidores generados por el laboratorio de la Dra. Y. M. Chook del UT Southwestern Medical Center, también de acceso libre:

- LocNES
(<http://prodata.swmed.edu/LocNES/LocNES.php>) [271].
- ValidNESs
(<http://validness.ym.edu.tw/PREDICTION.php>).
- NetNES 1.1 Server
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) [251].

Finalmente, se emplearon también otros programas informáticos de uso habitual en los laboratorios de biología celular y molecular como el Image Quant ECL (GE Healthcare Life Sciences) para la cuantificación de las densitometrías, el MetaMorph versión 7.0 de Molecular Devices para cuantificar las colocalizaciones en la microscopía de fluorescencia o el “software” estadístico Graph Pad Prism de Graph Pad Software (La Jolla, CA,

EE.UU.) Para la identificación de las proteínas correspondientes a los péptidos obtenidos del análisis de proteómica se utilizó el ProteinPilot™ Software versión 4.5 (AB Sciex) utilizando la base de datos de ExPasy como referencia.

2. Métodos

2.1. Cuantificación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó sobre todo mediante el método colorimétrico de Lowry [272] modificado con desoxicolato sódico [273] y usando BSA como patrón con una concentración conocida. La absorbancia resultante se midió a 750 nm, utilizando un espectrofotómetro M5/Spectra Max de Molecular Devices. Ocasionalmente, a efectos comparativos para algunas mediciones de la concentración de proteínas, se utilizaron otros procedimientos clásicos (absorción UV a 280 nm, Biuret o azul brillante de Coomassie) o el kit “BCA Protein Assay” (Thermo Fisher Scientific).

2.2. Expresión transitoria de proteínas recombinantes en células eucariotas

Para la sobreespresión expresión transitoria de proteínas recombinantes, los cultivos celulares se transfectaron con los correspondientes plásmidos, utilizando diferentes agentes de transfección en función del tipo celular y siguiendo en cada caso las especificaciones de los fabricantes. Para las células HeLa, HEK293T y COS-7 se utilizó “X-tremeGENE 9 o HP”, ambos de Roche Diagnostics o el método clásico con CaCl_2 como se describe en “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” [274]. Para las células HT-1080 se utilizó Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific).

2.3. Microscopía de fluorescencia

Las diferentes células se sembraron sobre cubreobjetos y, tras los tratamientos correspondientes en cada caso, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS durante 10 min, se lavaron 3 veces

con PBS y se montaron empleando el medio de montaje FluorSave™ (345789) de EMD Millipore. Las células sembradas y fijadas como se ha descrito arriba, se incubaron con NH₄Cl 75 mM y glicina 20 mM en PBS durante 10 min para bloquear los grupos aldehído reactivos generados por el PFA. A continuación, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0,3 % (v/v) en PBS durante 15 min y se bloquearon con BSA al 1 %, Tritón X-100 al 0,1 % y FBS al 4 % en PBS durante 30 min. Posteriormente, las células se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C. Después, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 1 h con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos del tipo Alexa Fluor (ver **Tabla 3**). Finalmente, tras cinco lavados con PBS, las muestras se montaron sobre portaobjetos usando el medio de montaje FluorSave™. En determinados experimentos, las células fueron también incubadas con DAPI a una concentración de 1 µg/ml en PBS durante 10 min para teñir el DNA y localizar de manera precisa los núcleos en las células. Todos los pasos, a excepción de la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron a 22 °C. Los experimentos se llevaron a cabo siempre con sus respectivos controles en los diferentes pasos. Las preparaciones se observaron mediante un microscopio de fluorescencia Zeiss Observer Z1 acoplado a una cámara fotográfica AxioCam MR Rev3 de Carl Zeiss. Para tomar imágenes de microscopía confocal se utilizó un microscopio Leica TCS-SP2-AOBS. La cuantificación de las colocalizaciones se llevó a cabo mediante el software MetaMorph versión 7.0.

2.4. Western-blot

El análisis por Western-blot se llevó a cabo básicamente como se describe en [275]. Las células se recogieron y se lisaron a 4 °C, con tampón RIPA o con tampón de lisis para la detección de proteínas fosforiladas, según fuese apropiado para la muestra estudiada. A las muestras, una vez determinada su concentración de proteínas, se les añadió tampón de carga (2x) y se calentaron a 95 °C durante 10 min. Las proteínas presentes en las diferentes muestras se analizaron en geles verticales desnaturalizantes y discontinuos de poliacrilamida (SDS-PAGE), mediante electroforesis unidimensionales a voltaje continuo de 120 V o 200 V, una vez el frente de

las proteínas alcanzó el gel separador. El porcentaje de acrilamida utilizado en los geles varió entre el 8 y el 15 %, dependiendo de la masa molecular de la proteína que se pretendía detectar.

Las proteínas de los geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, EMD Millipore) mediante transferencia húmeda a 30 V y 4 °C durante 16-18 h. La transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF se verificaba mediante la tinción de ésta con rojo Ponceau S al 0,5 % en ácido acético al 1 % durante 10 min. Posteriormente, la tinción se eliminaba lavando tres veces las membranas con tampón Tris salino (TBS) suplementado con detergente Tween-20 al 0,05 % (TBS-T). A continuación, se bloqueaban con leche desnatada al 5 % (p/v) en TBS-T durante 1 h a 22 °C y, posteriormente, se incubaban con el correspondiente anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche. Después, las membranas se lavaban exhaustivamente con TBS-T y se incubaban con sus respectivos anticuerpos secundarios durante 1 h a 22 °C. Por último, tras tres lavados con TBS-T y un último lavado con TBS para retirar el exceso de anticuerpo, las proteínas se visualizaban utilizando el sustrato quimioluminiscente “Lumi-Light Western Blotting Substrate” (Roche Diagnostics) o “ECL Western Blotting Detection Reagent” (GE Healthcare Life Sciences) en películas radiográficas “Medical X-Ray Film” (Kodak, Rochester, NY. EE.UU.). Las bandas reveladas de proteínas se cuantificaron mediante un análisis por densitometría, utilizando el software Image Quant ECL (GE Healthcare Life Sciences) dentro del rango lineal de respuesta del anticuerpo.

Para la detección de más de una proteína de interés con parecida masa molecular en la misma membrana de PVDF, se llevó a cabo un proceso de “stripping” tras la visualización de la primera proteína. Para esto, la membrana, ya revelada para el primer anticuerpo, se trataba durante 20 min a 22 °C, bien con un tampón glicina (glicina 50 mM, SDS 10 % pH 2,3) o bien con cloruro de guanidinio (CH_6ClN_3) 7 M. Después de este tratamiento, se lavaba la membrana varias veces con TBS y se volvía a bloquear y a incubar con los anticuerpos correspondientes, siguiendo el proceso que se ha descrito en el párrafo de arriba.

2.5. Estudio de la expresión de la laforina y de la malina mediante RT-qPCR

El análisis de la expresión de la laforina y de la malina se llevó a cabo en el correspondiente medio de cultivo completo o sin glucosa. Para ello, se aisló en primer lugar el RNA total procedente de las diferentes células en cultivo (ver más abajo, apartado 2.5.1.). Después, el RNA se copió a DNA de cadena simple (cDNA), que fue amplificado y cuantificado tal y como se indica más adelante (apartado 2.5.2.).

2.5.1. Extracción y purificación del RNA

La obtención del RNA de células en cultivo se llevó a cabo utilizando el kit "High Pure RNA Isolation Kit" de Roche Diagnostics, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron los diferentes fibroblastos humanos y las células HeLa y, cuando alcanzaron un 80 % de confluencia, se incubaron en medio completo con glucosa (4,5 g/l) o sin glucosa durante 8 h. Transcurrido ese tiempo, las células se tripsinizaron y los sedimentos de células se resuspendieron en PBS y se lisaron con el tampón de lisis proporcionado con el kit. Los lisados se cargaron en las columnas proporcionadas por el kit, se incubaron con DNasa I para digerir el DNA de las muestras y se lavaron con los tampones de lavado. Finalmente, las diferentes muestras de RNA fueron eluidas en 50 µl tampón de elución y se midieron con un NanoDrop modelo 1000 de Thermo Fisher Scientific.

2.5.2. RT-qPCR

Primero se llevó a cabo la retrotranscripción del RNA (RT-PCR). Para ello, 200 ng de RNA total de cada muestra se copiaron a cDNA en el termociclador "GeneAmp® PCR System 9700" (Applied Biosystems) utilizando el kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" de Applied Biosystems mediante tres pasos (activación de la RT-polimerasa, desnaturalización del RNA y copia del RNA a cDNA), siguiendo el protocolo del fabricante.

Una vez obtenido, el cDNA de la laforina y de la malina se cuantificaron por qPCR utilizando sondas “TaqMan Gene Expression” (Thermo Fisher Scientific) específicas para ellas y empleando el termociclador “The StepOne™ Real-Time PCR System” (Applied Biosystems). Para ello se tomaron 20 ng de cDNA de cada muestra y se sometieron a qPCR empleando las siguientes sondas fluorescentes:

- malina: Hs01112790_s1
- laforina: Hs00194655_m1
- GAPDH: Hs03929097_g1

El oligonucleótido para GAPDH se utilizó como control para normalizar los datos de los diferentes experimentos. Como controles negativos de la retrotranscripción y PCR en tiempo real se utilizó agua destilada estéril en lugar de RNA o DNA respectivamente. Además, el producto de la retrotranscripción del control negativo también se utilizó posteriormente como control negativo en la PCR en tiempo real, comprobando así que ninguno de los componentes de la reacción estaba contaminado con RNA o DNA de otra procedencia. Para evitar la contaminación cruzada entre muestras y verificar los resultados, las muestras se ensayaron por triplicado.

2.6. Obtención de fracciones celulares

2.6.1. Aislamiento de una subfracción celular enriquecida en núcleos

Las células, transfectadas o no según el caso con los correspondientes plásmidos, se dejaron crecer durante 48 h hasta semiconfluencia y, tras dos lavados con PBS, se incubaron en medio completo, en presencia o en ausencia de glucosa 25 mM, durante 8 h a 37 °C. Después de este tratamiento, las células se lavaron, se recogieron en PBS y se centrifugaron a 100 g durante 10 min a 4 °C. A continuación, las células se lavaron una vez más con sacarosa 0,25 M y se resuspendieron en 2 ml de sacarosa 0,25 M suplementada con el cóctel de inhibidores de proteasas (ver apartado 1.5), todo ello a 4 °C. Para llevar a cabo la rotura de la membrana plasmática, la suspensión celular se colocó en una bomba de cavitación de nitrógeno (Parr

Instruments Co.) y se incubó durante 10 min a 35 psi (~2,41 bar), a 4 °C y con agitación ocasional. A continuación, la suspensión se hizo pasar 10 veces a través de una aguja de 25 G para completar la rotura de la membrana plasmática celular. Como control se reservó una alícuota de estos homogenados (H) para diferentes determinaciones (medida de la concentración de proteínas, Western-blot, etc.). El homogenado restante se centrifugó a 1.000 g durante 10 min a 4 °C, obteniéndose un sedimento enriquecido en núcleos denominado fracción nuclear (N) y un sobrenadante, que se centrifugó de nuevo a 20.000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante resultante de los 20.000 g se denominó fracción citoplasmática (C), ya que contiene el citosol y algunos componentes celulares de pequeño tamaño (microsomos, etc.). Para algún experimento en concreto, entre la fracción nuclear y citoplasmática se realizó una centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 4 °C y a los sedimentos de las centrifugaciones a 10.000 g y 20.000 g en esas condiciones se les designó como P1 y P2, respectivamente. La fracción nuclear se lavó dos veces con sacarosa 0,25 M. Finalmente, se añadió a todas las muestras (fracciones nucleares, fracciones citoplasmáticas y homogenados) la cantidad correspondiente de tampón RIPA concentrado suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas y se incubaron durante 30 min a 4 °C con agitación ocasional. La concentración de proteína en las diferentes fracciones fue estimada mediante el método de Lowry-desoxicolato (apartado 2.1.). Después, se tomaron 50 µg de cada fracción y fueron analizados por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12 %, por Western-blot.

2.6.2. Aislamiento de una fracción enriquecida en polisomas

Se obtuvo una fracción enriquecida en polisomas a partir de fibroblastos humanos en cultivo, incorporando algunas modificaciones a un método previamente descrito [276, 277]. Brevemente, los fibroblastos se incubaron con CHX (100 µg/ml) durante 15 min, se lavaron y se recogieron con PBS suplementado con CHX a la misma concentración, a 4 °C. A continuación, las células se centrifugaron, se resuspendieron en un tampón isomolar (sacarosa 0,25 M, KCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM y Tris-HCl

50 mM a pH 7,4) suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, para llevar a cabo la rotura de la membrana plasmática, se colocó la solución celular en una bomba de cavitación de nitrógeno (ver apartado 2.6.1.) y se incubó durante 10 min a 35 psi (~2,41 bar), a 4 °C y con agitación ocasional. El extracto resultante se trató 8 veces (8 “strokes”) con un homogeneizador Potter-Elvehjem (VWR) y luego se centrifugó a 1.000 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante de 1.000 g se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4 °C. Tanto el sedimento de 1.000 g, compuesto principalmente de núcleos, como el de 10.000 g, compuesto principalmente por mitocondrias, lisosomas y peroxisomas, se lavaron con tampón isosmolar en las mismas condiciones de centrifugación y se resuspendieron con tampón de carga para SDS-PAGE de Laemmli 1x. El sobrenadante de 10.000 g se separó en dos tubos para poder detectar las proteínas asociadas a polisomas. Uno de los tubos se utilizó como control, para lo que se le trató con EDTA 15 mM durante 15 min a 4 °C o con 100 µg/ml de RNasa A durante 45 min a 22 °C con agitación ocasional; ambos tratamientos provocan la disociación de los polisomas. El sobrenadante, tratado o no, se dispuso en un tubo de ultracentrífuga en la parte de arriba de un gradiente discontinuo de sacarosa, suplementado con MgCl₂ 2 mM, y formado por cuatro capas de 1,5 ml, cada una de ellas con una concentración de sacarosa distinta (de arriba abajo: 0,25 M, 1,35 M, 1,6 M y 2 M). Los tubos se centrifugaron a 250.000 g durante 2 h a 4 °C en una ultracentrífuga con un rotor 70.1 Ti (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, EE.UU.). Posteriormente, se recogieron fracciones de 1 ml desde la superficie y el sedimento (rico en polisomas) se resuspendió en tampón de carga para SDS-PAGE de Laemmli 1x. Las fracciones recogidas se precipitaron a 4 °C con ácido tricloroacético al 10 %. Los precipitados resultantes se lavaron con acetona fría, se resuspendieron en tampón de carga de Laemmli 1x y se incubaron a 95 °C durante 10 min. Tanto las diferentes fracciones como el sedimento del gradiente se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12 % y posterior Western-blot.

2.7. Estudios sobre autofagia

Los procedimientos generales relacionados con el estudio de autofagia se realizaron siguiendo las recomendaciones de las “Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)” [278]. En esta tesis doctoral, de manera más específica, hemos utilizado los métodos siguientes.

2.7.1. Análisis de la actividad autofágica por fluorescencia con el marcador ptf-LC3

Este análisis, que permite estudiar las distintas etapas de la autofagia, se realizó por microscopía de fluorescencia utilizando fibroblastos humanos y transfectando transitoriamente las células con un plásmido, ptf-LC3, que expresa la proteína LC3 fusionada con dos fluoróforos situados en su extremo amino terminal (mRFP-EGFP-LC3). Brevemente, un día antes de la transfección se sembraron los fibroblastos humanos control y de pacientes con LD a una confluencia aproximada del 70 % sobre cubreobjetos redondos en placas de 24 pocillos. Después, los fibroblastos se transfectaron con el mencionado plásmido empleando Lipofectamina 2000 y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 500 μ L del medio Opti-MEM a cada pocillo. Para cada pocillo se prepararon además dos mezclas por separado, ambas con 50 μ L de Opti-MEM; la primera con 2 μ L de Lipofectamina 2000 y la segunda con 1 μ g del plásmido. Tras incubar las dos mezclas por separado durante 5 min a 22 °C, se añadió la segunda sobre la primera. La mezcla resultante se incubó 30 min más a la misma temperatura y se añadió gota a gota sobre las células. Tras una incubación de 6 h a 37 °C, se sustituyó el medio de transfección por el medio completo de fibroblastos, en el que se incubaron las células durante 48 h más para permitir la sobreexpresión de la proteína. Posteriormente, se incubaron en KH en presencia de inhibidores lisosomales (leupeptina 100 μ M y pepstatina A 1 μ M) durante 2 h a 37 °C. A continuación, las células se fijaron con PFA al 4 % durante 10 min a 22 °C, se retiró el fijador y se lavaron las células tres veces con PBS (5 min por lavado). Tras los lavados, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con el líquido de montaje FluorSave™. Finalmente, las preparaciones se

observaron y se fotografiaron en un microscopio confocal de fluorescencia.

2.7.2. Estimación de la masa lisosomal

Para determinar de manera aproximada el contenido relativo en lisosomas de los fibroblastos humanos, tanto de controles como de pacientes de Lafora, se sembraron las células en placas de 6 pocillos y se incubaron en su correspondiente medio de cultivo hasta que alcanzaron una confluencia aproximada del 80 %. A continuación se tripsinizaron las células y se incubaron en suspensión (2×10^5 células/ml) durante 2 h, bien en su medio de cultivo o bien en KH y durante los últimos 30 min de esta incubación se les añadió a todas las muestras el marcador fluorogénico LysoTracker Red DND-99 (λ de excitación 577) a una concentración final de 50 nM. La fluorescencia emitida (590 nm) se cuantificó mediante citometría de flujo [279] y este valor proporciona una estimación comparativa de la masa lisosomal en las diferentes células y condiciones.

2.7.3. Análisis de la mitofagia

Para inducir la mitofagia en las células se utilizaron diferentes agentes como el carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP, 10 μ M), el carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, 10 μ M) o una combinación de oligomicina (10 μ M) y antimicina A (1 μ M), manteniendo los mismos tiempos de incubación. El CCCP y el FCCP producen la despolarización de la membrana mitocondrial, mientras que la oligomicina y la antimicina producen la inhibición del complejo V o ATP sintasa mitocondrial y del complejo III mitocondrial, respectivamente.

Para observar el efecto producido por los tratamientos que inducen la mitofagia sobre la morfología mitocondrial, las células se hicieron crecer sobre cubreobjetos y se incubaron con MitoTracker 100 nM durante 30 min a 37 °C. Después, se lavaron las células con PBS y se trataron o no con CCCP, FCCP o la combinación de oligomicina y antimicina A en medio completo durante 18 h. A continuación, las células fueron fijadas con PFA al 4 % en PBS durante 10 min a 22 °C, se lavaron 3 veces con PBS y se montaron usando el líquido de montaje FluorSave™.

Para analizar y cuantificar, mediante inmunofluorescencia, los niveles de LC3-II en los experimentos de mitofagia, las células fueron lavadas e incubadas en medio completo en presencia o en ausencia de CCCP, FCCP o una combinación de oligomicina y antimicina A durante 18 h a 37 °C. Durante las últimas 2 h de tratamiento con los inductores de la mitofagia, las células fueron incubadas en medio completo o en KH, ambos con inhibidores lisosomales. Para inhibir la función lisosomal se utilizó tanto bafilomicina A1 500 nM como las combinaciones de leupeptina 100 µM con NH₄Cl 20 mM o con pepstatina A 1 µM, obteniéndose los mismos resultados. A continuación se fijaron las células y se procedió como se ha descrito en el párrafo anterior, pero utilizando el anticuerpo primario anti-LC3B (1:100). Las imágenes fueron tomadas usando un microscopio confocal SP2 de Leica y las cuantificaciones de fluorescencia se realizaron usando el software MetaMorph de Molecular Devices.

Para el estudio de la degradación de mitocondrias por autofagia se utilizaron tres aproximaciones diferentes, que se describen a continuación.

2.7.3.1. Citometría de flujo para la cuantificación de los niveles de MitoTracker Red

Las células, crecidas hasta semiconfluencia, se incubaron en medio completo con MitoTracker Red 100 nM durante 30 min a 37 °C. A continuación, se lavaron tres veces con PBS para eliminar el exceso de fluoróforo y se trataron o no con CCCP 10 µM, FCCP 10 µM o la combinación de oligomicina y antimicina A, 10 µM y 1 µM respectivamente, en medio completo durante 18 h a 37 °C. Tras este tratamiento, las células se recogieron por tripsinización, se lavaron dos veces con PBS a 0-4 °C y se resuspendieron (10⁶ células/ml) en 500 µl de BSA al 1 % en PBS a 0-4 °C. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta el momento de ser analizadas. La fluorescencia emitida fue cuantificada mediante citometría de flujo (λ de excitación/emisión: 579/599). Se realizaron tres experimentos independientes y los valores de fluorescencia se obtuvieron a partir de 10.000 células por cada tipo celular y condición.

2.7.3.2. Western-blot para medir los niveles de LC3-II y de proteínas mitocondriales

Para la detección y cuantificación mediante Western-blot de los niveles de LC3-II y de las proteínas mitocondriales que se especifican en los resultados, las células se incubaron en medio completo en presencia o ausencia de CCCP 10 μ M, FCCP 10 μ M o la combinación de oligomicina y antimicina A, 10 μ M y 1 μ M respectivamente, durante 18 h a 37 °C. Durante las últimas 2 h de tratamiento con los agentes inductores de la mitofagia, las células fueron incubadas en medio completo o en KH. Para analizar los niveles de LC3-II se utilizaron además inhibidores lisosomales, que impiden la degradación por los lisosomas de la proteína lipídada LC3-II. Finalizada la incubación, las células se recogieron a 0-4 °C con tampón RIPA suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, aprotinina 1 μ g/ml, EDTA 2 mM, pepstatina A 1 μ g/ml y leupeptina 1 μ g/ml). Se hicieron siete ciclos de hielo-vórtex cada 5 min y los extractos se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes de esa centrifugación, se cuantificó la concentración de proteínas y se analizaron 75 μ g de proteína de cada muestra mediante SDS-PAGE. Los geles de poliacrilamida fueron del 15 % para la LC3-II y del 12 % para las proteínas mitocondriales. La transferencia electroforética se realizó como se describe en el apartado correspondiente (apartado 2.4.), empleando después los anticuerpos indicados en cada experimento. Las bandas resultantes fueron analizadas mediante densitometría, utilizando un densitómetro Amersham Imager y el software Image Quant ECL (GE Healthcare Life Sciences), siempre dentro del rango lineal de respuesta de cada anticuerpo.

2.7.3.3. Microscopía de fluorescencia para el estudio de la colocalización de mitocondrias y lisosomas

Para investigar la colocalización de mitocondrias y de lisosomas mediante microscopía de fluorescencia, las células se hicieron crecer sobre cubreobjetos y se incubaron con MitoTracker Red 100 nM durante 30 min a 37 °C. Después, se lavaron las células con PBS y se trataron o no con CCCP 10 μ M, FCCP 10 μ M o la combinación de oligomicina y antimicina A, 10 μ M y

1 μ M respectivamente, en medio completo durante 18 h. Durante las últimas 2 h de estos tratamientos con los inductores de la mitofagia, las células fueron incubadas con inhibidores lisosomales. A continuación, las células fueron fijadas, permeabilizadas y bloqueadas, tal y como se detalla en el apartado de 2.3. de esta sección. Posteriormente, las células fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal anti-LAMP2 (dilución 1:100). Después, las células fueron lavadas cuatro veces con PBS e incubadas con un anticuerpo frente a ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (1:400), durante 1 h a 22 °C. Finalmente, las células se lavaron varias veces con PBS y los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos usando FluorSave™. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Observer Z1 y las imágenes fueron tomadas usando un microscopio confocal SP2 de Leica. La cuantificación de las colocalizaciones se realizó usando el software MetaMorph versión 7.0 de Molecular Devices. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado, analizando un total de 40 células por cada condición ensayada.

Para estudiar la colocalización de mitocondrias y lisosomas también se utilizó, junto al anticuerpo que reconoce a la proteína lisosomal LAMP2, el anticuerpo primario anti-TOM20 (dilución 1:300), que reconoce esta proteína de la membrana externa mitocondrial, como alternativa al uso del MitoTracker Red.

2.8. Estudio del transporte núcleo-citoplasma de la laforina

2.8.1. Entrada al núcleo

Para estudiar la entrada de la laforina al núcleo, se transfectaron transitoriamente las células HT-1080 con el plásmido que permite la expresión de la laforina conjugada con la proteína roja fluorescente (RFP-laforina). En ocasiones, y cuando así se indica, este plásmido se cotransfectó con otro plásmido (EYFP-Bimax), que permite la expresión del péptido Bimax2 conjugado con la proteína amarilla fluorescente. Tras 48 h, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en medio completo con o sin glucosa durante 8 h.

Una vez verificada la entrada de la laforina al núcleo por microscopía de fluorescencia (ver último párrafo del siguiente apartado), se estudió por ese mismo procedimiento la posible relevancia de una NLS de la laforina que se identificó “in silico” a partir del análisis informático con los programas indicados en el apartado 1.11. Como control, se empleó la NLS del virus SV40 y ambas secuencias se conjugaron con la de la proteína EYFP. En este caso, para analizar el transporte nuclear de la laforina también se sobreexpresaron transitoriamente durante 48 h las proteínas en células HT-1080.

2.8.2. Salida del núcleo

Para estudiar la salida de la laforina del núcleo, en primer lugar se transfectaron transitoriamente células HT-1080 sembradas en 6 pocillos y por triplicado en placas de 24 pocillos con el plásmido que permite la sobreexpresión de la laforina conjugada a la proteína roja fluorescente (RFP-laforina). Tras 24 h, las células se trataron o no durante 18 h con KPT-185, un inhibidor de la vía dependiente de CRM1, a una concentración 1 μM en medio completo. Durante las últimas 13 h de este tratamiento, dos de los pocillos (uno de ellos tratado y el otro sin tratar con el inhibidor) se lavaron con PBS y se incubaron primero en medio completo sin glucosa durante 8 h y después en medio con glucosa (4,5 g/l) durante las siguientes 5 h. Como controles, el resto de pocillos se incubaron durante las últimas 8 h de tratamiento con el inhibidor con medio completo en presencia o en ausencia de glucosa.

Las tres secuencias que podían corresponder a NES en la laforina (NES-1-3) y que se identificaron “in silico” a partir del análisis informático con los programas del apartado 1.11. se sobreexpresaron transitoriamente, conjugadas a la proteína EYFP, en células HT-1080. Como control se empleó una NES clásica procedente del inhibidor de proteína quinasas dependiente de cAMP (PKI). Tras 24 h, las células se trataron o no con KPT-185 1 μM durante 18 h. Todos estos experimentos se repitieron utilizando otro inhibidor de CRM1, la leptomicina B, a una concentración 5 nM.

En todas las aproximaciones experimentales para el estudio del transporte de la laforina a través del poro nuclear en uno u otro sentido, se incubaron también las células con Hoechst a una concentración final de 5 µg/ml durante los últimos 30 min de los diferentes tratamientos. Tras dicho tiempo, se tomaron imágenes de fluorescencia *in vivo* de 20 células para cada condición, en el microscopio confocal (valores de 350/461 nm para Hoechst, 555/584 nm para RFP y 512/529 nm para EYFP, excitación/emisión respectivamente). La intensidad de fluorescencia procedente del citoplasma o del núcleo en cada célula individual se cuantificó utilizando el software ImageJ versión k 1.45, de uso público, junto con el paquete de procesado de imágenes Fiji.

2.9. Estudio de la endocitosis

Las vías de endocitosis se pueden clasificar en dos grandes categorías: la fagocitosis y la pinocitosis [165]. Esta última a su vez se puede subdividir en endocitosis de fase fluida, dependiente de clatrina e independiente de clatrina [166].

2.9.1. Endocitosis de fase fluida

El estudio de la endocitosis de fase fluida se llevó a cabo mediante citometría de flujo, basándonos en un método previamente descrito [280]. Brevemente, las células, crecidas hasta semiconfluencia, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 30 min en KH a 37 °C, puesto que en trabajos previos habíamos comprobado que dicho tratamiento estimulaba esta endocitosis. A continuación, se añadió un típico marcador de la endocitosis de fase fluida, el isotiocianato de fluoresceína FITC-dextrano 40S, a una concentración final de 1 mg/ml y las células se incubaron a 37 °C durante los diferentes tiempos que se indican. Tras esa incubación, las células se lavaron dos veces con BSA al 0,1 % en PBS a 4 °C, se tripsinizaron y se centrifugaron a 100 g durante 10 min a 4 °C. Finalmente, se resuspendieron a una concentración de 10⁶ células/ml en BSA al 0,1 % en PBS y a 4 °C, se añadió yoduro de propidio a una concentración final de 6 µg/ml y las células se analizaron por citometría de flujo a las longitudes de

onda de excitación y de emisión de 495 y de 519 nm, respectivamente, cuantificándose la intensidad de fluorescencia del FITC-dextrano presente en las células para cada condición experimental. Se realizaron tres experimentos independientes y se calcularon las medias y las desviaciones estándar (SD) de los valores de fluorescencia. Como inhibidor de la endocitosis de fase fluida se utilizó la metil- β -ciclodextrina a una concentración final de 5 mM.

2.9.2. Endocitosis mediada por receptor

2.9.2.1. Dependiente de clatrina

El estudio por citometría de flujo de la endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina se llevó a cabo basándonos en el procedimiento descrito en [281, 282], utilizando por separado dos sustratos diferentes de la vía, la transferrina y el EGF, ambos conjugados con el fluoróforo AlexaFluor 488. Para ello, los fibroblastos, en semiconfluencia, se lavaron con PBS y se incubaron en KH durante 30 min, ya que se había comprobado previamente que este tratamiento aumenta el tipo de endocitosis estudiada en este apartado.

Para estudiar específicamente la internalización de la transferrina, se añadió AF488-transferrina a una concentración final de 50 μ g/ml durante los tiempos de incubación indicados. Seguidamente, las células se lavaron con BSA al 0,1 % en PBS a 4 °C, se tripsinizaron y se recogieron de nuevo con 0,1 % de BSA en PBS a 4 °C. Posteriormente, los fibroblastos se centrifugaron a 100 g durante 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió con 0,5 ml de BSA al 0,1 % en PBS a 4 °C. Por último, se añadió yoduro de propidio a una concentración final de 6 μ g/ml a cada muestra celular y éstas se analizaron por citometría de flujo con unas longitudes de onda de excitación y de emisión de 495 y 519 nm, respectivamente. Como control negativo de esta endocitosis, las células se incubaron a 4 °C en presencia de un inhibidor de la vía, el clorhidrato de clorpromazina, a una concentración final de 10 μ g/ml.

El estudio de la internalización del EGF se realizó siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado para el estudio de la transferrina, pero añadiendo una solución de AF488-EGF a una concentración final de 2 µg/ml en lugar de la de AF488-transferrina.

En ambos casos se obtuvieron las medias de los valores de fluorescencia de tres experimentos diferentes con muestras por triplicado en cada uno de ellos.

Para estudiar niveles del receptor de EGF (EGFR), total y fosforilado, mediante Western-blot, las células semiconfluentes se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 h en KH. Posteriormente, las células se trataron con EGF humano a una concentración final de 100 ng/ml durante los tiempos indicados. A continuación, se recogieron y se lisaron las células en tampón de lisis para proteínas fosforiladas (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, Nonidet P-40 al 1 % (v/v), glicerol al 20 % (v/v), PMSF 1 mM, leupeptina 100 µM, Na₃VO₄ 2 mM, NaF 100 mM y Na₄P₂O₇ 20 mM) a 4 °C. El anticuerpo específico para la forma fosforilada del EGFR siempre se utilizó primero. Posteriormente, las membranas se trataron con un tampón que produce “stripping” (ver último párrafo del apartado 2.4.) durante 20 min a 22 °C y tras ello se utilizó el anticuerpo que reconoce el EGFR total.

2.9.2.2. Dependiente de caveolas

Brevemente, para el estudio de la endocitosis mediada por caveolas, los fibroblastos se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en KH durante 30 min a 37 °C. A continuación, se añadió un sustrato fluorescente específico de esta vía endocítica, el Bodipy FLC5 (ceramida (N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-boro-3a,4a-diazo-s-indacen-3-pentánil) esfingosina) a una concentración final de 0,5 µM y las células se incubaron a 37 °C durante los tiempos de ensayo que se indican. Se detuvo la internalización del sustrato a los tiempos indicados en la sección de Resultados, lavando las células con BSA al 0,1 % en PBS a 4 °C y manteniendo los fibroblastos en hielo durante el resto del experimento. Las células se analizaron por citometría de flujo a las longitudes de onda de excitación y de emisión de 505 y 620 nm,

respectivamente. A partir de tres experimentos independientes se calcularon las medias \pm SD de la intensidad de fluorescencia cuantificándose 10.000 células por cada condición. Como controles negativos de estos experimentos se incubaron las células a 4 °C (un control negativo válido para todos los tipos de endocitosis mencionados) o se añadió filipina III a una concentración final de 5 μ g/ml durante la incubación en KH.

2.10. Ensayo de la actividad de calpaínas

Para analizar y cuantificar la actividad de las calpaínas en las células se utilizó el “Calpain Activity Assay Kit” (Abcam, ab65308) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los fibroblastos que habían crecido hasta semiconfluencia se tripsinizaron, se realizó un recuento de las células y se centrifugaron 10^6 células por muestra a 100 g durante 6 min. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100 μ l del tampón de extracción del kit. Este tampón de extracción recupera específicamente las proteínas citosólicas sin otros contaminantes celulares, como por ejemplo proteasas lisosomales (un aspecto muy importante porque varias de esas proteasas tienen una sensibilidad a muchos inhibidores similar a la de las calpaínas), y previene también la autoactivación de las calpaínas durante el procedimiento de extracción. Tras una incubación de 20 min en hielo con agitación ocasional, los lisados se centrifugaron a 10.000 g durante 4 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se dejó en hielo durante la determinación de la concentración de proteína mediante el método de Lowry-desoxicolato mencionado en el apartado 2.1. Tras la cuantificación, se tomaron 50 μ g de proteína total de cada muestra y se diluyeron hasta un volumen final de 85 μ l con el tampón de extracción. A cada muestra se le añadieron 10 μ l del tampón de reacción 10x del kit y 5 μ l de un sustrato de calpaínas también procedente del kit. La incubación se realizó a 37 °C en oscuridad para preservar la fluorescencia, que se cuantificó a los tiempos indicados con un espectrómetro M5/SpectraMax de Molecular Devices a las longitudes de excitación y de emisión de 400 nm y 505 nm, respectivamente. Como control negativo y control positivo del experimento se añadieron, respectivamente, un inhibidor de calpaínas y una solución de calpaínas

activas. Ambos reactivos procedían también del kit empleado para estas determinaciones.

2.11. Inmunoprecipitación

Las proteínas conjugadas con los epítopos FLAG o HA se inmunoprecipitaron siguiendo el protocolo previamente descrito por [283]. Para ello, se transfectaron transitoriamente células HEK-293T semiconfluentes con la proteína fusionada con FLAG y se mantuvo la expresión de la proteína durante un tiempo de 48 h. A continuación, las células se lavaron con PBS y se recogieron con tampón de lisis para inmunoprecipitación (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1 %, leupeptina 100 μ M, PMSF 1 mM, pepstatina A 1 μ M, aprotinina 10 μ g/ml, EDTA 5 mM, NaF 50 mM y $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 30 mM, pH 7,4). Los lisados celulares se incubaron en hielo durante 20 min con agitación ocasional y, a continuación, se sonicaron empleando la potencia de 10 W de un sonicador Microson Ultrasonic durante 10 veces con una duración de 10 s cada vez, seguidas de enfriamiento durante 1 min a 0-4 °C. Los lisados resultantes se centrifugaron a 13.000 g durante 10 min a 4 °C y los sobrenadantes de esa centrifugación se incubaron durante 1 h en agitación y a 4 °C con la resina de agarosa sin conjugar (AG-1000) de Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, EE.UU.). Esta resina había sido previamente bloqueada con BSA al 5 % disuelto en el tampón de lisis durante 12 h a 4 °C y en agitación, para reducir la unión inespecífica de proteínas a la misma. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13.000 g durante 1 min y a 4 °C, se recogieron los sobrenadantes, se suplementaron con BSA hasta el 5 % y se incubaron durante 2 h a 4 °C en agitación con la resina conjugada con el anticuerpo anti-FLAG (A2220, Sigma-Aldrich) bloqueada previamente en las mismas condiciones que la resina de agarosa sin conjugar. A continuación, se centrifugaron los extractos a 13.000 g durante 1 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y la resina se resuspendió y se lavó cuatro veces con tampón de lisis para inmunoprecipitación, pero aumentando la concentración de NaCl hasta 450 mM y durante un periodo de 15 min a 4 °C en agitación. Estos cuatro lavados se realizan para aumentar la especificidad de la unión a la resina. Por último, se llevó a cabo un lavado adicional con tampón de

elución (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0,1 %, glicerol 15 %, EDTA 0,2 mM, pH 7,4) para equilibrar la resina. Una vez lavada, la resina se incubó de nuevo con tampón de elución suplementado con 500 µg/mL del péptido FLAG (F3290, Sigma-Aldrich) durante 2 h a 4 °C y en agitación, para eluir, por competición con el péptido, las proteínas unidas al anticuerpo anti-FLAG. Finalmente, se centrifugó la resina a 13.000 g durante 1 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante, donde se encuentran las proteínas que habían inmunoprecipitado anteriormente. Este paso de elución se repitió dos veces más para asegurar la completa liberación de las proteínas específicamente unidas a la resina. El eluido resultante se hizo pasar a través de columnas de exclusión molecular provistas de un filtro de acetato de celulosa con poros de 0,45 µm (Thermo Fisher Scientific), para separar la resina de las proteínas inmunoprecipitadas. Para inmunoprecipitar las proteínas conjugadas al epítipo HA se siguió el mismo protocolo descrito, utilizándose en este caso una resina anti-HA agarosa (26181, Thermo Scientific) y una concentración de péptido HA (I2149, Sigma-Aldrich) de 1 mg/ml.

2.12. Cromatografía líquida y espectrometría de masas

Las proteínas inmunoprecipitadas, obtenidas tal y como se detalla en el apartado anterior, se analizaron por cromatografía líquida y por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Para ello, las proteínas eluidas de la resina anti-FLAG (ver apartado 2.11.), se separaron por SDS-PAGE en geles unidimensionales discontinuos del 10 al 20 % de poliacrilamida. A continuación, los geles resueltos se enviaron a la Sección de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València para su posterior procesamiento. En primer lugar, los geles se tiñeron con plata, utilizando el “Pierce™ Silver Stain Kit” (Thermo Fisher Scientific) para visualizar las diferentes bandas resueltas. Se compararon las muestras y se seleccionaron las bandas diferenciales que se encontraban presentes en la inmunoprecipitación de la laforina con respecto al control de GFP. Las bandas se cortaron utilizando un bisturí, se digirieron con tripsina [284, 285] y se cargaron en una columna analítica de cromatografía líquida (NanoLC Column, 3 µm C18-CL, 75 µm

durante 15 cm; Eksigen) para separar los diferentes péptidos y analizarlos en un espectrómetro de masas (Nano ESI qTOF (5600 TripleTOF), AB Sciex, Framingham, MA). Las proteínas correspondientes a los péptidos analizados se identificaron y cuantificaron utilizando el programa ProteinPilot™ Software versión 4.5 (AB Sciex) y la base de datos de ExPasy como referencia. Sólo se incluyeron en los estudios posteriores las proteínas representadas por al menos tres péptidos con un porcentaje de confianza ≥ 95 % y con una puntuación >50 (minimum overall MASCOT score >50).

2.13. Estudio de la vida media de la laforina

Para estudiar la vida media de la laforina mediante Western-blot, las células se dejaron crecer hasta semiconfluencia y se trataron con CHX (100 $\mu\text{g/ml}$) en medio completo y en presencia o en ausencia de glucosa según el caso, a 37 °C durante los tiempos indicados. Las células se lavaron con CHX (100 $\mu\text{g/ml}$) en PBS, se recogieron y se lisaron en tampón RIPA, suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas, mediante siete ciclos de agitación en vórtex/hielo de 5 min cada vez. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4 °C y la concentración de proteína de los sobrenadantes se determinó por el método de Lowry modificado. Se cargaron 75 μg de proteína de cada muestra en un gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 12 %. Las bandas detectadas con el anticuerpo anti-laforina fueron cuantificadas mediante densitometría en un escáner Amersham Imager con el software ImageQuant TL v8.1.0.0.

2.14. Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS)

Las células (HeLa y COS-7 en este caso concreto) se hicieron crecer sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro que estaban situados en placas de 24 pocillos y, una vez alcanzada una confluencia de aproximadamente el 80 %, se fijaron con una solución de metanol:acetona (1:1) durante 6 min a -20 °C. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el fijador y las preparaciones se dejaron secar al aire durante 20 min. Después, fueron rehidratadas y lavadas con PBS y, según el caso, fueron tratadas o no con diastasa 0,5 % durante 15 min a 37 °C. Se realizó un lavado con PBS y las preparaciones se incubaron en una solución de ácido peryódico al 0,5 % a 22 °C durante

30 min. A continuación, los cubreobjetos se lavaron con agua corriente y se incubaron con el reactivo de Schiff a 22 °C durante 25 min. Una vez finalizada esta incubación, los cubreobjetos se lavaron con agua corriente y se incubaron con una solución de hematoxilina (1 mg/ml) durante 3 min. El exceso de colorante se eliminó mediante lavados con agua corriente y las preparaciones se dejaron secar al aire durante 20 min. Finalmente, las células se incubaron en xilol 100 % durante 1 min y se montaron rápidamente sobre portaobjetos con el medio de montaje DPX. Las células fueron observadas en un microscopio Zeiss Observer Z1 y se tomaron 30 imágenes de cada muestra.

2.15. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos para determinar la significancia de las diferencias encontradas entre pares de muestras se llevó a cabo mediante la *t* de Student de dos colas, utilizando la versión 5.0 del software estadístico Graph Pad Prism de Graph Pad Software. Para comparaciones de más de dos muestras se utilizó el test de ANOVA de un factor, con análisis post hoc de Tukey. Los valores mostrados representan la media y la SD de, al menos, tres experimentos independientes. Se consideraron significativas las diferencias con los niveles siguientes: * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ y *** $P < 0,0001$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Alteraciones en la autofagia y en otros procesos lisosomales y no lisosomales

1.1. Vía autofagia-lisosomas

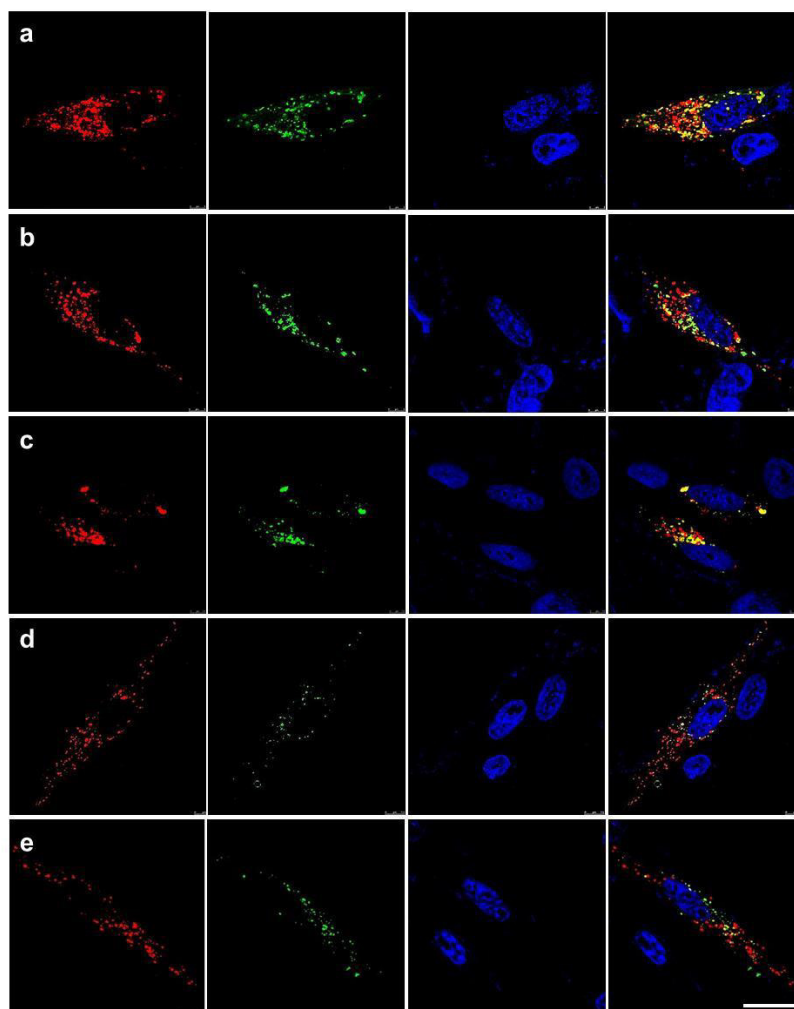
1.1.1. Determinación de la actividad autofágica con el marcador ptf-LC3

Como ya se ha comentado en la Introducción, la macroautofagia es un proceso que sigue una secuencia de varios pasos. Brevemente, tras la inducción de la macroautofagia, porciones de citoplasma, que pueden incluir orgánulos enteros, son rodeadas por una doble membrana. Ésta se cierra formando un pre-lisosoma, el autofagosoma, que secuestra así el material que va a degradarse. Posteriormente, los autofagosomas adquieren las enzimas hidrolíticas lisosomales y la bomba de protones por fusión con lisosomas y/o endosomas y forman un tipo de lisosomas, los autolisosomas, que se acidifican y donde finalmente ocurre la completa digestión de los orgánulos y macromoléculas que fueron secuestrados [123].

Para ampliar la información sobre las alteraciones observadas en la macroautofagia [75, 93-95], identificando el paso del proceso que estaba afectado en LD, se utilizaron fibroblastos humanos transfectados de forma transitoria con la construcción ptf-LC3. Ésta expresa la proteína LC3 fusionada con dos fluoróforos situados en tándem en su extremo amino terminal (mRFP-EGFP-LC3) y resulta muy útil para seguir el proceso de maduración de los autofagosomas [135]. Esto se debe a que en los lisosomas la fluorescencia de EGFP, pero no la de mRFP que es más estable, se reduce por el pH ácido y las condiciones degradativas existentes en estos orgánulos, mientras que esto no ocurre en los pre-lisosomas. De esta manera, los autofagosomas muestran las dos fluorescencias, roja y verde, mientras que la segunda se pierde progresivamente al acidificarse los autolisosomas, quedando así únicamente la roja. De esta forma, puede determinarse si la fusión de los autofagosomas con los lisosomas y/o endosomas se encuentra alterada. Como se observa en la **figura 10A**, la fluorescencia en su conjunto es menor en los fibroblastos deficientes en laforina y en los deficientes en malina que en los fibroblastos control, mostrándose pues menores niveles

de LC3 en los pacientes con LD. Además, en todas las líneas celulares existe un patrón similar entre las fluorescencias roja y verde, lo que se aprecia en las imágenes de colocalización (amarillo) en las que no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de colocalización de dichas fluorescencias entre fibroblastos control y de pacientes con LD (**Fig 10B**). Por tanto, en los fibroblastos de pacientes con LD no parece estar alterada la fusión de los autofagosomas con los lisosomas y/o endosomas, lo que concuerda con los resultados previos de nuestro grupo, que indican que la disminución de la autofagia en los modelos de LD se debe a una menor formación de los autofagosomas.

A



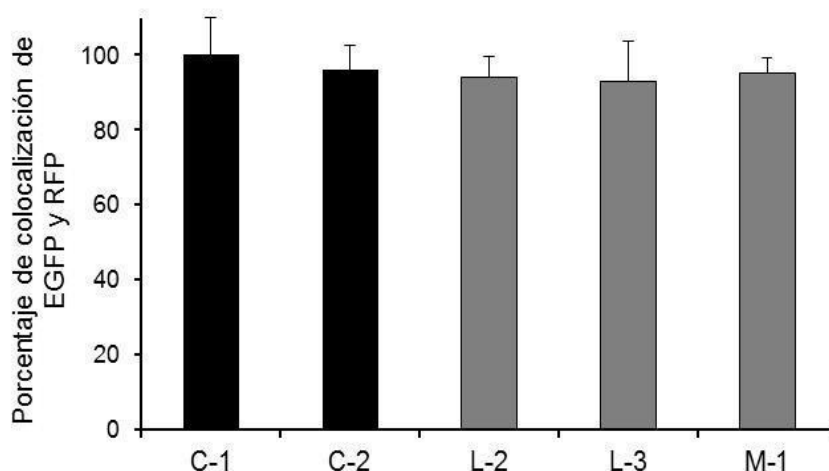
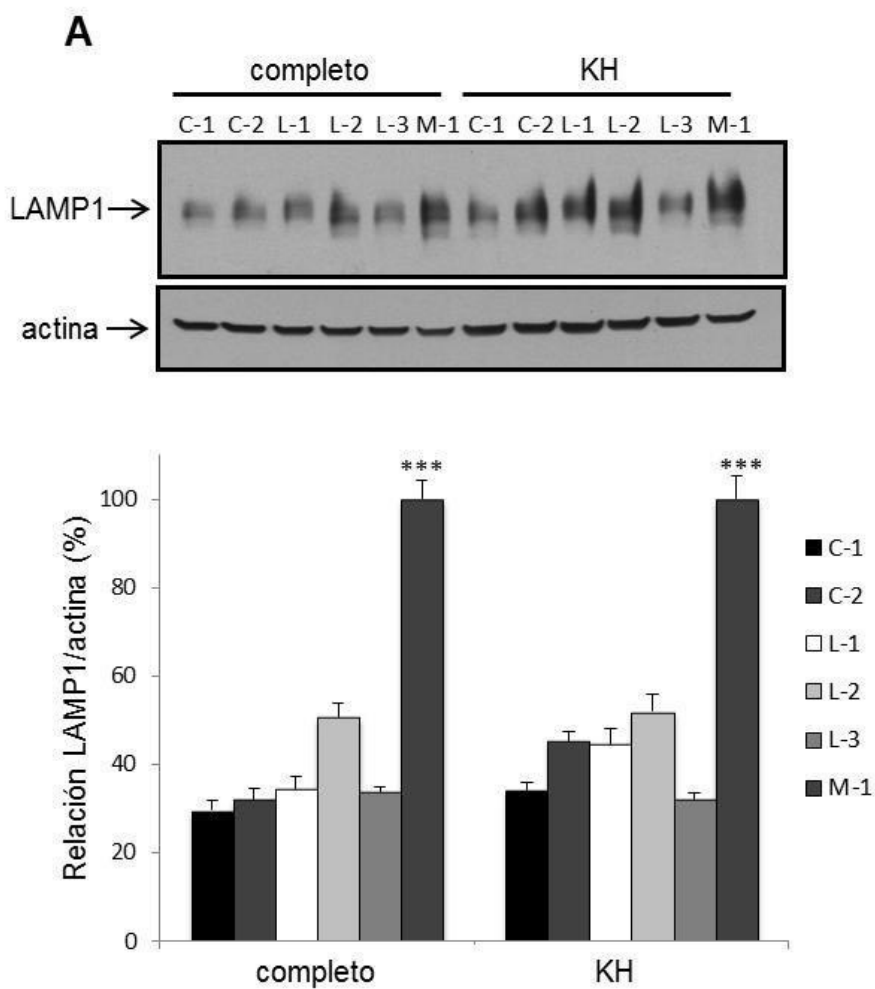
B

Figura 10. La fusión de los autofagosomas con lisosomas y/o endosomas no parece estar alterada en los fibroblastos de pacientes con LD. Fibroblastos humanos control (C-1 y C-2, **a** y **b**, respectivamente), deficientes en laforina (L-2 y L-3, **c** y **d**, respectivamente) y deficientes en malina (M-1, **e**) se transfearon transitoriamente con la construcción mRFP-EGFP-LC3. Tras 48 horas de sobreexpresión, las células se incubaron durante 2 h en KH con inhibidores lisosomales (leupeptina 100 μ M y pepstatina A 1 μ M). En la figura (**A**) se muestran imágenes de fluorescencia representativas. Las fluorescencias roja y verde corresponden a la proteína LC3 conjugada con RFP y EGFP, respectivamente, en azul los núcleos, y la combinación de las imágenes se muestra a la derecha. En el histograma (**B**) se cuantifica la colocalización de la RFP y la EGFP utilizando el software Metamorph. Los valores corresponden a las medias y SD, analizando un total de 40 células para cada línea celular en tres experimentos independientes. Barra: 20 μ m.

1.1.2. Cuantificación de la masa lisosomal

También se analizaron por Western-blot los niveles de las dos principales proteínas de la membrana lisosomal LAMP1 y LAMP2. Cabe destacar que se encontraron unos niveles significativamente mayores de ambas proteínas lisosomales, LAMP1 y LAMP2 (**Fig. 11A y B**, respectivamente), en los fibroblastos humanos de pacientes deficientes en malina con respecto a los controles y a los deficientes en laforina. Estos resultados se obtuvieron tanto en células incubadas en medio completo como en KH durante 4 h. Esto nos sugiere que, al igual que se ha postulado para la laforina, en base a la filogenia de ambas proteínas la malina podría

tener también funciones adicionales independientes de la laforina como en este caso en lisosomas.



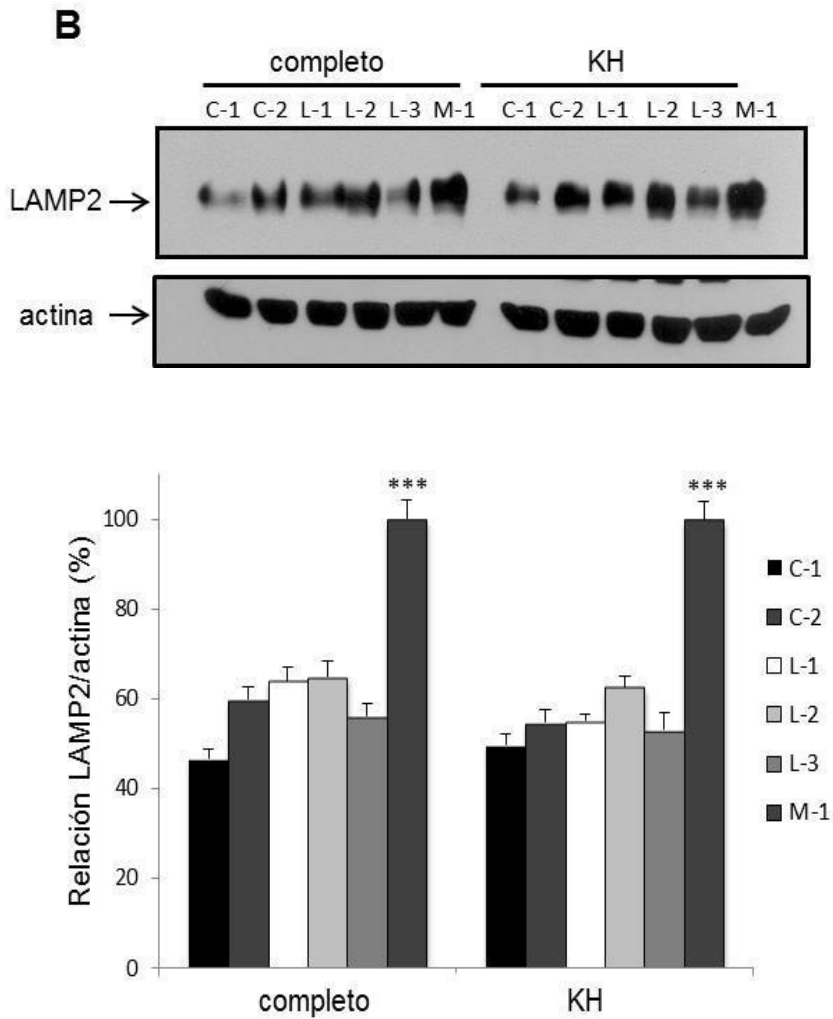


Figura 11. Niveles de LAMP1 y LAMP2 en fibroblastos humanos control y de pacientes con LD. Fibroblastos humanos control (C-1 y C-2) y de pacientes con LD (deficientes en laforina (L-1, L-2 y L-3) y deficientes en malina (M-1)) se incubaron en medio completo o KH durante 4 h. Las células se recogieron y lisaron con RIPA 1x suplementado con un cóctel de inhibidores lisosomales. Los extractos preclarificados (75 µg) se analizaron mediante Western-blot. En la figura se muestran inmunoblots representativos de las membranas incubadas con los anticuerpos anti-LAMP1, anti-LAMP2 y anti-actina. Las bandas fueron cuantificadas por densitometría y los valores de LAMP1 (A) y LAMP2 (B) se normalizaron frente a los correspondientes de actina. Los valores obtenidos que se muestran en los correspondientes histogramas se calcularon como porcentaje respecto al valor más alto. Los valores corresponden a las medias de tres experimentos independientes y las barras indican la SD (***) $P < 0,0001$.

Aunque la macroautofagia está disminuida en los fibroblastos de pacientes deficientes en malina, este aumento en la cantidad de proteínas lisosomales podría ser debido a que en estas células hay una mayor producción de lisosomas primarios.

1.1.3. Análisis de la mitofagia en los modelos celulares de LD

1.1.3.1. Estudio de la mitofagia en fibroblastos humanos control y de pacientes con LD

En muchos trastornos neurodegenerativos se han descrito diferentes alteraciones en las funciones mitocondriales [141]. Estos trastornos son principalmente debidos a la elevada dependencia que tienen las neuronas del metabolismo energético oxidativo [142]. De hecho, en el caso de LD, la función mitocondrial está alterada en diversos modelos de la enfermedad, observándose en ellos una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y en los niveles de ATP, así como un mayor estrés oxidativo debido tanto al aumento en la producción de ROS como a la disminución en la respuesta de las enzimas que forman parte de la defensa antioxidante [286, 287]. En estos mismos modelos de LD también se observa una alteración en la macroautofagia (que a partir de ahora nos referiremos, simplemente como autofagia) a nivel de la formación de autofagosomas [75, 93, 95]. Actualmente se desconoce por qué está disminuida la autofagia y si esta disminución es la responsable de los síntomas en LD e incluso se ha postulado que el defecto en la autofagia en la enfermedad, que también se ha observado por otros laboratorios, podría ser secundario a la acumulación de glucógeno [96, 288]. En cualquier caso y para tratar de relacionar los defectos en la función mitocondrial con los defectos en autofagia en LD, hemos investigado aquí si la disfunción mitocondrial descrita en esta enfermedad podría ser una consecuencia de un defecto en la degradación específica de mitocondrias por autofagia, también conocida como mitofagia [153, 289], para lo que investigamos en primer lugar si este proceso estaba alterado en LD.

Para estudiar de manera específica la mitofagia en LD hemos empleado diferentes agentes que afectan a la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS) y que han sido ampliamente utilizados, como el carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP), el carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), la oligomicina y la antimicina A [290]. En mamíferos estos inhibidores inducen una degradación selectiva de las mitocondrias alteradas, es decir, incrementan la mitofagia, mientras que otros orgánulos como los peroxisomas no se ven alterados [291]. Aunque el CCCP y el FCCP (ambos funcionan como desacopladores de la fosforilación oxidativa mitocondrial) son los compuestos más ampliamente utilizados para estudiar la mitofagia, se ha descrito que dichos compuestos, además de ocasionar una despolarización de la membrana mitocondrial, también pueden despolarizar la membrana plasmática celular [292, 293]. Por este motivo, para confirmar los resultados que se obtuvieron utilizando el CCCP (10 μ M) o el FCCP (10 μ M), se repitieron los mismos experimentos pero utilizando una combinación de inhibidores específicos de complejos de la cadena mitocondrial: la oligomicina (10 μ M), que es un inhibidor del complejo V o ATP sintasa mitocondrial y la antimicina A (1 μ M), que es un inhibidor del complejo III mitocondrial. Los resultados obtenidos se detallan en los siguientes apartados.

1.1.3.1.1. Los fibroblastos de pacientes con LD presentan una alteración en la formación de autofagosomas inducida con inhibidores mitocondriales

En primer lugar se confirmó en fibroblastos control el efecto de los inhibidores empleados sobre la morfología mitocondrial. Para ello, las células se incubaron con MitoTracker Red y se trataron con CCCP, FCCP o con una combinación de oligomicina y antimicina A. En la **figura 12** se aprecia que todos los tratamientos provocan un cambio en la red mitocondrial, que pasa de mostrar un aspecto tubular a tener una morfología fragmentada. Este cambio es claramente indicativo de una alteración en la función mitocondrial inducida por estos tratamientos (véase, por ejemplo, referencia [294]).

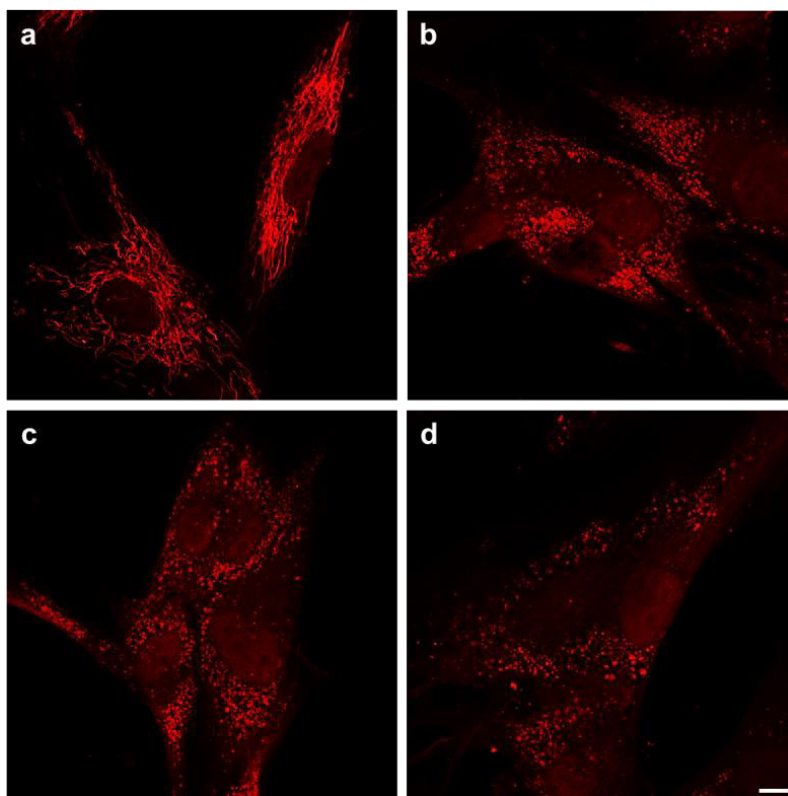
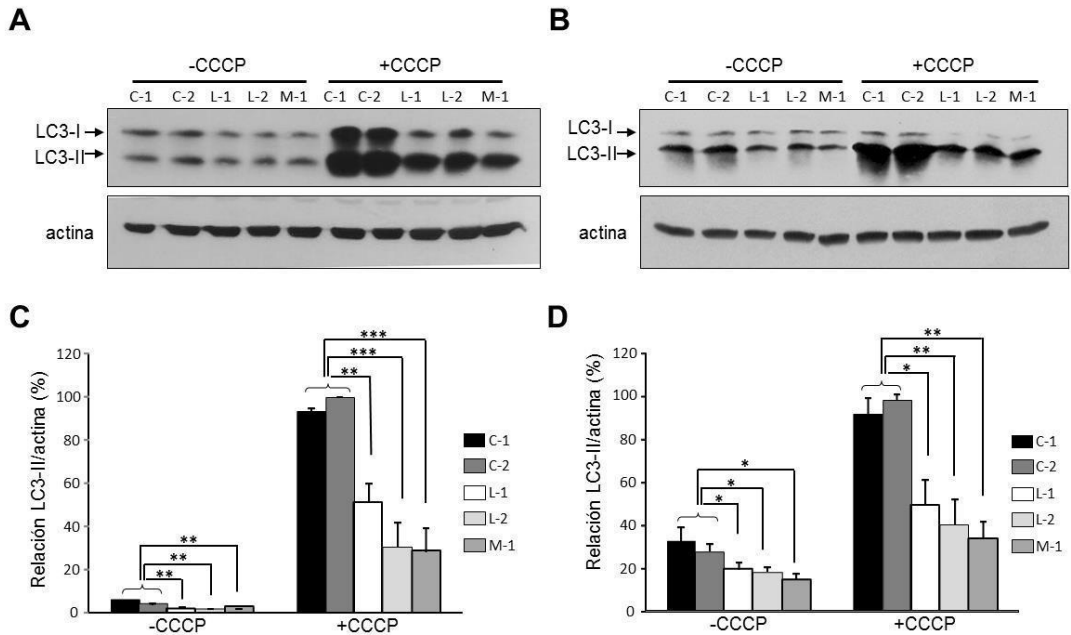


Figura 12. Efectos del tratamiento con CCCP, FCCP o con oligomicina y antimicina A sobre la morfología mitocondrial en fibroblastos humanos. Los fibroblastos control marcados con MitoTracker Red 100 nM durante 30 min a 37 °C se incubaron durante 18 h en ausencia (a) o en presencia de CCCP 10 μ M (b), de FCCP 10 μ M (c) o de oligomicina 10 μ M y antimicina A 1 μ M (d). Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia. La red mitocondrial de las células no tratadas (a) aparece fragmentada tras el tratamiento con CCCP (b), FCCP (c) u oligomicina y antimicina A (d). Barra: 10 μ m.

A continuación, y para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos (CCCP, FCCP y oligomicina y antimicina A) sobre la autofagia, utilizamos el marcador LC3-II, cuyos niveles en presencia de inhibidores lisosomales se correlacionan bien, bajo ciertas condiciones, con la cantidad de vacuolas autofágicas presente en las células [295]. Para ello, fibroblastos control y de pacientes con LD se analizaron por Western-blot después del tratamiento durante 18 h con CCCP, FCCP u oligomicina y antimicina A, añadiendo durante las últimas 2 h los inhibidores lisosomales. Como control, las células se incubaron durante 2 h en KH (adicionado con inhibidores lisosomales), ya que en estas condiciones de ayuno se estimula

la autofagia. Como se muestra en la **figura 13**, en fibroblastos humanos control (C-1 y C-2) el tratamiento con CCCP u oligomicina y antimicina A (OA) aumentó los niveles de LC3-II en las dos condiciones de cultivo utilizadas, medio completo (A y E) y KH (B y F). Este aumento en todas las condiciones probablemente refleja la inducción de la mitofagia ya descrita en otros tipos celulares (véase, por ejemplo, la referencia [296]).

En los fibroblastos de pacientes con LD (L-1 y L-2, deficientes en laforina, y M-1, deficiente en malina) se observaron, en ausencia de los tratamientos anteriores, unos niveles de LC3-II inferiores a los de los controles, lo que confirma la disminución en la formación de vacuolas autofágicas descrita por nuestro laboratorio con anterioridad [75, 93, 95]. Aunque el tratamiento con agentes inductores de la mitofagia aumentó los niveles de LC3-II tanto en los fibroblastos control como en los de pacientes con LD, ese aumento fue menor en estos últimos y esto se observó tanto en medio completo como en KH (**Fig. 13**).



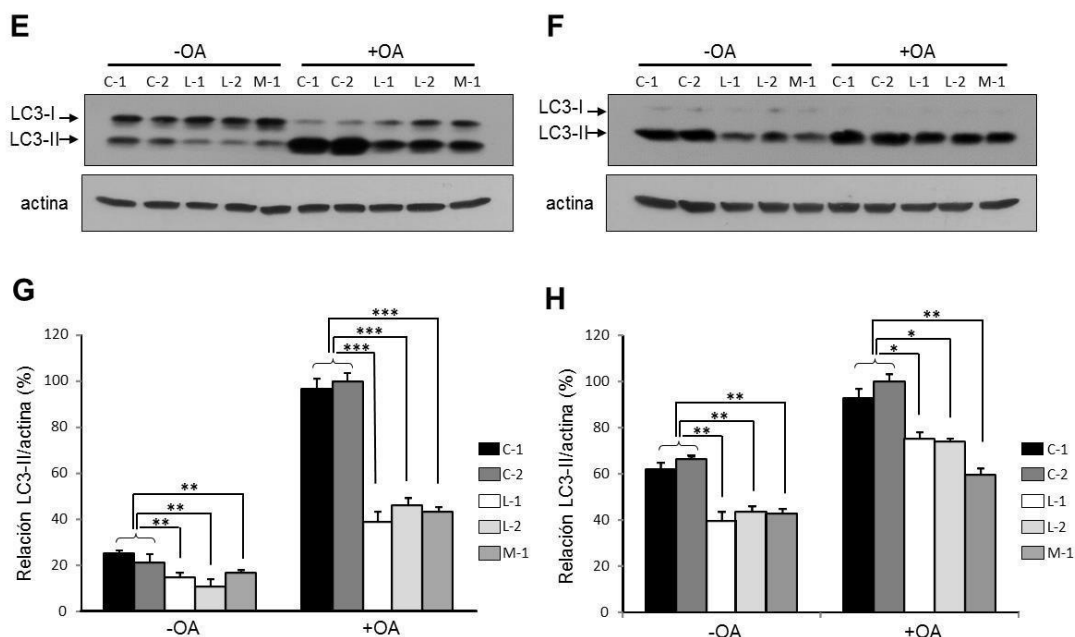
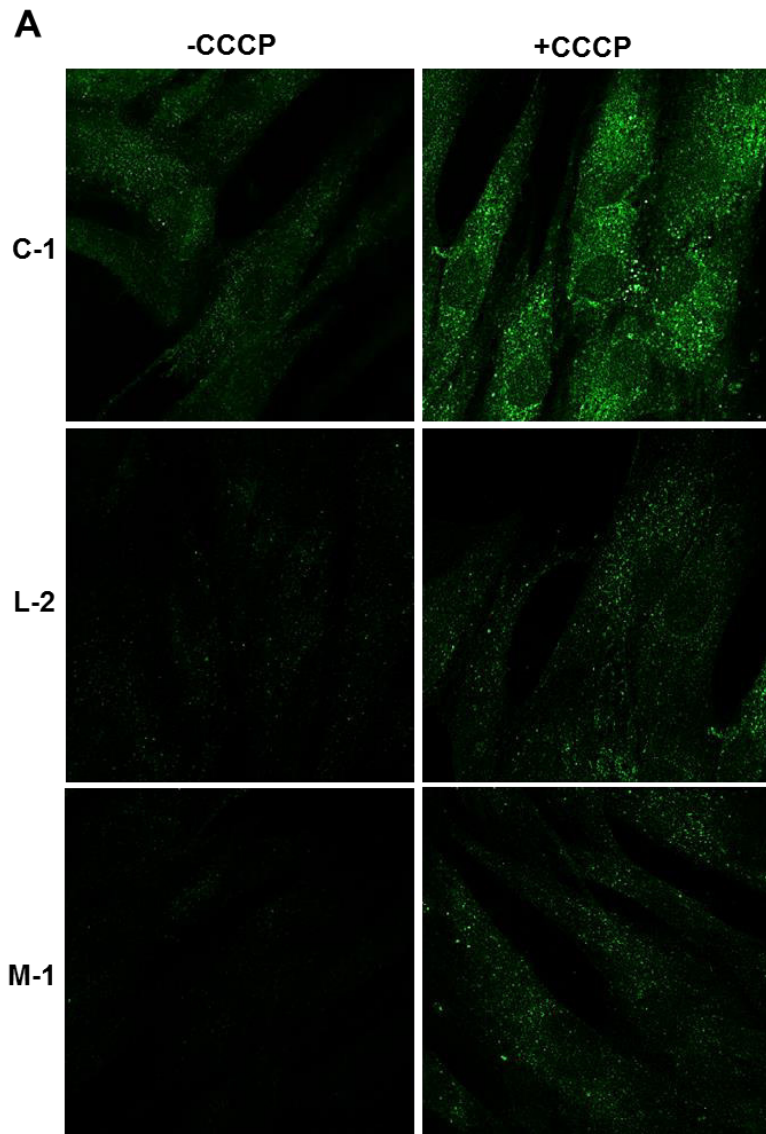


Figura 13. Efecto del tratamiento con CCCP u oligomicina y antimicina A sobre los niveles de LC3-II en los fibroblastos control y de pacientes con LD. Los fibroblastos control (C-1 y C-2), los deficientes en laforina (L-1 y L-2) y los deficientes en malina (M-1) se incubaron en medio completo sin (-CCCP, -OA) o con (+CCCP, +OA) CCCP 10 μ M u oligomicina 10 μ M y antimicina A 1 μ M durante 18 h. Durante las últimas 2 h de tratamiento las células se incubaron en medio completo (A y E) o en KH (B y F) con inhibidores lisosomales (cloruro amónico 20 mM y leupeptina 100 μ M). Las células se recogieron en el tampón RIPA, se lisaron y las muestras (75 μ g de proteína) se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida. En la figura se muestran imágenes representativas de las membranas incubadas con los anticuerpos anti-LC3 y anti-actina. En el histograma (C y G, para medio completo; D y H, para KH) se representan las medias y las desviaciones estándar de la relación de LC3-II/actina de cinco experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al valor más alto obtenido en los fibroblastos control. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los fibroblastos control (* P <0,01; ** P <0,001; *** P <0,0001).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de LC3-II entre las células deficientes en laforina y malina, indicando que el defecto en la autofagia está presente en fibroblastos mutados tanto en el gen *EPM2A* como en el *EPM2B*. Resultados similares se obtuvieron utilizando CCCP, oligomicina y antimicina A o FCCP (resultados no mostrados).

Estos resultados fueron coherentes con los datos obtenidos en los experimentos, que se realizaron en paralelo, de microscopía de fluorescencia con el marcador de vacuolas autofágicas LC3. Los fibroblastos

control (C-1) y de pacientes con LD (L-2 y M-1), tras el tratamiento en medio sin (-CCCP) o con (+CCCP) CCCP 10 μ M, se incubaron con un anticuerpo anti-LC3 y un anticuerpo secundario fluorescente. Como se observa en la **figura 14**, el tratamiento con CCCP provocó un aumento de la autofagia tanto en medio completo (A) como en KH (B), siendo los niveles de fluorescencia más elevados en los fibroblastos humanos controles (C-1) que en los de pacientes con LD (L-2 y M-1) en todas las condiciones ensayadas. Además, no se observaron diferencias significativas en los niveles de fluorescencia entre las distintas líneas de fibroblastos con LD. Por tanto, aunque estos tratamientos con CCCP están estimulando la autofagia, el aumento fue menor de forma consistente en los fibroblastos de pacientes con LD.



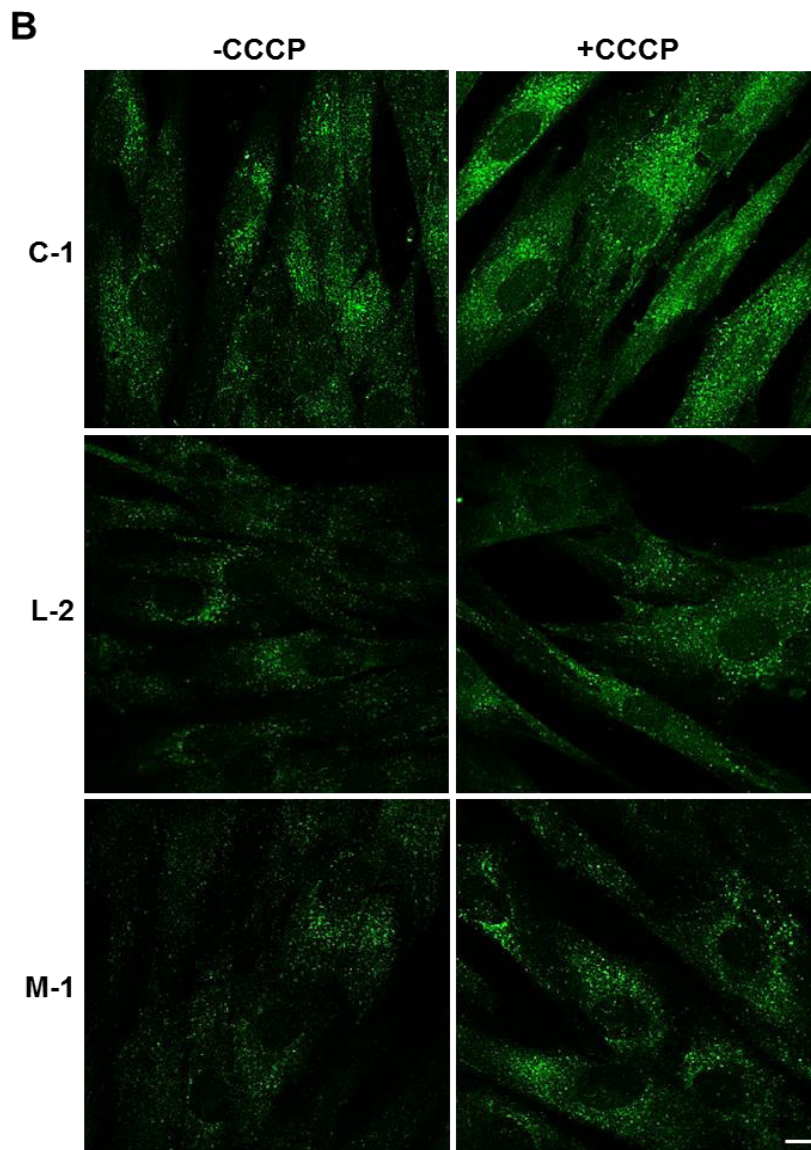


Figura 14. Efecto del tratamiento con CCCP sobre la cantidad de vacuolas autofágicas en fibroblastos control y de pacientes con LD analizado mediante fluorescencia. Los fibroblastos humanos control (C-1), los deficientes en laforina (L-2) y los deficientes en malina (M-1) se incubaron en medio completo sin (-CCCP) o con (+CCCP) CCCP 10 μ M durante 18 h. Durante las últimas 2 h de tratamiento las células se incubaron en medio completo (A) o en KH (B) con inhibidores lisosomales (leupeptina 100 μ M y pepstatina A 1 μ M). Se muestran imágenes de fluorescencia representativas de la inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-LC3. Barra: 10 μ m.

1.1.3.1.2. La degradación de las mitocondrias está reducida en fibroblastos de pacientes con LD tras el tratamiento con CCCP, FCCP u oligomicina y antimicina A

Para medir la degradación mitocondrial se utilizan diferentes aproximaciones. Una de ellas es el análisis de la disminución en la intensidad de fluorescencia de células marcadas con MitoTracker [297], disminución que puede ser seguida mediante citometría de flujo [298]. Por lo tanto, y para ver si la alteración en la autofagia tras el tratamiento con CCCP, FCCP u oligomicina y antimicina A, anteriormente descrita, estaba también acompañada por una degradación defectuosa de las mitocondrias, incubamos las células con MitoTracker Red durante 30 min y mediante citometría de flujo medimos la intensidad de fluorescencia tras un período de 18 h de incubación con los inhibidores mitocondriales en ausencia del fluoróforo. En estas condiciones experimentales el MitoTracker, ya internalizado, permanece retenido en las mitocondrias tras la alteración mitocondrial que produce el tratamiento con estos inhibidores [298]. En las células no tratadas observamos de forma consistente que en los fibroblastos de pacientes con LD (**Fig. 15c**) existe una menor fluorescencia de MitoTracker Red en comparación con los fibroblastos control (**Fig. 15a**), probablemente debido a la ligera disminución en el potencial de membrana mitocondrial ya observado con tetrametilrodamina-metil-éster en fibroblastos de pacientes con LD [286].

Para investigar la degradación específica de las mitocondrias inducida por CCCP, se calculó el porcentaje de disminución de fluorescencia tras restar la fluorescencia en las células tratadas con CCCP de la fluorescencia en las mismas células incubadas en paralelo y durante el mismo tiempo, pero en ausencia del desacoplante (**Fig. 15B**). Estos cálculos mostraron que la señal de fluorescencia del MitoTracker Red después del tratamiento con CCCP sólo se redujo en un 36 % en los fibroblastos de pacientes con LD frente al 51 % de reducción observada en los fibroblastos control. Esto sugiere que en las células de pacientes con LD la degradación específica de las mitocondrias alteradas tras el tratamiento con los

inductores de mitofagia está disminuida. Resultados similares se obtuvieron con FCCP y oligomicina y antimicina A (datos no mostrados).

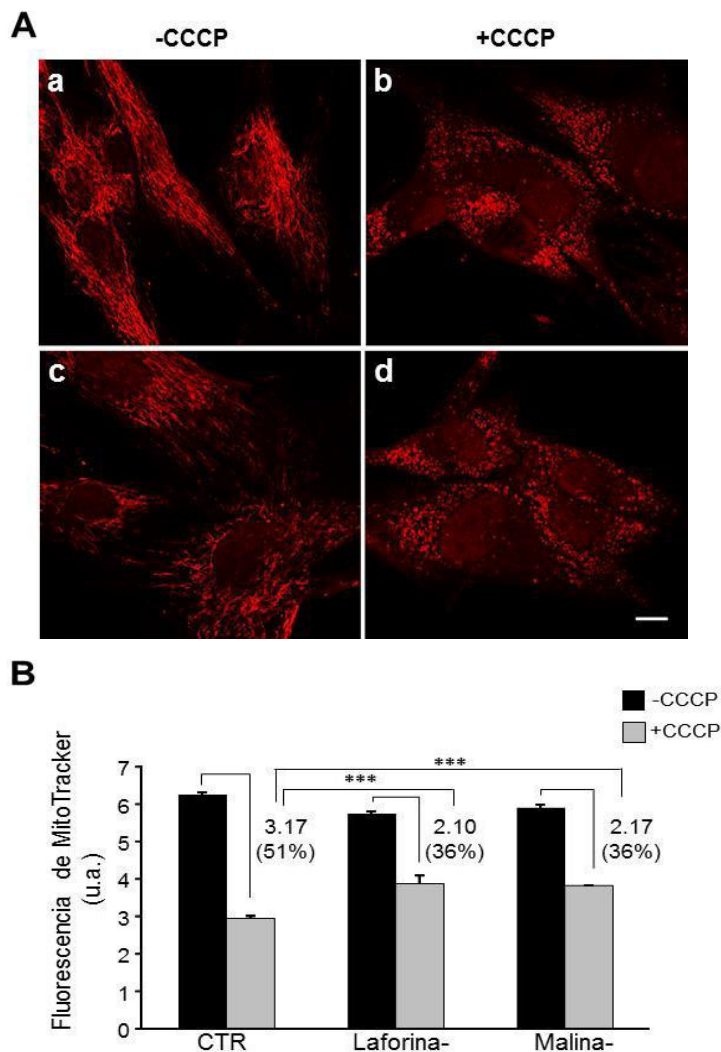
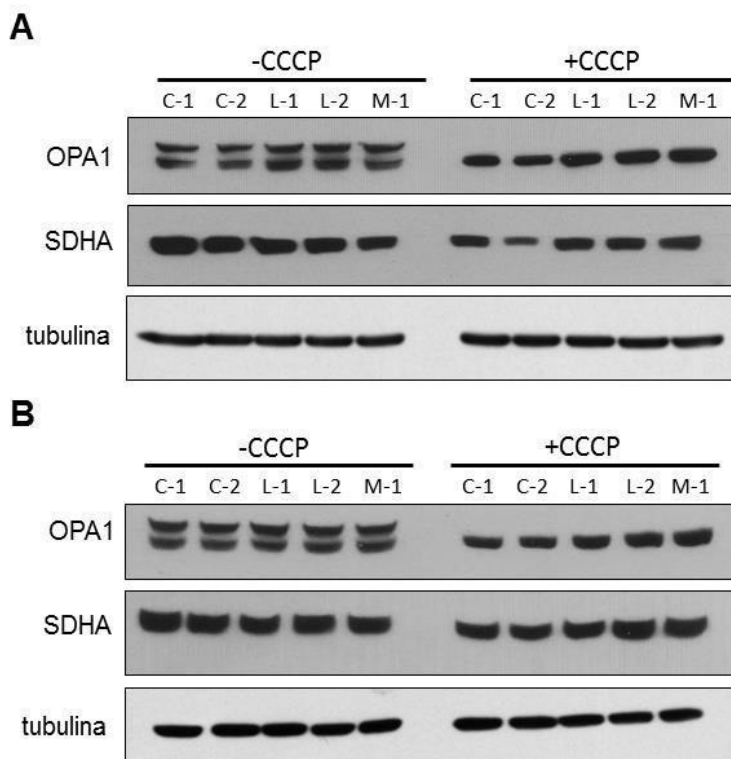


Figura 15. Cuantificación de los niveles de MitoTracker Red en fibroblastos humanos control y de pacientes con LD tras el tratamiento o no con CCCP. Los fibroblastos controles (**a** y **b**) y los de pacientes con LD (**c** y **d**) se incubaron durante 30 min a 37 °C con MitoTracker Red y luego se trataron (+CCCP: **b** y **d**) o no (-CCCP: **a** y **c**) con CCCP 10 µM en medio completo durante 18 h. La figura (A) muestra imágenes representativas de los fibroblastos control (C-1) y de pacientes con LD (L-1). Barra: 10 µm. La pérdida de fluorescencia en presencia de CCCP corresponde a la degradación mitocondrial inducida por este desacoplante. Estos valores fueron analizados estadísticamente (B) en fibroblastos control (CTR), en los deficientes en laforina (Laforina-: L-1 y L-2) y en los deficientes en malina (Malina-: M-1). El histograma muestra la media y la SD de tres experimentos diferentes y se encontró que las diferencias eran significativas a $***P < 0,0001$.

También investigamos, mediante la utilización de inhibidores mitocondriales, la degradación de algunas proteínas específicas mitocondriales, comenzando por dos de ellas: OPA1, que es una GTPasa mitocondrial similar a la dinamina, y la subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa (SDHA), ambas localizadas en la membrana mitocondrial interna. En concordancia con otros grupos, quienes han demostrado que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial conduce al procesamiento proteolítico de OPA1 y a la fragmentación de las mitocondrias [299], encontramos que el CCCP indujo, además de la fragmentación mitocondrial (ver **Fig. 12**), el procesamiento proteolítico de OPA1 en los fibroblastos, lo que se manifiesta por la desaparición de la banda de mayor peso molecular tanto en el medio completo como en KH (**Fig. 16A y B**, respectivamente). También los niveles de SDHA se redujeron tras el tratamiento con CCCP (**Fig. 16A y B**). Sin embargo, esta disminución en los niveles de OPA1 y de SDHA tanto en el medio completo (**Fig. 16C**) como en KH (**Fig. 16D**) fue menos severa en los fibroblastos de pacientes con LD que en los de los controles.



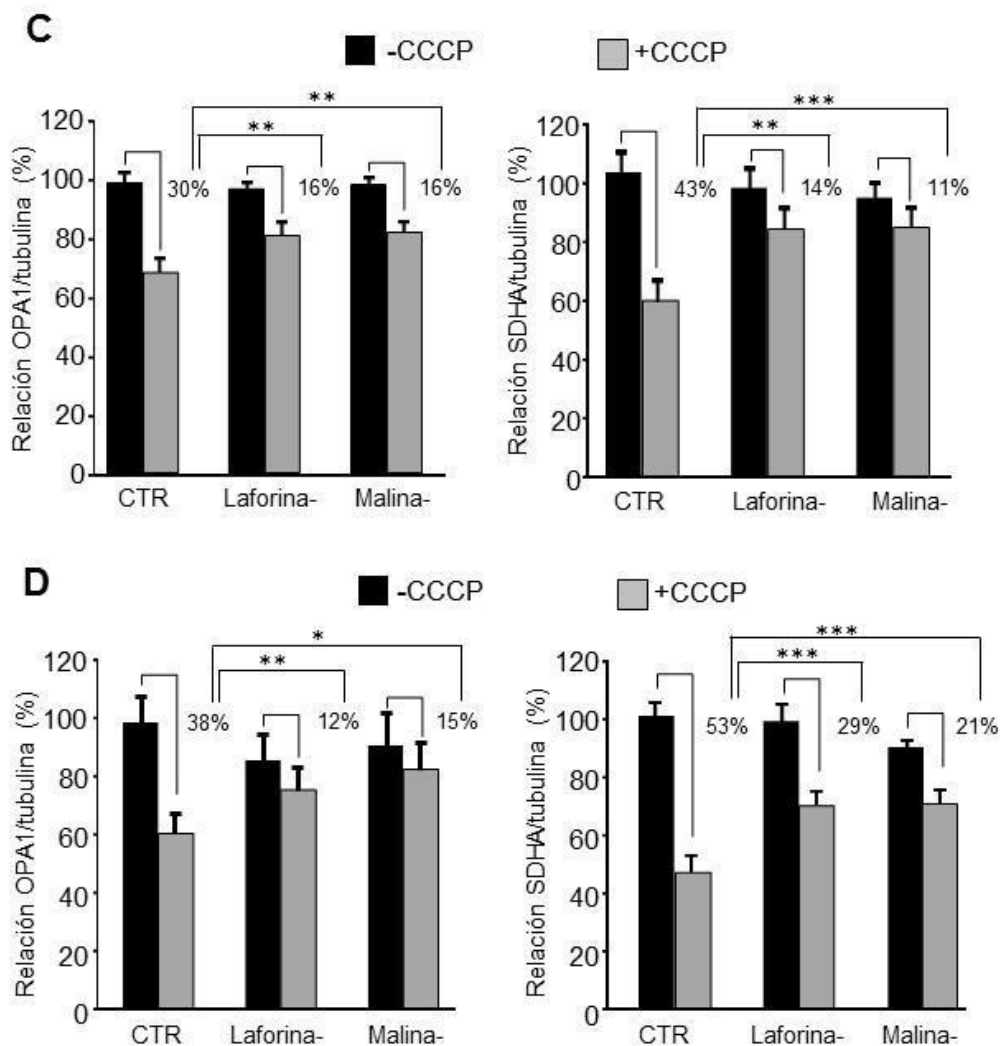
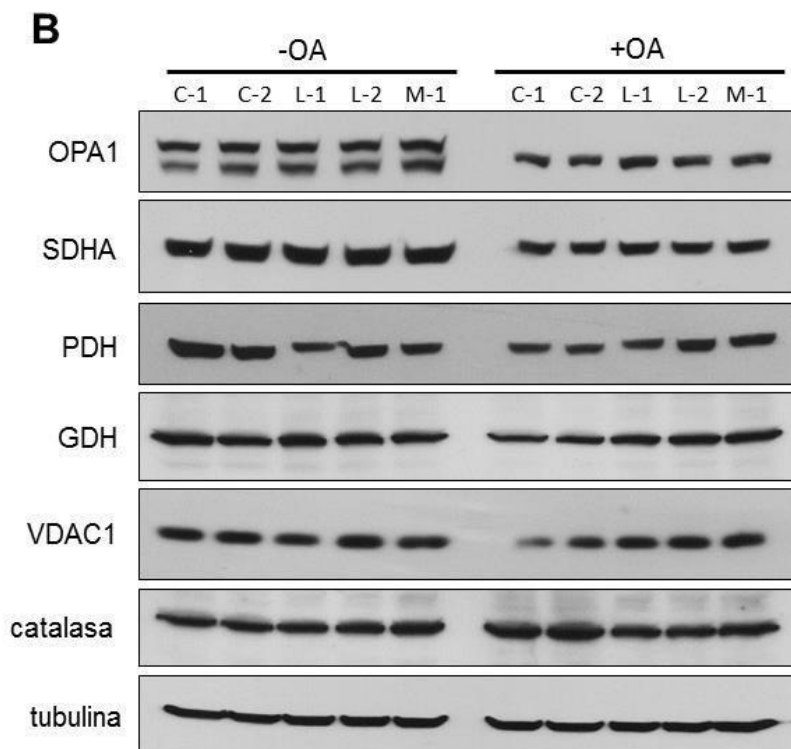
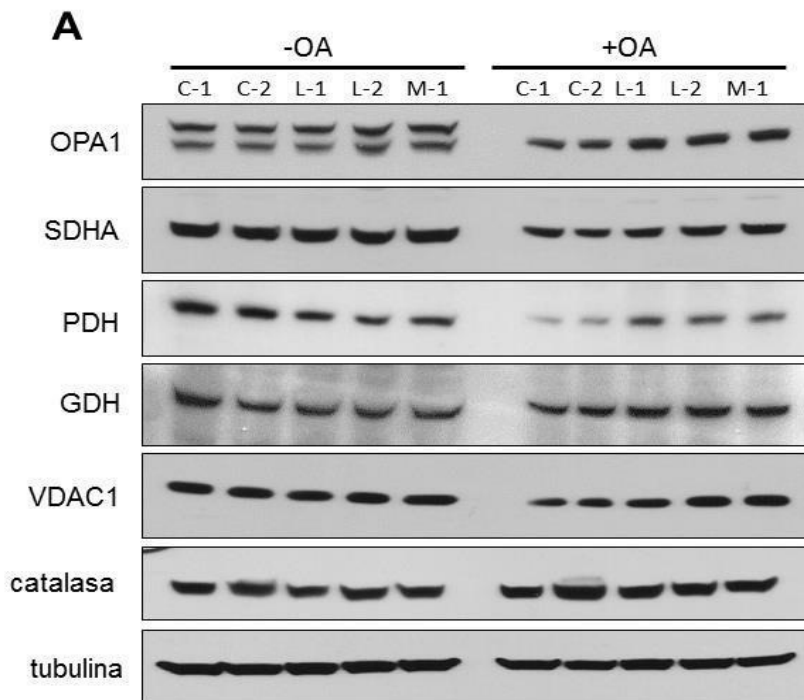
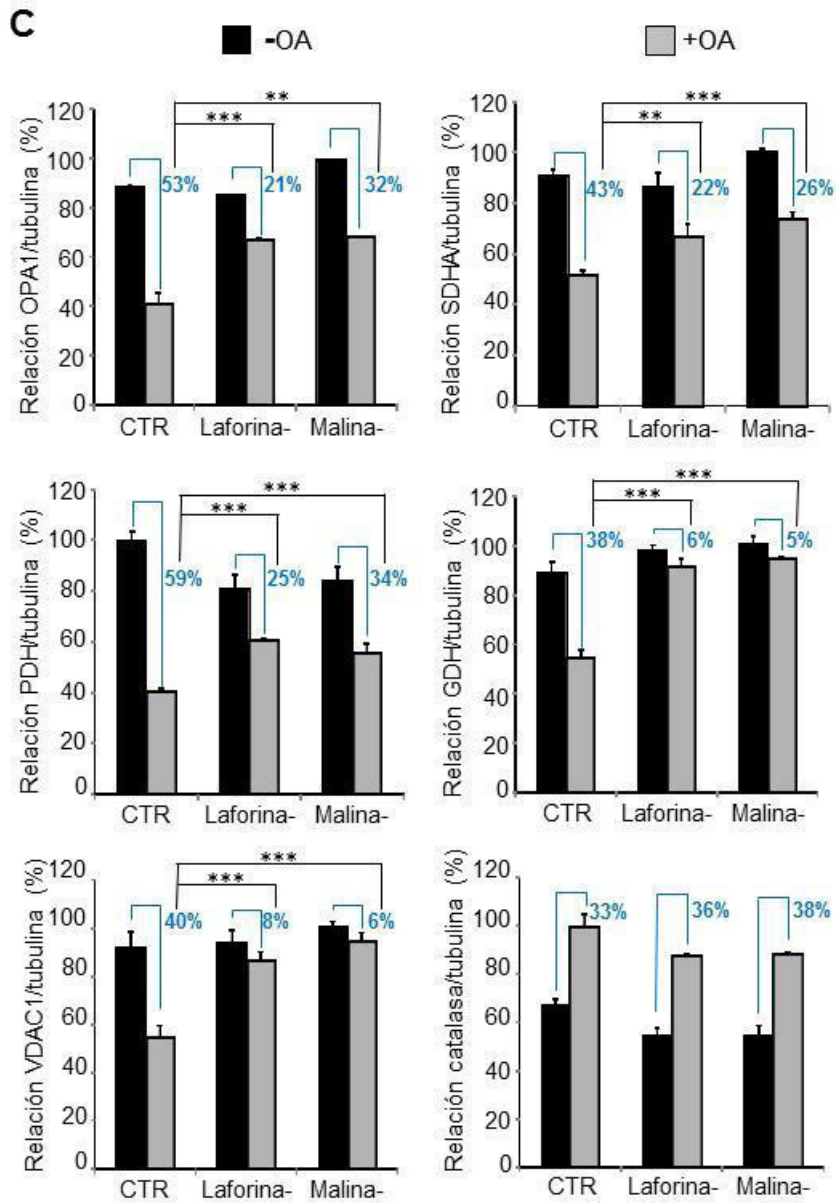


Figura 16. Niveles de las proteínas mitocondriales OPA1 y SDHA en fibroblastos humanos control y de pacientes con LD, tras el tratamiento con CCCP. Las células se incubaron en medio completo con (+CCCP) o sin (-CCCP) CCCP 10 μ M durante 18 h. Durante las últimas 2 h de tratamiento, las células se incubaron en medio completo (A) o en KH (B). Los extractos preclarificados, se analizaron (75 μ g de proteína) en geles de SDS-PAGE al 12 % y posterior Western-blot utilizando anticuerpos anti-OPA1, anti-SDHA y anti-tubulina. Los histogramas en C y D muestran la cuantificación por densitometría de los niveles de proteína en A y B, respectivamente, y calculados como porcentaje respecto al valor más alto de los fibroblastos control. CTR: Células control (C-1 y C-2); Laforina-: células deficientes en laforina (L-1 y L-2); Malina-: células deficientes en malina (M-1). Los valores representan la media y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los fibroblastos control * P <0,01, ** P <0,001, *** P <0,0001.

Resultados similares se obtuvieron tratando las células con FCCP (datos no mostrados) y con oligomicina y antimicina A. En el tratamiento con oligomicina y antimicina A, además de SDHA y OPA1, dos proteínas localizadas en la membrana mitocondrial interna, como ya se ha mencionado, se analizaron proteínas de otros compartimentos mitocondriales: VDAC1 (canal selectivo de aniones dependiente de voltaje 1), localizada en la membrana mitocondrial externa y PDH (piruvato deshidrogenasa) y GDH (glutamato deshidrogenasa), localizadas en la matriz mitocondrial (**Fig. 17**). Tras el tratamiento con oligomicina y antimicina A, de nuevo observamos, tanto en medio completo (**Fig. 17A**) como en KH (**Fig. 17B**), una menor reducción en los niveles de las proteínas mitocondriales analizadas y, por tanto, una menor degradación mitocondrial en los fibroblastos procedentes de pacientes con LD con respecto a los fibroblastos control (**Fig. 17C y D**). Por el contrario, los niveles de la catalasa, que nos sirvió como control del experimento por ser una enzima localizada en los peroxisomas, no disminuyeron tras el tratamiento con oligomicina y antimicina A, ni se encontraron diferencias entre los fibroblastos control y los de pacientes con LD. Estos resultados, que concuerdan con los resultados obtenidos con el MitoTracker Red, indican que en los fibroblastos con LD está alterada la degradación autofágica selectiva de las mitocondrias dañadas por estos tratamientos (CCCP, FCCP y oligomicina y antimicina A).





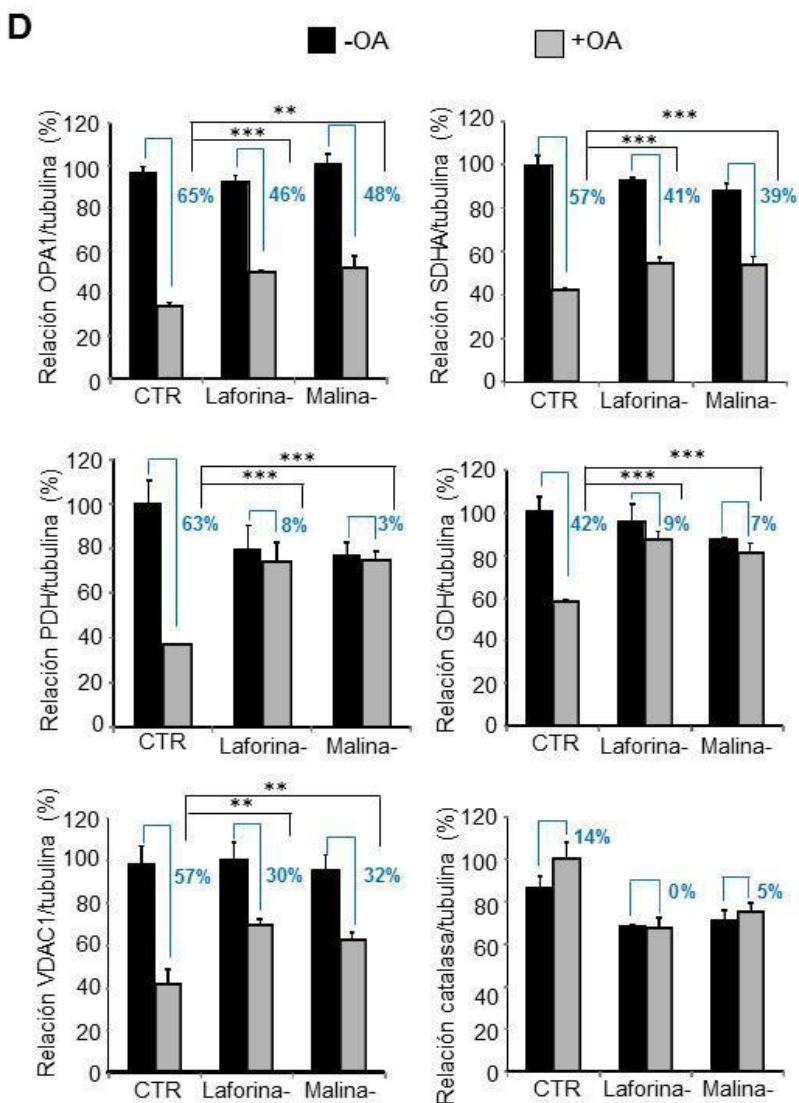


Figura 17. Niveles de las proteínas mitocondriales OPA1, SDHA, PDH, GDH y VDAC1 en fibroblastos humanos control y de pacientes con LD tras el tratamiento con oligomicina y antimicina A. Las células se incubaron en medio completo sin (-OA) o con (+OA) oligomicina 10 μ M y antimicina A 1 μ M durante 18 h. Durante las últimas 2 h de tratamiento, las células se incubaron en medio completo (A) o en KH (B). Los extractos celulares se analizaron (75 μ g de proteína) por Western-blot, con anticuerpos específicos contra las proteínas mitocondriales OPA1, SDHA, PDH, GDH y VDAC1 y contra catalasa y tubulina como controles. Los histogramas (C y D) muestran la cuantificación por densitometría de los niveles de proteína, calculados como porcentaje respecto al valor más alto. CTR: células control (C-1 y C-2); Laforina-: células deficientes en laforina (L-1 y L-2); Malina-: células deficientes en malina (M-1). Los valores corresponden a las medias con su desviación estándar. de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los fibroblastos control (** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$).

1.1.3.1.3. La colocalización de mitocondrias con lisosomas es menor en fibroblastos de pacientes con LD después del tratamiento con CCCP o con oligomicina y antimicina A

Nuestros resultados anteriores indican una reducción de la autofagia y de la degradación selectiva de las mitocondrias y de sus proteínas en fibroblastos de pacientes con LD tras el tratamiento con diferentes inhibidores mitocondriales. A continuación investigamos la conexión entre estos dos procesos analizando la colocalización de mitocondrias y lisosomas mediante microscopía de fluorescencia después de la inhibición de la degradación lisosomal. Para marcar las mitocondrias y los lisosomas utilizamos, respectivamente, MitoTracker Red y un anticuerpo anti-LAMP2. La colocalización de ambas señales es significativamente menor en los fibroblastos de pacientes con LD, como se puede observar en las imágenes de fluorescencia y en su cuantificación (**Fig. 18A y B**, respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre los fibroblastos de pacientes con LD deficientes en laforina o en malina. Estos resultados indican que la eliminación de mitocondrias por los lisosomas está disminuida en los fibroblastos de pacientes con LD y además apoyan las observaciones descritas anteriormente, es decir, que los fibroblastos de pacientes con LD tienen reducida tanto la autofagia como la degradación selectiva de las mitocondrias.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los fibroblastos de pacientes con LD no pueden mantener un adecuado control de calidad de las mitocondrias que han sido dañadas por CCCP.

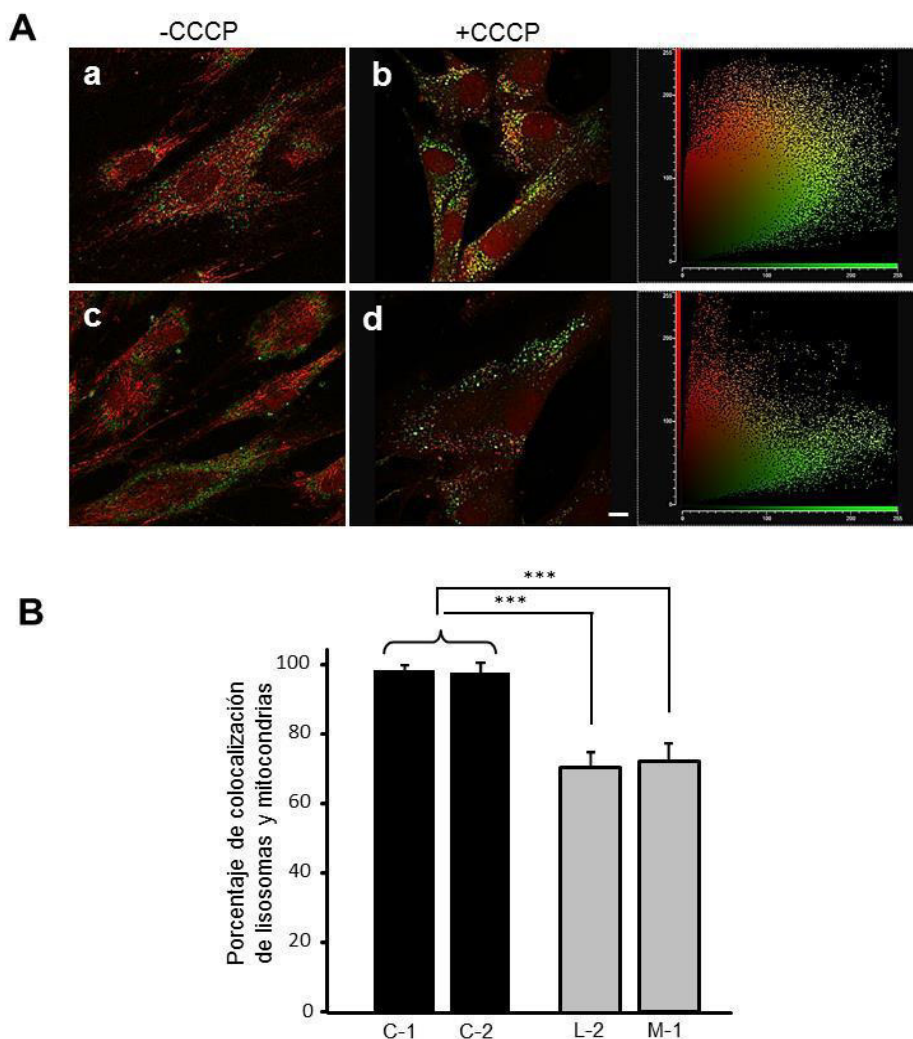


Figura 18. Colocalización de mitocondrias y lisosomas en fibroblastos control y de pacientes con LD tras el tratamiento con CCCP. Para investigar la colocalización de mitocondrias y lisosomas, los fibroblastos control (**a** y **b**) y los de pacientes con LD (**c** y **d**) se marcaron con MitoTracker Red 100 nM durante 30 min a 37 °C, se lavaron y luego se trataron (+CCCP) o no (-CCCP) con CCCP 10 μ M en medio completo durante 18 h. Las células fueron incubadas con inhibidores lisosomales (leupeptina 100 μ M y pepstatina A 1 M) durante las últimas 2 h del tratamiento. A continuación, las células se incubaron con anti-LAMP2. La figura (**A**) muestra imágenes representativas de fibroblastos control C-1 (**a** y **b**) y del paciente L-2 (**c** y **d**), tratados (**b** y **d**) y no tratados (**a** y **c**) con CCCP, acompañadas del gráfico de dispersión bidimensional correspondiente a las intensidades de píxeles rojo-verde de las imágenes **b** y **d**. Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio confocal SP2 de Leica. En el histograma (**B**) se cuantifica la colocalización de MitoTracker Red y LAMP2 tras el tratamiento con CCCP en las células (C-1 y C-2: controles; L-2 y M-1: pacientes), utilizando el software MetaMorph. El experimento se realizó por duplicado, analizando un total de 40 células para cada línea celular. Los valores corresponden a las medias y SD (***) $P < 0,0001$). Barra: 10 μ m.

Resultados parecidos se obtuvieron utilizando oligomicina y antimicina A y un anticuerpo anti-TOM20 para marcar las mitocondrias, observándose de nuevo una mayor colocalización de lisosomas y mitocondrias en los fibroblastos control que en los de pacientes con LD (Fig. 19).

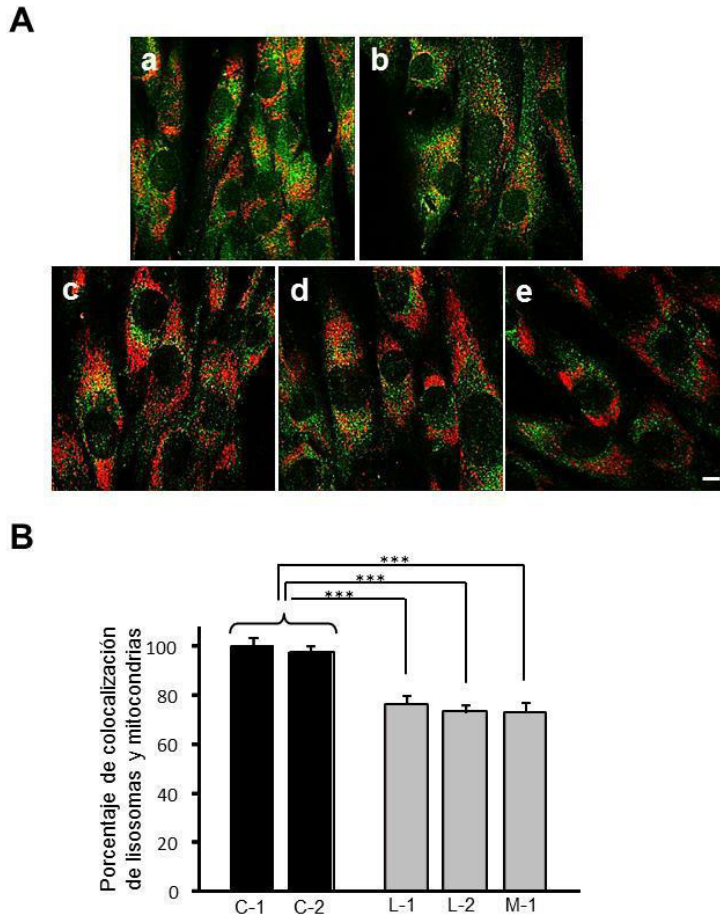


Figura 19. Colocalización de mitocondrias y lisosomas en fibroblastos control y de pacientes con LD tras el tratamiento con oligomicina y antimicina A. Los fibroblastos control (C-1 y C-2, respectivamente, a y b) y de pacientes con LD (L-1, L-2 y M-1, respectivamente, c, d y e) se trataron o no (imágenes no mostradas) con oligomicina 10 μ M y antimicina A 1 μ M en medio completo durante 18 h. Las células fueron incubadas con inhibidores lisosomales (leupeptina 100 μ M y pepstatina A 1 μ M) durante las últimas 2 h del tratamiento. La figura (A) muestra imágenes representativas de fibroblastos control (a y b) y de pacientes con LD (c, d y e) tras el tratamiento con oligomicina y antimicina A y posterior incubación con anti-LAMP2 (verde) y anti-TOM20 (rojo). En el histograma (B) se cuantifica la colocalización de TOM20 y LAMP2 utilizando el software MetaMorph. El experimento se realizó por duplicado, analizando un total de 40 células por línea celular. Los valores corresponden a las medias y SD (***) $P < 0,0001$). Barra: 10 μ m.

1.1.3.2. Estudio de la mitofagia en astrocitos de ratones

Una vez determinada la alteración en la mitofagia en fibroblastos humanos de pacientes con LD, estudiamos si esta alteración también se confirmaba en otros modelos de la enfermedad. Dado que LD afecta principalmente a las neuronas, pero su aislamiento y cultivo resulta bastante complicado, escogimos los astrocitos de ratones neonatales como modelo más cercano a ellas para estudiar la mitofagia. Para ello, el laboratorio del Dr. P. Sanz (IBV, Valencia) nos cedió amablemente astrocitos de ratones neonatales (7 días de edad) tanto control como modelos de LD (deficientes en malina o en laforina). Los resultados obtenidos se detallan en los siguientes apartados.

1.1.3.2.1. Los astrocitos de ratones modelo de LD no tienen alterada la formación de autofagosomas

El estudio de la mitofagia en los astrocitos se realizó tal y como se ha comentado anteriormente para los fibroblastos humanos. En primer lugar, estudiamos si la macroautofagia se encontraba alterada. Como se observa en la **figura 20**, ni en medio completo (**A**) ni en KH (**B**) se observaron diferencias significativas en los niveles de LC3-II entre los astrocitos control y los deficientes en laforina o malina (**C** y **D**, respectivamente), como sería de esperar en base a los resultados obtenidos con los otros modelos de la enfermedad [75, 93, 95]. Además, observamos que el CCCP no produce ningún aumento en los niveles de LC3-II ni en los astrocitos control ni en los de ratones con LD. Como control del experimento, en paralelo, se realizó el mismo tratamiento en fibroblastos humanos control, donde sí se observó un aumento en los niveles de LC3-II tras el tratamiento con CCCP. Esto indica que el CCCP no produce ningún cambio en la macroautofagia de los astrocitos, al menos en las condiciones ensayadas.

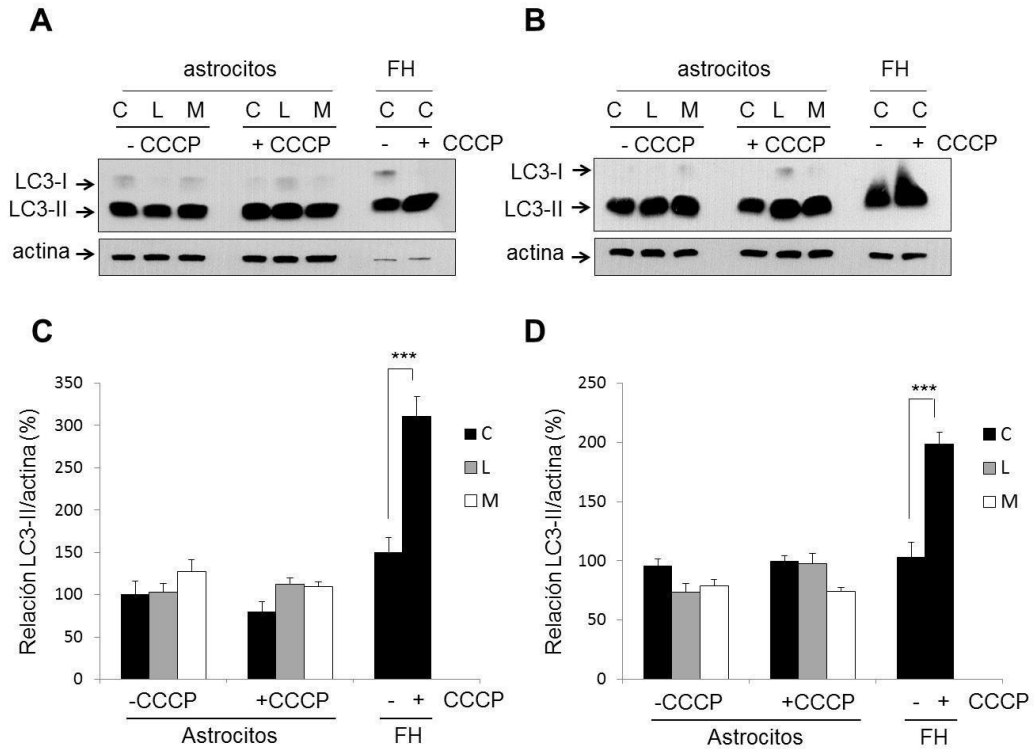


Figura 20. Efecto del tratamiento con CCCP sobre los niveles de LC3-II en los astrocitos de ratón controles y con LD y fibroblastos humanos control. Los astrocitos de ratón control (C) y con LD (deficientes en laforina (L) y deficientes en malina (M)) se incubaron en medio completo sin (-CCCP) o con (+CCCP) CCCP 10 μ M durante 18 h. En paralelo y como control, fibroblastos humanos control (FH) se trataron en las mismas condiciones que los astrocitos en presencia (+) o no (-) de CCCP 10 μ M durante 18 h. Durante las últimas 2 h de tratamiento con CCCP, las células se incubaron en medio completo (A) o en KH (B) conteniendo inhibidores lisosomales (véase Material y Métodos). En la figura se muestran inmunoblots representativos, utilizando los anticuerpos anti-LC3 y anti-actina, de extractos (75 μ g de proteína) procedentes de las diferentes muestras. Las bandas fueron cuantificadas por densitometría y los valores de LC3-II se normalizaron respecto a la actina (C y D, para medio completo y KH, respectivamente). Los resultados se expresan como porcentaje del respectivo control de valor más alto. Todos los valores corresponden a las medias de tres experimentos independientes y las barras indican la SD (***) $P < 0,0001$).

1.1.3.2.2. Los astrocitos de ratones control y de ratones modelo de LD no muestran diferencias en la colocalización de mitocondrias y lisosomas

También estudiamos si el CCCP inducía cambios en la colocalización de lisosomas y mitocondrias en los astrocitos de ratón, tal como se había observado en fibroblastos humanos, y si existían diferencias entre los ratones control y los deficientes en laforina o malina. Para ello, astrocitos procedentes de ratones control y de ratones deficientes en laforina o en

malina se incubaron con CCCP 10 μ M durante 18 h y, posteriormente, se analizaron por inmunofluorescencia utilizando marcadores específicos para lisosomas (verde) y mitocondrias (rojo). Como se observa en la **figura 21**, el tratamiento con CCCP 10 μ M no provocó ningún cambio significativo en la colocalización en ninguna de las células ensayadas, ya que era prácticamente la misma con y sin tratamiento (**A**). Tampoco se observaron diferencias en la proporción de mitocondrias que colocalizan con lisosomas entre los astrocitos de controles y los del modelo de LD (**B**). Estos mismos resultados se confirmaron con los otros inductores de mitofagia, FCCP u oligomicina y antimicina A (resultados no mostrados).

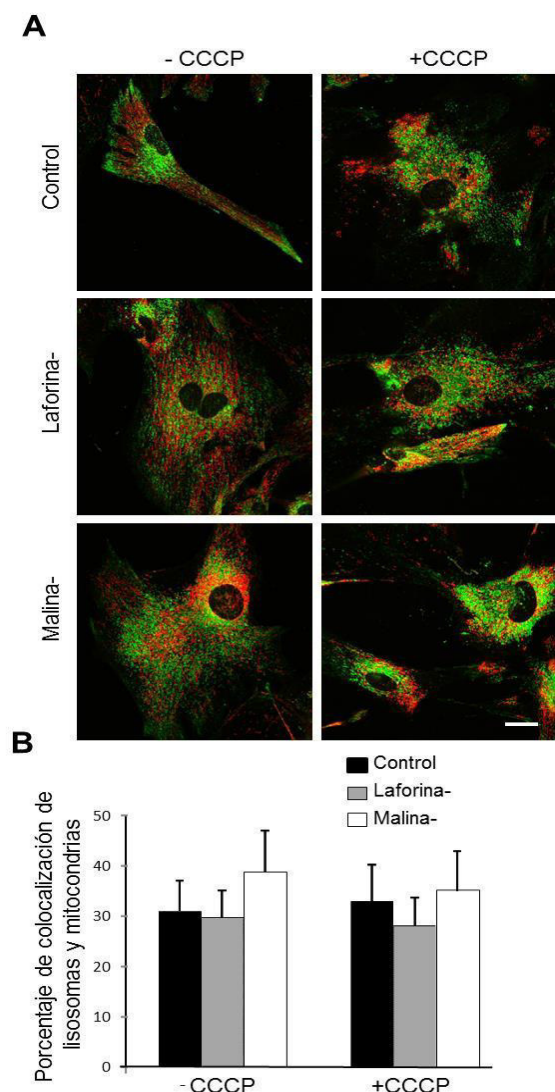


Figura 21. Colocalización de mitocondrias y lisosomas en astrocitos tras el tratamiento o no con CCCP. Para investigar la colocalización de mitocondrias y lisosomas, los astrocitos de ratones modelo de LD (deficientes en laforina (Laforina-) o deficientes en malina (Malina-)) y control (Control), se trataron (+CCCP) o no (-CCCP) con CCCP 10 μ M en medio completo durante 18 h. Las células fueron incubadas con inhibidores lisosomales (leupeptina 100 μ M y pepstatina A 1 M) durante las últimas 2 h de la incubación con CCCP. Después, las células fueron incubadas con anti-LAMP2 (verde) y anti-TOM20 (rojo) para marcar lisosomas y mitocondrias, respectivamente. La figura (**A**) muestra imágenes representativas de astrocitos control y modelo de LD tras el tratamiento (+CCCP) o no (-CCCP) con CCCP. En el histograma (**B**) se cuantifica la colocalización de TOM20 y LAMP2 tras el tratamiento (+CCCP) o no (-CCCP) en las diferentes líneas celulares, utilizando el software MetaMorph. Se analizaron un total de 40 células para cada línea celular. Los valores corresponden a las medias y SD. Barra: 10 μ m.

En resumen, observamos que no existen diferencias entre astrocitos de ratones control y de ratones modelo de LD ni en la macroautofagia ni en la colocación de mitocondrias con lisosomas. Además, el no observarse efectos debidos al tratamiento con los inhibidores mitocondriales sugiere que los astrocitos no son tan sensibles a éstos como los fibroblastos, resultados que concuerdan con los observados por otros grupos [300].

De todos estos resultados obtenidos podemos decir que en los fibroblastos de pacientes con LD la eliminación por los lisosomas de las mitocondrias dañadas está reducida, confirmando los resultados anteriormente descritos, que indican que existe una reducción en los niveles de autofagia y en la degradación mitocondrial. Además, esta alteración es similar en los fibroblastos de los pacientes deficientes en laforina y en malina. Por otro lado, utilizando como modelo los astrocitos procedentes de ratones neonatales, no hemos podido confirmar los resultados obtenidos con los fibroblastos de pacientes con LD. Esto podría deberse a que los astrocitos se encuentran todavía en un estadio de desarrollo muy prematuro para poder observar diferencias, ya que situaciones como el ayuno (KH), que en otras células inducen un aumento en la macroautofagia [301], no producen ningún cambio en estas células. Posiblemente, los astrocitos no sean un buen modelo para estudiar la mitofagia, al menos en nuestras condiciones.

En los últimos años, los defectos en la mitofagia o en la autofagia mitocondrial específica para eliminar las mitocondrias dañadas han empezado a ser considerados un factor importante en la patología de muchas enfermedades, incluidos algunos trastornos neurodegenerativos [302]. Aunque existen otras vías mitofágicas (ver las revisiones en [303, 304]), en la vía canónica de mitofagia la quinasa mitocondrial PINK1 y la E3 ubiquitina ligasa Parkina juegan un papel central. PINK1 se acumula en las mitocondrias defectuosas y facilita la unión de Parkina a estas mitocondrias dañadas, que son posteriormente reconocidas y degradadas por autofagia [305]. El grupo del Dr. Sanz no encontró, después del tratamiento con CCCP y oligomicina, ninguna alteración en el reclutamiento de la Parkina a las mitocondrias de fibroblastos de pacientes deficientes en laforina o en

malina, excluyéndose pues un defecto en el mecanismo canónico PINK1/Parkina en LD.

En resumen, todos estos resultados muestran que en células deficientes en laforina y malina existe una degradación autofágica parcialmente disminuida de las mitocondrias alteradas, que es independiente de Parkina. Esta deficiencia en la degradación específica por autofagia es similar en los fibroblastos deficientes en laforina y en malina sugiriendo una alteración común y reforzando la relevancia de estas alteraciones para LD. Este defecto parcial podría conducir a la acumulación progresiva de mitocondrias alteradas en LD, contribuyendo probablemente al desarrollo de la patología.

1.2. Otras vías lisosomales y no lisosomales

1.2.1. Vías endocíticas

La autofagia es una vía de direccionamiento de material intracelular para su posterior degradación en los lisosomas. Las vías endocíticas tienen igualmente como destino final los lisosomas, ya que son los orgánulos encargados de degradar también el material extracelular y de membrana plasmática a través de diferentes procesos, que se conocen en su conjunto como endocitosis. Además, las dos vías, autofagia y endocitosis, comparten proteínas como por ejemplo las de fusión a los lisosomas, proteínas implicadas en la regulación de estos procesos, como la PI3K de clase IA o las proteínas Rab5 y Rab7, entre otras [306-309]. En los resultados presentados anteriormente hemos mostrado que tanto la macroautofagia como la mitofagia están afectadas en los modelos de LD. Por tanto, es posible que puedan existir alteraciones también en otra importante función lisosomal como es la endocitosis.

Para analizar esta posibilidad, hemos estudiado en diferentes modelos de LD, fibroblastos humanos y MEFs, las principales vías endocíticas. Concretamente, nos hemos centrado en el estudio de tres de ellas: la endocitosis de fase fluida o macropinocitosis y, dentro de la endocitosis mediada por receptor, en la dependiente de clatrina y dinamina,

y en la endocitosis mediada por caveolas, dependiente únicamente de dinamina.

Como paso previo, se optimizó la estimulación de estos procesos endocíticos mediante la incubación de los fibroblastos en KH. Además de sustratos fluorescentes específicos de cada una de las vías endocíticas estudiadas, como controles negativos se utilizaron diferentes inhibidores: metil- β -ciclodextrina (M β CD) para la endocitosis de fase fluida [310], clorpromazina para la endocitosis mediada por clatrina [311] y filipina III para la endocitosis mediada por caveolas [312].

1.2.1.1. Endocitosis de fase fluida o macropinocitosis

En la endocitosis de fase fluida, la activación de cambios en el citoesqueleto de actina permite la formación de grandes extensiones de la membrana plasmática que se prolongan hacia el exterior celular. Posteriormente estas extensiones plasmáticas se retraen hacia la superficie de la célula conduciendo a la internalización inespecífica del medio extracelular secuestrado (fluidos y partículas) en vesículas citoplasmáticas sin recubrimiento proteico denominadas macropinosomas [168, 313].

Para estudiar la endocitosis de fase fluida, los fibroblastos de pacientes y los MEFs modelo de LD y sus respectivos controles se incubaron con el fluoróforo FITC-dextrano 40S en KH a 37 °C durante los tiempos indicados, que llegaron hasta 5 h. Posteriormente, las células se procesaron y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados obtenidos (**Fig. 22**) mostraron una clara disminución en la actividad macropinocítica de los fibroblastos de pacientes con LD con respecto a los controles (**A**). Esta disminución fue aún más severa en el caso de los MEFs modelo de LD, llegando a ser del 50 % con respecto a los MEFs control (**B**). Como cabía esperar, la adición del inhibidor M β CD a ambos tipos de fibroblastos control redujo drásticamente la internalización del sustrato fluorescente. Por tanto, observamos una importante disminución en la endocitosis de fase fluida en los dos modelos de la enfermedad analizados.

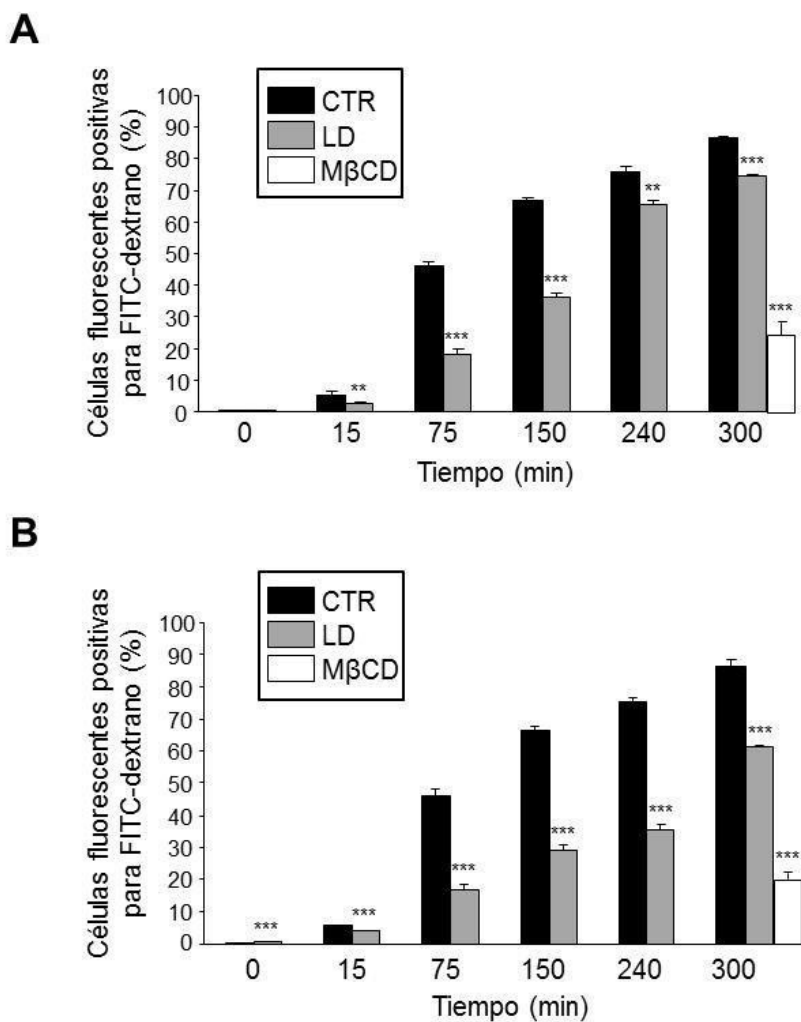


Figura 22. Análisis mediante citometría de flujo de la internalización del FITC-dextrano en fibroblastos. Fibroblastos humanos (A) y MEFs (B) control (CTR) y modelo de LD (LD) se incubaron en KH durante 30 min y después con el fluoróforo FITC-dextrano 40S durante los tiempos indicados en las gráficas. Como control de esta endocitosis, se incubaron en presencia de MβCD durante el tiempo más largo ambas líneas de fibroblastos control. Las muestras se procesaron y se analizaron mediante citometría de flujo cuantificando 10.000 células por muestra. La actividad macropinocítica se calculó como el porcentaje de células que habían incorporado el fluoróforo a los diferentes tiempos. Se analizaron células control (CTR, fibroblastos humanos control C-1 y C2 (A) y MEFs control (B)) y modelos de LD (fibroblastos humanos de pacientes deficientes en laforina L-1 y L-2 y deficientes en malina M-1 (A) y MEFs deficientes en laforina o en malina (B)). Los resultados de los fibroblastos controles (C-1 y C-2) y modelos de LD, tanto de fibroblastos (L-1, L-2 y M-1) como de MEFs (deficientes en laforina o en malina), se agruparon al no existir diferencias significativas entre ellos. Todos los valores de fluorescencia corresponden a las medias ± SD de tres experimentos independientes. Se encontraron diferencias significativas entre las células control y las células modelo de LD en ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$.

1.2.1.2 Endocitosis mediada por receptor

En la endocitosis mediada por receptor el ligando extracelular se une específicamente a su receptor, localizado generalmente en invaginaciones de la superficie celular. Esto provoca el cierre de la invaginación y la internalización del complejo ligando-receptor en el interior de una vesícula endocítica recubierta de diferentes proteínas. En la mayoría de los casos el ligando es transportado a los lisosomas para ser degradado, mientras que los receptores son reciclados de nuevo a la superficie celular. Por tanto, la velocidad a la que se internaliza un determinado ligando estará determinada tanto por la cantidad de receptor presente en la superficie celular como por su velocidad de reciclaje.

1.2.1.2.1. Endocitosis mediada por clatrina

La endocitosis mediada por receptor generalmente se produce a través de vesículas recubiertas de clatrina. Para su estudio por citometría de flujo se utilizaron por separado dos sustratos diferentes que se internalizan mediante esta vía: el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la transferrina (Tfr) [314-316], ambos conjugados al fluoróforo Alexa Fluor-488 (AF488-EGF y AF488-Tfr, respectivamente).

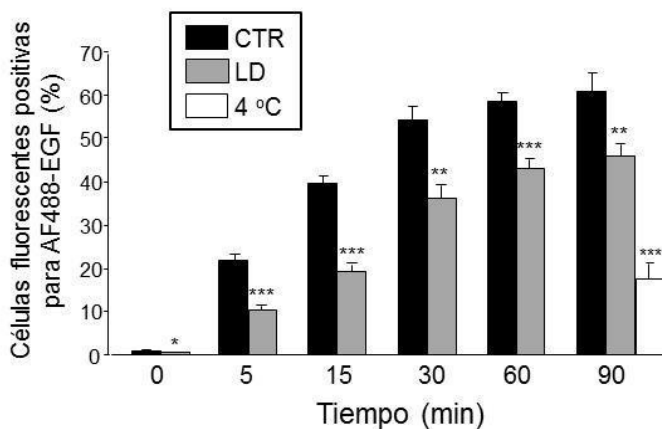
A. Endocitosis mediada por el receptor EGFR

A.1. Estudio de la internalización del EGFR

Hemos comentado anteriormente que los receptores de superficie que se internalizan junto a sus ligandos a través de un proceso dependiente de clatrina y dinamina generalmente se reciclan. Sin embargo, en la endocitosis de EGF, tras la internalización, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se dirige mayoritariamente a los lisosomas para su degradación [317]. En el estudio de la internalización del EGF, fibroblastos humanos y MEFs con LD y sus respectivos controles se incubaron a diferentes tiempos con el sustrato fluorescente AF488-EGF y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados de la **figura 23** mostraron una disminución en la internalización del complejo AF488-EGF-EGFR en los fibroblastos modelos de LD, tanto humanos (**A**) como MEFs (**B**), con respecto a sus controles. En este caso, la

disminución observada fue similar en fibroblastos humanos y en MEFs. Además, observamos que la incubación de las células a 4 °C redujo drásticamente la internalización del fluoróforo (A y B). Estos resultados sugieren que, en estos modelos de LD analizados, la internalización del EGFR está considerablemente disminuida.

A



B

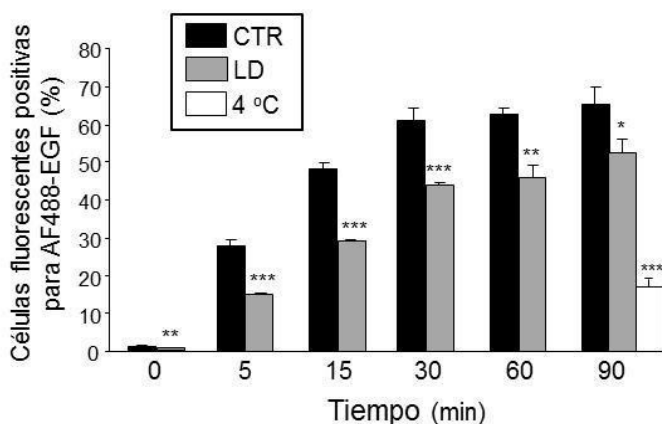


Figura 23. Cuantificación de la internalización del complejo EGF-EGFR mediante citometría de flujo. Fibroblastos humanos (A) y MEFs (B) control (CTR) y modelo de LD (LD) se incubaron en KH durante 30 min y después se añadió el sustrato fluorescente AF488-EGF durante los tiempos indicados en las gráficas. Como control de la internalización del EGFR, se incubaron a 4 °C ambas líneas de fibroblastos control durante el mayor tiempo utilizado. Las muestras se procesaron y se analizaron mediante citometría de flujo cuantificando 10.000 células por muestra. Los valores de

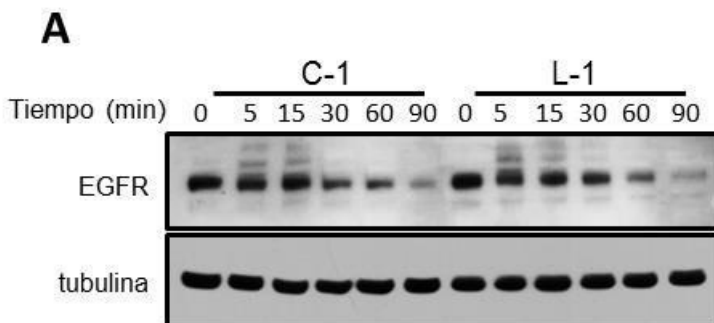
fluorescencia se expresaron como el porcentaje de células que habían incorporado el fluoróforo a los diferentes tiempos. Se analizaron células control (CTR, fibroblastos humanos control C-1 y C2 (A) y MEFs control (B)) y modelos de LD (fibroblastos humanos de pacientes deficientes en laforina L-1 y L-2 y deficientes en malina M-1 (A) y MEFs deficientes en laforina o en malina (B)). Todos los valores de fluorescencia corresponden a las medias \pm SD de tres experimentos independientes. Los resultados de los fibroblastos controles (C-1 y C-2) y modelos de LD, tanto de fibroblastos (L-1, L-2 y M-1) como de MEFs (deficientes en laforina o en malina), se agruparon al no existir diferencias significativas entre ellos. Se encontraron diferencias significativas entre las células control y las modelo de LD en $**P < 0,001$, $***P < 0,0001$.

A.2. Análisis de los niveles de EGFR total y fosforilado

La unión de EGF a su receptor (EGFR) desencadena la fosforilación (en la Tyr845, entre otras) y la activación de este último para englobarse ambos en una vesícula endocítica [318]. Una vez el complejo EGF-EGFR es internalizado, es llevado hacia los endosomas tardíos donde se disocia y el EGF se dirige a los lisosomas para su degradación. El receptor puede seguir el mismo camino que su ligando y degradarse en los lisosomas o reciclarse dirigiéndose de nuevo a la membrana plasmática.

En el apartado anterior hemos comentado que la internalización del EGF dependerá tanto de la cantidad de EGFR presente en la superficie celular como de su correcto reciclaje. Por ello, estudiamos si en los fibroblastos de pacientes con LD existe alguna alteración en los niveles de EGFR o en los de su forma activa fosforilada.

Para analizar los niveles totales de EGFR, incubamos los fibroblastos humanos control y de pacientes con LD con su ligando EGF a una concentración de 100 ng/ml, necesaria para que aproximadamente el 90 % del receptor se dirija a los lisosomas para su degradación [174]. La incubación se realizó durante los tiempos que se indican en la **figura 24**. A continuación, las muestras se procesaron y analizaron mediante Western-blot. Los fibroblastos humanos control y los deficientes en laforina o en malina muestran unos niveles totales de EGFR semejantes en todos los tiempos analizados.



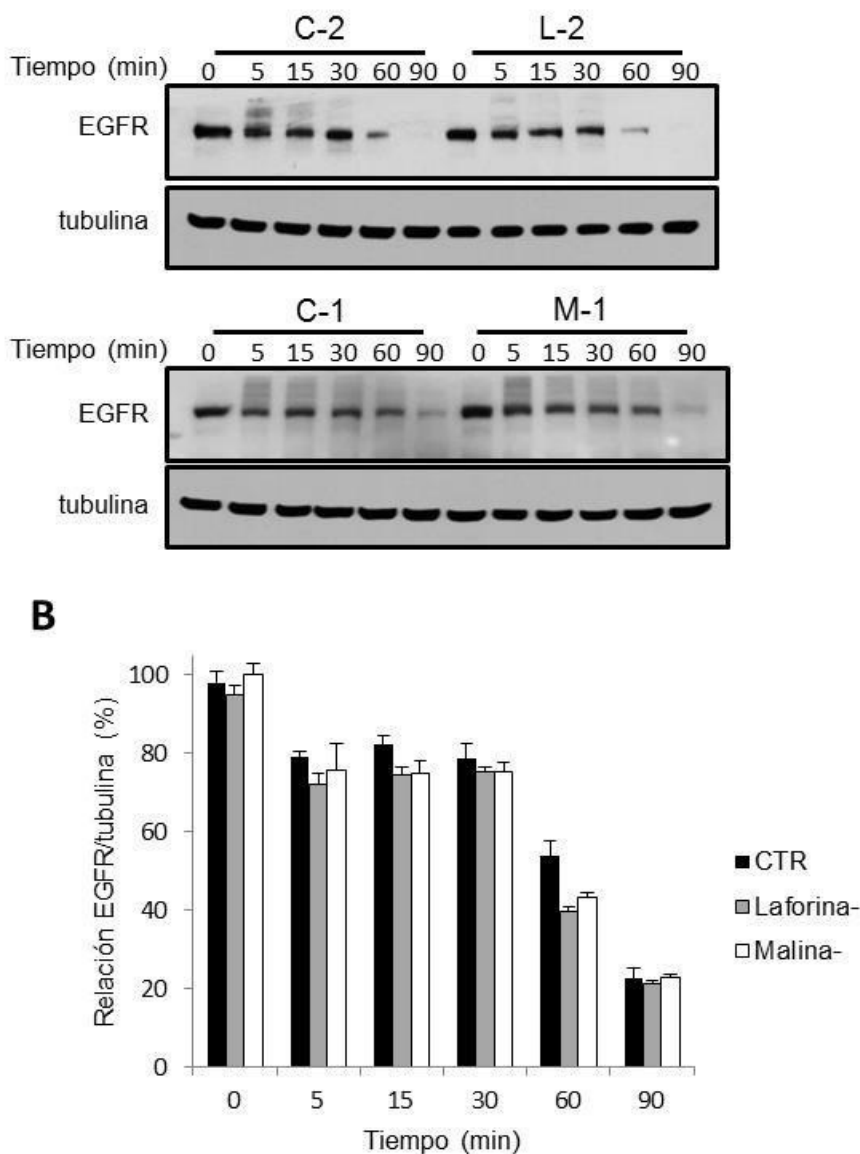
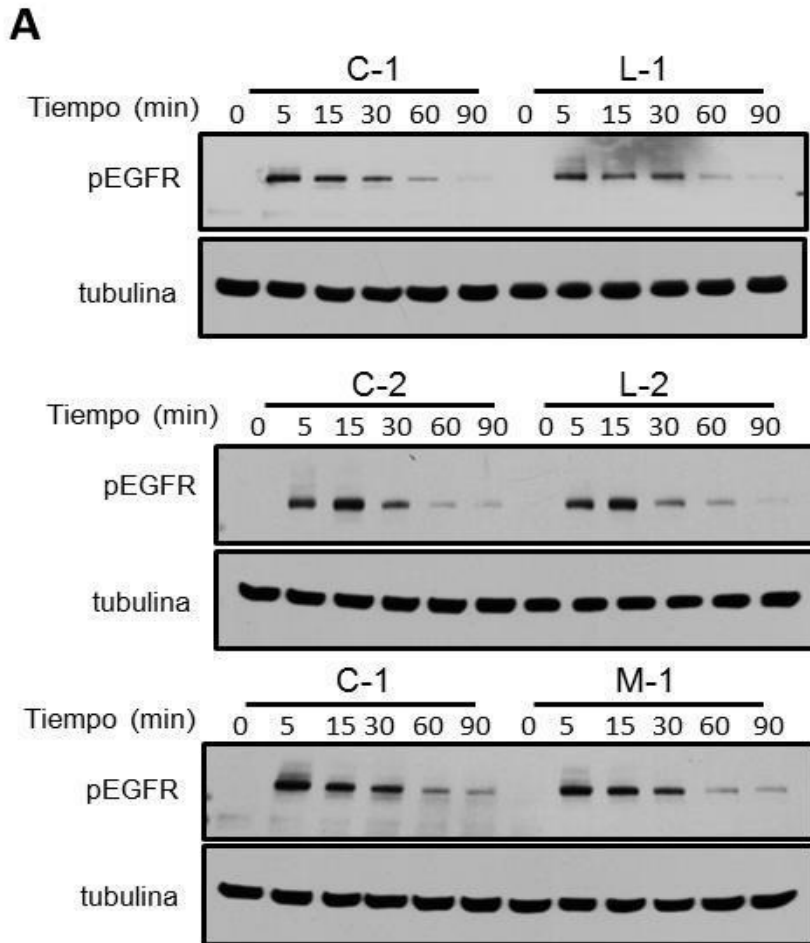


Figura 24. Niveles de EGFR en los fibroblastos de pacientes con LD. Fibroblastos humanos control (CTR: C-1 y C-2) y de pacientes deficientes en laforina (Laforina-: L-1 y L-2) y en malina (Malina-: M-1) se incubaron en KH durante 1 h y posteriormente se añadió EGF humano 100 ng/ml durante los tiempos indicados en la figura. Se muestran inmunoblots representativos (A) de extractos (75 μ g de proteína) procedentes de las diferentes muestras utilizando anticuerpos contra EGFR y contra tubulina. Las bandas fueron cuantificadas por densitometría y los valores de EGFR se normalizaron a los correspondientes de tubulina (B). Los resultados de los fibroblastos controles (C-1 y C-2) y de pacientes deficientes en laforina (L-1 y L-2) se agruparon entre ellos al no existir diferencias significativas entre ellos. Todos los valores del histograma corresponden a las medias \pm SD de tres experimentos independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

En esas mismas condiciones se estudió por Western-blot la activación del EGFR mediante su fosforilación en la Tyr 845. Tal y como se observa en la **figura 25**, no encontramos diferencias significativas entre fibroblastos humanos control y deficientes en laforina o en malina. Por tanto, la menor internalización del EGF en los fibroblastos de pacientes con LD no se debe ni a una menor cantidad del receptor en la membrana plasmática ni a una menor activación del mismo.



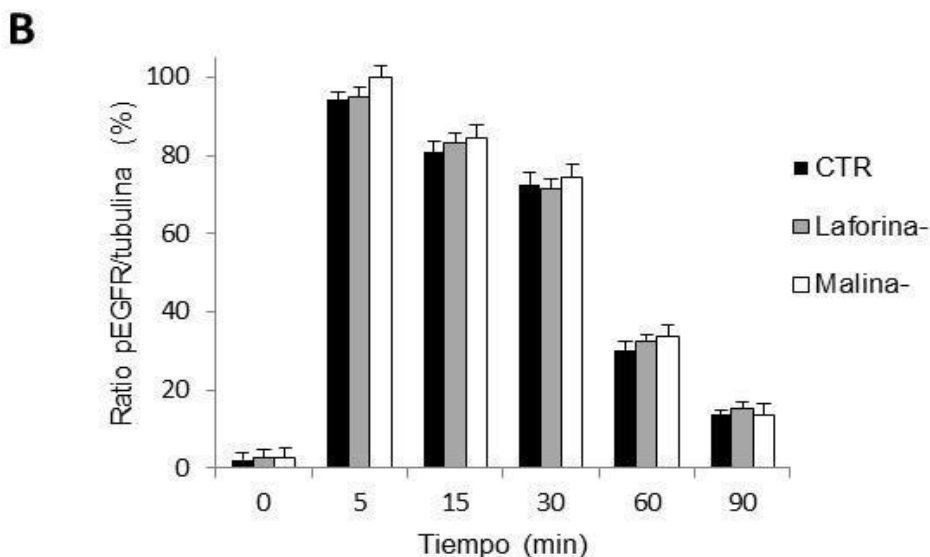


Figura 25. Efecto del EGF sobre los niveles de pEGFR (Tyr845). Fibroblastos humanos control (CTR: C-1 y C-2) y deficientes en laforina (Laforina-: L-1 y L-2) y en malina (Malina-: M-1) se incubaron en KH durante 1 h y posteriormente se añadió EGF humano a una concentración de 100 ng/ml durante los tiempos indicados en la figura. Los extractos totales preclarificados de las muestras (75 µg) se analizaron por Western-blot utilizando anticuerpos contra la forma de EGFR fosforilada en Tyr845 (pEGFR) y contra tubulina (A). Las bandas detectadas fueron cuantificadas por densitometría y los valores de pEGFR se normalizaron frente a tubulina (B). Los resultados de los fibroblastos controles (C-1 y C-2) y de pacientes deficientes en laforina (L-1 y L-2) se agruparon entre ellos al no existir diferencias significativas entre ellos. Los valores del histograma corresponden a las medias ± SD de tres experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas entre los fibroblastos humanos control y los de pacientes con LD.

B. Endocitosis mediada por el receptor TfrR

La endocitosis mediada por clatrina también puede ser estudiada utilizando como sustrato la transferrina (Tfr), la cual es reconocida por su receptor TfrR e internalizada. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el EGFR, el TfrR se recicla y no se dirige a los lisosomas para degradarse.

Para estudiar la internalización del TfrR los fibroblastos se incubaron con el sustrato fluorescente AF488-Tfr durante los tiempos que se indican en la **figura 26**. A continuación, las células se procesaron para análisis mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron una disminución en la internalización del TfrR en los fibroblastos de pacientes con LD con respecto a los de los controles. Esta disminución en la internalización del TfrR fue semejante a la observada para el EGFR.

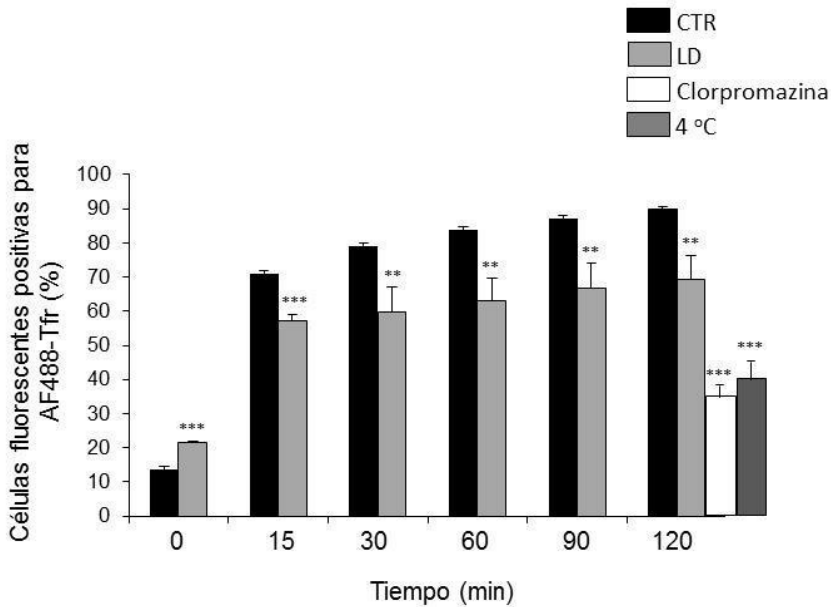


Figura 26. Cuantificación de la internalización del complejo Tfr-TfrR mediante citometría de flujo. Los fibroblastos humanos control, C-1, C-2 (CTR), y deficientes en laforina L-2, L-3 y en malina M-1 (LD) se incubaron en KH durante 30 min y posteriormente se añadió el sustrato fluorescente AF488-Tfr durante los tiempos indicados en la figura. Las células se procesaron y analizaron mediante citometría de flujo. Los valores resultantes de fluorescencia se expresan como el porcentaje de células que habían incorporado el fluoróforo. Como control de esta endocitosis, fibroblastos control se incubaron en presencia de clorpromazina o a 4 °C durante el mayor de los tiempos analizados. Todos los valores de fluorescencia corresponden a las medias \pm SD de tres experimentos independientes. Los resultados de los fibroblastos controles (C-1 y C-2) y de pacientes con LD (L-1, L-2 y M-1) se agruparon al no existir diferencias significativas entre ellos. Se encontraron diferencias significativas entre fibroblastos humanos control y con LD en $**P < 0,001$, $***P < 0,0001$.

Por tanto, de los resultados obtenidos estudiando ambos tipos de receptores podemos decir que existe una disminución de la endocitosis mediada por clatrina en las células de pacientes con LD.

1.2.1.2.2. Endocitosis mediada por caveolas

En la endocitosis mediada por caveolas la vesícula endocítica se encuentra recubierta por la caveolina. Para estudiar esta endocitosis se utilizó como ligando BodiPY FLC5, el cual entra a la célula utilizando principalmente esta vía endocítica [319, 320]. Fibroblastos humanos control y de pacientes con LD se incubaron con el fluoróforo BodiPY FLC5 durante

los tiempos indicados y posteriormente se analizaron por citometría de flujo.

Como se observa en el histograma de la **figura 27**, los fibroblastos de pacientes con LD presentan una disminución significativa en la internalización del fluoróforo respecto a los de los controles, sobre todo a partir de 60 min de incubación. Sin embargo, esta alteración es menor a la observada tanto en la endocitosis mediada por clatrina como, especialmente, a la observada en la endocitosis de fase fluida. Esto puede ser debido a que tanto la endocitosis de fase fluida como la mediada por clatrina siguen una vía de internalización similar por la cual las diferentes vesículas internalizadas se fusionan con el lisosoma, sin embargo, en la endocitosis mediada por caveolas, la vesícula caveolar además de internalizarse de forma similar a las anteriores, también pueden dirigirse al retículo endoplásmico o al complejo de Golgi pasando previamente por un compartimento endosomal denominado caveosoma [181, 321]. Por tanto, puede que la endocitosis mediada por caveolas no se encuentre tan alterada como las otras vías endocíticas, debido a que las vesículas internalizadas no se dirigen únicamente a los lisosomas.

Así pues, estos resultados de la endocitosis muestran que tanto la endocitosis de fase fluida como la mediada por receptor están reducidas en los modelos de LD. Además, esta alteración de la endocitosis es similar en las diferentes líneas de fibroblastos con LD, en las deficientes en la laforina y en las deficientes en la malina.

En resumen, todos estos resultados en su conjunto, es decir, las alteraciones tanto en la macroautofagia (autofagia no selectiva) y en la mitofagia (autofagia selectiva) como en la endocitosis, indican que en la enfermedad de Lafora la vía lisosomal está claramente alterada, ya que sus dos principales funciones están disminuidas.

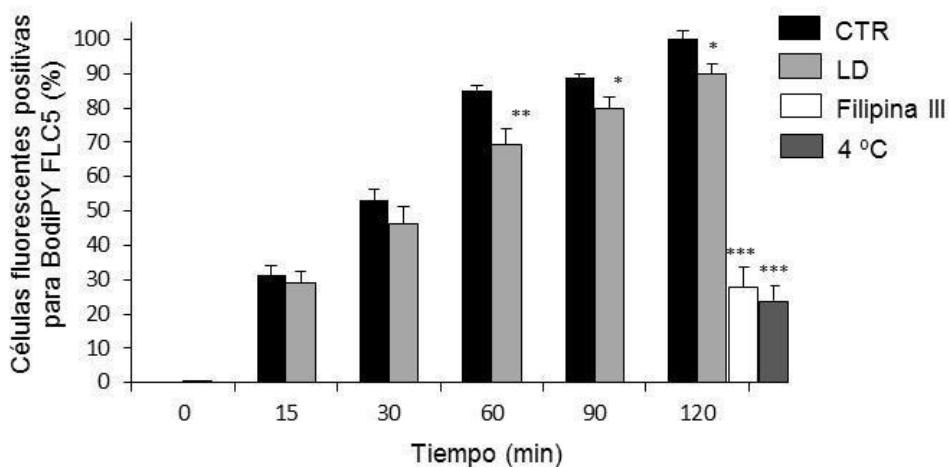


Figura 27. Cuantificación de la internalización del fluoróforo Bodipy FLC5 mediante citometría de flujo. Los fibroblastos humanos control C-1 y C-2 (CTR) y los deficientes en laforina L-2 y L-3 o en malina M-1 (LD) se incubaron en KH durante 30 min y posteriormente se añadió el sustrato fluorescente, Bodipy FLC5, durante los tiempos de incubación que se indican en el histograma. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Como control del experimento, fibroblastos humanos control se incubaron con el fluoróforo a 4 °C o en presencia también de filipina III durante el mayor de los tiempos analizados. La actividad endocítica se calculó como el porcentaje del número de células fluorescentes. De cada una de las muestras se analizaron un total de 10.000 células. Los resultados de los fibroblastos controles (C-1 y C-2) y de pacientes con LD (L-1, L-2 y M-1) se agruparon al no existir diferencias significativas entre ellos. Todos los valores corresponden a las medias \pm SD de tres experimentos independientes con muestras por duplicado (* $P < 0,01$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$).

1.2.2. Actividad de las calpaínas

Dado que LD se caracteriza por la acumulación de poliglucosanos y de proteínas que quedan retenidas en estos agregados, y que los dos principales sistemas de degradación intracelular de proteínas, la autofagia y el sistema ubiquitina-proteasoma, se encuentran disminuidos en esta enfermedad [322], estudiamos si un tercer sistema de degradación intracelular de proteínas como son las calpaínas, se encontraba también alterado en LD. Para analizar la actividad de las calpaínas en fibroblastos control y de pacientes con LD, se utilizó el kit comercial “Calpain Activity Assay Kit”, tal y como se describe en el Material y Métodos. Las muestras se

incubaron durante 7 h 30 min con el sustrato de calpaínas Ac-LLY-AFC, proporcionado por el kit. La digestión del sustrato por las calpaínas provoca la emisión de fluorescencia, por lo que a mayor intensidad de fluorescencia, mayor actividad calpaína. En la **figura 28** se representa la actividad calpaína en las diferentes líneas celulares analizadas, medida cada 5 min durante el tiempo total del experimento. Observamos una disminución en la intensidad de fluorescencia y, por tanto, en la actividad calpaína en los fibroblastos de pacientes con LD con respecto a los fibroblastos controles.

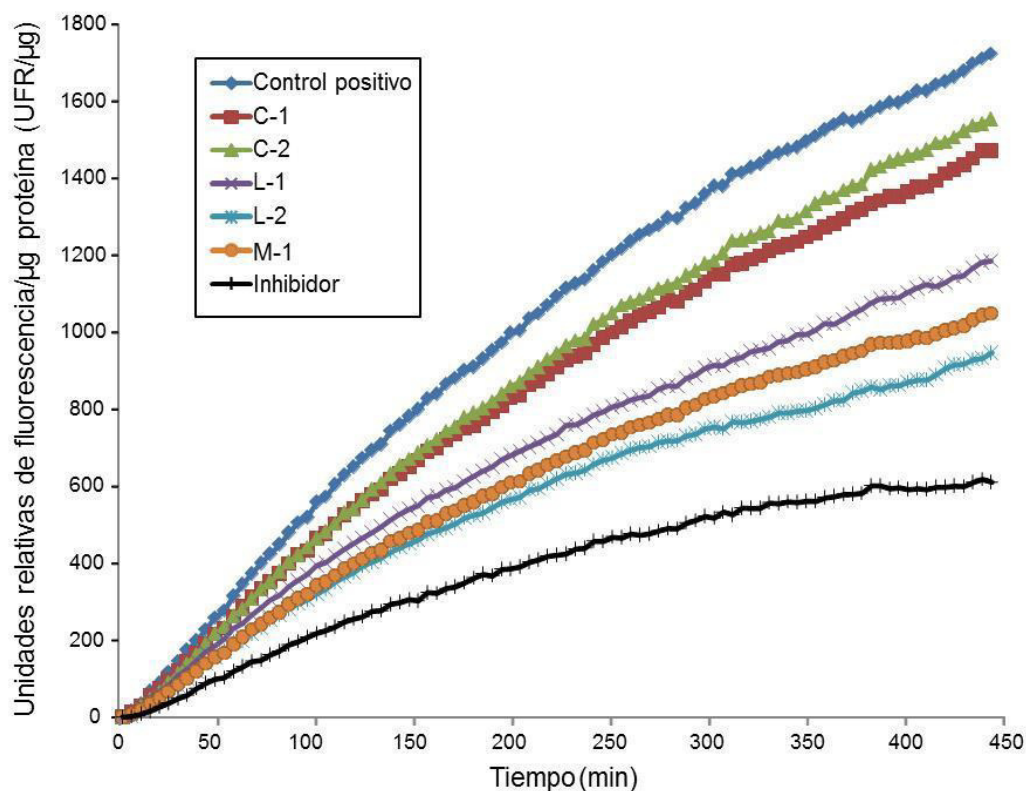


Figura 28. Cuantificación de la actividad calpaína en fibroblastos control y de pacientes con LD mediante fluorescencia. Fibroblastos humanos control (C-1 y C-2) y de pacientes con LD (deficientes en laforina (L-1, L-2) y deficientes en malina (M-1)) se recogieron y se procesaron tal y como se detalla en el Material y Métodos. Los extractos celulares se incubaron con el sustrato de calpaína en un tampón proporcionado por el kit. Las diferentes muestras se cuantificaron tomando medidas de fluorescencia cada 5 min durante 7 h 30 min. Como control positivo y negativo de la actividad calpaína se añadió, respectivamente, una solución de calpaína activa y un inhibidor de calpaínas, proporcionados también por el kit. Este experimento se realizó por triplicado y en la figura se muestra una gráfica representativa de los valores medios de intensidad de fluorescencia por μg de proteína para cada una de las muestras ensayadas.

Por tanto, hemos visto que los principales sistemas de degradación intracelular de proteínas están alterados en LD. Esto la convierte en una patología particular, ya que en la mayoría de enfermedades donde existe una alteración de alguno de los sistemas de degradación intracelular, se observa una inducción en los otros sistemas degradativos, posiblemente como respuesta para intentar compensar dicha deficiencia [323, 324].

2. Estudio de la localización celular de la laforina y de la malina

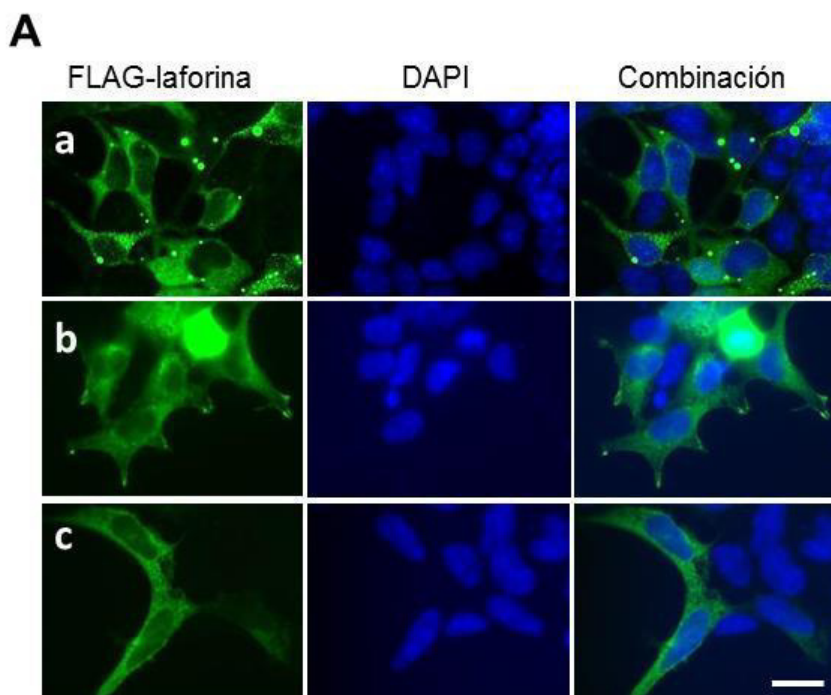
En los últimos años se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios para determinar las bases moleculares de LD. En ellos se ha conseguido asociar defectos en las dos principales proteínas involucradas en la enfermedad, la laforina y la malina, con diversas alteraciones en determinados procesos celulares [75, 91-93, 286]. Sin embargo, todavía no se conocen de manera detallada las funciones precisas de estas dos proteínas.

Es bien sabido que una estrategia inicial de aproximación a la determinación de la función de una proteína, es la de identificar su localización o localizaciones y conocer otras proteínas que allí interactúan con ella. Éste es el estudio que nos hemos planteado comenzar aquí y hemos empezado analizando la localización de la laforina y la malina en diferentes líneas celulares, empleado tanto la inmunofluorescencia como el subfraccionamiento celular y el subsiguiente análisis de las fracciones por Western-blot.

2.1. Localización celular de la laforina y de la malina sobreexpresadas

Para determinar la localización de la laforina y la malina en la célula se comenzó por realizar experimentos de inmunofluorescencia. Sin embargo, no hay disponible ningún anticuerpo comercial que detecte la malina endógena ni ningún laboratorio de investigación al que solicitárselo.

Además, el anticuerpo contra la laforina que utilizamos habitualmente en el laboratorio no es capaz de detectar la laforina endógena por inmunofluorescencia. Por ello, se tuvo que recurrir a la sobreexpresión de las dos proteínas, transfectando transitoriamente células HeLa, COS-7 o HEK293T con plásmidos que expresaban la laforina o la malina conjugadas con el péptido FLAG. Después, se analizó la localización de las dos proteínas por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-FLAG y utilizando un microscopio de fluorescencia o un microscopio confocal. Como se muestra en la **figura 29**, en las diferentes líneas celulares ensayadas observamos que, en medio completo y en condiciones de sobreexpresión, la laforina presenta una localización claramente citoplasmática, mientras que la malina es mayoritariamente nuclear.



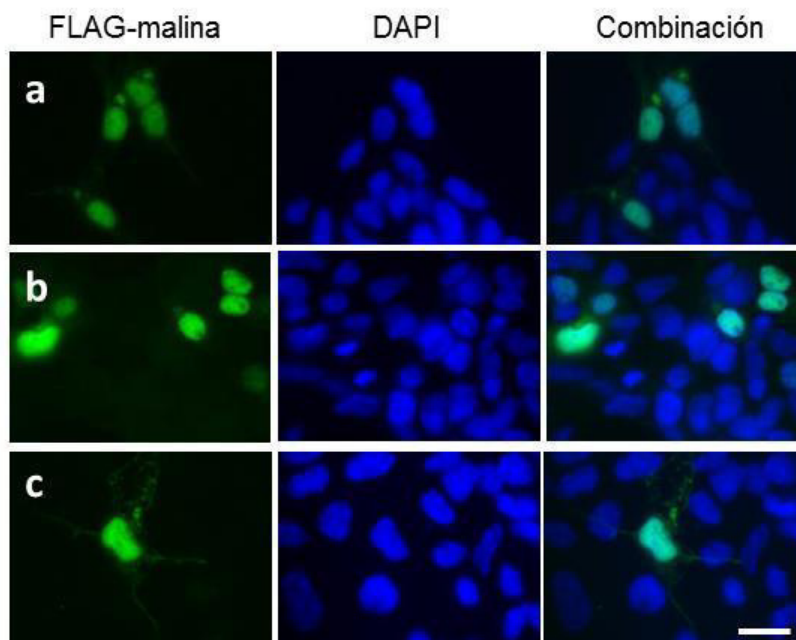
B

Figura 29. Localización de la laforina y de la malina en células HeLa, HEK293T y COS-7, analizada mediante inmunofluorescencia. La laforina (A) y la malina (B) conjugadas con FLAG fueron sobrexpresadas transitoriamente durante 48 h en células HEK293T (a), HeLa (b) y COS-7 (c). Las células se analizaron por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-FLAG. La laforina y la malina se muestran en color verde, el marcador nuclear DAPI en color azul y la combinación de ambas imágenes se muestra tanto en A como en B en el extremo derecho en cada fila (Combinación). Barra: 20 μ m.

2.1.1. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina y de la malina

Como ya se ha explicado en la Introducción, LD se caracteriza por una acumulación de poliglucosanos. Estos polisacáridos se corresponden con un tipo de glucógeno poco ramificado e insoluble que tiende a precipitar, permaneciendo así en gran parte inaccesible para su metabolización. Es posible, por tanto, que la acumulación de esos poliglucosanos en LD pudiese propiciar, al menos en determinadas situaciones, una menor disponibilidad de glucosa para la célula. Por eso, se decidió investigar si la glucosa tendría algún efecto en la localización celular de la laforina o de la malina en las células HeLa, COS-7 y HEK293T. Estas células fueron previamente transfectadas transitoriamente con plásmidos que expresan la laforina o la

malina conjugadas con el péptido FLAG. Después, fueron incubadas durante 8 h en el medio completo correspondiente con o sin glucosa. Ese tiempo de 8 h, en el caso del medio completo sin glucosa, permitiría que se degradase, al menos en parte, el glucógeno almacenado por las células antes de esta incubación. La ausencia de glucosa se limitó a las mencionadas 8 h, puesto que a partir de entonces observábamos una disminución de la viabilidad de las células HeLa y HEK293T (datos no mostrados).

La **figura 30** muestra imágenes de fluorescencia representativas de la localización de la laforina y de la malina en células HeLa y COS-7 en esas condiciones. Como se puede observar, en medio completo sin glucosa, y en contraste con lo que ocurre en el medio con glucosa (ver también la **figura 29**), una gran parte de la laforina se encuentra localizada en el núcleo. En cambio, en ausencia de glucosa la malina mantiene su localización nuclear, es decir, no sufre cambios significativos en su localización. Por lo tanto, la ausencia de glucosa en el medio estaría provocando la translocación de la laforina, inicialmente citoplásmica, al núcleo y no afectaría a la localización de la malina. Esto indica que la localización de la laforina, pero no la de la malina, es dependiente de glucosa.

Aunque no se muestran las imágenes correspondientes a las células HEK293T, se obtuvieron resultados semejantes a los mostrados con las células HeLa y COS-7 en la **figura 30**. Como control del experimento, las células HeLa se transfectaron transitoriamente también con un plásmido que codifica para la proteína GFP conjugada con FLAG y, tras la sobreexpresión de esa proteína, las células se incubaron también en medio completo en presencia o no de glucosa durante 8 h. Como se observa también en la **figura 30A**, el GFP presenta una localización homogénea por toda la célula, localizándose tanto en el citoplasma como en el núcleo y la presencia o no de la glucosa no afecta aparentemente a esa localización.

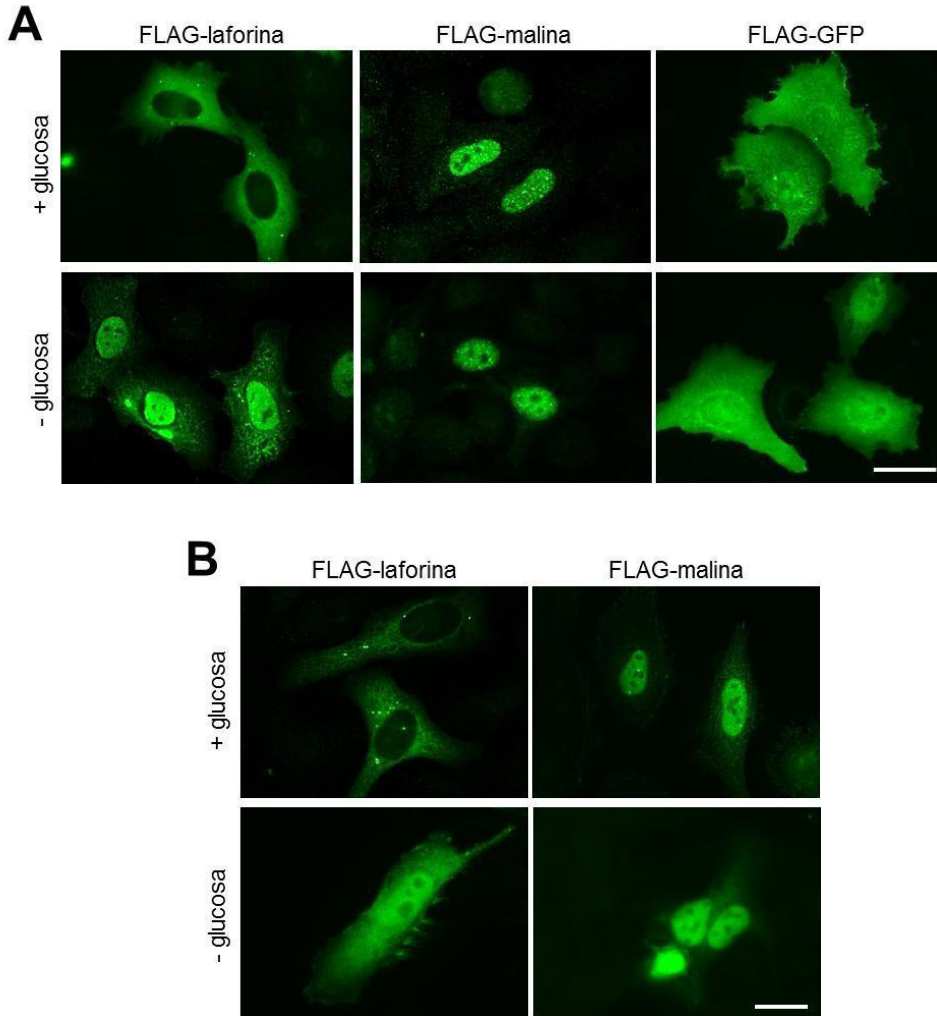


Figura 30. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina y de la malina en células HeLa y COS-7, analizada mediante inmunofluorescencia. Las dos proteínas conjugadas con FLAG fueron transitoriamente sobrepresadas en las células HeLa (A) y COS-7 (B). Como control del experimento, también se sobrepresó la GFP conjugada con FLAG en las células HeLa (las dos micrografías del extremo derecho en A). Las células se analizaron por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-FLAG. La laforina, la malina y la GFP se muestran en color verde después de 8 h de incubación de las células en el medio completo con o sin glucosa (+ glucosa o - glucosa, respectivamente), tal y como se indica a la izquierda de cada fila. Barra: 20 μ m.

Por tanto, la localización de la laforina, pero no la de otra proteína como GFP que también se encuentra localizada en el citoplasma y en el núcleo, es dependiente de glucosa. Además, este transporte de la laforina al núcleo que ocurre en ausencia de glucosa es reversible, ya que tras la

adición de glucosa a las células que habían sido incubadas previamente durante 8 h en ausencia de este azúcar, la laforina vuelve a localizarse en el citoplasma (**Fig. 31c**). Para comprobar que la laforina detectada en el citoplasma tras la adición de glucosa no se trataba de laforina de nueva síntesis, al medio con glucosa, también se añadió CHX para inhibir la síntesis proteica. Como se puede observar en la **figura 31d**, la laforina observada en el citoplasma no se trataría de laforina de nueva síntesis, sino que la laforina presente en el núcleo en ausencia de glucosa se transportaría al citoplasma tras la adición de glucosa. Como control, las células incubadas en ausencia de glucosa durante 8 h también se incubaron en medio sin glucosa y con CHX durante 8 h adicionales, observándose que la CHX no afecta a la localización de la laforina (**Fig. 31e**).

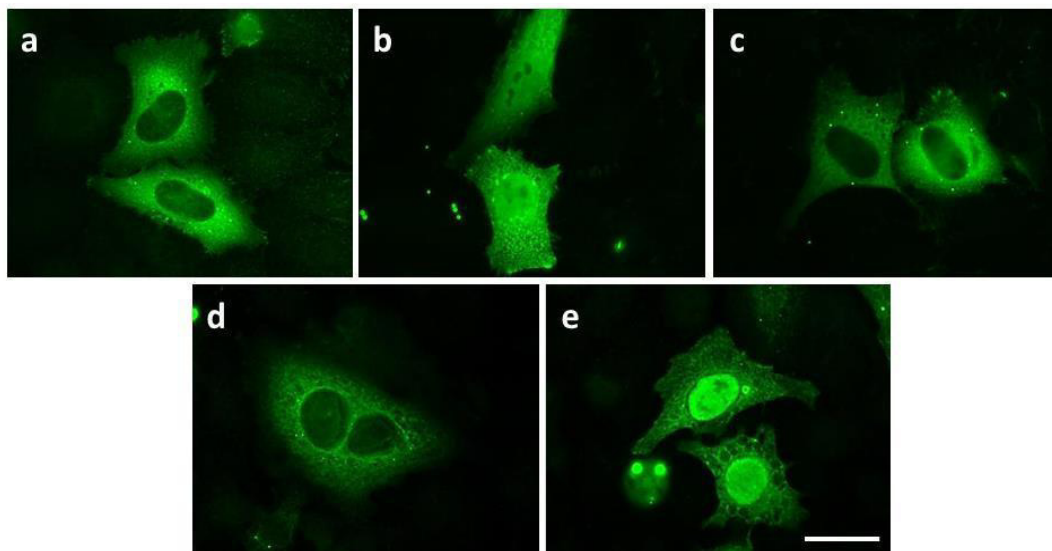


Figura 31. Efecto de la re-adición de glucosa a células previamente incubadas en ausencia de ésta sobre la localización de la laforina, analizada mediante inmunofluorescencia. La laforina conjugada con FLAG fue sobrepresada transitoriamente en células HeLa. La laforina se muestra en color verde después de 8 h de incubación de las células en medio completo: i) con glucosa (**a**), ii) sin glucosa (**b**), iii) sin glucosa y posterior incubación en medio con glucosa durante 8 h adicionales (**c**) iv) sin glucosa y posterior incubación en medio con glucosa y CHX 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 8 h adicionales (**d**) o v) sin glucosa y posterior incubación en medio sin glucosa y CHX 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 8 h adicionales (**e**). Para localizar la laforina se utilizó un anticuerpo anti-FLAG. Barra: 20 μm .

Por otra parte, analizando mediante inmunofluorescencia la localización de FLAG-laforina en células HeLa incubadas a tiempos que van de 0 a 8 h en medio completo sin glucosa, observamos que la ausencia de glucosa en el medio no producía un cambio instantáneo en su localización como respuesta a esa situación, sino que tenía lugar un cambio progresivo de su localización citoplásmica a una nuclear, reflejando posiblemente el descenso gradual en la disponibilidad de glucosa por las células cuando el azúcar está ausente del medio en el que son incubadas. Así, sólo tras 5 h de incubación de las células en ausencia de glucosa, aproximadamente el 50 % de ellas presentaban la mayor parte de la laforina localizada en el núcleo (resultados no mostrados).

Para evitar posibles efectos del conjugado empleado sobre la localización de las proteínas, se repitió el experimento en las mismas condiciones que en el caso anterior, pero conjugando las proteínas con el péptido HA en lugar de con FLAG. Como se observa en la **figura 32**, el resultado obtenido con las proteínas conjugadas con HA fue idéntico al obtenido con FLAG. Por tanto, la localización observada de la laforina y la malina es independiente del tipo de conjugado empleado.

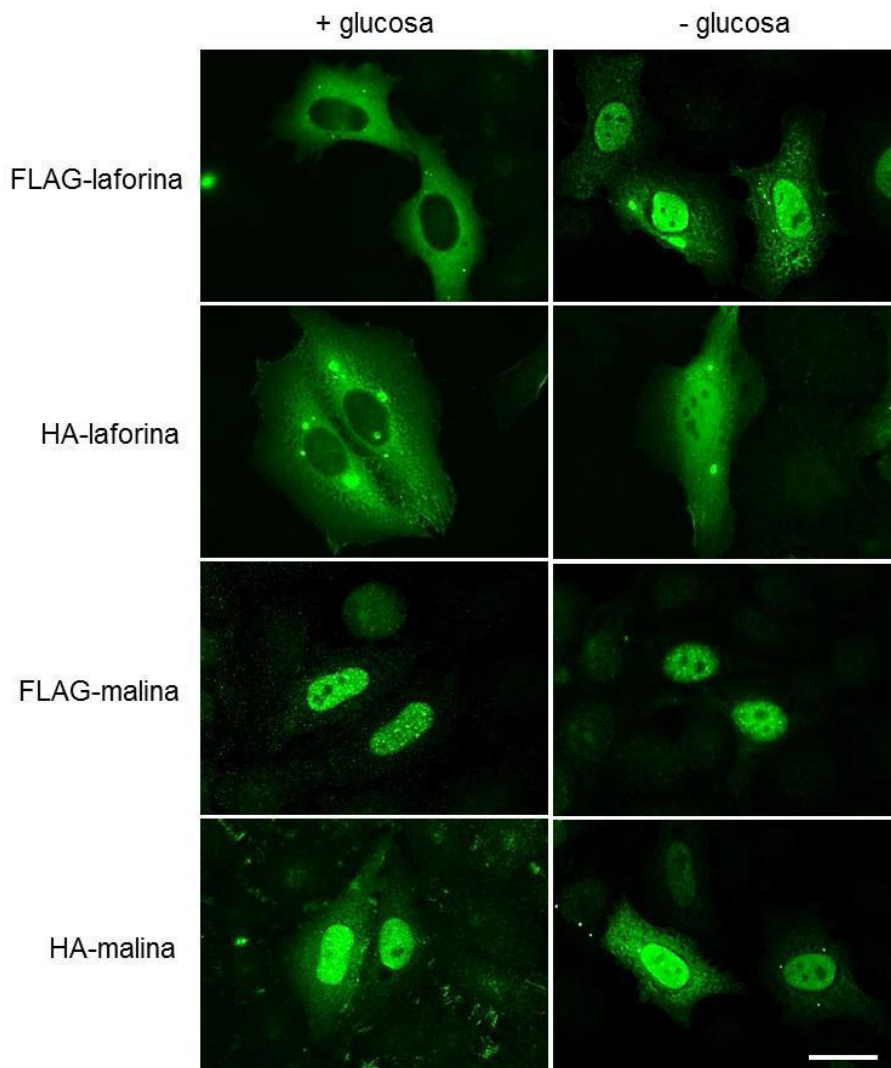


Figura 32. Efecto del tipo de conjugado empleado para marcar la laforina y la malina sobre la localización de estas dos proteínas en las células incubadas en presencia o en ausencia de glucosa, analizada mediante inmunofluorescencia. Las proteínas, conjugadas con FLAG o con HA, fueron sobrepresadas transitoriamente en células HeLa. La laforina y la malina se muestran en color verde después de 8 h de incubación de las células en medio completo con o sin glucosa (+ glucosa o - glucosa, respectivamente). Para localizar la laforina o la malina se utilizaron los anticuerpos anti-FLAG y anti-HA, como se indica en el lateral izquierdo de los paneles de la figura. Barra: 20 μ m.

La localización nuclear de la laforina en ausencia de glucosa también pudo confirmarse realizando un subfraccionamiento celular de MEFs que sobrepresaban establemente la laforina [76]. Como se observa en la

figura 33, cuando las células se incubaron en medio completo con glucosa, la laforina se detectaba, sobre todo, tanto en el homogenado celular (H) como en una fracción citoplásmica (C). Sin embargo, en ausencia de glucosa la laforina se detecta, además de en el homogenado celular (H), tanto en la fracción enriquecida en núcleos (N) como en la fracción citoplásmica. Esto indica que, en MEFs incubados en ausencia de glucosa, la laforina previamente citoplásmica se transporta, al menos parcialmente, al núcleo. La histona H3 (con localización nuclear) y la GAPDH (con localización citosólica) detectadas con los correspondientes anticuerpos, muestran el grado de purificación de las diferentes fracciones celulares empleadas en el ensayo. Asimismo se emplearon otros marcadores como referencia incluyendo las proteínas LAMP2 (lisosomal), VDAC (mitocondrial) y calnexina (retículo endoplásmico).

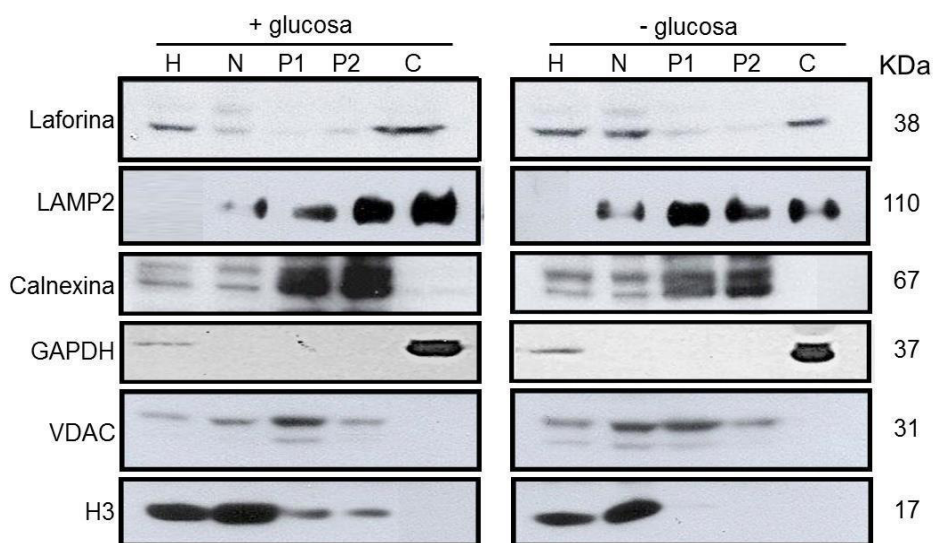


Figura 33. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina en varias subfracciones celulares aisladas de MEFs, analizadas mediante Western-blot. Los MEFs que sobreespresaban establemente la laforina, se incubaron durante 8 h en medio completo con glucosa (+ glucosa) o sin ella (- glucosa). Las células se homogeneizaron y se obtuvieron cuatro fracciones subcelulares mediante centrifugación diferencial, tal y como se detalla en el Material y Métodos. Las diferentes fracciones se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos correspondientes. H, homogenado; N, sedimento de 1.000 g x 10 min; P1, sedimento de 10.000 g x 15 min; P2, sedimento de 20.000 g x 30 min; C, sobrenadante de la última centrifugación. Marcadores subcelulares empleados: histona H3 para los núcleos; LAMP2 para los lisosomas; VDAC para las mitocondrias; calnexina para el retículo endoplásmico y GAPDH para el citosol.

Así pues, a partir de los experimentos de inmunofluorescencia y de subfraccionamiento celular y Western-blot, concluimos que, en medio con glucosa y en condiciones de sobreexpresión, la laforina está localizada en el citoplasma y la malina en el núcleo. Sin embargo, cuando las células se incuban en medio sin glucosa, mientras la malina permanece en el núcleo, una buena parte de la laforina cambia su localización desde el citoplasma al núcleo y este cambio tiene además un carácter reversible.

En definitiva y por tanto, la localización de la laforina parece ser dependiente de la presencia o no de glucosa en el medio donde se incuban las células.

2.1.2. Efecto de otras condiciones de estrés sobre la localización de la laforina y de la malina

Dado que la localización de la laforina es dependiente de glucosa y que la ausencia de glucosa en el medio representa un estrés para la célula [325, 326], se estudió si este efecto observado se debía al estrés producido y si otras condiciones de estrés, como la incubación en un medio pobre en nutrientes pero conteniendo glucosa (KH) o la presencia de peróxido de hidrógeno, tenían efectos similares sobre la localización de la laforina. Para ello, se transfectaron transitoriamente células HeLa con los plásmidos que expresan la laforina o la malina conjugadas con FLAG y HA, respectivamente, y se incubaron durante 4 h en medio completo con glucosa en presencia de peróxido de hidrógeno o en KH (**Fig. 34**). Se observó que estas otras dos condiciones de estrés no modificaron la localización de la laforina ni de la malina, indicando que el transporte de la laforina al núcleo en ausencia de glucosa no es debido a una respuesta general al estrés y que es una respuesta, probablemente bastante específica, a la ausencia de glucosa.

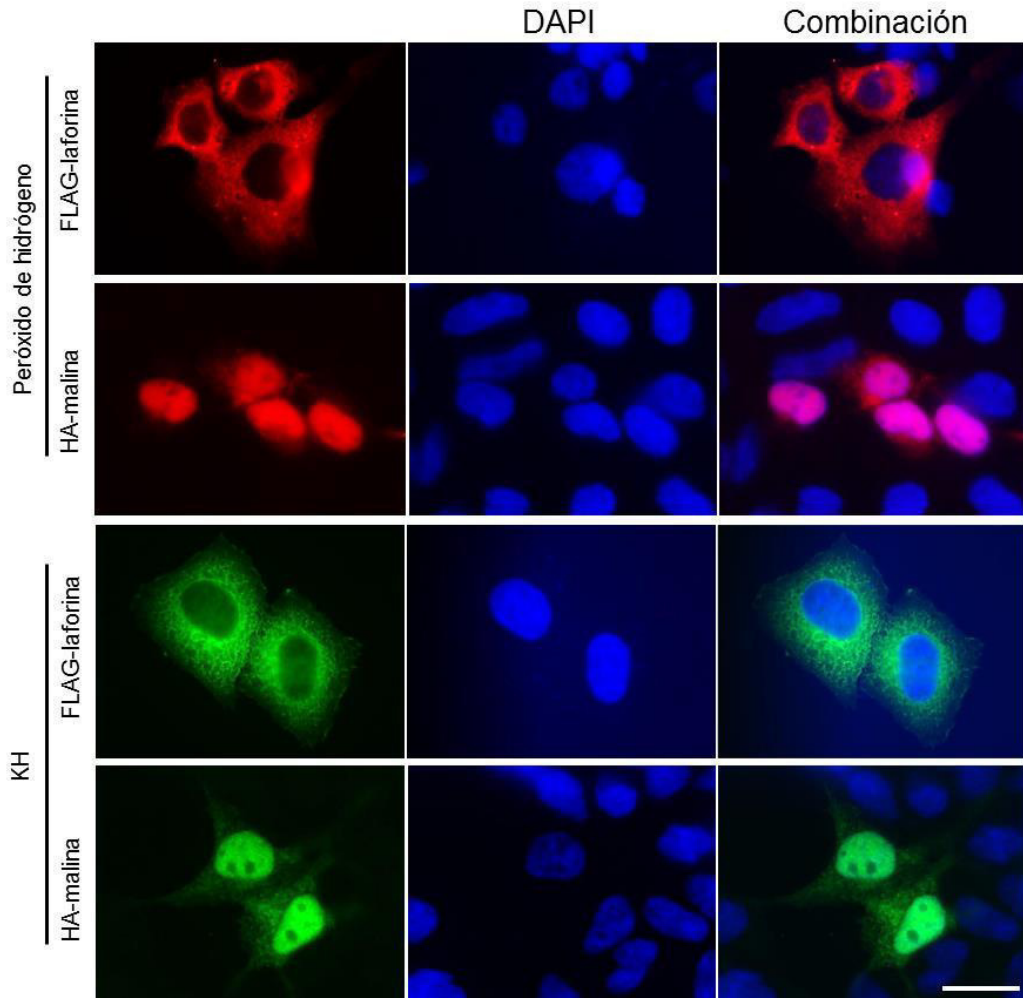


Figura 34. Efecto de dos condiciones diferentes de estrés, un tratamiento con peróxido de hidrógeno o de una incubación en un medio empobrecido en nutrientes, KH, sobre la localización de la laforina y de la malina, analizado mediante inmunofluorescencia. La laforina y la malina, conjugadas con FLAG y HA respectivamente, fueron sobreexpresadas transitoriamente en células HeLa. Después de incubar las células durante 4 h en medio completo con glucosa en presencia de peróxido de hidrógeno 0,5 mM (paneles superiores) o en KH (paneles inferiores), las células se fijaron y se analizaron por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-FLAG o anti-HA. La laforina y la malina se muestran, en las células tratadas con peróxido de hidrógeno, en color rojo, y en las células incubadas en medio KH, en color verde. En color azul se muestra el marcador nuclear DAPI. Las imágenes del extremo derecho en cada fila (Combinación) corresponden a la combinación de las dos imágenes a su izquierda. Barra: 20 μ m.

Además, para confirmar que el cambio provocado por la glucosa en la localización de la laforina es independiente del medio de incubación de las células, incubamos células previamente transfectadas transitoriamente con los plásmidos que codifican para la laforina o la malina conjugadas, respectivamente, con FLAG y HA en otro medio, el KH, también en presencia o no de glucosa durante 5 h. Como se observa en la **figura 35**, en KH sin glucosa, una vez más, una gran parte de la laforina se localiza en el núcleo, lo que parece indicar que el cambio en la localización de la laforina es debido específicamente a la glucosa, independientemente de la composición del medio en el que se encuentran las células.

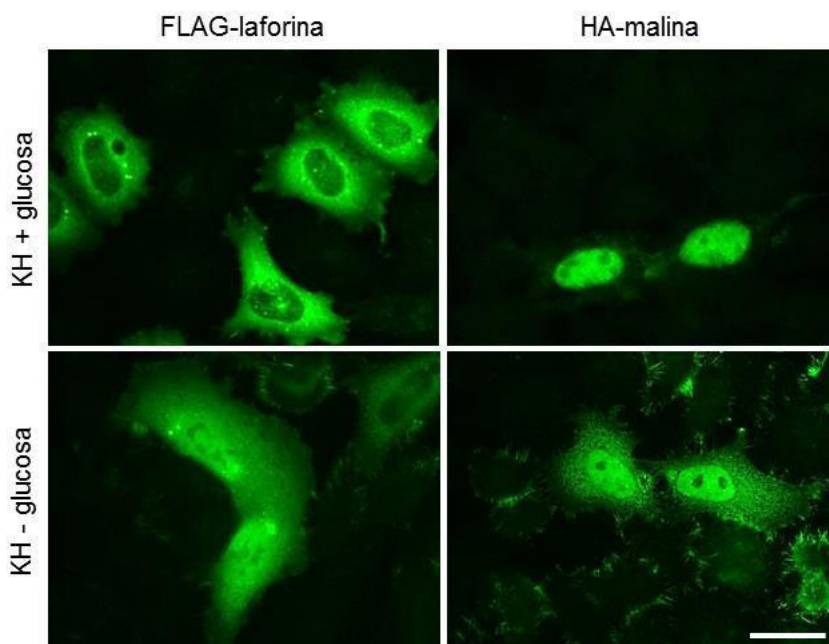


Figura 35. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina y de la malina en células incubadas en KH, analizada mediante inmunofluorescencia. La laforina y la malina conjugadas con FLAG y HA, respectivamente, fueron sobreexpresadas transitoriamente en células HeLa. Después de 5 h de incubación de las células en KH con o sin glucosa (KH + glucosa o KH - glucosa, respectivamente), la laforina y la malina se inmunodetectaron con los anticuerpos frente a FLAG y frente a HA como se indica en la parte de arriba de los paneles de la figura. Barra: 20 μ m.

2.1.3. Localización de la laforina y de la malina cuando se sobrepresan conjuntamente

Anteriormente, hemos podido observar que la laforina y la malina presentaban localizaciones diferentes cuando se sobrepresaban por separado en las células incubadas en medio completo con glucosa. Sin embargo, se ha descrito que la laforina y la malina interaccionan entre sí formando un complejo funcional [61, 69, 327]. En las condiciones de sobrepresión utilizadas anteriormente, una de las dos proteínas, la que se sobrepresa, se encontrará siempre en exceso con respecto a la otra proteína. A continuación, estudiamos si las diferentes localizaciones podían ser también observadas cuando ambas proteínas se sobrepresaban conjuntamente, lo que supondría, al menos teóricamente, niveles similares de ambas proteínas en las células cotransfectadas. En la **figura 36** se observa el resultado de la sobrepresión conjunta de la laforina y la malina, conjugadas con FLAG y HA, respectivamente, en células HeLa e incubadas en el correspondiente medio completo con o sin glucosa durante 8 h. En las dos condiciones ensayadas, la localización tanto de la laforina como de la malina es mayoritariamente nuclear.

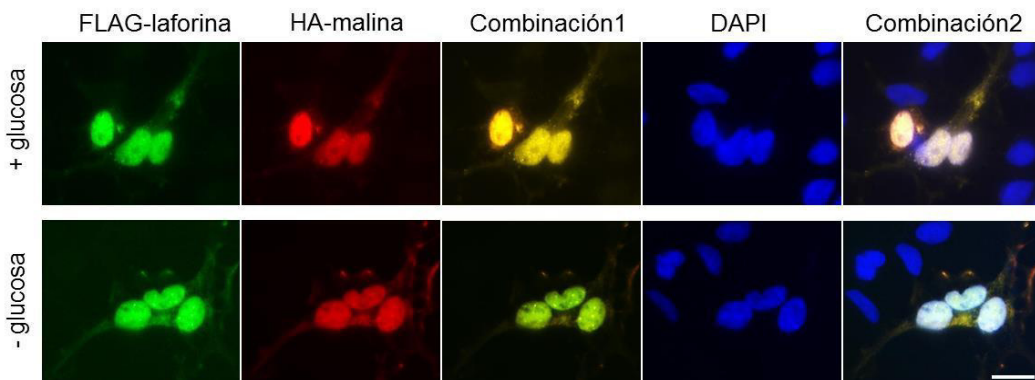
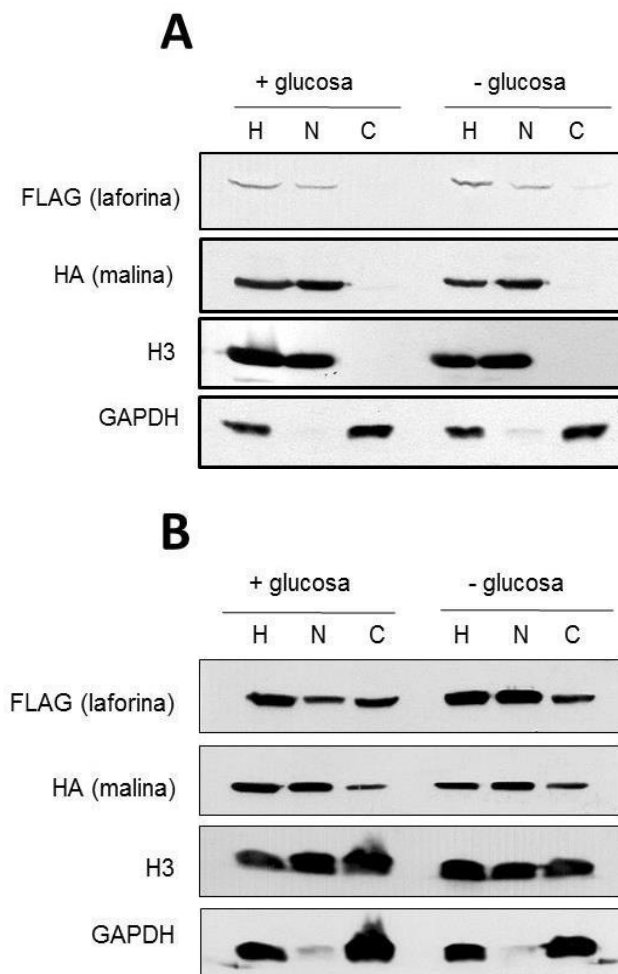


Figura 36. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina y de la malina cuando las dos proteínas se sobrepresan conjuntamente, analizada mediante inmunofluorescencia. Las imágenes corresponden a las proteínas cotransfectadas FLAG-laforina (verde) y HA-malin (rojo) después de incubar las células HeLa durante 8 h en medio completo con glucosa (+ glucosa) o sin ella (- glucosa), como se indica a la izquierda de los paneles. El marcador nuclear DAPI marca los núcleos de color azul. Para detectar la laforina y la malina se utilizaron anticuerpos anti-FLAG y anti-HA, respectivamente. Las imágenes de la tercera y quinta columna corresponden, respectivamente, a la combinación de las imágenes que se muestran en las columnas primera y segunda (Combinación1), y primera, segunda y cuarta (Combinación2). Barra: 20 μ m.

Los resultados de inmunofluorescencia fueron confirmados mediante un subfraccionamiento celular y Western-blot, sobrexpresando conjuntamente la laforina y la malina en células HeLa, HEK293T y COS-7 en presencia o no de glucosa (**Fig. 37**). En el fraccionamiento subcelular, la separación de la fracción nuclear y citoplásmica no resultó totalmente satisfactoria en los dos últimos tipos celulares (probablemente por producirse rotura nuclear en la bomba de cavitación), aunque sí en el caso de las células HeLa. Sin embargo, esto no afecta a la conclusión de que la laforina aparece ahora en la fracción nuclear tanto en presencia como en ausencia de glucosa incluso en las células HEK293T y COS-7, ya que la fracción nuclear de las mismas apenas parece estar contaminada por la GAPDH.



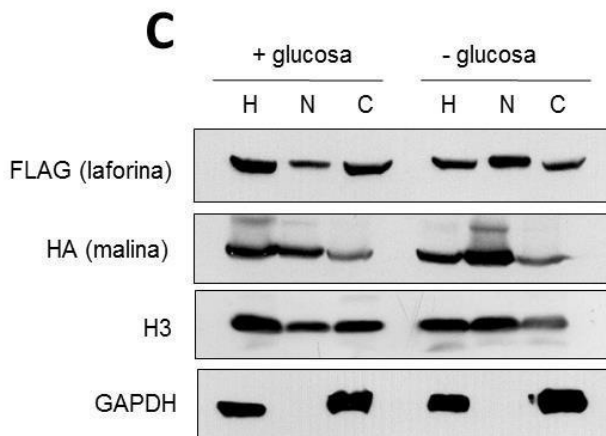


Figura 37. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina y de la malina en varias subfracciones celulares cuando las dos proteínas se sobreexpresan conjuntamente, analizadas mediante Western-blot. Las células HeLa (A), COS-7 (B) y HEK293T (C) fueron cotransfectadas con FLAG-laforina y HA-malina. Después de 8 h de incubación de las células en medio con (+ glucosa) o sin (- glucosa) glucosa, se obtuvieron diferentes fracciones subcelulares mediante centrifugación diferencial como se ha descrito en la figura 33. H, homogenado; N, sedimento de 1.000 g x 10 min; C, sobrenadante de 20.000 g x 30 min. Marcadores subcelulares empleados: histona H3 para los núcleos y GAPDH para el citosol.

En resumen, empleando dos procedimientos diferentes hemos comprobado que cuando se expresan conjuntamente la laforina y la malina, ambas se encuentran mayoritariamente localizadas en el núcleo, independientemente de la presencia o no de glucosa en el medio. Recordemos, en cambio, que cuando las dos proteínas se sobreexpresaban por separado en medio con glucosa la laforina estaba localizada en el citoplasma y la malina en el núcleo. Solamente cuando las células se incubaban en un medio sin glucosa, una buena parte de la laforina cambiaba su localización desde el citoplasma al núcleo, sin que la malina cambiara su localización nuclear. Estos resultados podrían ser explicados asumiendo que la laforina y la malina interactúan entre sí en un complejo funcional y estable [61, 69] y que, como hemos demostrado aquí, la mayor parte de la malina tiene una localización nuclear bastante fija e independiente de la presencia o no de glucosa. Así, cuando sobreexpresamos ambas proteínas, la cantidad de malina sería semejante a la de laforina, por lo que se uniría a ésta y la retendría en el núcleo. Por otra parte, cuando se sobreexpresa la

laforina pero no la malina, esta última se encuentra en mucha menor cantidad con respecto a la laforina y esa laforina en exceso no podría interactuar con la malina y quedaría libre para dirigirse al citoplasma.

Dado que en un medio de cultivo con glucosa la laforina sobrepresada en solitario se encuentra sobre todo localizada en el citoplasma, pero que cuando se sobrepresa junto con la malina se localiza en el núcleo, investigamos si este efecto sobre la localización de la laforina era específico de la malina o si era debido a que la simple coexpresión con cualquier proteína pudiera alterar, por alguna razón, su localización. Para ello, coexpresamos en células HeLa la laforina y la malina con otras dos proteínas, GTPBP3 y CERKL, que tienen, respectivamente, una localización citoplásmica (concretamente mitocondrial) y preferentemente nuclear [328, 329] y que, aparentemente, no están relacionadas con la laforina o la malina. Después, analizamos la localización de las diferentes proteínas mediante inmunofluorescencia.

Como se muestra en la **figura 38**, la localización de la laforina es citoplasmática y no varía con la coexpresión de otras proteínas diferentes a la malina. Estos resultados nos indican que la localización nuclear de la laforina es dependiente de la presencia de suficiente malina en ese subcompartimento celular.

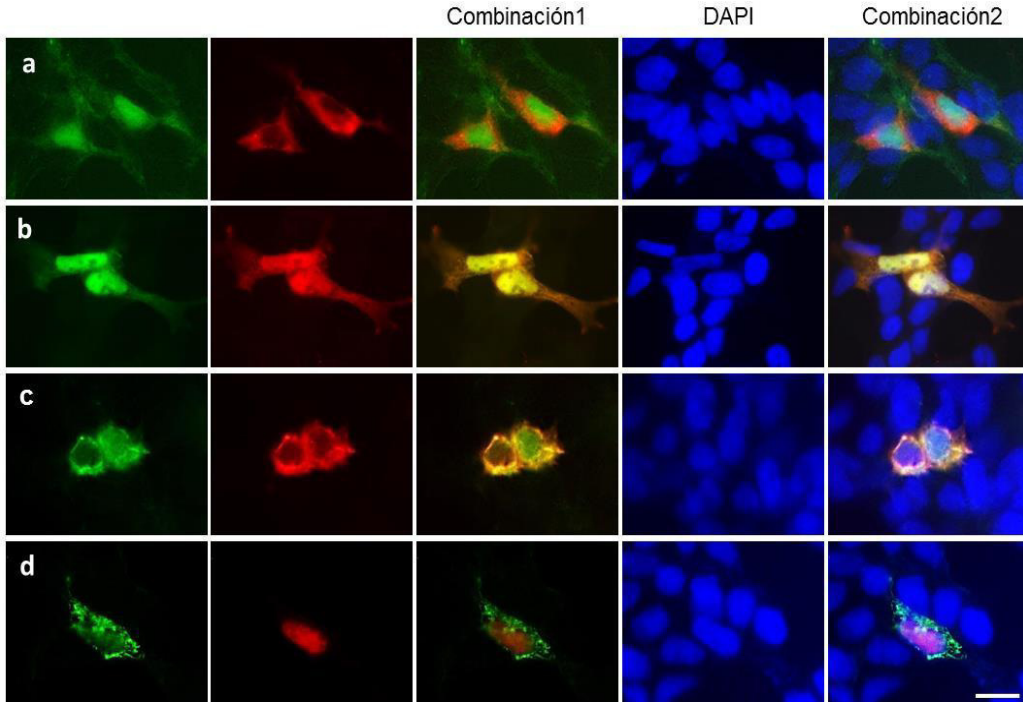


Figura 38. Efecto de la coexpresión de la laforina junto a otras proteínas sobre su localización, analizada mediante inmunofluorescencia. La doble sobreexpresión transitoria fue llevada a cabo en células HeLa combinando FLAG-laforina o HA-malina (como control) con GFP-CERKL (con una localización principalmente nuclear) o GFP-GTPBP3 (con una localización mitocondrial y, por tanto, en el citoplasma) en medio completo con glucosa. **(a)** GFP-CERKL (verde) y FLAG-laforina (rojo). **(b)** GFP-CERKL (verde) y HA-malina (rojo). **(c)** GFP-GTPBP3 (verde) y FLAG-laforina (rojo). **(d)** GFP-GTPBP3 (verde) y HA-malina (rojo). El marcador nuclear DAPI se muestra en color azul. Las imágenes de la tercera y quinta columna corresponden, respectivamente, a la combinación de las imágenes que se muestran en las columnas primera y segunda (Combinación1), y primera, segunda y cuarta (Combinación2). Barra: 20 μ m.

2.1.4. Análisis de la sobreexpresión de la laforina y la malina mediante PAS

En los estudios de localización de la laforina y la malina mediante inmunofluorescencia, observamos que cuando sobreexpresábamos la laforina en células incubadas en medio con glucosa, en muchas de las células transfectadas una parte de la laforina se encontraba formando unos acúmulos compactos de gran tamaño en el citoplasma (**Fig. 39**). Esto no ocurría con la malina, ya que su localización es mayoritariamente nuclear. Además, estos acúmulos de laforina prácticamente desaparecían en ausencia de glucosa.

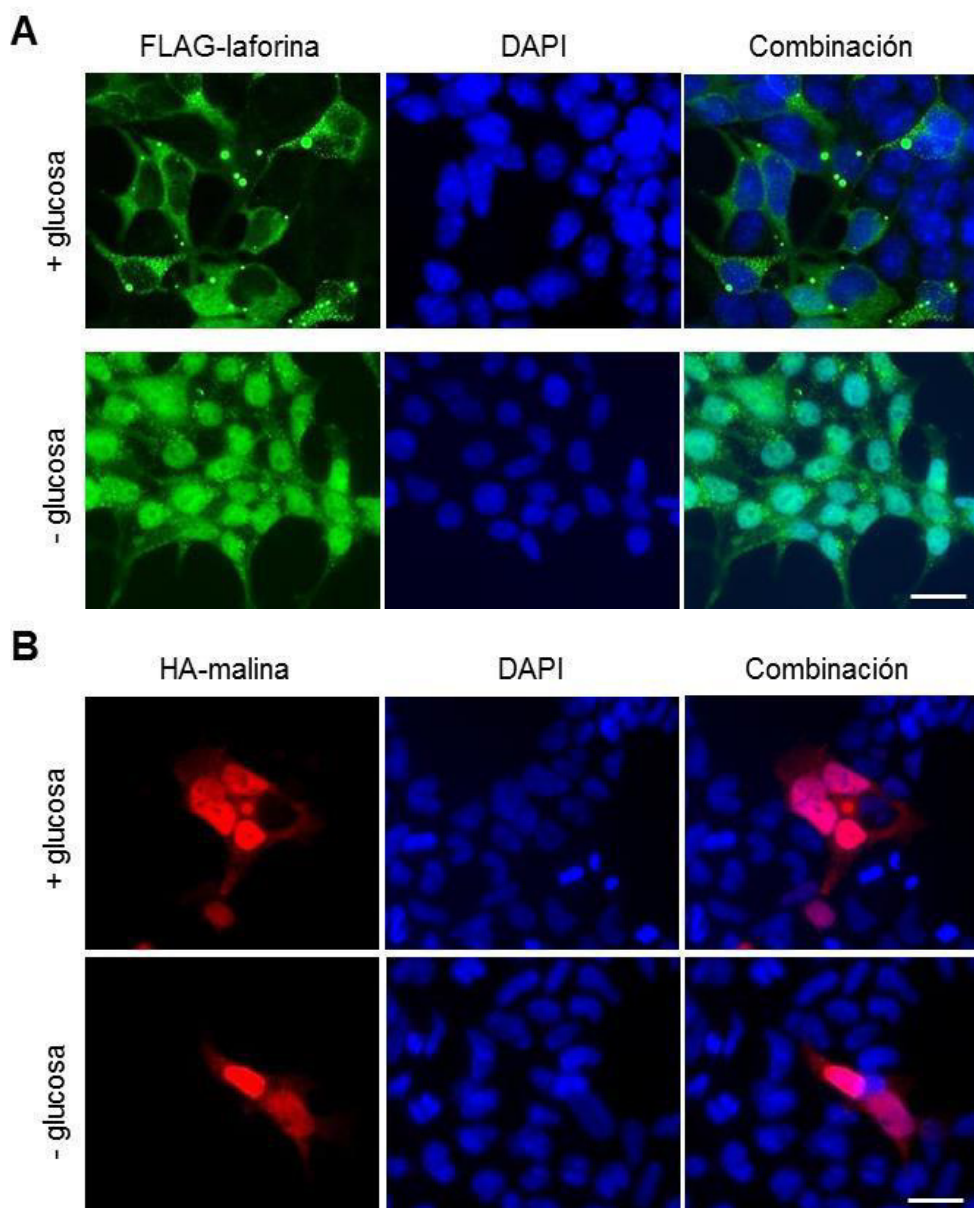
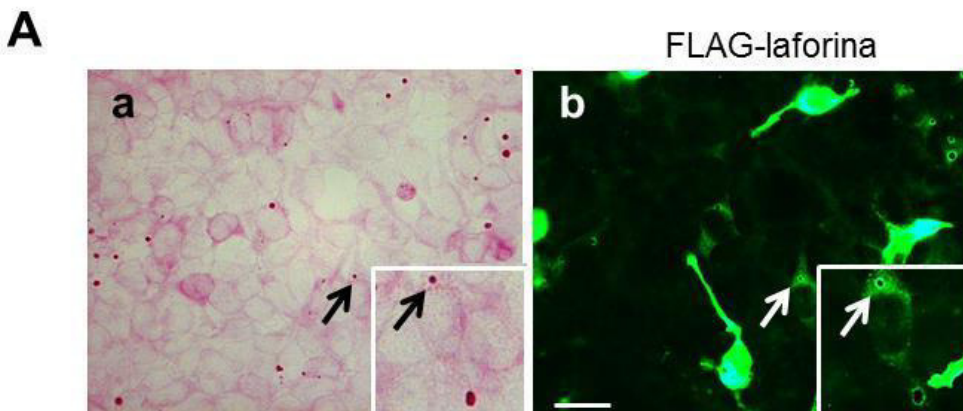


Figura 39. La sobreexpresión de la laforina pero no de la malina, produce la formación de acúmulos de laforina en el citoplasma. La laforina (A) y la malina (B) conjugadas con FLAG y HA, respectivamente, se sobreexpresaron transitoriamente en células HeLa durante 48 h. A continuación, las células se incubaron en medio con (+ glucosa) o sin (- glucosa) glucosa durante 8 h. Las preparaciones se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-FLAG o anti-HA según cada caso. La laforina se muestra en color verde, la malina en rojo y el marcador nuclear DAPI en azul. En la columna de la derecha (Combinación) se muestra la combinación de las dos imágenes de la izquierda. Barra: 20 μ m.

Esto último, junto al hecho de que se haya asociado a la laforina con el metabolismo del glucógeno [53, 72, 79], sugiere que estos acúmulos podrían corresponder a gránulos de este polisacárido unidos a la laforina, que además recordemos que posee un dominio de unión a carbohidratos. Para comprobarlo, sobreexpresamos la laforina (**A**) y la malina (**B**), esta última como control negativo, conjugadas con FLAG y HA, respectivamente, en células HeLa. Transcurridas 48 h, fijamos las células y realizamos la tinción de PAS que, como es bien sabido, tiñe azúcares [330]. A continuación, las muestras se analizaron por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-FLAG o anti-HA correspondiente.

En la **figura 40** se observa que las células que sobreexpresan la laforina presentan unos gránulos PAS positivos (**a**), que no se observan en la sobreexpresión de la malina (**c**). Esto sugiere que la sobreexpresión de la laforina causa la formación de estos gránulos. Además, observamos que la parte central de los gránulos PAS positivos carece de fluorescencia (**b**), probablemente debido a que la tinción colorimétrica que se concentra en estos acúmulos imposibilita la penetración del anticuerpo. En cambio, esos gránulos presentan a su alrededor un halo intenso de fluorescencia que indica que la laforina realmente se concentra allí.



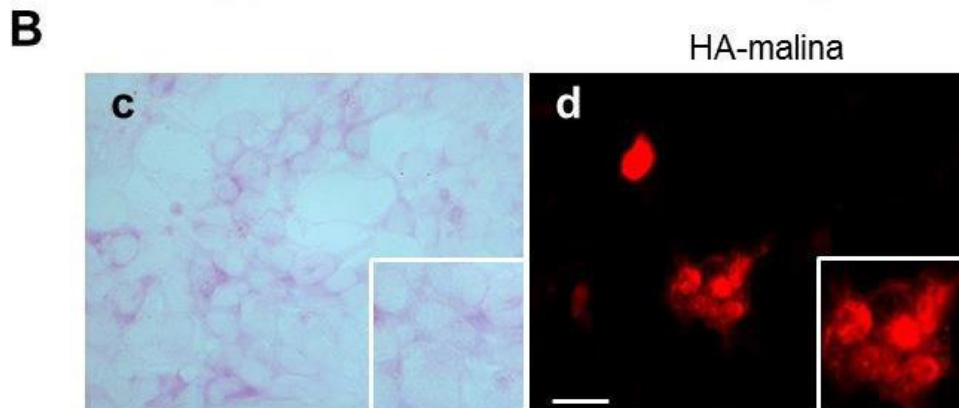


Figura 40. Los acúmulos producidos en la sobreexpresión de la laforina son PAS-positivos. Se transfectaron transitoriamente células HeLa con plásmidos que codifican para FLAG-laforina (**A**) o HA-malina (**B**). Transcurridas 48 h se fijaron las células y se tiñeron mediante PAS como se indica en el Material y Métodos. Posteriormente, las células se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-FLAG y anti-HA. Las imágenes correspondientes a la tinción de PAS (**a** y **c**) y a la fluorescencia (**b** y **d**) fueron tomadas por microscopía de campo claro y de fluorescencia, respectivamente. La laforina se muestra en verde y la malina en rojo. Los recuadros marcan áreas de interés. Las flechas marcan acúmulos PAS positivos. Barra: 20 μ m.

A continuación, y aunque aquí nos encontramos en la situación opuesta a LD (sobreexpresión de laforina), verificamos que los polisacáridos presentes en estos gránulos no correspondían a los poliglucosanos que se acumulan en los LBs, característicos de la patología [2, 331]. Para ello, se transfectaron o no células HeLa transitoriamente con FLAG-laforina, con HA-malina o con ambas y se incubaron en medio completo con o sin glucosa durante 8 h. Posteriormente, las células se trataron o no con diastasa durante 15 min y se tiñeron con PAS.

En la **figura 41** se observa de nuevo que al sobreexpresar la laforina, tanto sola como junto a la malina, se forman gránulos PAS positivos que no aparecen en la sobreexpresión de la malina sola, ni en las células control sin sobreexpresión alguna. Además, en las células incubadas en medio completo con glucosa y tratadas con diastasa, observamos la completa desaparición de los gránulos PAS positivos. Es decir, los polisacáridos que se acumulan en

condiciones de sobreexpresión de la laforina son sensibles a diastasa y probablemente corresponden a gránulos de glucógeno producidos en exceso o simplemente reclutados y concentrados a partir de gránulos de menor tamaño en acúmulos mayores debido al exceso de laforina. Por tanto, estos acúmulos de polisacáridos PAS positivos no son como los poliglucosanos que constituyen los LBs característicos de LD.

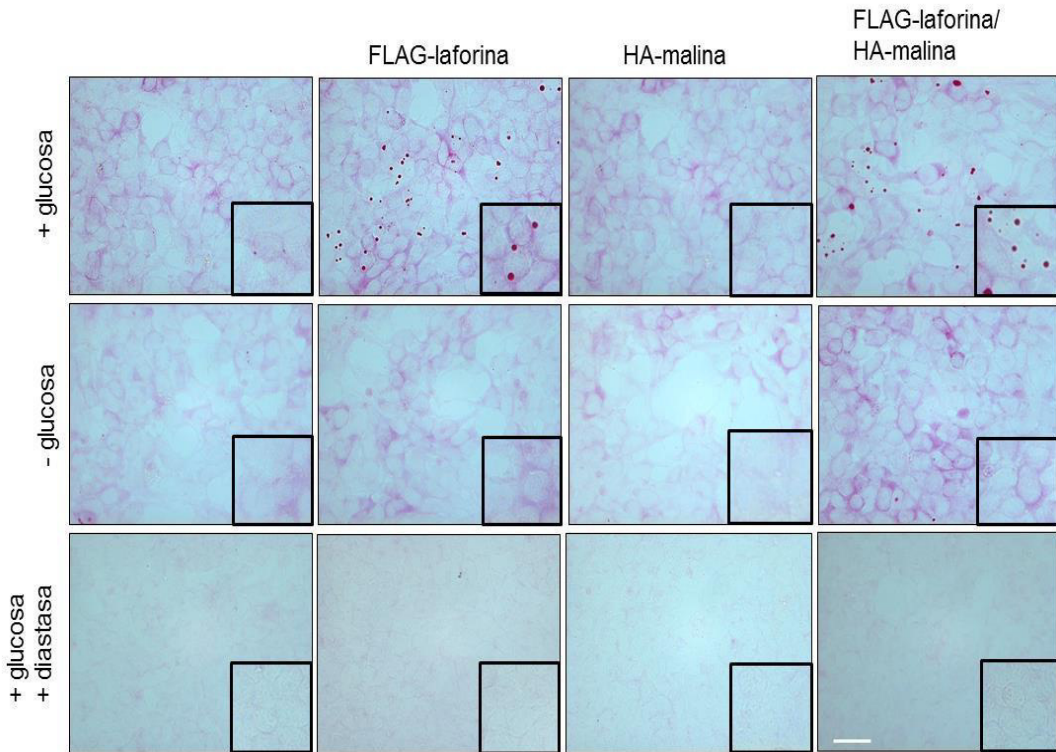


Figura 41. Los acúmulos PAS-positivos producidos en la sobreexpresión de la laforina son sensibles a la diastasa. Se transfectaron o no transitoriamente células HeLa con plásmidos que expresan FLAG-laforina, HA-malina o ambas. Transcurridas 48 h, las células se incubaron en medio completo con (+ glucosa) o sin (- glucosa) glucosa durante 8 h. Posteriormente, las células se trataron (+ diastasa) o no con diastasa 0,5 % durante 15 min. A continuación, todas las preparaciones se tiñeron con PAS. Las imágenes fueron tomadas por microscopía de campo claro. Los recuadros marcan áreas de interés. Barra: 20 μ m.

En estos experimentos conviene destacar que en todas las condiciones en las que se producen esos acúmulos (es decir, aquéllas donde hay sobreexpresión de laforina), al retirar la glucosa del medio se produce

tanto la desaparición de los gránulos PAS positivos como el transporte de la laforina al núcleo (ver **figuras 41 y 39** en ausencia de glucosa, respectivamente). Esto plantea una estrecha relación entre la acumulación de laforina y la de polisacáridos (probablemente glucógeno) que sería compatible con una retención de la laforina en el citoplasma por la presencia del glucógeno.

Así pues, todo ello sugiere que en condiciones basales de glucosa la laforina se localizaría en el citoplasma asociada a glucógeno para realizar alguna función relacionada con su metabolismo. Sin embargo, en ausencia de glucosa, los acúmulos de glucógeno se degradarían para reabastecer de glucosa a la célula y la laforina se transportaría al núcleo para realizar alguna función todavía desconocida.

2.2. Localización celular de la laforina endógena

Por último y para evitar posibles efectos derivados de la sobreexpresión de las proteínas, se estudió la localización de la laforina endógena. Como hemos comentado anteriormente, ninguno de los anticuerpos disponibles actualmente, comerciales o no, permite detectar la malina endógena. Con los anticuerpos que reconocen a la laforina, tampoco fue posible detectar la laforina endógena por inmunofluorescencia aunque sí por Western-blot tras un subfraccionamiento celular. Por ello, se incubaron fibroblastos humanos y células HeLa en medio completo con o sin glucosa y se analizó por Western-blot la fracción enriquecida en núcleos y en citoplasma.

En la **figura 42** se observa que en medio completo con glucosa la laforina endógena se encuentra localizada en el citoplasma (C), mientras que cuando las células se incuban en su correspondiente medio completo pero sin glucosa, parte de la laforina cambia su localización al núcleo (N), confirmando así los resultados obtenidos anteriormente con la proteína sobreexpresada.

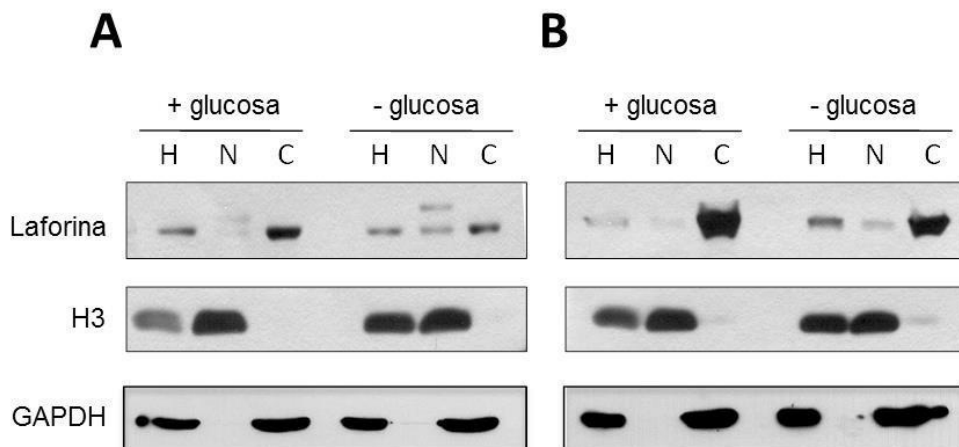


Figura 42. Efecto de la glucosa sobre la localización de la laforina endógena en fracciones subcelulares aisladas de fibroblastos humanos y de células HeLa, analizada mediante Western-blot. Las diferentes fracciones celulares se obtuvieron mediante subfraccionamiento celular por centrifugación diferencial como se ha descrito en la figura 33, después de incubar los fibroblastos humanos (A) o las células HeLa (B) en medio con glucosa (+ glucosa) o sin ella (- glucosa) durante 8 h. H, homogenado; N, sedimento de 1.000 g x 10 min; C, sobrenadante de 20.000 g x 30 min. Marcadores subcelulares empleados: histona H3 para los núcleos y GAPDH para el citosol.

En resumen, utilizando distintos modelos celulares y en condiciones de sobreexpresión hemos observado en diferentes células incubadas en medio con glucosa que la malina se localiza siempre en el núcleo mientras que la laforina se encuentra sobre todo en el citoplasma. Sin embargo, en ausencia de glucosa o cuando se sobreexpresan a la vez la malina y la laforina, la localización de esta última cambia de forma reversible y se acumula en el núcleo. Estos resultados se han obtenido con diferentes tipos celulares (HeLa, HEK293T, COS-7, MEFs y fibroblastos humanos), en diferentes condiciones de cultivo (KH o medio completo, con y sin glucosa, medio completo con H_2O_2) y se han estudiado mediante dos procedimientos distintos (inmunofluorescencia y subfraccionamiento celular analizando las fracciones por Western-blot). Además, al menos en el caso de la laforina y mediante subfraccionamiento celular, los resultados obtenidos con la proteína endógena (es decir, sin realizar una sobreexpresión) apoyan esa localización de la laforina, citoplásmica y/o nuclear, dependiente de glucosa.

Por otro lado, y teniendo en cuenta los resultados de sobreexpresión, por separado y a la vez, de la malina y la laforina y que la laforina y la malina pueden formar un complejo funcional, es bastante probable que: i) en condiciones endógenas la laforina se encuentre en exceso frente a la malina en las células, lo que explicaría su localización citoplásmica frente a la localización nuclear de la malina, ii) la laforina tendría una función independiente de la malina en el citoplasma, ya que se encuentra sobre todo allí en condiciones basales y iii) la función verdaderamente relevante para LD de la laforina y la malina tendría que ver con la localización de ambas en el núcleo, donde formarían el complejo funcional que ha sido descrito por varios autores.

3. Entrada y salida de la laforina del núcleo

Una vez establecida la localización de la malina en el núcleo de las células y, en ciertas condiciones, también de la laforina, el siguiente paso consistió en estudiar las vías de entrada a este orgánulo y de salida del mismo de las dos proteínas, particularmente de la laforina ya que habíamos observado que existía una regulación de su transporte al núcleo por glucosa. Era pues posible que la investigación en mayor detalle de ese transporte nuclear pudiese aportar más datos para conocer mejor la posible función de esas proteínas en el núcleo. De hecho, pensamos que resultaba particularmente novedoso el centrar la investigación de la función de las dos proteínas en esa localización. Esto podía ser relevante para conocer las bases moleculares de LD, ya que los estudios realizados hasta el momento se habían centrado casi exclusivamente en las posibles funciones que el complejo formado por las dos proteínas puede desempeñar en el citoplasma, por ejemplo en el metabolismo del glucógeno o en los mecanismos de degradación intracelular de proteínas a través sobre todo de la autofagia [72, 75, 79, 80, 93].

El estudio de las vías de entrada y salida del núcleo de estas dos proteínas se llevó a cabo durante una estancia de cuatro meses en el University of Texas Southwestern Medical Center (Dallas, TX, EE.UU.), más concretamente en el laboratorio de la Dra. Y. M. Chook. Este laboratorio

posee una dilatada experiencia en estudios sobre el tráfico núcleo-citoplasma de macromoléculas, un proceso celular que desempeña un papel esencial en aspectos tan importantes para la fisiología de las células como la expresión génica o la transducción de señales. Además, el laboratorio disponía de las técnicas y metodologías más actuales y adecuadas para abordar este tipo de estudios.

3.1. Entrada de la laforina al núcleo dependiente de glucosa y de la malina

En la actualidad, se han descrito en humanos un gran número de importinas y de exportinas que regulan, respectivamente, la entrada al núcleo de aquellas proteínas que presentan una localización nuclear y, en ocasiones, la salida del mismo [218, 219, 223]. Esto implica la existencia de una gran variedad de vías de entrada al núcleo y también de secuencias, las llamadas NLS (“nuclear localization signal”), que son reconocidas en las proteínas para su transporte a este compartimento de la célula.

Para estudiar la posible vía de entrada de la laforina al núcleo, nos centramos en la principal de estas vías. Se trata de la vía clásica de transporte de proteínas al núcleo mediada por las importinas α/β . En esta vía clásica, la importina α es la encargada de reconocer la NLS de la proteína que se va a transportar al núcleo y de unirse a ella. Sin embargo, la importina α es incapaz por sí misma de transportar a esa proteína al interior del núcleo. Se necesita además otra proteína, la importina β , que reconoce al complejo formado por la importina α y la proteína que se va a transportar, para llevar a cabo finalmente el transporte de todo el conjunto hasta el nucleoplasma, cruzando así la doble membrana nuclear a través de uno de los numerosos poros nucleares que la atraviesan.

Para el estudio del transporte de una proteína al núcleo por la vía mediada por las importinas α/β , es muy apropiada la utilización del péptido Bimax2, que corresponde a una típica secuencia NLS reconocida por la importina α . Este péptido impide que la importina α reconozca otras NLSs [236, 237], ya que esta importina tiene una afinidad de unión muy elevada

por el péptido Bimax2. De esta manera, Bimax2 actúa como un inhibidor competitivo de la importina α frente al resto de proteínas con NLS que siguen esta vía de entrada al núcleo y, por consiguiente, bloquea de manera muy específica la entrada al núcleo de las proteínas que utilizan esta vía mediada por las importinas α/β .

Para estudiar si la laforina utiliza efectivamente esa vía clásica de entrada al núcleo, se clonaron, en los vectores apropiados, los cDNAs de la isoforma 1 de la laforina y de Bimax2 conjugados, respectivamente, con las proteínas fluorescente RFP o EYFP, como se ha descrito en el Material y Métodos. Una vez generadas esas construcciones, se utilizaron para transfectar o cotransfectar transitoriamente las células HT-1080 y así sobreexpresar la RFP-laforina, sola o con EYFP-Bimax2. Transcurridas 48 h, las células se incubaron en medio completo con o sin glucosa durante 8 h más. De esta forma, postulábamos que en el medio sin glucosa se produciría, también en esas células, la entrada de la laforina al núcleo, como así ocurrió. Si en presencia de Bimax2 esa entrada al núcleo se bloqueaba indicaría que la entrada de la laforina al núcleo está mediada por la vía clásica de las importinas α/β . Las células fueron analizadas por fluorescencia y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la RFP-laforina en el citoplasma y en el núcleo a partir de imágenes tomadas *in vivo* en un microscopio confocal.

La **figura 43** muestra los resultados cuantitativos obtenidos en este estudio. Puede observarse que al incubar las células en medio sin glucosa (dos últimas barras del histograma), disminuye significativamente la intensidad de fluorescencia de la RFP-laforina en el citoplasma respecto a la del núcleo (relación C/N), cuando se compara con la misma relación pero en presencia de glucosa (dos primeras barras del histograma). Esto indica que también en las células HT-1080 aumentaba la cantidad de laforina en el núcleo en ausencia de glucosa. Por otra parte, aunque en el medio con glucosa se producía un ligero descenso cuando la laforina se sobreexpresaba a la vez que el péptido Bimax2, apenas observamos, tal y como esperábamos, que existieran diferencias, y desde luego no eran

significativas, en la localización de la RFP-laforina con (segunda barra del histograma) o sin (primera barra del histograma) el péptido Bimax2. Esto se debe a que en medio con glucosa la mayor parte de la laforina es citoplásmica. Sin embargo, en el medio sin glucosa, cuando el péptido Bimax2 está presente (última barra del histograma) sí se aprecia un aumento significativo en la relación C/N de fluorescencia con respecto al valor en ausencia de este péptido (penúltima barra del histograma). Este resultado indica que en presencia del péptido Bimax2 existe una mayor proporción relativa de laforina que se encuentra localizada en el citoplasma con respecto a la que existe en el núcleo, en comparación a la existente en las mismas condiciones pero cuando el péptido Bimax2 no está presente en las células. Por tanto, parece que este péptido está inhibiendo la entrada de la laforina al núcleo que tiene lugar en ausencia de glucosa. Esta inhibición es solamente parcial, debido a que en presencia del péptido Bimax2 en el medio sin glucosa (última barra del histograma) no se recupera la relación C/N de fluorescencia existente en el medio con glucosa, como debería ocurrir, al menos de una manera aproximada por la variación experimental, si tuviera lugar una inhibición completa de la entrada de la laforina al núcleo. Por tanto, la laforina entra en el núcleo utilizando al menos en parte la vía clásica mediada por las importinas α/β .

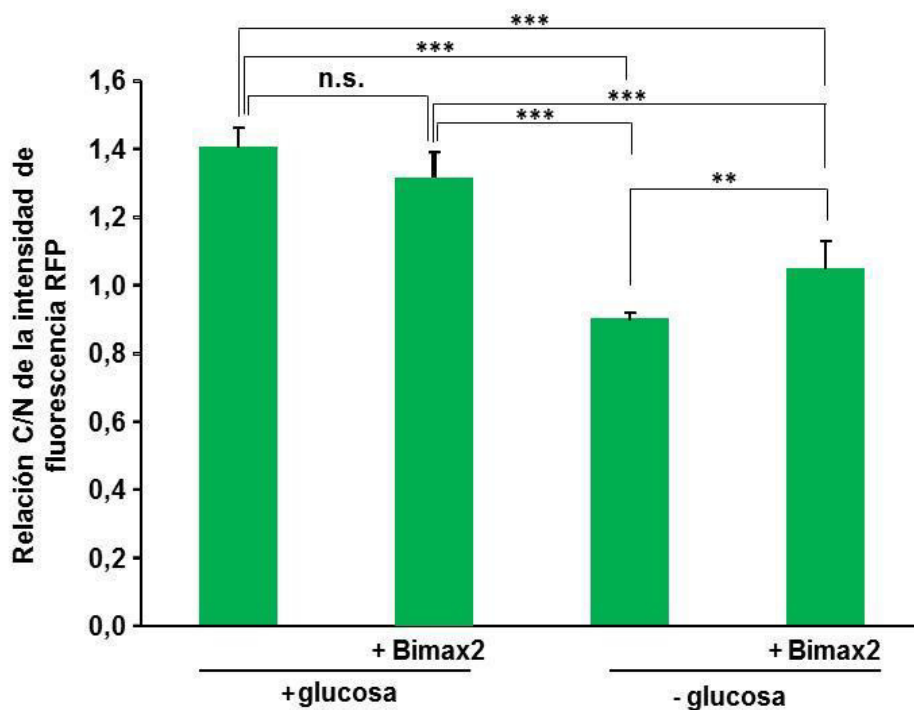


Figura 43. Efecto del péptido Bimax2 sobre la localización citoplasma/núcleo de la laforina en células HT-1080 incubadas en presencia o no de glucosa. La laforina (RFP-laforina) se sobrexpresó transitoriamente en células HT-1080, bien sola (primera y tercera barra del histograma) o bien junto al péptido Bimax2 (EYFP-Bimax2, segunda y cuarta barra del histograma). Transcurridas 48 h desde el comienzo de la transfección, las células se incubaron durante 8 h más en medio completo con (+ glucosa) o sin (- glucosa) glucosa. Las intensidades de fluorescencia de la RFP-laforina, citosólica y nuclear, se cuantificaron en 20 células diferentes para cada condición. No se muestran las imágenes de fluorescencia de estos experimentos, que fueron obtenidas *in vivo* mediante microscopía confocal. En el caso de la coexpresión, sólo se tuvieron en cuenta aquellas células que sobrexpresaban ambas proteínas. En el histograma se muestran los valores expresados como la relación de las intensidades de fluorescencia existentes en el citoplasma respecto a las del núcleo (C/N) y corresponden a las medias \pm SD de cuatro experimentos independientes con muestras por duplicado. Se muestran las diferencias, que resultaron ser estadísticamente significativas para valores de $**P < 0,001$ y $***P < 0,0001$.

El estudio del transporte de la malina al núcleo, al tratarse de una proteína aparentemente localizada de forma permanente en el mismo, tuvo que abordarse de manera diferente al utilizado para estudiar el transporte de la laforina. En este caso, se transfectaron transitoriamente las células HT-1080, primero con EYFP-Bimax2 para que se sobrexpresara el péptido y bloqueara la vía clásica mediada por las importinas α/β y, transcurridas 8 h,

con RFP-malina. Esperábamos observar que si la malina utilizaba esta vía clásica para entrar en el núcleo, se acumulase en el citoplasma en presencia del péptido Bimax2. Sin embargo, esta doble transfección, pero no las transfecciones individuales, parecía letal para las células por alguna razón, ya que morían habiendo transcurrido sólo 24 h desde el comienzo de la doble transfección. Esta letalidad, en el caso de que la malina utilizara la vía clásica mediada por las importinas α/β y que Bimax2 estuviera inhibiendo su entrada, podría ser debida, bien a que la acumulación de malina en el citoplasma resulta tóxica para la célula o bien a que la malina tiene una función nuclear que es esencial para la supervivencia celular. Además, a diferencia de lo que ocurre con la laforina, la glucosa no afecta a la localización de la malina y, de momento al menos, no conocemos ningún modo de hacer que la malina que se encuentra en el núcleo se transporte en cantidad suficiente al citoplasma para su detección. Por eso, podíamos también anticipar ya que no íbamos a poder estudiar su posible vía de salida del núcleo al citoplasma. Es por ello que en este apartado sobre el mecanismo de transporte núcleo-citoplasma nos hemos centrado en la laforina, ya que de las dos proteínas implicadas en LD es la que parece más relevante para analizar la importancia de este transporte.

3.1.1. Identificación de una NLS en la laforina y ensayos para verificar su funcionalidad

Para que una proteína de más de 30 kDa pueda entrar en el núcleo, se precisa, en primer lugar, que tenga una NLS [215-217, 332] y después, que ésta sea reconocida por la importina correspondiente [221, 223, 332]. Las NLSs presentan una gran variabilidad, tanto en tamaño como en secuencia, lo que dificulta enormemente su identificación. Como comentamos en la Introducción, existen 2 tipos de NLS, aunque nosotros nos hemos centrado aquí en investigar la posible presencia en la laforina y en la malina de la NLS clásica, ya que es la que mejor se conoce. Además, los resultados anteriores indicaban que la laforina utiliza la vía clásica mediada por las importinas α/β para entrar al núcleo.

Por lo tanto y en base a todo lo anterior, tratamos de identificar alguna NLS en la laforina y en la malina que fuese reconocida por la importina α . Para identificar “in silico” posibles NLSs en estas dos proteínas, se utilizaron diferentes servidores “online” (NLSMapper, NLStradamus, NucPred, SeqNLS) que permiten predecir posibles NLSs en una proteína dada a partir de su secuencia de aminoácidos. Cada uno de estos servidores utiliza unos parámetros propios y específicos y, en el caso de la laforina, sólo el NLSMapper predijo con un buen grado de confianza una secuencia candidata a NLS en la laforina y que se muestra a continuación:

NLS (laforina): 295-FLMAKRPAVYIDEEALARAQEDFFQKFGKV-324

Una vez identificada una posible secuencia NLS, el siguiente paso era probar si esta secuencia era funcional y, por tanto, capaz de dirigir al núcleo a una proteína dada de localización citoplasmática. Para ello, se llevó a cabo la clonación de esta secuencia candidata en un vector de clonaje pEYFP-EYFP-C1 que codifica para dos proteínas EYFP (de 26 kDa aproximadamente cada una) situadas en tándem. Las dos proteínas EYFP en tándem se usaron para aumentar suficientemente el tamaño de la proteína conjugada a nuestra NLS. De esta forma, se evita la posibilidad de que una sola EYFP unida a nuestra NLS pueda atravesar la doble membrana nuclear por simple difusión a través de los poros nucleares, debido a que el tamaño de la EYFP está por debajo de los 30 kDa establecidos como límite. Por otro lado, la proteína EYFP, tras su sobreexpresión, se localiza exclusivamente en el citoplasma, por lo que resulta muy apropiada para investigar si una determinada secuencia candidata a actuar como NLS es realmente capaz de dirigir una proteína citosólica al núcleo. En nuestro caso, el vector que codificaba para las dos proteínas EYFP fue clonado para que éstas apareciesen conjugadas en el extremo NH₂-terminal de la NLS candidata de la laforina. De esta forma, si la NLS predicha por el NLSMapper era realmente funcional sería reconocida por las importinas y dirigiría a las dos proteína EYFP en tándem al núcleo, donde se acumularían. Además, en estos experimentos utilizamos paralelamente y como control positivo, una NLS bien establecida (procedente de un virus, el SV40) conjugada a las dos

proteínas de EYFP. Es sabido que esta NLS es perfectamente funcional para dirigir proteínas al núcleo por la vía clásica.

Para este estudio, las células HT-1080 se transfectaron transitoriamente con los dos plásmidos por separado, el EYFP-EYFP-NLS_{laforina} (que incluye la supuesta NLS de la laforina) y el EYFP-EYFP-NLS_{SV40} (con la NLS del SV40). Tras 48 h, se analizó por microscopia de fluorescencia la localización *in vivo* de las proteínas en un microscopio confocal.

Como se muestra en las imágenes de la **figura 44A**, la secuencia candidata a constituir una NLS de la laforina no parece funcionar como tal (imágenes **a-c**), ya que no es capaz de dirigir la proteína EYFP-EYFP-NLS_{laforina} al núcleo, acumulándose en el citoplasma y resultando por consiguiente en una relación C/N de intensidades de fluorescencia muy alta. En cambio, el control positivo es capaz de dirigir la proteína EYFP-EYFP-NLS_{SV40} al núcleo (imágenes **d-f**), lo que resulta en una relación C/N de intensidades de fluorescencia muy baja (**Fig. 44B**).

En el caso de la malina, como ya hemos mencionado, no disponemos de ninguna evidencia de que esta proteína entre en el núcleo utilizando la vía clásica mediada por las importinas α/β . Además, ninguno de los servidores fue capaz de encontrar alguna secuencia candidata suficientemente firme para actuar como NLS.

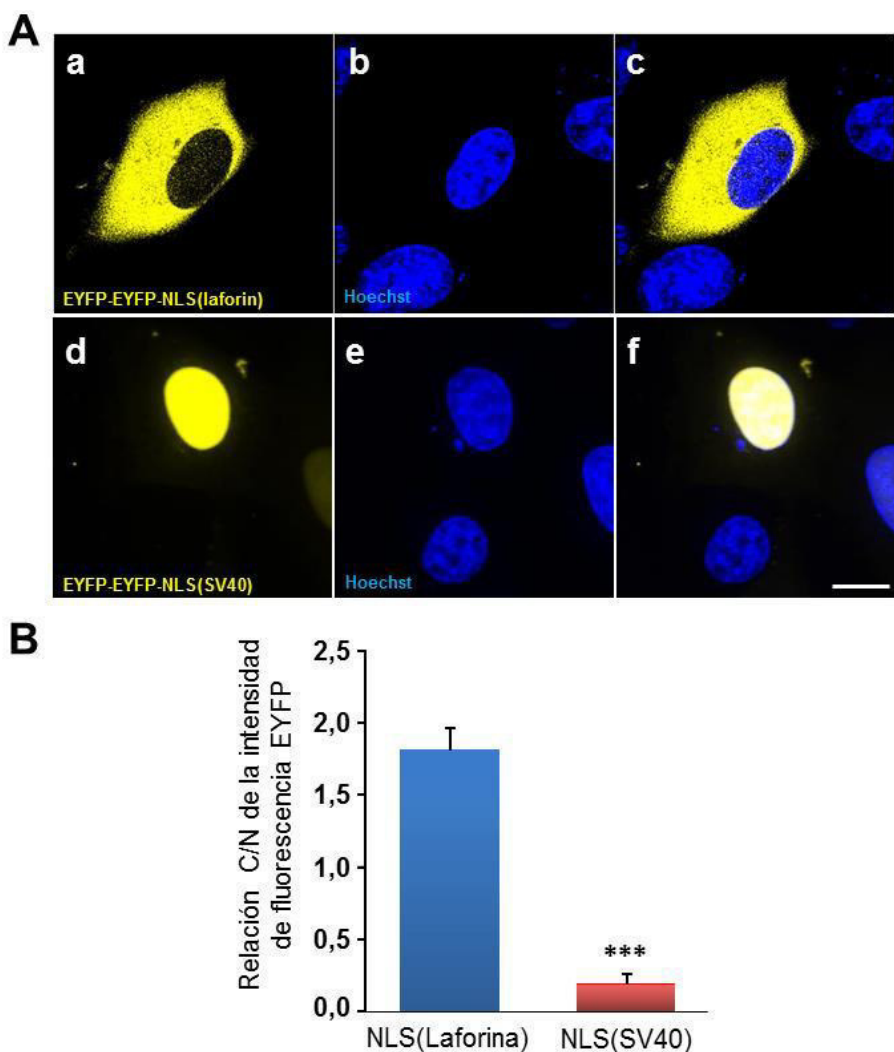


Figura 44. Localización mediante fluorescencia de la secuencia candidata a actuar como NLS en la laforina conjugada con EYFP. Imágenes de fluorescencia representativas (A) tras 48 h de las transfecciones realizadas en células HT-1080 con los plásmidos que expresan la secuencia candidata a actuar como una NLS en la laforina (a-c) y, como control positivo, la secuencia NLS del SV40 (d-f), conjugadas con dos proteínas EYFP situadas en tandem. Las proteínas EYFP con la correspondiente NLS y sobrexpresadas transitoriamente se muestran en amarillo (a y d), los núcleos de las células se tiñeron con Hoechst y aparecen en azul (b y e) y las imágenes combinadas correspondientes se encuentran en c y f. Las imágenes se obtuvieron *in vivo* mediante microscopía confocal. Barra: 10 μ m. El histograma (B) muestra las relaciones C/N resultantes de la cuantificación de las intensidades de fluorescencia citosólica y nuclear de la proteína EYFP. Los valores representan las medias \pm SD de 20 células diferentes para cada una de las dos NLSs analizadas en tres experimentos independientes. La diferencia resultó estadísticamente significativa para un valor de *** $P < 0,0001$.

3.2. Salida de la laforina del núcleo dependiente de glucosa

Al igual que ocurre para la entrada al núcleo, la salida del núcleo también puede producirse mediante diferentes vías [221, 223, 224]. Para estudiar la vía de salida de la laforina del núcleo, nos centramos en la vía más estudiada y mayoritaria, que está mediada por la exportina 1 o CRM1. CRM1 reconoce una determinada secuencia de exportación nuclear (NES) en la proteína que va a salir del núcleo y media en su transporte hacia el citoplasma. Tanto la leptomicina B como el KPT-185 funcionan como inhibidores específicos de CRM1, provocando la acumulación en el núcleo de las proteínas que se exportan mediante esa exportina.

Dado que el transporte de la laforina al núcleo es reversible y dependiente de glucosa, utilizando dos inhibidores de la exportación nuclear, el KPT-185 y la leptomicina B, analizamos si la laforina sale del núcleo mediante la vía dependiente de CRM1. Los resultados cuantitativos del estudio con el inhibidor KPT-185 se muestran en la **figura 45**. Para realizar ese estudio, transfectamos transitoriamente las células HT-1080 con RFP-laforina y, transcurridas 24 h, las células se trataron (barras pares del histograma) o no (barras impares del histograma) con KPT-185 durante 18 h. Durante las últimas 13 h de ese tratamiento y para estudiar la reversibilidad del proceso de entrada de la laforina al núcleo, parte de las células se incubaron en medio completo sin glucosa durante 8 h y después se añadió glucosa al medio durante 5 h más (dos últimas barras del histograma). De esa forma, conseguimos inducir inicialmente la entrada de la laforina al núcleo para, posteriormente, inducir su salida mediante la adición de glucosa al medio de cultivo. Las otras muestras se incubaron durante las últimas 8 h de tratamiento en medio completo con glucosa (dos primeras barras del histograma) o sin glucosa (tercera y cuarta barra del histograma).

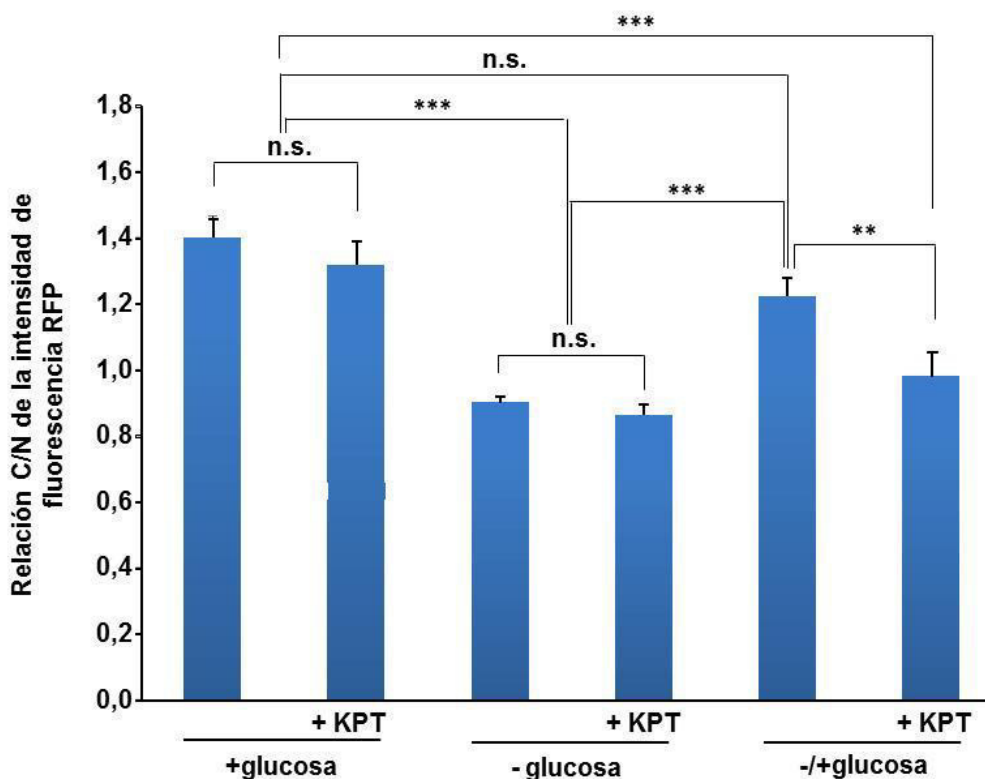


Figura 45. Cuantificación del efecto del KPT-185 en la localización de la laforina conjugada con RFP en presencia o no de glucosa, analizada mediante la determinación de la fluorescencia en el citoplasma y en el núcleo. La laforina conjugada con RFP se sobreexpresó transitoriamente en células HT-1080. Transcurridas 24 h de la transfección, las células fueron tratadas (+ KPT-185) o no con KPT-185 1 μ M durante 18 h. Durante las últimas 13 h de tratamiento, las células se incubaron durante 8 h en medio sin glucosa y, posteriormente, se añadió glucosa durante 5 h más (-/+ glucosa). Como control, las células se incubaron durante las últimas 8 h de tratamiento en presencia (+ glucosa) o en ausencia (- glucosa) de glucosa 25 mM. Las intensidades de fluorescencia de la RFP-laforina citosólica y nuclear se cuantificaron en 20 células diferentes para cada condición. No se muestran las imágenes de fluorescencia de estos experimentos, que fueron obtenidas *in vivo* mediante microscopía confocal. En el histograma se muestran los valores como la relación de las intensidades de fluorescencia existentes en el citoplasma respecto a las del núcleo (C/N) y corresponden a las medias \pm SD de tres experimentos independientes con muestras por duplicado. Las diferencias resultaron estadísticamente significativas para valores de $**P < 0,001$ y $***P < 0,0001$. Las diferencias no significativas se indican con n.s.

En la **figura 45** se observa que al incubar las células en el medio sin glucosa (tercera y cuarta barra del histograma), disminuye significativamente la relación C/N de la RFP-laforina con respecto a esa misma relación en las células incubadas con glucosa (primera y segunda

barra del histograma), indicando que la cantidad de la laforina en el núcleo aumentó significativamente en ausencia de glucosa. Esto confirma, una vez más, nuestros resultados anteriores en los que en ausencia de glucosa la localización nuclear de la laforina aumenta considerablemente. Por otra parte y tal y como esperábamos, no observamos diferencias significativas en la localización de la RFP-laforina debidas al tratamiento con KPT-185 ni cuando las células se incubaban en el medio que contiene glucosa (comparar la segunda barra del histograma con la primera) ni tampoco cuando se hacía en el que no la contiene (comparar la cuarta barra del histograma con la tercera). Esto es lógico puesto que en ninguna de estas dos condiciones estamos induciendo una salida de la laforina del núcleo que pueda ser inhibida por KPT-185. En cambio, se observaron diferencias significativas en la localización de la laforina tras la adición de glucosa a las células previamente incubadas en ausencia de ésta (quinta barra del histograma) con respecto a lo que ocurre en ausencia de glucosa (tercera y cuarta barra del histograma). Estos resultados muestran que tras la adición de glucosa, la laforina previamente nuclear vuelve al citoplasma, probando, por tanto y de nuevo, que el transporte de la laforina dependiente de glucosa es reversible.

Aunque no se observaron diferencias significativas en la localización de la laforina tras la adición de glucosa a las células previamente incubadas en ausencia de ésta (quinta barra del histograma) con respecto a la observada en presencia de glucosa en todo momento (dos primeras barras del histograma), la relación de fluorescencias C/N fue ligeramente menor en el primer caso. Para explicar esto, recordemos que la entrada al núcleo es progresiva y cabe esperar que la salida del núcleo también lo será, y aquí estamos comparando un tratamiento de 5 horas con glucosa y en el que las células habían estado previamente sin glucosa durante 8 h, con tratamientos en los que la glucosa está presente durante 8 h y también previamente. También se observó que el aumento en la relación de fluorescencia C/N tras la adición de glucosa fue significativamente menor en las células tratadas con KPT-185 (sexta y última barra del histograma) con respecto a las no tratadas (quinta barra del histograma). Esto nos indica que en presencia de KPT-185 se retiene una mayor cantidad de la laforina en el núcleo y

demuestra, por tanto, que el KPT-185 está inhibiendo la salida de la laforina del núcleo que tiene lugar cuando se restablece la presencia de glucosa en el medio. Resultados similares se obtuvieron utilizando leptomicina B a una concentración de 5 nM (datos no mostrados). Por tanto, podemos concluir que la laforina utiliza la vía dependiente de CRM1 para salir del núcleo.

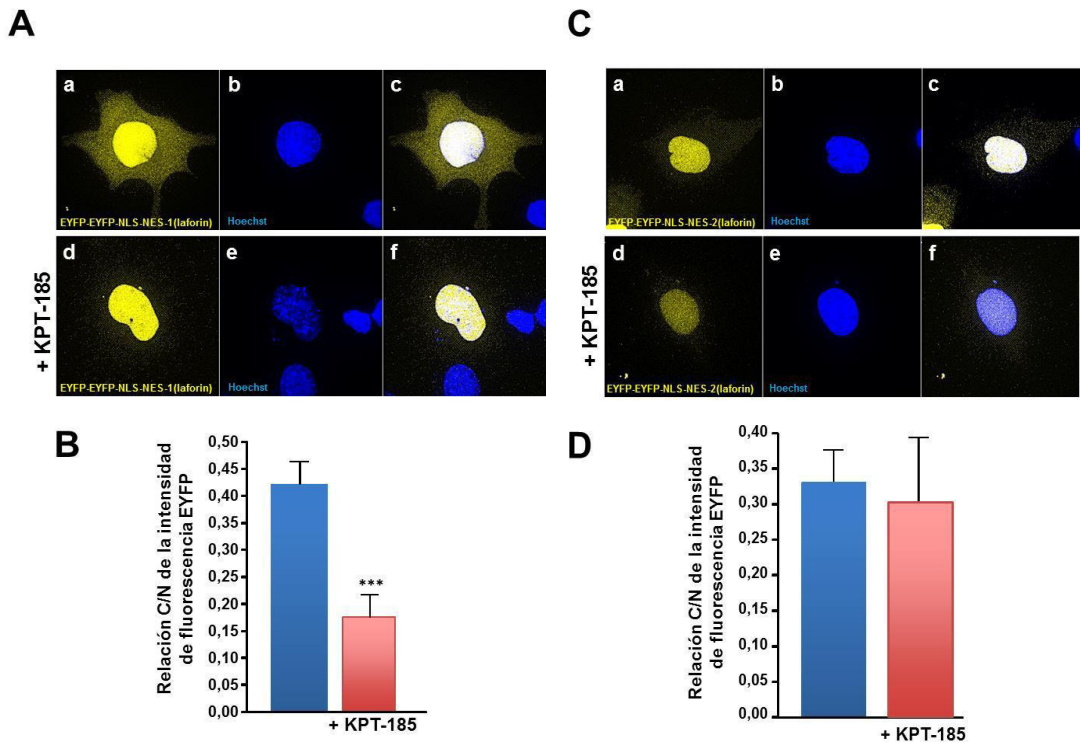
3.2.1. Identificación y confirmación de una NES en la laforina

Las proteínas precisan de una secuencia de exportación nuclear (NES), que será reconocida por la exportina correspondiente, para salir del núcleo [241, 244]. Para identificar “in silico” posibles NESs en la laforina para la vía dependiente de CRM1, se utilizaron diferentes servidores “online” de predicción de estas secuencias (LocNES, ValidNESs, y NetNES 1.1 Server). Estos programas fueron generados en el laboratorio de la Dra. Y. M. Chook y se basan en la identificación de NESs en la proteína de interés a partir de la conocida secuencia consenso reconocida por CRM1. Combinando los resultados mostrados por los diferentes programas, se encontraron tres secuencias candidatas a constituir una NES en la laforina, que se muestran a continuación:

- NES-1: 172-QVEHVTIKCLKHELGI-186
- NES-2: 242-VQMLPQAVCLLHALL-256
- NES-3: 283-YVMGWNLRKVQYFLM-297

Estas tres secuencias se clonaron por separado en el vector EYFP-EYFP-NLS_{SV40}-C1. Este vector, a diferencia del empleado para la comprobación de la NLS, contiene, además de la NES candidata de la laforina, una NLS procedente del virus SV40. Esto permite dirigir el tándem EYFP al núcleo y comprobar si la NES es capaz de redirigir de nuevo el tándem hacia el citoplasma. Como control positivo de la salida del núcleo, se utilizó el plásmido EYFP-EYFP-NLS_{SV40}-NES_{PKI}, que contiene la NES de la proteína PKI (inhibidor de la proteína quinasa dependiente de cAMP). Se conoce que esta NES clásica es reconocida por CRM1 [249] y, por tanto, dirigirá el tándem EYFP hacia el citoplasma.

Para determinar si las secuencias NES candidatas de la laforina son funcionales, y por tanto, capaces de redirigir el tándem EYFP hacia el citoplasma, en primer lugar, se transfectaron las células HT-1080 con los plásmidos pEYFP-EYFP-NLS_{SV40}-NES-1, pEYFP-EYFP-NLS_{SV40}-NES-2 y pEYFP-EYFP-NLS_{SV40}-NES-3 por separado. Después, y una vez transcurridas 24 h, las células se trataron o no durante 18 h con KPT-185 o leptomicina B que, al inhibir específicamente la vía dependiente de CRM1, si la NES conjugada es funcional, causarán la acumulación en el núcleo del tándem EYFP que se exportaría desde el núcleo al citoplasma mediante esta exportina. Finalmente, se analizó a localización *in vivo* del tándem EYFP en las diferentes preparaciones mediante microscopía confocal de fluorescencia (**Fig. 46**).



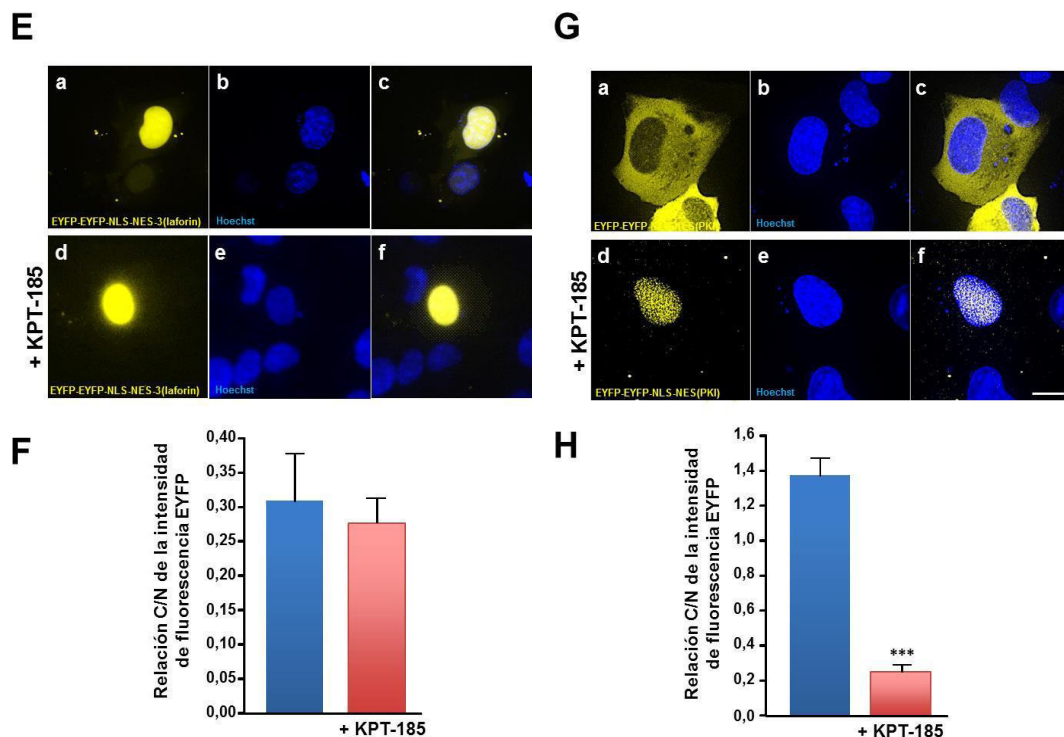


Figura 46. Localización mediante fluorescencia del tándem EYFP conjugado a las secuencias candidatas a actuar como NES en la laforina, en presencia o no de KPT-185. El tándem EYFP conjugado a la NLS del SV40 y a la NES-1 (A), NES-2 (C) o NES-3 (E) de la laforina o, como control positivo, a la NES del PKI (G), se sobrexpresó transitoriamente en células HT-1080. Éste se muestra en amarillo (a y d), los núcleos, teñidos con Hoechst, en azul (b y e) y a su derecha la combinación de ambas (c y f). Las imágenes de las células tratadas (+ KPT-185) o no con el inhibidor KPT-185 1 μ M durante 18 h se obtuvieron *in vivo* mediante microscopía confocal. Los histogramas (B, D, F y H) muestran las relaciones C/N resultantes de la cuantificación de las intensidades de fluorescencia citosólica y nuclear de l tándem EYFP para cada caso. Los valores representan medias \pm SD de 20 células diferentes para cada una de las NES analizadas por duplicado en tres experimentos independientes. Las diferencias resultaron estadísticamente significativas para un valor de *** $P < 0,0001$.

Como se observa en la **figura 46**, tanto con la NES-2 (**Fig. 46C**) como con la NES-3 (**Fig. 46E**), el tándem fluorescente presenta una localización prácticamente nuclear (imágenes **a** en los paneles **C** y **E**), indicando que estas secuencias no son reconocidas por CRM1 y, por tanto, no dirigen el tándem al citoplasma. Además, como era de esperar, en este caso el KPT-185 no provoca ningún cambio significativo en la localización del tándem (imágenes **d** en los paneles **C** y **E** de la **Fig. 46**) que permanece localizado en el núcleo. Sin embargo, en el caso de la NES-1 observamos una

considerable localización citoplasmática del tándem (**Fig. 46**, imagen **a** en el panel **A**), lo que está indicando que la NES-1 es capaz de dirigir el tándem al citoplasma. En presencia de KPT-185 observamos una disminución significativa en la localización citoplásmica del tándem con la NES-1, ya que la mayor parte de la fluorescencia se localiza en el núcleo (**Fig. 46**, imagen **d** en el panel **A**), indicando que el KPT-185 está inhibiendo la salida del núcleo del tándem fluorescente. Por tanto, podemos concluir que la NES-1 de la laforina es funcional y es reconocida por CRM1. Finalmente, en el control positivo de NES, el tándem presenta una localización prácticamente citosólica (**Fig. 46**, imagen **a** en el panel **G**), que tras el tratamiento con KPT-185 se vuelve completamente nuclear (**Fig. 46**, imagen **d** en el panel **H**) como queda confirmado en la bajada tan significativa observada de la relación C/N de las fluorescencias del tándem. Resultados similares se obtuvieron utilizando leptomicina B a una concentración de 5 nM (datos no mostrados). Por tanto, la NES-1 identificada en la laforina sería reconocida por CRM1, permitiéndole llevar a cabo el transporte reversible de salida del núcleo regulado por glucosa.

En resumen, coexpresando en células HT-1080 la RFP-laforina con EYFP-Bimax2 para estudiar su entrada al núcleo y utilizando KPT-185 y leptomicina B para estudiar su salida del núcleo, encontramos que la laforina entra al núcleo utilizando en parte la vía clásica mediada por las importinas α/β (empleando una NLS no identificada todavía) y que sale mediante la vía dependiente de CRM1, posiblemente a través del reconocimiento de la NES-1 encontrada en el estudio “in silico” de la laforina. Estos resultados obtenidos del estudio del transporte de la laforina a través del poro nuclear nos permiten explicar los resultados anteriormente obtenidos, tanto los que indican que la laforina se transporta al núcleo en ausencia de glucosa en el medio, como en los que ese transporte se revierte al adicionar de nuevo glucosa a las células. Por tanto, en ciertas condiciones, la malina y la laforina colocalizan en el núcleo, lo que puede ser relevante para la patogénesis de LD. Además, creemos que esto resulta especialmente interesante para comenzar a abordar el estudio de las posibles funciones de la laforina y de la malina en el núcleo, particularmente

porque, hasta ahora, la mayoría de estudios se han centrado en las posibles funciones de ambas proteínas en el citoplasma. En cuanto a las vías utilizadas por la laforina para entrar y salir del núcleo, si se pusiera de manifiesto la relevancia de la función nuclear del complejo laforina-malina para la patogenia de LD, podría considerarse su uso con fines terapéuticos para regular la entrada o salida de la laforina según se precisara.

4. Experimentos para tratar de identificar posibles funciones de la laforina, sobre todo en relación con su localización nuclear junto a la malina

4.1. Identificación de proteínas que interaccionan con la laforina

Una vez determinada la localización de la laforina y la malina, tratamos de identificar proteínas con las que interacciona la laforina. Aprovechando este estudio, en primer lugar, confirmamos que la laforina y la malina interaccionan efectivamente entre ellas, como ya se ha descrito que ocurre [61, 69, 70]. Para eso, se coexpresaron en células HEK293T la laforina, la malina o la GFP conjugadas con FLAG o con HA en las combinaciones que se muestran en la **figura 47**. La coexpresión de la laforina o de la malina con GFP se incluyó como control negativo de la interacción. Posteriormente se llevó a cabo la lisis celular y la incubación de los extractos preclarificados con una resina unida a anti-FLAG, tal y como se detalla en el Material y Métodos. Una parte del eluido de las diferentes muestras se analizó por Western-blot utilizando un anticuerpo anti-FLAG.

Como se observa en la **figura 47A**, correspondiente a una parte de los eluidos obtenidos a partir de la resina unida a anti-FLAG, en las calles 1 y 2 observamos una banda del mismo tamaño que corresponde a la proteína GFP conjugada con FLAG. En la calle 3 aparece una banda de mayor tamaño que corresponde a la malina conjugada con FLAG y en la calle 4 aparece otra banda que corresponde a la laforina conjugada con FLAG. Este resultado obtenido de las muestras eluidas de la resina anti-FLAG nos indica que la precipitación de las proteínas conjugadas con FLAG se ha realizado correctamente con esa resina.

Posteriormente, los eluidos restantes se volvieron a incubarse, en este caso, con una resina unida a anti-HA. Al igual que con la resina unida a anti-FLAG, tras la elución de las proteínas unidas a la resina anti-HA, éstas se analizaron por Western-blot utilizando ahora un anticuerpo anti-HA. En la **figura 47B**, correspondiente a los eluidos de la resina unida a anti-HA, no observamos ninguna banda en las calles 1 y 2, que corresponderían a la HA-laforina y a la HA-malina respectivamente, indicando que, tal como esperábamos, ni la laforina ni la malina interactúan con la proteína GFP y que estas proteínas se perdieron al no quedar retenidas en la resina unida a anti-FLAG. Sin embargo, sí observamos una banda correspondiente a HA-laforina (además de otra banda bastante clara por encima de ésta) en la calle 3 y otra que corresponde a la HA-malina en la calle 4. Esto indica que la laforina y la malina se encuentran unidas entre sí y que cuando eluimos una de ellas en la resina unida a anti-FLAG la otra, conjugada con HA, también se eluye unida a ella. Estos resultados son compatibles con la existencia de una interacción entre la laforina y la malina, tal y como se había sugerido ya por otros [61, 69, 70].

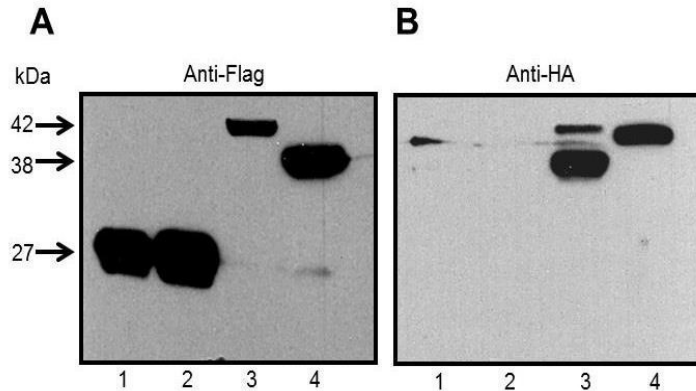


Figura 47. Interacción de la laforina con la malina. Las células HEK293T se transfectaron de forma transitoria con cuatro combinaciones de proteínas: 1) FLAG-GFP/HA-laforina, 2) FLAG-GFP/HA-malina, 3) FLAG-malina/HA-laforina y 4) FLAG-laforina/HA-malina. Después, las células se lisaron y se incubaron con una resina de agarosa unida a anti-FLAG previamente bloqueada como se ha descrito en el Material y Métodos. Tras varios lavados, las proteínas unidas se eluyeron utilizando un exceso del péptido FLAG. Un 30 % del volumen de los eluidos se analizó por Western-blot utilizando anticuerpo anti-FLAG (**A**). El 70 % restante de los eluidos se incubó con una resina conjugada con anticuerpo anti-HA previamente bloqueada. Tras varios lavados, las proteínas unidas a la resina anti-HA se eluyeron utilizando un exceso del péptido HA y los eluidos resultantes se analizaron por Western-blot utilizando un anticuerpo anti-HA (**B**).

Una vez comprobado que la laforina y la malina interaccionan entre sí y que la metodología utilizada nos permite precipitar estas proteínas, nos centramos en identificar otras que interaccionan con la laforina. Para abordar este estudio, combinamos una precipitación de la laforina conjugada con FLAG con un análisis proteómico del eluido obtenido. Así, se transfectaron transitoriamente células HEK293T con laforina o con GFP conjugadas con FLAG y se llevó a cabo una incubación y precipitación con la resina unida a anti-FLAG, tal y como se ha comentado en el apartado anterior. El eluido de la resina anti-FLAG se repartió y analizó en dos geles SDS-PAGE, de 10 y 20 % de poliacrilamida respectivamente, para facilitar la separación de las proteínas de diferentes pesos moleculares coprecipitadas con la laforina (ver Material y Métodos). Los geles resueltos se tiñeron con plata y se seleccionaron las bandas de proteínas diferenciales de la elución de FLAG-laforina respecto a las del control FLAG-GFP. Las bandas aisladas se analizaron mediante cromatografía líquida para separar los diferentes péptidos y analizarlos por espectrometría de masas (LC/MS). Esto se hizo en la Sección de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València. Utilizando el programa ProteinPilot™ y la base de datos ExPasy se identificaron las proteínas correspondientes a los péptidos obtenidos. La siguiente tabla muestra las proteínas mayoritarias identificadas que interaccionan con la laforina.

Tabla 4. Listado de proteínas identificadas que interaccionan con la laforina.

Grupo	Proteína	Localización mayoritaria	Gen	Función
Proteínas ribosomales	Proteína ribosomal 40S S14	Citoplasma	RPS14	Traducción de proteínas
	Proteína ribosomal 40S S18		RPS18	
	Proteína ribosomal 40S S2		RPS2	
	Proteína ribosomal 40S SA		RPSA	
	Proteína ribosomal 60S L10		RPL10	
Factores de elongación	Factores de elongación 1 α -1, 1 α -2 y 1 α -3			

Grupo	Proteína	Localización mayoritaria	Gen	Función		
Enzima antioxidante	Peroxirredoxina-4	Citoplasma	PRDX4	Respuesta antioxidante		
Proteínas de unión a RNA y DNA	Proteína 14 de unión a RNA	Núcleo	RBM14	Regulación de la transcripción y procesamiento del mRNA		
	Proteína de unión a octámeros con dominio non-POU		NONO			
	Matrin-3		MATR3			
	Factor de "splicing" rico en prolina y glutamina		SFPQ			
Proteínas de unión a RNA	Proteína WDR33 de procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA		WDR33			
	Subunidad 2 del factor de especificidad de corte y poliadenilación		CPSF2			
	Subunidad 4 del factor de especificidad de corte y poliadenilación		CPSF4			
	Subunidad 3 del factor de especificidad de corte y poliadenilación		CPSF3			
	Proteína 82 con repeticiones WD		WDR82			
Proteínas reguladoras y del "espliceosoma"	Arginina N-metiltransferasa 5		PRMT5			
	Ribonucleoproteína nuclear pequeña Sm D3		SNRPD3			
	Subunidad del metilosoma pICln		CLNS1A			
	Ribonucleoproteína nuclear pequeña		SNRNPB			
Carioferinas	Importina α 2		Citoplasma y núcleo		KPNA2	Transporte de proteínas a través del poro nuclear
	Importina β 1				KPNB1	
	Importina 5				IPO5	
	Exportina 1	XPO1				

La mayoría de proteínas identificadas corresponden a proteínas ribosomales y relacionadas con la regulación de la transcripción y el procesamiento de mRNAs. Podemos destacar en este listado la identificación de la peroxirredoxina-4, ya que se trata de una enzima antioxidante involucrada en la regulación redox de la célula y que, posiblemente, guardaría relación directa con el mayor estrés oxidativo que observamos en las células de los pacientes con LD [287]. Además, se identificaron varias carioferinas relacionadas con el transporte de proteínas a través del poro nuclear, tanto con la entrada, la importina $\alpha 2$, la importina $\beta 1$ y la importina 5, como con la salida al núcleo, la exportina 1. Esto está en consonancia con nuestros anteriores resultados que indicaban que la laforina emplea para su entrada al núcleo la vía clásica mediada por importinas α/β y para su salida la vía dependiente de la exportina 1. Por otra parte, la interacción de la laforina con proteínas nucleares nos sugiere alguna función de la laforina en el núcleo relacionada con la regulación transcripcional y el procesamiento de mRNAs. En cuanto a los factores de elongación y las proteínas ribosomales identificadas, puesto que la laforina puede encontrarse en el núcleo y en el citoplasma, pensamos en la posibilidad de que tuviera alguna función en la expresión de determinadas proteínas. Por ello, analizamos su posible localización en tres componentes celulares que contienen proteínas ribosomales: polisomas, gránulos de estrés y cuerpos P.

4.1.1. Identificación de la laforina en una fracción enriquecida en polisomas

Un polisoma consiste en un conjunto de ribosomas asociados a una molécula de mRNA realizando la traducción simultánea y ordenada de una misma proteína. Se conoce que los iones metálicos, especialmente el Mg^{2+} , contribuyen a la estabilidad estructural de las subunidades ribosomales y que la asociación de las subunidades pequeña y grande para formar el ribosoma presenta una gran dependencia de este catión [333-335]. En este sentido, la adición a los polisomas de un quelante como el EDTA que secuestre el Mg^{2+} , causará la disociación de las subunidades ribosomales y la

liberación del mRNA [336]. Alternativamente, los polisomas pueden también disociarse tratándolos con una ribonucleasa que digiera el mRNA.

Para determinar si la laforina se encuentra efectivamente asociada a polisomas, llevamos a cabo el aislamiento de una fracción enriquecida en éstos a partir de fibroblastos humanos mediante centrifugación diferencial en un gradiente discontinuo de sacarosa [277]. Tras la homogeneización de las células y la obtención de una fracción enriquecida en núcleos, S1, (1.000 g, 5 min) y de un sedimento, S2, obtenido tras centrifugar el sobrenadante de la centrifugación anterior a 10.000 g durante 10 min, el sobrenadante resultante de esta última centrifugación se trató o no con EDTA o con RNasa A. Las muestras resultantes se situaron encima de un gradiente discontinuo de sacarosa como se ha descrito en el Material y Métodos. Tras la centrifugación del gradiente, las ocho fracciones obtenidas, el sedimento enriquecido en polisomas y los sedimentos obtenidos previamente, se analizaron por Western-blot con un anticuerpo que detecta a la laforina y, como referencia, otro que detecta a la proteína S3 de la subunidad pequeña o 40S del ribosoma (RPS3).

En la **figura 48A** observamos que la laforina se encuentra presente tanto en la fracción enriquecida en polisomas, donde también se detecta como cabía esperar RPS3, como en diferentes fracciones celulares. Al tratar el sobrenadante de la centrifugación a 10.000 g durante 10 min con EDTA para disociar los polisomas (**Fig. 48B**), el marcador ribosomal desaparece de la fracción enriquecida en polisomas mientras que la laforina permanece en ella. Por tanto, la laforina se encuentra presente en la fracción enriquecida en polisomas pero no forma parte de éstos. Un resultado semejante se obtuvo tratando los polisomas con RNasa en lugar de EDTA (datos no mostrados).

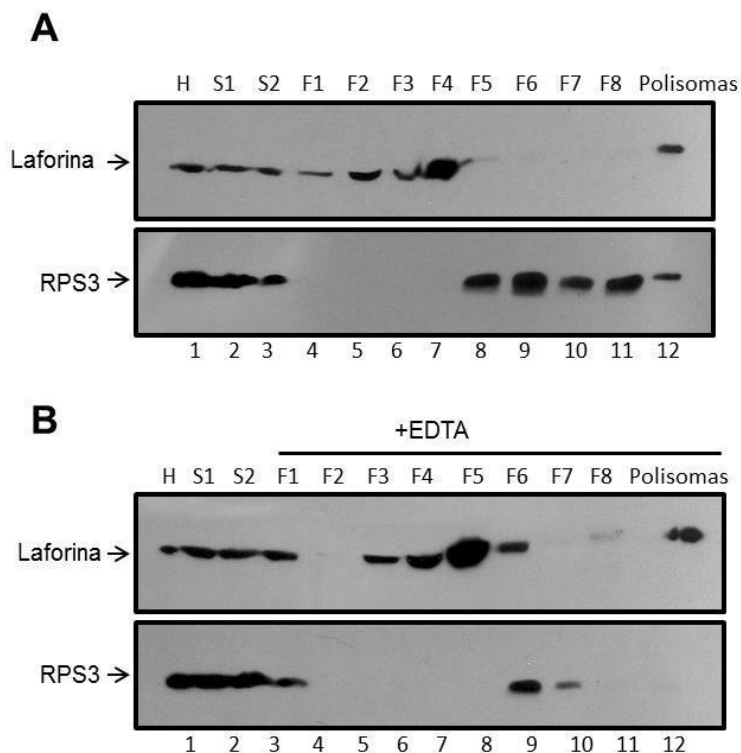


Figura 48. Análisis mediante Western-blot de diferentes fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial y en gradiente. Los fibroblastos humanos se preincubaron con CHX (100 µg/ml) y se homogeneizaron (H) para aislar un primer sedimento enriquecido en núcleos, S1 (1.000 g, 5 min) y un segundo sedimento, S2 (10.000 g, 10 min). El sobrenadante resultante se trató (B) o no (A) con EDTA (15 mM durante 15 min a 4 °C) y se centrifugó en un gradiente discontinuo de sacarosa. Las fracciones, F1 a F8, y el sedimento enriquecido en polisomas resultantes, junto al homogenado, H, y los sedimentos obtenidos tras las dos centrifugaciones sucesivas, S1 y S2, se analizaron mediante Western-blot con anticuerpos que reconocen a la laforina y a la proteína S3 de la subunidad pequeña del ribosoma (RPS3). Se muestran dos Western-blots representativos de cuatro experimentos independientes.

4.1.2. Colocalización de la laforina y la malina con gránulos de estrés y cuerpos P

El transporte intracelular, el procesamiento y la estabilidad de los mRNAs son importantes en la fisiología de la célula y, se piensa que, defectos en estos procesos contribuyen a la patogénesis en diferentes trastornos neurodegenerativos [337]. Los gránulos de estrés son agregados citoplasmáticos donde se almacenan determinados mRNAs en situaciones de estrés para su posterior uso cuando reviertan esas situaciones [338,

339]. Los cuerpos P también contienen mRNAs que, en muchos casos pero no siempre, son degradados por ser innecesarios o defectuosos. Tanto los cuerpos P como los gránulos de estrés son estructuras dinámicas y transitorias, que comparten algunos componentes pero no otros, que resultan inducidas sobre todo bajo ciertas condiciones desfavorables o de estrés, y que se encuentran espacial y funcionalmente conectadas entre sí y con polisomas [340]. Los gránulos de estrés contienen como componentes centrales mRNA, subunidades pequeñas ribosomales, factores de iniciación traduccionales (eIF3, eIF4E, eIF4G) y la proteína PABP. En cambio, los cuerpos P son lugares relacionados sobre todo con el “decapping” de los mRNAs y con su degradación [341]. De modo que cuando las condiciones vuelven a ser favorables o se precisa de estos transcritos de mRNA, son liberados para poder ser traducidos. Si alguno de los mRNAs queda dañado o ya no resulta útil, se lleva a los cuerpos P donde será degradado. También se ha sugerido que el empaquetar estos mRNAs citosólicos en los agregados podría tratarse de un mecanismo de regulación de la expresión génica mediante el que se conseguiría retrasar la traducción de transcritos específicos, permitiendo así dirigir el momento de la traducción de un determinado mRNA [342].

Tras observar que la laforina no se encontraba presente en polisomas, investigamos si pudiera estar presente en otras estructuras asociadas a ribosomas como son los gránulos de estrés y los cuerpos P. Para ello, células COS-7 que sobreexpresaban transitoriamente la laforina o la malina conjugadas con FLAG, se trataron o no con arsenito durante 30 min para inducir la formación de estas estructuras [343, 344]. Posteriormente, las células se analizaron por inmunofluorescencia. Para estudiar la colocalización de la laforina y la malina con los gránulos de estrés y cuerpos P, utilizamos marcadores específicos de éstos. Así, tanto la proteína de unión a la cola poli A de los mRNA (PABP) como el factor de iniciación traduccional eIF4E se localizan en los gránulos de estrés, mientras que la proteína activadora del “decapping” del mRNA 4 (EDC4) es un componente esencial de los cuerpos P.

Como se observa en la **figura 49**, tanto la malina como la laforina colocalizan con EDC4, un marcador de cuerpos P y esta colocalización es mayor en las células tratadas con arsenito, que incrementa la cantidad de estas estructuras [344].

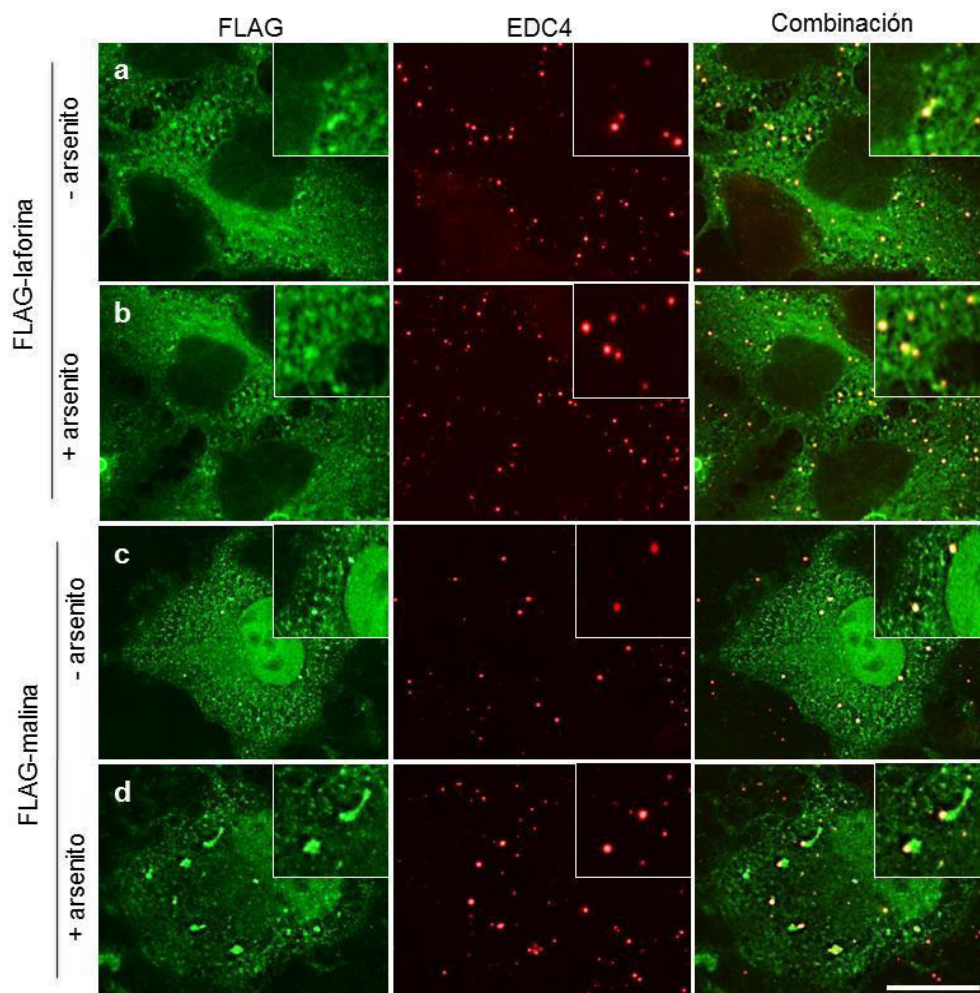


Figura 49. Colocalización de la laforina y la malina con un marcador de cuerpos P (EDC4). Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con plásmidos que expresan laforina (**a** y **b**) o malina (**c** y **d**) conjugadas con FLAG. Transcurridas 48 h, las células se trataron (+ arsenito, **b** y **d**) o no (- arsenito, **a** y **c**) con arsenito 0,5 mM durante 30 min. Las células se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce una proteína marcadora de cuerpos P (EDC4) y que marca estas estructuras en rojo (**a-d**, imágenes de la segunda columna) y uno frente a FLAG que marca la laforina (**a** y **b**) y la malina (**c** y **d**) en verde (imágenes de la primera columna). En la última columna (Combinación) se muestra la combinación de las dos primeras columnas. Se muestran imágenes representativas adquiridas mediante un microscopio confocal. Barra: 20 μ m.

Además, en la **figura 50** observamos que tanto la laforina como la malina colocalizan también con el marcador de gránulos de estrés PABP en las células tratadas con arsenito. La formación de gránulos de estrés se induce por el tratamiento con arsenito y en las células sin tratamiento rara vez se observan gránulos de estrés. Resultados similares se obtuvieron utilizando como marcador de gránulos de estrés eIF4E (imágenes no mostradas).

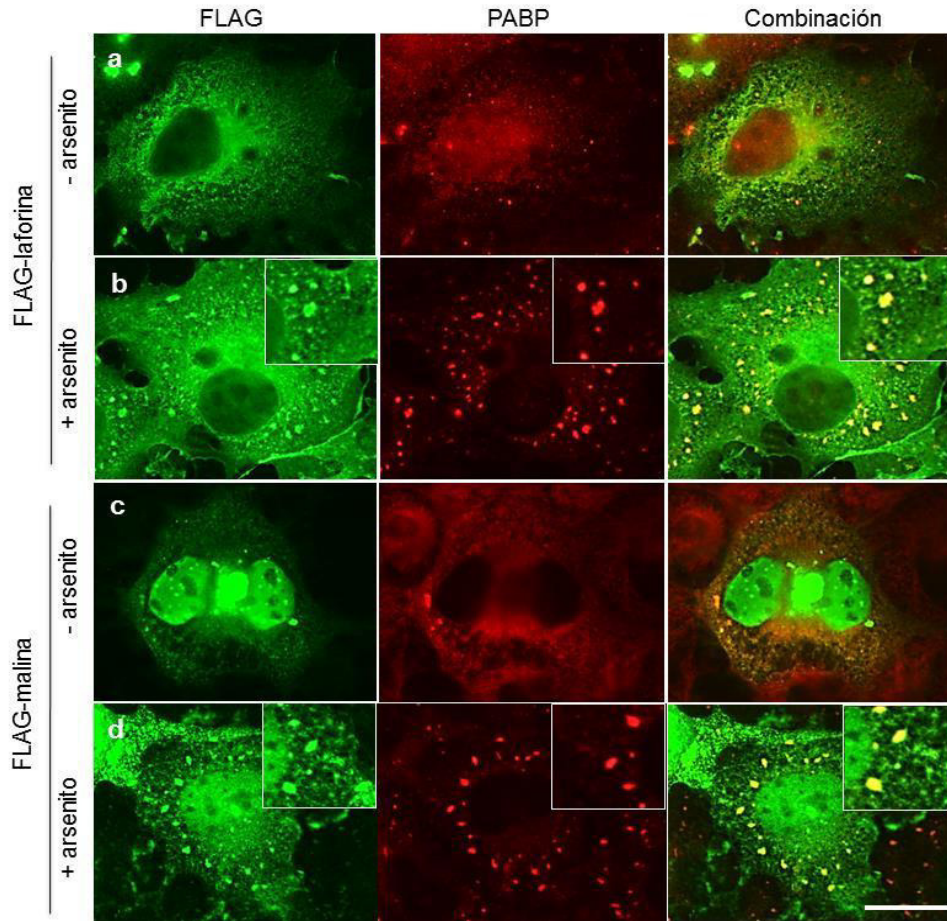


Figura 50. Colocalización de la laforina y la malina con un marcador de gránulos de estrés (PABP). Se transfectaron transitoriamente células COS-7 con plásmidos que expresan laforina (**a** y **b**) o malina (**c** y **d**) conjugadas con FLAG. Transcurridas 48 h, las células se trataron (+ arsenito, **b** y **d**) o no (- arsenito, **a** y **c**) con arsenito 0,5 mM durante 30 min. Las células se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce una proteína marcadora de gránulos de estrés (PABP) en rojo (**a-d**, imágenes de la segunda columna) y otro frente a FLAG que marca la laforina (**a** y **b**) y la malina (**c** y **d**) en verde (imágenes de la primera columna). En la última columna (Combinación) se muestra la combinación de las dos primeras columnas. Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio confocal. Barra: 20 μ m.

El hecho de que la laforina y la malina se encuentren presentes tanto en gránulos de estrés como en cuerpos P, junto con el hecho de que determinadas proteínas ribosomales y factores de elongación interactúan con la laforina (ver **tabla 4**), nos sugiere que la laforina y la malina podrían tener algún papel en la regulación de la traducción de mRNAs. Además, otros autores ya han sugerido que la malina podría regular el reclutamiento de una proteína activadora del “decapping” del mRNA (Dcp1) en los cuerpos P [345], apoyando esta posible función y siendo así posible que defectos en el procesamiento de determinados mRNAs sean relevantes en la patogénesis de LD.

4.2. Posibles funciones de la laforina en el núcleo

El hecho de que la laforina responda a cambios de glucosa en el medio y se transporte al núcleo en su ausencia sugiere también un papel de la laforina como sensor de los niveles de glucosa celular, pudiendo actuar en el núcleo como un factor transcripcional de una serie de genes, probablemente relacionados con el metabolismo del glucógeno o con la autofagia [325].

Es sabido que las proteínas con una función reguladora, en particular los factores de transcripción, suelen ser degradadas muy rápidamente, mientras que la gran mayoría de las proteínas relacionadas con la estructura de la célula o con su metabolismo, excluyendo las que ocupan pasos limitantes en las vías metabólicas, son más estables [346]. La forma habitual de expresar la velocidad con que se degrada una proteína es en términos de vida media, que es el tiempo requerido para que una cantidad determinada (de proteína en nuestro caso) se reduzca a la mitad. Los factores de transcripción suelen tener vidas medias cortas, generalmente de unas pocas horas. Por tanto, una aproximación relativamente sencilla para obtener más datos que apoyasen un posible papel de la laforina como regulador transcripcional era determinar su vida media en diferentes tipos celulares.

La vida media de una proteína puede medirse de varias maneras. Los dos métodos más habituales [347] son el análisis de pulso y caza y el bloqueo de las síntesis proteica con cicloheximida. Aquí empleamos CHX (**Fig. 51**), que actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando así la elongación traduccional. Concretamente, tratamos las células con CHX con el fin de inhibir la síntesis proteica y, por tanto, observar la degradación mediante la determinación densitométrica de sus niveles tras diferentes tiempos de incubación con la CHX.

Como se observa en la **figura 51A y B**, la vida media de la laforina (calculada por los métodos que se describen extensamente en [183]) varía entre los diferentes tipos celulares. Además, en conjunto, no parece especialmente corta, comparándola por ejemplo con la de la ciclina D1, que tiene una vida media de una hora o menos [348]. Por el contrario, considerando el resultado obtenido en las diferentes líneas celulares y las vidas medias promedio del conjunto de proteínas en cultivos celulares (como fibroblastos, por ejemplo, ver [183]) parece que se trata de una proteína con una vida media más bien larga.

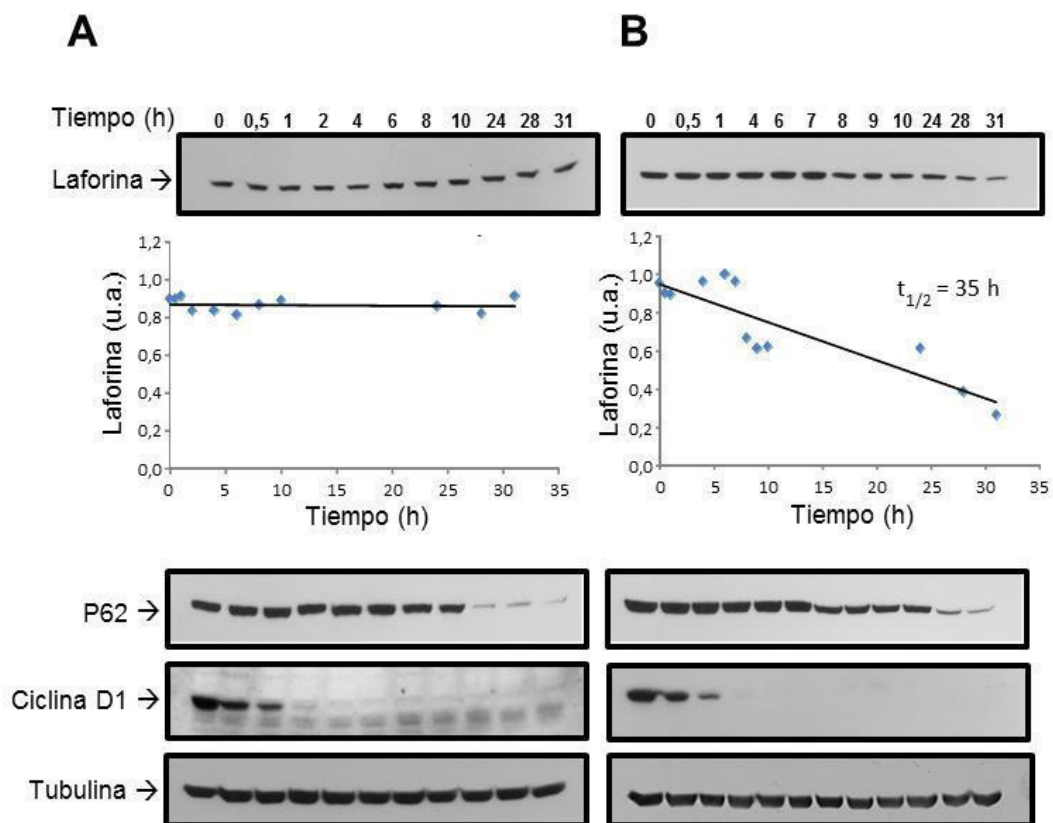


Figura 51. Vida media de la laforina. Se incubaron células SH-SY5Y (A) o células HeLa (B) en medio completo y se trataron con CHX 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A los tiempos indicados (0 a 31 h) se recogieron las células de cada placa, se prepararon extractos y se analizaron mediante Western-blot utilizando anticuerpos anti-laforina, anti-p62, anti-ciclina D1 y anti-tubulina. Las bandas correspondientes se cuantificaron por densitometría y los valores obtenidos se ajustaron por regresión lineal a una recta. Se determinó la pendiente de esa recta (k_d) y, a partir de ella, la vida media ($t_{1/2} = \ln 2 / k_d$) como se describe en [183]. En la figura se muestran Western-blots representativos de tres experimentos independientes para cada línea celular. A efectos comparativos se utilizaron la ciclina D1 y la proteína p62, con vidas medias en el rango de alrededor de 1 y 10 h, respectivamente.

Otra posibilidad que consideramos fue que la laforina se dirigiera al núcleo en ausencia de glucosa para degradarse. Esta posibilidad vendría avalada por la localización mayoritariamente nuclear de la malina y porque se ha sugerido que la ubiquitinación y la degradación de la laforina por proteasomas es dependiente de malina [57]. Además, determinados autores han indicado que los niveles de la laforina disminuyen en ausencia de glucosa en el medio [349]. Sin embargo, en ausencia de glucosa y tanto en

fibroblastos humanos control como en células HeLa, nosotros observamos un aumento significativo de aproximadamente un 30 % en la expresión génica de la laforina pero no de la malina, con respecto a los valores obtenidos en presencia de glucosa (**Fig. 52**). Esto podría deberse a un intento de compensar una posible degradación aumentada de la laforina en ausencia de glucosa.

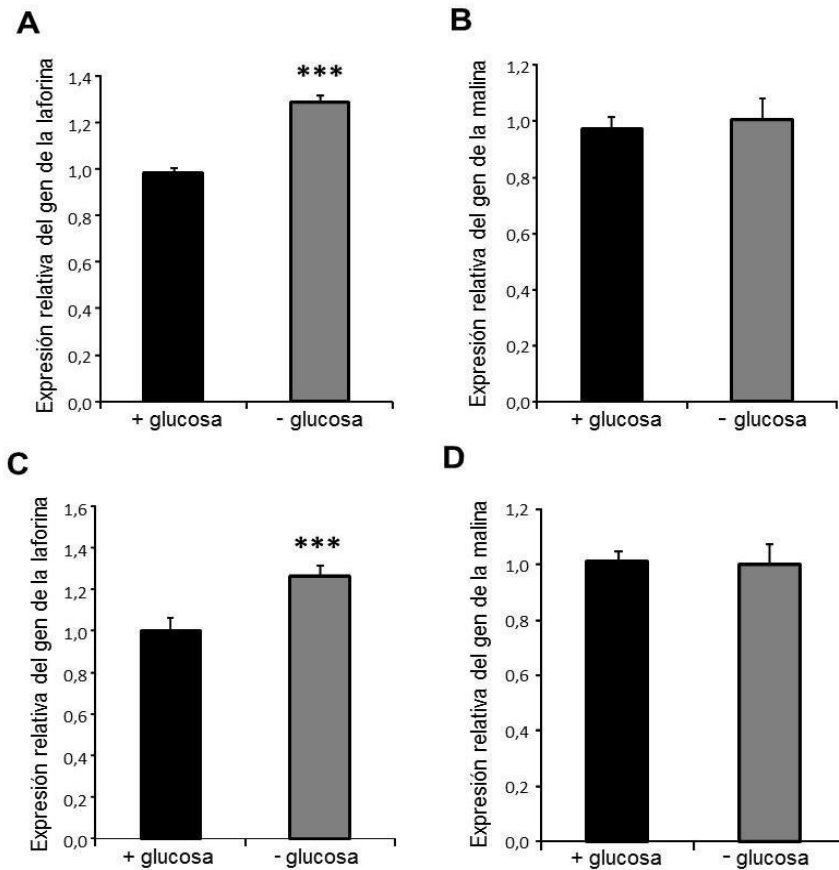


Figura 52. Análisis cuantitativo de la expresión de la laforina y la malina en presencia o no de glucosa. Fibroblastos humanos control (A y B) y células HeLa (C y D), se incubaron en medio completo en presencia (+glucosa) o no (-glucosa) de glucosa 25 mM durante 8 h. Posteriormente, se llevó a cabo la lisis celular y extracción del RNA total de las células, tal y como se indica en el Material y Métodos. Los RNAs se copiaron a cDNAs y se analizaron mediante una PCR cuantitativa utilizando sondas TaqMan específicas para laforina, malina y GAPDH, esta última como control. Los niveles de mRNA de la laforina (A y C) y la malina (B y D) se relativizaron con respecto a los obtenidos para GAPDH. Los valores que se muestran correspondientes a los fibroblastos humanos, proceden de la media de tres líneas de fibroblastos humanos control diferentes. Se muestran las medias \pm SD de dos experimentos independientes con 9 réplicas para cada muestra y experimento (***) $P < 0,0001$.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la vida media de la laforina para un mismo tipo celular en presencia o no de glucosa (**Fig. 53**). Estos experimentos sobre la vida media de la laforina en presencia o ausencia de glucosa los hemos repetido varias veces en diferentes líneas celulares sin encontrar diferencias (datos no mostrados). Por tanto, estos resultados no parecen ser compatibles con la posibilidad de que en ausencia de glucosa la laforina vaya al núcleo para degradarse.

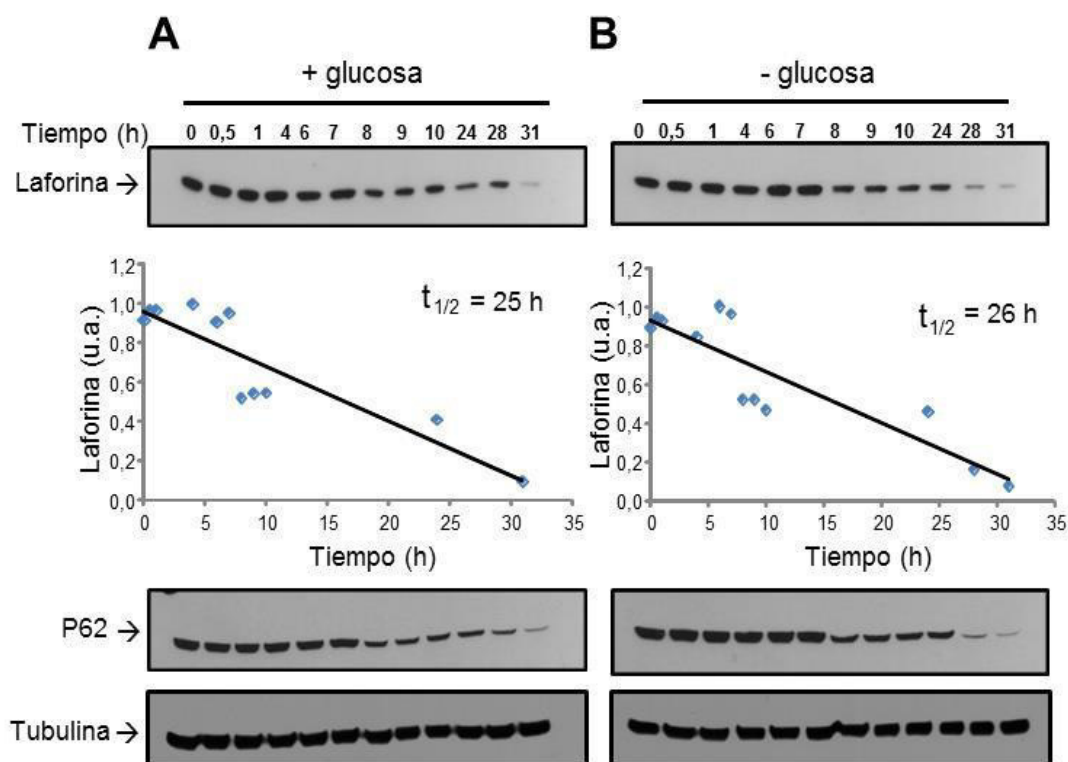


Figura 53. Vida media de la laforina en presencia o no de glucosa. Se incubaron fibroblastos humanos en medio completo con (A) o sin (B) glucosa 25mM y se trataron con CHX 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A los tiempos indicados (0 a 31 h) se recogieron las células de cada placa, se prepararon extractos y se analizaron mediante Western-blot utilizando anticuerpos anti-laforina, anti-p62 y anti-tubulina. Las bandas correspondientes se cuantificaron por densitometría, los valores obtenidos se ajustaron por regresión lineal a una recta y se determinó la vida media de la laforina como se ha descrito en la **figura 51**. En la figura se muestran Western-blots representativos de tres experimentos independientes.

En resumen, la laforina parece dirigirse al núcleo a cumplir, probablemente junto con la malina, una determinada función. Aunque la vida media de la laforina no parece particularmente corta ni se modifica por la glucosa lo que no parece muy compatible con ser un típico factor de transcripción, sí podría tener otras funciones correspondientes a proteínas más estables como las de una proteína adaptadora en la activación de la transcripción de determinados genes, por ejemplo los relacionados con la autofagia [75, 93, 95, 325] o con el metabolismo del glucógeno [61, 74, 79].

CONCLUSIONES FINALES

Conclusiones finales:

Las **principales conclusiones** obtenidas en este trabajo han sido:

- La degradación específica por macroautofagia de mitocondrias dañadas (mitofagia) es defectuosa en fibroblastos humanos procedentes de pacientes con enfermedad de Lafora y deficientes en laforina o en malina. Como en esas mismas células también se observa una disminución, respecto a los correspondientes controles, en la actividad de calpaínas, parece que en la enfermedad de Lafora se produce un defecto general en mecanismos de degradación intracelular de proteínas.
- La endocitosis mediada por receptor y, especialmente, la de fase fluida se encuentran también reducidas en fibroblastos procedentes de pacientes con enfermedad de Lafora y en fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en malina o en laforina.
- La malina se localiza mayoritariamente en el núcleo y la laforina en el citosol en diferentes líneas celulares incubadas en condiciones basales. Sin embargo, en ausencia de glucosa, una parte importante de la laforina, pero no de la malina que esencialmente permanece donde estaba, cambia su localización y se dirige al núcleo. Este cambio es reversible cuando se repone la glucosa del medio.
- La laforina emplea para su entrada al núcleo en ausencia de glucosa, al menos en parte, la vía clásica mediada por las importinas α/β y para su salida la vía dependiente de CRM1. En relación con esta última, se ha identificado en la laforina una señal de exportación del núcleo (NES) que es funcional.

CONCLUSIONES FINALES

- Se han identificado en células HEK293T diversas proteínas, nucleares y citoplasmáticas, que interaccionan con la laforina. En el núcleo, y puesto que la laforina no parece degradarse más rápidamente en ausencia de glucosa, esta proteína, junto a la malina, podría desempeñar alguna función relacionada con la regulación de la transcripción y el procesado de algunos RNAs mensajeros. Además, la colocalización por microscopia de fluorescencia de laforina y malina con marcadores de cuerpos P y de gránulos de estrés es compatible con su participación en la estabilidad de esos RNAs mensajeros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berkovic, S.F., et al., *Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis*. N Engl J Med, 1986. **315**(5): p. 296-305.
2. Minassian, B.A., *Progressive myoclonus epilepsy with polyglucosan bodies: Lafora disease*. Adv Neurol, 2002. **89**: p. 199-210.
3. Lafora, G.R., Glueck, B., *Beitrag zur histopathologie der myoklonischen Epilepsie*. 1911: Z. Ges. Neurol. Psychiat. p. 6: 1-14.
4. Delgado-Escueta, A.V., S. Ganesh, and K. Yamakawa, *Advances in the genetics of progressive myoclonus epilepsy*. Am J Med Genet, 2001. **106**(2): p. 129-38.
5. Serratosa, J.M., et al., *The gene for progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type maps to chromosome 6q*. Hum Mol Genet, 1995. **4**(9): p. 1657-63.
6. Harriman, D.G., J.H. Millar, and A.C. Stevenson, *Progressive familial myoclonic epilepsy in three families: its clinical features and pathological basis*. Brain, 1955. **78**(3): p. 325-49.
7. Minassian, B.A., *Lafora's disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis*. Pediatr Neurol, 2001. **25**(1): p. 21-9.
8. Tinuper, P., et al., *Visual ictal phenomena in a case of Lafora disease proven by skin biopsy*. Epilepsia, 1983. **24**(2): p. 214-8.
9. Berkovic, S.F., et al., *Progressive myoclonus epilepsies: clinical and genetic aspects*. Epilepsia, 1993. **34 Suppl 3**: p. S19-30.
10. Minassian, B.A., et al., *Mutation spectrum and predicted function of laforin in Lafora's progressive myoclonus epilepsy*. Neurology, 2000. **55**(3): p. 341-6.
11. Andrade, D.M., et al., *Nonepileptic visual hallucinations in Lafora disease*. Neurology, 2005. **64**(7): p. 1311-2.
12. Striano, P., et al., *Typical progression of myoclonic epilepsy of the Lafora type: a case report*. Nat Clin Pract Neurol, 2008. **4**(2): p. 106-11.
13. Van Hoof, F. and M. Hageman-Bal, *Progressive familial myoclonic epilepsy with Lafora bodies. Electron microscopic and histochemical study of a cerebral biopsy*. Acta Neuropathol, 1967. **7**(4): p. 315-36.
14. Genton P, M.A., Moulard B, Rogel-Ortiz F, Dravet Ch, Bureau M, Roger J, *Progressive myoclonus epilepsies*, in *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. 2005, In Roger J, Bureau M, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P (Eds): John Libbey Eurotext, Montrouge p. 441-465.
15. Delgado-Escueta, A.V., *Advances in lafora progressive myoclonus epilepsy*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2007. **7**(5): p. 428-33.
16. Andrade, D.M., et al., *Skin biopsy in Lafora disease: genotype-phenotype correlations and diagnostic pitfalls*. Neurology, 2003. **61**(11): p. 1611-4.

17. Ramachandran, N., et al., *The autosomal recessively inherited progressive myoclonus epilepsies and their genes*. Epilepsia, 2009. **50 Suppl 5**: p. 29-36.
18. Yokoi, S., et al., *Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). I. Isolation and preliminary characterization of Lafora bodies in two cases*. Arch Neurol, 1968. **19**(1): p. 15-33.
19. Sakai, M., et al., *Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). II. Polyglucosans in the systemic deposits of myoclonus epilepsy and in corpora amylacea*. Neurology, 1970. **20**(2): p. 160-76.
20. Worby, C.A., M.S. Gentry, and J.E. Dixon, *Laforin, a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 30412-8.
21. Nitschke, F., et al., *Hyperphosphorylation of glucosyl C6 carbons and altered structure of glycogen in the neurodegenerative epilepsy Lafora disease*. Cell Metab, 2013. **17**(5): p. 756-67.
22. Tagliabracci, V.S., et al., *Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19262-6.
23. Tagliabracci, V.S., et al., *Abnormal metabolism of glycogen phosphate as a cause for Lafora disease*. J Biol Chem, 2008. **283**(49): p. 33816-25.
24. Gentry, M.S., J.E. Dixon, and C.A. Worby, *Lafora disease: insights into neurodegeneration from plant metabolism*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(12): p. 628-39.
25. Yokoi, S., H. Nakayama, and T. Negishi, *Biochemical studies on tissues from a patient with Lafora disease*. Clin Chim Acta, 1975. **62**(3): p. 415-23.
26. Ganesh, S., et al., *Targeted disruption of the Epm2a gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(11): p. 1251-62.
27. Sinha, S., et al., *Progressive myoclonic epilepsy: A clinical, electrophysiological and pathological study from South India*. J Neurol Sci, 2007. **252**(1): p. 16-23.
28. Ganesh, S., et al., *Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy*. J Hum Genet, 2006. **51**(1): p. 1-8.
29. Turnbull, J., et al., *PTG depletion removes Lafora bodies and rescues the fatal epilepsy of Lafora disease*. PLoS Genet, 2011. **7**(4): p. e1002037.
30. Turnbull, J., et al., *Early-onset Lafora body disease*. Brain, 2012. **135**(Pt 9): p. 2684-98.
31. Busard, B.L., et al., *Lafora's disease. Comparison of inclusion bodies in skin and in brain*. Arch Neurol, 1986. **43**(3): p. 296-9.

32. Busard, H.L., et al., *Axilla skin biopsy: a reliable test for the diagnosis of Lafora's disease*. *Ann Neurol*, 1987. **21**(6): p. 599-601.
33. Carpenter, S. and G. Karpati, *Sweat gland duct cells in Lafora disease: diagnosis by skin biopsy*. *Neurology*, 1981. **31**(12): p. 1564-8.
34. de Assis Franco, I., et al., *Mystery Case: Lafora periodic acid-Schiff inclusion bodies*. *Neurology*, 2015. **85**(17): p. e130-1.
35. Chan, E.M., et al., *Genetic mapping of a new Lafora progressive myoclonus epilepsy locus (EPM2B) on 6p22*. *J Med Genet*, 2003. **40**(9): p. 671-5.
36. Minassian, B.A., et al., *Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy*. *Nat Genet*, 1998. **20**(2): p. 171-4.
37. Serratos, J.M., et al., *A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2)*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(2): p. 345-52.
38. Minassian, B.A., et al., *Identification of new and common mutations in the EPM2A gene in Lafora disease*. *Neurology*, 2000. **54**(2): p. 488-90.
39. Gómez-Garre, P., et al., *Mutational spectrum of the EPM2A gene in progressive myoclonus epilepsy of Lafora: high degree of allelic heterogeneity and prevalence of deletions*. *Eur J Hum Genet*, 2000. **8**(12): p. 946-54.
40. Ki, C.S., et al., *Two novel mutations in the EPM2A gene in a Korean patient with Lafora's progressive myoclonus epilepsy*. *J Hum Genet*, 2003. **48**(1): p. 51-4.
41. Annesi, G., et al., *A novel exon 1 mutation in a patient with atypical lafora progressive myoclonus epilepsy seen as childhood-onset cognitive deficit*. *Epilepsia*, 2004. **45**(3): p. 294-5.
42. Ianzano, L., et al., *Loss of function of the cytoplasmic isoform of the protein laforin (EPM2A) causes Lafora progressive myoclonus epilepsy*. *Hum Mutat*, 2004. **23**(2): p. 170-6.
43. Singh, S., et al., *Mutations in the NHLRC1 gene are the common cause for Lafora disease in the Japanese population*. *J Hum Genet*, 2005. **50**(7): p. 347-52.
44. Singh, S. and S. Ganesh, *Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes*. *Hum Mutat*, 2009. **30**(5): p. 715-23.
45. Lohi, H., et al., *On the road to tractability: the current biochemical understanding of progressive myoclonus epilepsies*. *Adv Neurol*, 2006. **97**: p. 399-415.
46. Lesca, G., et al., *Novel mutations in EPM2A and NHLRC1 widen the spectrum of Lafora disease*. *Epilepsia*, 2010. **51**(9): p. 1691-8.

47. Khiari, H.M., et al., *A novel exon 3 mutation in a Tunisian patient with Lafora's disease*. J Neurol Sci, 2011. **304**(1-2): p. 136-7.
48. Harirchian, M.H., et al., *Lafora disease: a case report, pathologic and genetic study*. Indian J Pathol Microbiol, 2011. **54**(2): p. 374-5.
49. Dubey, D., R. Parihar, and S. Ganesh, *Identification and characterization of novel splice variants of the human EPM2A gene mutated in Lafora progressive myoclonus epilepsy*. Genomics, 2012. **99**(1): p. 36-43.
50. Ganesh, S., et al., *Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(15): p. 2251-61.
51. Ganesh, S., T. Suzuki, and K. Yamakawa, *Alternative splicing modulates subcellular localization of laforin*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**(5): p. 1134-7.
52. Wang, J., et al., *A unique carbohydrate binding domain targets the lafora disease phosphatase to glycogen*. J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2377-80.
53. Gentry, M.S., C. Romá-Mateo, and P. Sanz, *Laforin, a protein with many faces: glucan phosphatase, adapter protein, et alii*. FEBS J, 2013. **280**(2): p. 525-37.
54. Gentry, M.S. and R.M. Pace, *Conservation of the glucan phosphatase laforin is linked to rates of molecular evolution and the glucan metabolism of the organism*. BMC Evol Biol, 2009. **9**: p. 138.
55. Ganesh, S., et al., *The carbohydrate-binding domain of Lafora disease protein targets Lafora polyglucosan bodies*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(4): p. 1101-9.
56. Gentry, M.S., et al., *The phosphatase laforin crosses evolutionary boundaries and links carbohydrate metabolism to neuronal disease*. J Cell Biol, 2007. **178**(3): p. 477-88.
57. Gentry, M.S., C.A. Worby, and J.E. Dixon, *Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8501-6.
58. Slack, F.J. and G. Ruvkun, *A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(12): p. 474-5.
59. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
60. Chan, E.M., et al., *Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy*. Nat Genet, 2003. **35**(2): p. 125-7.

61. Lohi, H., et al., *Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(18): p. 2727-36.
62. Freemont, P.S., *RING for destruction?* Curr Biol, 2000. **10**(2): p. R84-7.
63. Gómez-Abad, C., et al., *Lafora disease due to EPM2B mutations: a clinical and genetic study*. Neurology, 2005. **64**(6): p. 982-6.
64. Singh, S., et al., *Novel NHLRC1 mutations and genotype-phenotype correlations in patients with Lafora's progressive myoclonic epilepsy*. J Med Genet, 2006. **43**(9): p. e48.
65. Traoré, M., et al., *Novel mutation in the NHLRC1 gene in a Malian family with a severe phenotype of Lafora disease*. Neurogenetics, 2009. **10**(4): p. 319-23.
66. Couarch, P., et al., *Lafora progressive myoclonus epilepsy: NHLRC1 mutations affect glycogen metabolism*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(9): p. 915-25.
67. Franceschetti, S., et al., *Clinical and genetic findings in 26 Italian patients with Lafora disease*. Epilepsia, 2006. **47**(3): p. 640-3.
68. Ianzano, L., et al., *Lafora progressive Myoclonus Epilepsy mutation database-EPM2A and NHLRC1 (EPM2B) genes*. Hum Mutat, 2005. **26**(4): p. 397.
69. Solaz-Fuster, M.C., et al., *Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(5): p. 667-78.
70. Garyali, P., et al., *The malin-laforin complex suppresses the cellular toxicity of misfolded proteins by promoting their degradation through the ubiquitin-proteasome system*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(4): p. 688-700.
71. Brackmann, F.A., et al., *Rapidly progressive phenotype of Lafora disease associated with a novel NHLRC1 mutation*. Pediatr Neurol, 2011. **44**(6): p. 475-7.
72. Tagliabracci, V.S., et al., *Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease*. Cell Metab, 2011. **13**(3): p. 274-82.
73. Raththagala, M., et al., *Structural mechanism of laforin function in glycogen dephosphorylation and lafora disease*. Mol Cell, 2015. **57**(2): p. 261-72.
74. Worby, C.A., M.S. Gentry, and J.E. Dixon, *Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG)*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 4069-76.
75. Criado, O., et al., *Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(7): p. 1521-33.

76. Gayarre, J., et al., *The phosphatase activity of laforin is dispensable to rescue Epm2a^{-/-} mice from Lafora disease*. Brain, 2014. **137**(Pt 3): p. 806-18.
77. Andrade, D.M., J. Turnbull, and B.A. Minassian, *Lafora disease, seizures and sugars*. Acta Myol, 2007. **26**(1): p. 83-6.
78. Cheng, A., et al., *A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease*. Genes Dev, 2007. **21**(19): p. 2399-409.
79. Vilchez, D., et al., *Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy*. Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1407-13.
80. Liu, Y., et al., *Laforin-malin complex degrades polyglucosan bodies in concert with glycogen debranching enzyme and brain isoform glycogen phosphorylase*. Mol Neurobiol, 2014. **49**(2): p. 645-57.
81. Rubio-Villena, C., M.A. Garcia-Gimeno, and P. Sanz, *Glycogenic activity of R6, a protein phosphatase 1 regulatory subunit, is modulated by the laforin-malin complex*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(7): p. 1479-88.
82. Fernández-Sánchez, M.E., et al., *Laforin, the dual-phosphatase responsible for Lafora disease, interacts with R5 (PTG), a regulatory subunit of protein phosphatase-1 that enhances glycogen accumulation*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(23): p. 3161-71.
83. Wang, W., et al., *Glycogen metabolism in tissues from a mouse model of Lafora disease*. Arch Biochem Biophys, 2007. **457**(2): p. 264-9.
84. DePaoli-Roach, A.A., et al., *Genetic depletion of the malin E3 ubiquitin ligase in mice leads to lafora bodies and the accumulation of insoluble laforin*. J Biol Chem, 2010. **285**(33): p. 25372-81.
85. Turnbull, J., et al., *Glycogen hyperphosphorylation underlies lafora body formation*. Ann Neurol, 2010. **68**(6): p. 925-33.
86. Kesidou, E., et al., *Autophagy and neurodegenerative disorders*. Neural Regen Res, 2013. **8**(24): p. 2275-83.
87. Menzies, F.M., A. Fleming, and D.C. Rubinsztein, *Compromised autophagy and neurodegenerative diseases*. Nat Rev Neurosci, 2015. **16**(6): p. 345-57.
88. Kotoulas, O.B., S.A. Kalamidas, and D.J. Kondomerkos, *Glycogen autophagy*. Microsc Res Tech, 2004. **64**(1): p. 10-20.
89. Zirin, J., J. Nieuwenhuis, and N. Perrimon, *Role of autophagy in glycogen breakdown and its relevance to chloroquine myopathy*. PLoS Biol, 2013. **11**(11): p. e1001708.
90. Stroikin, Y., et al., *Inhibition of autophagy with 3-methyladenine results in impaired turnover of lysosomes and accumulation of lipofuscin-like material*. Eur J Cell Biol, 2004. **83**(10): p. 583-90.

91. Vernia, S., et al., *Increased endoplasmic reticulum stress and decreased proteasomal function in lafora disease models lacking the phosphatase laforin*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5907.
92. Puri, R. and S. Ganesh, *Laforin in autophagy: a possible link between carbohydrate and protein in Lafora disease?* Autophagy, 2010. **6**(8): p. 1229-31.
93. Aguado, C., et al., *Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(14): p. 2867-76.
94. Knecht, E., et al., *Malin knockout mice support a primary role of autophagy in the pathogenesis of Lafora disease*. Autophagy, 2012. **8**(4): p. 701-3.
95. Knecht, E., et al., *Impaired autophagy in Lafora disease*. Autophagy, 2010. **6**(7): p. 991-3.
96. Duran, J., et al., *Glycogen accumulation underlies neurodegeneration and autophagy impairment in Lafora disease*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(12): p. 3147-56.
97. Duran, J., et al., *Deleterious effects of neuronal accumulation of glycogen in flies and mice*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(8): p. 719-29.
98. Berthier, A., et al., *Pharmacological Interventions to Ameliorate Neuropathological Symptoms in a Mouse Model of Lafora Disease*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(2): p. 1296-309.
99. Pederson, B.A., et al., *Inhibiting glycogen synthesis prevents Lafora disease in a mouse model*. Ann Neurol, 2013. **74**(2): p. 297-300.
100. Cameron, J.M., et al., *Identification of a novel mutation in GYS1 (muscle-specific glycogen synthase) resulting in sudden cardiac death, that is diagnosable from skin fibroblasts*. Mol Genet Metab, 2009. **98**(4): p. 378-82.
101. Weinstein, D.A., et al., *Hepatic glycogen synthase deficiency: an infrequently recognized cause of ketotic hypoglycemia*. Mol Genet Metab, 2006. **87**(4): p. 284-8.
102. Turnbull, J., et al., *PTG protein depletion rescues malin-deficient Lafora disease in mouse*. Ann Neurol, 2014. **75**(3): p. 442-6.
103. Meléndez-Hevia, E., T.G. Waddell, and E.D. Shelton, *Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule*. Biochem J, 1993. **295 (Pt 2)**: p. 477-83.
104. Meléndez, R., E. Meléndez-Hevia, and E.I. Canela, *The fractal structure of glycogen: A clever solution to optimize cell metabolism*. Biophys J, 1999. **77**(3): p. 1327-32.
105. Roach, P.J., *Glycogen and its metabolism*. Curr Mol Med, 2002. **2**(2): p. 101-20.

106. Graham, T.E., et al., *The regulation of muscle glycogen: the granule and its proteins*. Acta Physiol (Oxf), 2010. **199**(4): p. 489-98.
107. Hejazi, M., et al., *Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization*. Plant J, 2008. **55**(2): p. 323-34.
108. Fontana, J.D., *The presence of phosphate in glycogen*. FEBS Lett, 1980. **109**(1): p. 85-92.
109. Lomako, J., et al., *The role of phosphate in muscle glycogen*. Biofactors, 1994. **4**(3-4): p. 167-71.
110. Roach, P.J., et al., *Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes*. Biochem J, 2012. **441**(3): p. 763-87.
111. Suraweera, A., et al., *Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition*. Mol Cell, 2012. **48**(2): p. 242-53.
112. Dean, R.T., *Protein degradation in cell cultures: general considerations on mechanisms and regulation*. Fed Proc, 1980. **39**(1): p. 15-9.
113. Ciechanover, A., *Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting*. Bioorg Med Chem, 2013. **21**(12): p. 3400-10.
114. Knecht, E., et al., *Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(15): p. 2427-43.
115. Zhou, S., et al., *Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?* Cancer Lett, 2012. **323**(2): p. 115-27.
116. Okayama, H., *Cell cycle control by anchorage signaling*. Cell Signal, 2012. **24**(8): p. 1599-609.
117. Luciani, A., et al., *Cystic fibrosis: a disorder with defective autophagy*. Autophagy, 2011. **7**(1): p. 104-6.
118. Dennissen, F.J., N. Kholod, and F.W. van Leeuwen, *The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: culprit, accomplice or victim?* Prog Neurobiol, 2012. **96**(2): p. 190-207.
119. Saftig, P. and J. Klumperman, *Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(9): p. 623-35.
120. Saftig, P., B. Schröder, and J. Blanz, *Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(6): p. 1420-3.
121. Bellettato, C.M. and M. Scarpa, *Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders*. J Inherit Metab Dis, 2010. **33**(4): p. 347-62.

122. Kobayashi, S., *Choose Delicately and Reuse Adequately: The Newly Revealed Process of Autophagy*. Biol Pharm Bull, 2015. **38**(8): p. 1098-103.
123. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *Eaten alive: a history of macroautophagy*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(9): p. 814-22.
124. Levine, B., N. Mizushima, and H.W. Virgin, *Autophagy in immunity and inflammation*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 323-35.
125. Cuervo, A.M., *Autophagy: in sickness and in health*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(2): p. 70-7.
126. Klionsky, D.J., *Cell biology: regulated self-cannibalism*. Nature, 2004. **431**(7004): p. 31-2.
127. Esteve, J.M. and E. Knecht, *Mechanisms of autophagy and apoptosis: Recent developments in breast cancer cells*. World J Biol Chem, 2011. **2**(10): p. 232-8.
128. Hara, T., et al., *FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells*. J Cell Biol, 2008. **181**(3): p. 497-510.
129. Russell, R.C., H.X. Yuan, and K.L. Guan, *Autophagy regulation by nutrient signaling*. Cell Res, 2014. **24**(1): p. 42-57.
130. Chan, E.Y., *Regulation and function of uncoordinated-51 like kinase proteins*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(5): p. 775-85.
131. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 132-41.
132. Jaber, N. and W.X. Zong, *Class III PI3K Vps34: essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1280**: p. 48-51.
133. Kang, R., et al., *The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis*. Cell Death Differ, 2011. **18**(4): p. 571-80.
134. Proikas-Cezanne, T., et al., *WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome*. J Cell Sci, 2015. **128**(2): p. 207-17.
135. Kimura, S., T. Noda, and T. Yoshimori, *Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3*. Autophagy, 2007. **3**(5): p. 452-60.
136. Park, S., et al., *Choline dehydrogenase interacts with SQSTM1/p62 to recruit LC3 and stimulate mitophagy*. Autophagy, 2014. **10**(11): p. 1906-20.
137. Zhou, C., et al., *Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells*. Autophagy, 2012. **8**(8): p. 1215-26.

138. Kim, Y.M., et al., *mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation*. Mol Cell, 2015. **57**(2): p. 207-18.
139. Fader, C.M., et al., *TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(12): p. 1901-16.
140. Palikaras, K. and N. Tavernarakis, *Mitophagy in neurodegeneration and aging*. Front Genet, 2012. **3**: p. 297.
141. Orth, M. and A.H. Schapira, *Mitochondria and degenerative disorders*. Am J Med Genet, 2001. **106**(1): p. 27-36.
142. Schon, E.A. and G. Manfredi, *Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction*. J Clin Invest, 2003. **111**(3): p. 303-12.
143. Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J.J. Lemasters, *Selective degradation of mitochondria by mitophagy*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 245-53.
144. Lemasters, J.J., et al., *Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(5): p. 769-81.
145. Xu, J., J. Ji, and X.H. Yan, *Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2012. **52**(5): p. 373-81.
146. Fedorowicz, M.A., et al., *Cytosolic cleaved PINK1 represses Parkin translocation to mitochondria and mitophagy*. EMBO Rep, 2014. **15**(1): p. 86-93.
147. Thomas, R.E., et al., *PINK1-Parkin pathway activity is regulated by degradation of PINK1 in the mitochondrial matrix*. PLoS Genet, 2014. **10**(5): p. e1004279.
148. Nguyen, T.N., B.S. Padman, and M. Lazarou, *Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy*. Trends Cell Biol, 2016. **26**(10): p. 733-44.
149. Nardin, A., E. Schrepfer, and E. Ziviani, *Counteracting PINK/Parkin Deficiency in the Activation of Mitophagy: A Potential Therapeutic Intervention for Parkinson's Disease*. Curr Neuropharmacol, 2016. **14**(3): p. 250-9.
150. Kane, L.A., et al., *PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity*. J Cell Biol, 2014. **205**(2): p. 143-53.
151. Kondapalli, C., et al., *PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65*. Open Biol, 2012. **2**(5): p. 120080.

152. Shiba-Fukushima, K., et al., *PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 1002.
153. Ding, W.X. and X.M. Yin, *Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis*. Biol Chem, 2012. **393**(7): p. 547-64.
154. Ding, W.X., et al., *Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming*. J Biol Chem, 2010. **285**(36): p. 27879-90.
155. Geisler, S., et al., *PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(2): p. 119-31.
156. Novak, I., et al., *Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance*. EMBO Rep, 2010. **11**(1): p. 45-51.
157. Liu, L., et al., *Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(2): p. 177-85.
158. Liu, L., et al., *Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems*. Cell Res, 2014. **24**(7): p. 787-95.
159. Orvedahl, A., et al., *Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors*. Nature, 2011. **480**(7375): p. 113-7.
160. Marsh, M., *Endocytosis*. 2001, Oxford. Oxford University Press.
161. Toit, A.D., *Endocytosis: A new gateway into cells*. 2015, Nat Rev Mol Cell Biol.
162. Grant, B.D. and J.G. Donaldson, *Pathways and mechanisms of endocytic recycling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(9): p. 597-608.
163. Burgdorf, S. and C. Kurts, *Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(1): p. 89-95.
164. Haucke, V., *Cell biology: On the endocytosis rollercoaster*. Nature, 2015. **517**(7535): p. 446-7.
165. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
166. Vercauteren, D., et al., *The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls*. Mol Ther, 2010. **18**(3): p. 561-9.
167. Falcone, S., et al., *Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 22): p. 4758-69.
168. Swanson, J.A. and C. Watts, *Macropinocytosis*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(11): p. 424-8.
169. Lim, J.P. and P.A. Gleeson, *Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(8): p. 836-43.

170. Racoosin, E.L. and J.A. Swanson, *Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages*. J Exp Med, 1989. **170**(5): p. 1635-48.
171. Roth, M.G., *Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(1): p. 63-8.
172. Sorkin, A. and M. von Zastrow, *Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(9): p. 609-22.
173. Mayor, S. and R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 603-12.
174. Sigismund, S., et al., *Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation*. Dev Cell, 2008. **15**(2): p. 209-19.
175. Sorkin, A. and M. Von Zastrow, *Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 600-14.
176. Bastiani, M. and R.G. Parton, *Caveolae at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 22): p. 3831-6.
177. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, *Mechanisms of endocytosis*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 857-902.
178. Pelkmans, L. and A. Helenius, *Endocytosis via caveolae*. Traffic, 2002. **3**(5): p. 311-20.
179. Kiss, A.L. and E. Botos, *Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation?* J Cell Mol Med, 2009. **13**(7): p. 1228-37.
180. Gilbert, A., et al., *Direct demonstration of the endocytic function of caveolae by a cell-free assay*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 7): p. 1101-10.
181. Parton, R.G. and K. Simons, *The multiple faces of caveolae*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 185-94.
182. Eisele, F. and D.H. Wolf, *Degradation of misfolded protein in the cytoplasm is mediated by the ubiquitin ligase Ubr1*. FEBS Lett, 2008. **582**(30): p. 4143-6.
183. Fuertes, G., A. Villarroya, and E. Knecht, *Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(5): p. 651-64.
184. Brooks, P., et al., *Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells*. Biochem J, 2000. **346** Pt 1: p. 155-61.
185. Bader, N., T. Jung, and T. Grune, *The proteasome and its role in nuclear protein maintenance*. Exp Gerontol, 2007. **42**(9): p. 864-70.
186. Rivett, A.J., *Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes*. Biochem J, 1993. **291** (Pt 1): p. 1-10.

187. Palmer, A., et al., *Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol*. Biochem J, 1996. **316 (Pt 2)**: p. 401-7.
188. Orłowski, R.Z., *The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis*. Cell Death Differ, 1999. **6(4)**: p. 303-13.
189. Zhao, J., et al., *The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 23**: p. 4363-71.
190. McMahon, M., et al., *Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression*. J Biol Chem, 2003. **278(24)**: p. 21592-600.
191. Lecker, S.H., A.L. Goldberg, and W.E. Mitch, *Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17(7)**: p. 1807-19.
192. Liu, N., et al., *Inhibition of 19S proteasome-associated deubiquitinases by metal-containing compounds*. Oncoscience, 2015. **2(5)**: p. 457-66.
193. Tanaka, K., *The proteasome: overview of structure and functions*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2009. **85(1)**: p. 12-36.
194. Adams, J., *The proteasome: structure, function, and role in the cell*. Cancer Treat Rev, 2003. **29 Suppl 1**: p. 3-9.
195. Ferrington, D.A. and D.S. Gregerson, *Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **109**: p. 75-112.
196. Melloni, E. and S. Pontremoli, *The calpains*. Trends Neurosci, 1989. **12(11)**: p. 438-44.
197. Mellgren, R.L., W.M. Renno, and R.D. Lane, *The non-lysosomal, calcium-dependent proteolytic system of mammalian cells*. Revis Biol Celular, 1989. **20**: p. 139-59.
198. Ono, Y., H. Sorimachi, and K. Suzuki, *Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **245(2)**: p. 289-94.
199. Goll, D.E., et al., *The calpain system*. Physiol Rev, 2003. **83(3)**: p. 731-801.
200. Hosfield, C.M., et al., *Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation*. EMBO J, 1999. **18(24)**: p. 6880-9.
201. Murachi, T., *[Calpain and calpastatin]*. Rinsho Byori, 1990. **38(4)**: p. 337-46.
202. Nishimura, T. and D.E. Goll, *Binding of calpain fragments to calpastatin*. J Biol Chem, 1991. **266(18)**: p. 11842-50.
203. Sorimachi, H., T.C. Saido, and K. Suzuki, *New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains*. FEBS Lett, 1994. **343(1)**: p. 1-5.

204. Suzuki, K., et al., *Structure, activation, and biology of calpain*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S12-8.
205. Richard, I., et al., *Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. Cell, 1995. **81**(1): p. 27-40.
206. Ono, Y., et al., *Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 17073-8.
207. Yamashima, T., *Reconsider Alzheimer's disease by the 'calpain-cathepsin hypothesis'--a perspective review*. Prog Neurobiol, 2013. **105**: p. 1-23.
208. Zatz, M. and A. Starling, *Calpains and disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(23): p. 2413-23.
209. Huang, Y. and K.K. Wang, *The calpain family and human disease*. Trends Mol Med, 2001. **7**(8): p. 355-62.
210. Suntharalingam, M. and S.R. Wenthe, *Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function*. Dev Cell, 2003. **4**(6): p. 775-89.
211. Rout, M.P. and J.D. Aitchison, *Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange*. Essays Biochem, 2000. **36**: p. 75-88.
212. Shulga, N., et al., *Yeast nucleoporins involved in passive nuclear envelope permeability*. J Cell Biol, 2000. **149**(5): p. 1027-38.
213. Stoffler, D., B. Fahrenkrog, and U. Aebi, *The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(3): p. 391-401.
214. Ryan, K.J. and S.R. Wenthe, *The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(3): p. 361-71.
215. Freitas, N. and C. Cunha, *Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins*. Curr Genomics, 2009. **10**(8): p. 550-7.
216. Rabut, G., P. Lénárt, and J. Ellenberg, *Dynamics of nuclear pore complex organization through the cell cycle*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(3): p. 314-21.
217. Weis, K., *Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle*. Cell, 2003. **112**(4): p. 441-51.
218. Ström, A.C. and K. Weis, *Importin-beta-like nuclear transport receptors*. Genome Biol, 2001. **2**(6): p. REVIEWS3008.
219. Mosammamarast, N. and L.F. Pemberton, *Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(10): p. 547-56.
220. Görlich, D., et al., *Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import*. Nature, 1995. **377**(6546): p. 246-8.

221. Chook, Y.M. and G. Blobel, *Karyopherins and nuclear import*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(6): p. 703-15.
222. Tran, E.J., T.A. Bolger, and S.R. Wenthe, *SnapShot: nuclear transport*. Cell, 2007. **131**(2): p. 420.
223. Xu, D., A. Farmer, and Y.M. Chook, *Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- β proteins*. Curr Opin Struct Biol, 2010. **20**(6): p. 782-90.
224. Pemberton, L.F. and B.M. Paschal, *Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export*. Traffic, 2005. **6**(3): p. 187-98.
225. Boulikas, T., *Nuclear localization signals (NLS)*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1993. **3**(3): p. 193-227.
226. Boulikas, T., *Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors*. J Cell Biochem, 1994. **55**(1): p. 32-58.
227. Vancurova, I., et al., *An NLS is sufficient to engage facilitated translocation by the nuclear pore complex and subsequent intranuclear binding*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(1): p. 529-36.
228. Mattaj, I.W. and L. Englmeier, *Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 265-306.
229. Nehrbass, U., et al., *Analysis of nucleo-cytoplasmic transport in a thermosensitive mutant of nuclear pore protein NSP1*. Eur J Cell Biol, 1993. **62**(1): p. 1-12.
230. Adam, E.J. and S.A. Adam, *Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope*. J Cell Biol, 1994. **125**(3): p. 547-55.
231. Chelsky, D., R. Ralph, and G. Jonak, *Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(6): p. 2487-92.
232. Kalderon, D., et al., *A short amino acid sequence able to specify nuclear location*. Cell, 1984. **39**(3 Pt 2): p. 499-509.
233. Dingwall, C. and R.A. Laskey, *Nuclear targeting sequences--a consensus?* Trends Biochem Sci, 1991. **16**(12): p. 478-81.
234. Dingwall, C., et al., *The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen*. J Cell Biol, 1988. **107**(3): p. 841-9.
235. Robbins, J., et al., *Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence*. Cell, 1991. **64**(3): p. 615-23.
236. Kosugi, S., et al., *Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling*. Chem Biol, 2008. **15**(9): p. 940-9.

237. Marfori, M., et al., *Structural basis of high-affinity nuclear localization signal interactions with importin- α* . *Traffic*, 2012. **13**(4): p. 532-48.
238. Pollard, V.W., et al., *A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway*. *Cell*, 1996. **86**(6): p. 985-94.
239. Lange, A., et al., *A PY-NLS nuclear targeting signal is required for nuclear localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein Hrp1*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(19): p. 12926-34.
240. Lee, B.J., et al., *Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2*. *Cell*, 2006. **126**(3): p. 543-58.
241. Ossareh-Nazari, B., C. Gwizdek, and C. Dargemont, *Protein export from the nucleus*. *Traffic*, 2001. **2**(10): p. 684-9.
242. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals*. *Cell*, 1997. **90**(6): p. 1051-60.
243. Fukuda, M., et al., *CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal*. *Nature*, 1997. **390**(6657): p. 308-11.
244. Stade, K., et al., *Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor*. *Cell*, 1997. **90**(6): p. 1041-50.
245. Johnson, A.W., E. Lund, and J. Dahlberg, *Nuclear export of ribosomal subunits*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(11): p. 580-5.
246. Thakar, K., et al., *Identification of CRM1-dependent Nuclear Export Cargos Using Quantitative Mass Spectrometry*. *Mol Cell Proteomics*, 2013. **12**(3): p. 664-78.
247. Fischer, U., et al., *Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA*. *EMBO J*, 1994. **13**(17): p. 4105-12.
248. Meyer, B.E. and M.H. Malim, *The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm*. *Genes Dev*, 1994. **8**(13): p. 1538-47.
249. Wen, W., et al., *Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus*. *Cell*, 1995. **82**(3): p. 463-73.
250. Kutay, U. and S. Güttinger, *Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak*. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(3): p. 121-4.
251. la Cour, T., et al., *Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals*. *Protein Eng Des Sel*, 2004. **17**(6): p. 527-36.
252. Henderson, B.R. and A. Eleftheriou, *A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals*. *Exp Cell Res*, 2000. **256**(1): p. 213-24.
253. Stommel, J.M., et al., *A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking*. *EMBO J*, 1999. **18**(6): p. 1660-72.

254. Heerklotz, D., et al., *The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1759-68.
255. Ohno, M., et al., *PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation*. Cell, 2000. **101**(2): p. 187-98.
256. Brunet, A., et al., *14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport*. J Cell Biol, 2002. **156**(5): p. 817-28.
257. Kuge, S., et al., *Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(18): p. 6139-50.
258. Kudo, N., et al., *A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 15151-8.
259. Yan, C., L.H. Lee, and L.I. Davis, *Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor*. EMBO J, 1998. **17**(24): p. 7416-29.
260. Kudo, N., et al., *Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9112-7.
261. Dong, X., et al., *Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1136-41.
262. Monecke, T., et al., *Crystal structure of the nuclear export receptor CRM1 in complex with Snurportin1 and RanGTP*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1087-91.
263. Ranganathan, P., et al., *Preclinical activity of a novel CRM1 inhibitor in acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **120**(9): p. 1765-73.
264. Kalab, P. and R. Heald, *The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 10): p. 1577-86.
265. Panté, N. and M. Kann, *Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(2): p. 425-34.
266. Sorokin, A.V., E.R. Kim, and L.P. Ovchinnikov, *Nucleocytoplasmic transport of proteins*. Biochemistry (Mosc), 2007. **72**(13): p. 1439-57.
267. Kosugi, S., et al., *Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(25): p. 10171-6.
268. Nguyen Ba, A.N., et al., *NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction*. BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 202.

269. Brameier, M., A. Krings, and R.M. MacCallum, *NucPred--predicting nuclear localization of proteins*. Bioinformatics, 2007. **23**(9): p. 1159-60.
270. Lin, J.R. and J. Hu, *SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76864.
271. Xu, D., et al., *LocNES: a computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins*. Bioinformatics, 2015. **31**(9): p. 1357-65.
272. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
273. Peterson, G.L., *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. Anal Biochem, 1977. **83**(2): p. 346-56.
274. Russell, J.F.S.y.D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
275. Moruno-Manchón, J.F., E. Pérez-Jiménez, and E. Knecht, *Glucose induces autophagy under starvation conditions by a p38 MAPK-dependent pathway*. Biochem J, 2013. **449**(2): p. 497-506.
276. Bor, Y.C., et al., *The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron*. Genes Dev, 2006. **20**(12): p. 1597-608.
277. Esposito, A.M., et al., *Eukaryotic polyribosome profile analysis*. J Vis Exp, 2010(40).
278. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*. Autophagy, 2016. **12**(1): p. 1-222.
279. Poot, M., *Analysis of intracellular organelles by flow cytometry or microscopy*. Curr Protoc Cytom, 2001. **Chapter 9**: p. Unit 9.4.
280. Dowrick, P., et al., *Circular ruffle formation and closure lead to macropinocytosis in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells*. Eur J Cell Biol, 1993. **61**(1): p. 44-53.
281. Lauer, S., et al., *Analysis of cholera toxin-ganglioside interactions by flow cytometry*. Biochemistry, 2002. **41**(6): p. 1742-51.
282. Göstring, L., et al., *Quantification of internalization of EGFR-binding Affibody molecules: Methodological aspects*. Int J Oncol, 2010. **36**(4): p. 757-63.
283. O'Donnell, A.F., et al., *Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(20): p. 3552-66.
284. Shevchenko, A., et al., *A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone*. Biochem Soc Trans, 1996. **24**(3): p. 893-6.

285. Shevchenko, A., et al., *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*. *Anal Chem*, 1996. **68**(5): p. 850-8.
286. Romá-Mateo, C., et al., *Increased oxidative stress and impaired antioxidant response in Lafora disease*. *Mol Neurobiol*, 2015. **51**(3): p. 932-46.
287. Romá-Mateo, C., et al., *Oxidative stress, a new hallmark in the pathophysiology of Lafora progressive myoclonus epilepsy*. *Free Radic Biol Med*, 2015. **88**(Pt A): p. 30-41.
288. Garyali, P., et al., *Protein degradation and quality control in cells from laforin and malin knockout mice*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(30): p. 20606-14.
289. Rodriguez-Enriquez, S., et al., *Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes*. *Autophagy*, 2006. **2**(1): p. 39-46.
290. Georgakopoulos, N.D., G. Wells, and M. Campanella, *The pharmacological regulation of cellular mitophagy*. *Nat Chem Biol*, 2017. **13**(2): p. 136-146.
291. Ashrafi, G. and T.L. Schwarz, *The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria*. *Cell Death Differ*, 2013. **20**(1): p. 31-42.
292. Park, K.S., et al., *FCCP depolarizes plasma membrane potential by activating proton and Na⁺ currents in bovine aortic endothelial cells*. *Pflugers Arch*, 2002. **443**(3): p. 344-52.
293. Buckler, K.J. and R.D. Vaughan-Jones, *Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells*. *J Physiol*, 1998. **513** (Pt 3): p. 819-33.
294. Mitra, K. and J. Lippincott-Schwartz, *Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches*. *Curr Protoc Cell Biol*, 2010. **Chapter 4**: p. Unit 4.25.1-21.
295. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, *Methods in mammalian autophagy research*. *Cell*, 2010. **140**(3): p. 313-26.
296. Zhu, Y., et al., *Monitoring mitophagy in mammalian cells*. *Methods Enzymol*, 2014. **547**: p. 39-55.
297. Xiao, B., et al., *Flow Cytometry-Based Assessment of Mitophagy Using MitoTracker*. *Front Cell Neurosci*, 2016. **10**: p. 76.
298. Mauro-Lizcano, M., et al., *New method to assess mitophagy flux by flow cytometry*. *Autophagy*, 2015. **11**(5): p. 833-43.
299. Duvezin-Caubet, S., et al., *Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(49): p. 37972-9.

300. Charan, R.A., et al., *Inhibition of apoptotic Bax translocation to the mitochondria is a central function of parkin*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1313.
301. Li, L., Y. Chen, and S.B. Gibson, *Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation*. Cell Signal, 2013. **25**(1): p. 50-65.
302. Hamacher-Brady, A. and N.R. Brady, *Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(4): p. 775-95.
303. Bernardini, J.P., M. Lazarou, and G. Dewson, *Parkin and mitophagy in cancer*. Oncogene, 2017. **36**(10): p. 1315-1327.
304. Roberts, R.F., et al., *Defending the mitochondria: The pathways of mitophagy and mitochondrial-derived vesicles*. Int J Biochem Cell Biol, 2016. **79**: p. 427-436.
305. Durcan, T.M. and E.A. Fon, *The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications*. Genes Dev, 2015. **29**(10): p. 989-99.
306. Hunker, C.M., et al., *Rab5-activating protein 6, a novel endosomal protein with a role in endocytosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(3): p. 967-75.
307. Simonsen, A. and S.A. Tooze, *Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes*. J Cell Biol, 2009. **186**(6): p. 773-82.
308. Dou, Z., et al., *Class IA PI3K p110 β subunit promotes autophagy through Rab5 small GTPase in response to growth factor limitation*. Mol Cell, 2013. **50**(1): p. 29-42.
309. Lamb, C.A., H.C. Dooley, and S.A. Tooze, *Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation*. Bioessays, 2013. **35**(1): p. 34-45.
310. Rodal, S.K., et al., *Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 961-74.
311. Wang, L.H., K.G. Rothberg, and R.G. Anderson, *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation*. J Cell Biol, 1993. **123**(5): p. 1107-17.
312. Pohl, J., A. Ring, and W. Stremmel, *Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway*. J Lipid Res, 2002. **43**(9): p. 1390-9.
313. Donaldson, J.G., N. Porat-Shliom, and L.A. Cohen, *Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling*. Cell Signal, 2009. **21**(1): p. 1-6.
314. Motley, A., et al., *Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells*. J Cell Biol, 2003. **162**(5): p. 909-18.

315. Huang, F., et al., *Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 16657-61.
316. Boucrot, E., et al., *Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10597.
317. Dikic, I., *Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1178-81.
318. Mueller, K.L., et al., *EGFR Tyrosine 845 Phosphorylation-Dependent Proliferation and Transformation of Breast Cancer Cells Require Activation of p38 MAPK*. Transl Oncol, 2012. **5**(5): p. 327-34.
319. Marks, D.L., R. Bittman, and R.E. Pagano, *Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(5): p. 819-32.
320. Singh, R.D., D.L. Marks, and R.E. Pagano, *Using fluorescent sphingolipid analogs to study intracellular lipid trafficking*. Curr Protoc Cell Biol, 2007. **Chapter 24**: p. Unit 24.1.
321. Lajoie, P. and I.R. Nabi, *Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis*. Int Rev Cell Mol Biol, 2010. **282**: p. 135-63.
322. García-Giménez, J.L., et al., *Lafora disease fibroblasts exemplify the molecular interdependence between thioredoxin 1 and the proteasome in mammalian cells*. Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 347-59.
323. Nedelsky, N.B., P.K. Todd, and J.P. Taylor, *Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(12): p. 691-9.
324. Cecarini, V., et al., *Crosstalk between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in a human cellular model of Alzheimer's disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(11): p. 1741-51.
325. Marambio, P., et al., *Glucose deprivation causes oxidative stress and stimulates aggresome formation and autophagy in cultured cardiac myocytes*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(6): p. 509-18.
326. Ding, B., et al., *Sestrin2 is induced by glucose starvation via the unfolded protein response and protects cells from non-canonical necroptotic cell death*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22538.
327. Viana, R., P. Lujan, and P. Sanz, *The laforin/malin E3-ubiquitin ligase complex ubiquitinates pyruvate kinase M1/M2*. BMC Biochem, 2015. **16**: p. 24.
328. Martínez-Zamora, A., et al., *Defective Expression of the Mitochondrial-tRNA Modifying Enzyme GTPBP3 Triggers AMPK-Mediated Adaptive Responses Involving Complex I Assembly Factors, Uncoupling Protein 2, and the Mitochondrial Pyruvate Carrier*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144273.

329. Fathinajafabadi, A., et al., *CERKL, a retinal disease gene, encodes an mRNA-binding protein that localizes in compact and untranslated mRNPs associated with microtubules*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87898.
330. Schaart, G., et al., *A modified PAS stain combined with immunofluorescence for quantitative analyses of glycogen in muscle sections*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(2): p. 161-9.
331. Wang, Y., et al., *Laforin prevents stress-induced polyglucosan body formation and Lafora disease progression in neurons*. Mol Neurobiol, 2013. **48**(1): p. 49-61.
332. Breeuwer, M. and D.S. Goldfarb, *Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins*. Cell, 1990. **60**(6): p. 999-1008.
333. Chao, F.C. and H.K. Schachman, *The isolation and characterization of a macro-molecular ribonucleoprotein from yeast*. Arch Biochem Biophys, 1956. **61**(1): p. 220-30.
334. Chao, F.C., *Dissociation of macromolecular ribonucleoprotein of yeast*. Arch Biochem Biophys, 1957. **70**(2): p. 426-31.
335. Tissieres, A., Watson, J. D., Schlessinger, D. and Hollingsworth, B. R., *Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli*. J. Mol. Biol, 1959. **1**(3): p. 221-233.
336. Sheets, M.D., et al., *Polyribosome analysis for investigating mRNA translation in Xenopus oocytes, eggs and embryos*. Methods, 2010. **51**(1): p. 152-6.
337. Gallo, J.M., et al., *The role of RNA and RNA processing in neurodegeneration*. J Neurosci, 2005. **25**(45): p. 10372-5.
338. Cassola, A., *RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes' Case*. Curr Chem Biol, 2011. **5**(2): p. 108-117.
339. Anderson, P. and N. Kedersha, *Stress granules: the Tao of RNA triage*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(3): p. 141-50.
340. Parker, R. and U. Sheth, *P bodies and the control of mRNA translation and degradation*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 635-46.
341. Kedersha, N. and P. Anderson, *Mammalian stress granules and processing bodies*. Methods Enzymol, 2007. **431**: p. 61-81.
342. Decker, C.J. and R. Parker, *P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a012286.
343. Basu, M., S.C. Courtney, and M.A. Brinton, *Arsenite-induced stress granule formation is inhibited by elevated levels of reduced glutathione in West Nile virus-infected cells*. PLoS Pathog, 2017. **13**(2): p. e1006240.

344. Kedersha, N., et al., *Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling*. J Cell Biol, 2005. **169**(6): p. 871-84.
345. Singh, S., et al., *Lafora disease E3 ubiquitin ligase malin is recruited to the processing bodies and regulates the microRNA-mediated gene silencing process via the decapping enzyme Dcp1a*. RNA Biol, 2012. **9**(12): p. 1440-9.
346. Sharova, L.V., et al., *Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells*. DNA Res, 2009. **16**(1): p. 45-58.
347. Zhou, P., *Determining protein half-lives*. Methods Mol Biol, 2004. **284**: p. 67-77.
348. Diehl, J.A., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3499-511.
349. Singh, P.K., S. Singh, and S. Ganesh, *The laforin-malin complex negatively regulates glycogen synthesis by modulating cellular glucose uptake via glucose transporters*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(3): p. 652-63.