

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



**POSIBLE PAPEL DIFERENCIAL DE LA AUTOFAGIA EN
RESPUESTA AL ESTRÉS PROTEICO EN MICROGLÍA Y
NEURONAS**

**Memoria presentada por la Lda. Helena Domínguez Martín, para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Sevilla
Sevilla, 17 de Diciembre de 2021**

ÍNDICE

ÍNDICE

.....	
INTRODUCCIÓN	- 1 -
1. CHAPERONAS.....	- 2 -
2. EL SISTEMA UBIQUITINA / PROTEASOMA	- 4 -
3. LA AUTOFAGIA	- 8 -
3.1. FORMACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA.....	- 10 -
3.2. SELECCIÓN DE CARGO	- 12 -
3.3. FORMACIÓN DEL AUTOFAGOLISOSOMA Y DEGRADACIÓN	- 13 -
4. RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS (UPR)	- 13 -
4.1. Vía de IRE1 α	- 16 -
4.2. Vía de ATF6	- 17 -
4.3. Vía de PERK	- 18 -
5. RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE EL UPS Y LA AUTOFAGIA.....	- 19 -
6. VÍAS Y PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA AUTOFAGIA.....	- 21 -
6.1. GSK-3	- 21 -
6.2. PI3K/AKT/mTOR	- 24 -
6.3. WNT/ β -CATENINA	- 29 -
6.4. FOXO3	- 31 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 34 -
1. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES	- 35 -
1.1. Línea microglial BV2	- 35 -
1.2. Línea neuronal N2a	- 35 -
2. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS	- 36 -
2.1. Cultivo mixto de microglía y astrocitos.....	- 36 -
2.2. Cultivo de neuronas	- 37 -
3. ENSAYO DE ESTIMULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES.....	- 38 -

4. ENSAYO DE TOXICIDAD EN CULTIVOS CELULARES, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	- 41 -
4.1. Fundamento	- 41 -
4.2. Procedimiento	- 42 -
5. AISLAMIENTO DE ARN Y PROTEÍNAS	- 42 -
5.1. Aislamiento de ARN.....	- 43 -
5.2. Aislamiento de proteínas totales.....	- 44 -
6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY	- 45 -
7. WESTERN BLOT (WB)	- 46 -
7.1. Fundamento	- 46 -
7.2. Procedimiento	- 47 -
8. RETROTRANSCRIPCIÓN	- 49 -
9. qPCR EN TIEMPO REAL	- 50 -
9.1. Fundamento	- 50 -
9.2. Procedimiento	- 51 -
10. INMUNOFLUORESCENCIA PARA CÉLULAS DE CULTIVO	- 53 -
10.1. Marcaje inmunofluorescente múltiple para células de cultivo.....	- 53 -
10.2. Obtención y procesamiento de imágenes mediante Microscopía Confocal.....	- 54 -
10.2.1. Cuantificación de neuronas.....	- 54 -
11. VISUALIZACIÓN DE COMPARTIMENTOS ACÍDICOS MEDIANTE NARANJA DE ACRIDINA.....	- 55 -
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 56 -
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	- 57 -
1. ANTECEDENTES	- 58 -
2. OBJETIVOS.....	- 59 -
RESULTADOS	- 61 -

1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS SISTEMAS CELULARES IMPLICADOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA PROTEOSTASIS CELULAR EN MICROGLÍA Y NEURONAS SOMETIDAS A ESTRÉS PROTEICO.....	- 62 -
1.1. Implicación de los sistemas de degradación de proteínas en la proteostasis celular.....	- 62 -
1.2. Estudio de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y de marcadores del sistema de degradación de proteínas asociado al retículo endoplásmico (ERAD)	- 65 -
1.3. Estudio de la respuesta autofágica.....	- 73 -
2. CARACTERIZACIÓN COMPARATIVA DE PROTEÍNAS/VÍAS MOLECULARES QUE PARTICIPAN EN EL MANTENIMIENTO DE LA PROTEOSTASIS EN SITUACIÓN DE ESTRÉS PROTEICO EN MICROGLÍA Y NEURONAS.....	- 83 -
2.1. mTOR	- 83 -
2.2. AKT	- 85 -
2.3. GSK-3 β	- 86 -
2.4. FOXO3	- 88 -
2.5. β -catenina.....	- 89 -
3. CONTRIBUCIÓN DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS/RUTAS EN EL MANTENIMIENTO DE LA VIABILIDAD CELULAR EN SITUACIÓN DE ESTRÉS PROTEICO	- 92 -
3.1. Estrés de retículo y UPR	- 92 -
3.2. GSK-3 β	- 96 -
3.3. β -catenina.....	- 97 -
3.4. Caseína quinasa 2.....	- 99 -
4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA IP SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE CULTIVOS PRIMARIOS DE MICROGLÍA Y NEURONAS	- 101 -
4.1. Estudio de la respuesta a la IP en cultivos primarios de microglía y neuronas	- 101 -
DISCUSIÓN.....	- 106 -
DISCUSIÓN	- 107 -
1. DIFERENTE SUSCEPTIBILIDAD AL ESTRÉS PROTEICO	- 109 -

2. MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS FRENTE AL ESTRÉS PROTEICO	- 111 -
2.1. UPR.....	- 111 -
2.2. AUTOFAGIA	- 116 -
2.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	- 121 -
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	- 130 -
CONCLUSIONES	- 131 -
CONCLUSIONS	- 132 -
SUMMARY	- 134 -
SUMMARY	- 135 -
BIBLIOGRAFÍA	- 138 -

INTRODUCCIÓN

La homeostasis proteica (proteostasis) comprende la interrelación dinámica de los procesos que dirigen la generación y localización de las proteínas funcionales. Sin embargo, existen factores fisiológicos y patológicos que pueden perjudicar el balance entre la carga proteica y su procesamiento, lo que resulta en la acumulación de proteínas mal plegadas (Almanza et al., 2019; Oakes & Papa, 2015; Schönthal, 2012). Una de las características del envejecimiento es la pérdida de la capacidad de mantener la proteostasis (E. Gavilán, Pintado, et al., 2015; M. P. Gavilán et al., 2006; Kaushik & Cuervo, 2015), y la agregación de proteínas específicas se ha caracterizado como uno de los factores clave en el origen de enfermedades neurodegenerativas, como son la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson; tanto así, que este tipo de enfermedades se engloban en el grupo de **proteinopatías** (Allegri, 2020).

Para evitar y/o reducir al mínimo la agregación de proteínas, las células poseen varios sistemas de control de calidad, que abarcan desde el momento de la síntesis hasta la degradación de las mismas. A continuación, se comentan los diferentes sistemas de control de calidad.

1. CHAPERONAS

Tras su síntesis en el ribosoma, la gran mayoría de las secuencias lineales de aminoácidos deben plegarse para adquirir la estructura tridimensional (estado nativo) que les proporciona su funcionalidad. Aunque algunas proteínas son capaces de plegarse de manera espontánea, muchas proteínas son poco eficientes y pueden tender al mal plegamiento, un problema que se ve exacerbado por la alta concentración proteica del medio celular (Y. E. Kim et al., 2013). En el caso concreto de proteínas grandes y de estructura compleja, pueden quedar expuestos al medio residuos hidrofóbicos que van a promover interacciones no nativas y la agregación (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Y. E. Kim et al., 2013).

Para contrarrestar estos problemas, existe una compleja red de varios cientos de proteínas cuyos componentes principales son las chaperonas moleculares y sus reguladores. Estas proteínas ayudan a mantener la proteostasis celular

actuando directamente sobre las proteínas mal plegadas o ayudando al proteasoma y a la autofagia para facilitar su degradación (figura 1) (Hartl et al., 2011). Para ello, las chaperonas ayudan a las proteínas a adquirir su estado nativo acelerando los pasos hacia el mismo, evitando así que se queden atrapadas en conformaciones que puedan promover su agregación. Además, no sólo actúan durante el plegamiento *de novo*, sino sobre proteínas desnaturalizadas debido a diversos tipos de estrés (Hartl et al., 2011; Y. E. Kim et al., 2013).

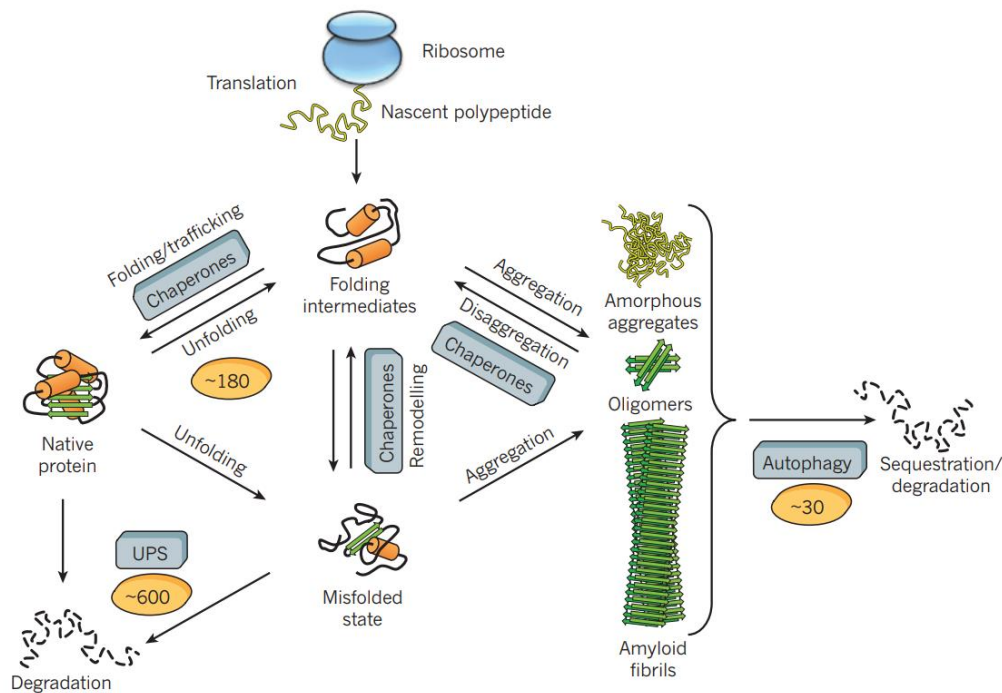


Figura 1. Destinos de las proteínas en la red de proteostasis. La red de proteostasis integra las vías de chaperonas para el plegamiento de nuevas proteínas, la remodelación de estados mal plegados y la desagregación junto a la degradación de proteínas mediada por el proteasoma y la autofagia. Aunque el primer objetivo del sistema de chaperonas es la prevención de la agregación, se ha descrito maquinaria para la desagregación de proteínas en bacterias y hongos, y se ha detectado una actividad similar en metazoos, aunque no se han identificado los componentes. Figura tomada de Hartl et al., 2011.

Por tanto, las chaperonas moleculares se definen como cualquier proteína que interacciona con otra para ayudarla a adquirir su estado nativo sin formar parte de su estructura final. Se pueden clasificar en distintos grupos atendiendo a la homología de secuencias y según su peso molecular, y muchas de ellas son proteínas asociadas a estrés, denominadas proteínas de choque térmico (Hsp por sus siglas en inglés) (Balchin et al., 2016; Y. E. Kim et al., 2013). Sin embargo,

durante el plegamiento *de novo* se pueden diferenciar dos mecanismos principales a través de los cuales participan las chaperonas del citosol. Por una parte, están aquellas que se adhieren a las cadenas recién sintetizadas (bloqueando la agregación por las regiones hidrófobas) y las liberan al medio para su plegamiento, como Hsp70; mientras que por otro lado actúan grandes complejos cilíndricos de chaperoninas que delimitan un espacio definido y diferenciado del citosol donde la proteína pueda plegarse (Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

Además, se pueden diferenciar aquellas que se unen al ribosoma cerca del sitio de salida del polipéptido, asociándose a la cadena nascente y ayudando a su plegamiento, para disociarse de la misma una vez la nueva proteína se libera del ribosoma. En el caso de las proteínas pequeñas, muchas veces este sistema es suficiente para su correcto plegamiento. En cambio, cuando la proteína es de mayor tamaño puede ser necesaria su interacción con otras chaperonas no unidas a ribosoma (Balchin et al., 2016; Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Ejemplo de este tipo de chaperonas son el sistema Hsp70 o la prefoldina, chaperonas de unión a cadena que reconocen características estructurales comunes a la mayoría de proteínas nascentes (cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos expuestos, junto al esqueleto polipeptídico accesible) (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Suelen ser proteínas dependientes de ATP (salvo la prefoldina) que tras el gasto de ATP liberan a la proteína sin plegar para que pueda hacerlo en el medio, pudiendo volver a unirse en caso de que se trate de proteínas de plegamiento lento, evitando así la agregación (Balchin et al., 2016; Hartl et al., 2011). Es en el caso de ciertas proteínas de plegamiento lento y sensibles a la agregación cuando entran en acción las chaperoninas (Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

2. EL SISTEMA UBIQUITINA / PROTEASOMA

El sistema ubiquitina / proteasoma (UPS) es un sistema de degradación de proteínas dependiente de ATP, que lleva a cabo la degradación de aproximadamente el 80% de las proteínas celulares. El UPS cumple así dos funciones principales, la destrucción de proteínas dañadas y el control de ciertas actividades biológicas mediante la degradación de proteínas clave

para las mismas. Se encuentra implicado por tanto en numerosos procesos esenciales para la célula y está regulado por una variedad de factores que permiten su correcto funcionamiento (Nandi et al., 2006; Wang & Le, 2019). Una de las maneras en que se regula este proceso es el marcaje de los sustratos para poder ser reconocidos como tal. Para ello se da el proceso de ubiquitinación, un sistema de etiquetado basado en la unión covalente de una pequeña proteína llamada ubiquitina a la proteína a degradar. Este proceso es específico y selectivo, y se da por la acción secuencial de tres enzimas: E1, E2 y E3 (figura 2). La enzima E1 activa la ubiquitina y la transporta a E2, que se va a unir a E3 cuya actividad ligasa le va a permitir unir la ubiquitina a un residuo concreto de lisina de la proteína diana. Este proceso puede repetirse, o puede darse una elongación a través de la actividad de unas enzimas específicas para esto llamadas E4 dando lugar a la poli-ubiquitinación (normalmente se requiere una cadena de al menos 4 ubiquitinas para ser reconocida por el proteasoma) (Wang & Le, 2019).

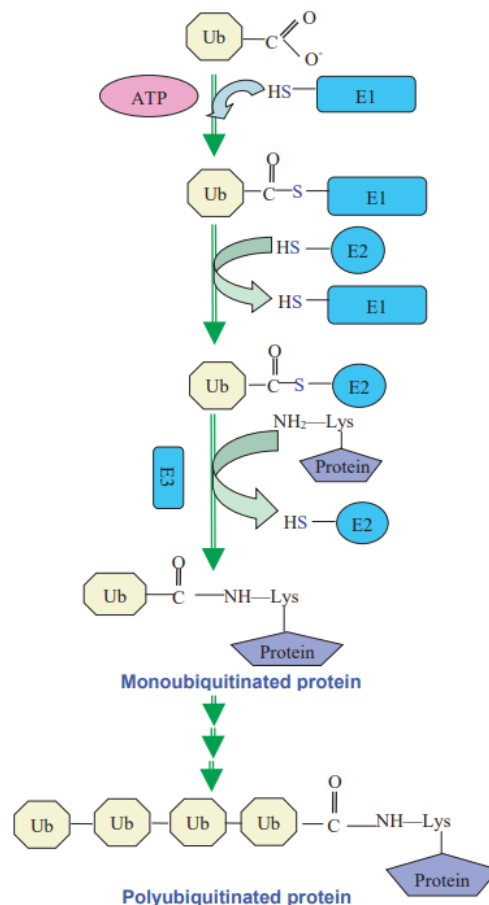


Figura 2. Vía de ubiquitinación de proteínas. La ubiquitina (Ub) se activa por E1 y se transfiere a E2, para finalmente conjugarse con la proteína sustrato a través de una ligasa E3 específica. La subsiguiente poli-ubiquitinación es necesaria para el marcaje de las proteínas para su degradación. Figura tomada de Nandi et al., 2006.

Existen multitud de tipos de estas enzimas, sobre todo de E2 y E3, lo cual permite especificidad de marcaje. Además, puesto que la unión a otra molécula de ubiquitina puede darse en 7 residuos diferentes de lisina, dependiendo del residuo concreto de lisina marcado mayoritario en la cadena, va a implicar un destino u otro para la proteína: por ejemplo, el marcaje del residuo K48 conlleva la degradación por el proteasoma, mientras que otros marcajes pueden regular eventos independientes del proteasoma como la transducción de señales (Kwon & Ciechanover, 2017; Ohtake et al., 2018). Se trata de un código muy complejo, el cual aún se desconoce en su totalidad, puesto que depende de la combinación de distintas ubiquitinaciones. Este marcaje es reversible, y el proceso de desubiquitinación es llevado a cabo por enzimas específicas denominadas desubiquitininasas.

Una vez marcadas, las proteínas van a transportarse al proteasoma, un complejo enzimático conformado por un núcleo catalítico (20S) y varios tipos de subunidades reguladoras. Las distintas combinaciones van a dar lugar a diferentes clases de proteasomas. Se encuentra tanto en el citosol como en el núcleo y cumple varias funciones, entre las que se destacan: degradación de proteínas dañadas o no necesarias, degradación de proteínas reguladoras del ciclo celular y generación de péptidos para su presentación por las moléculas HLA (Volker & Lupas, 2002).

El **proteasoma 20S** es un complejo tubular de enzimas proteolíticas que se organizan en cuatro anillos heptaméricos, los dos externos formados por subunidades α y los dos internos por subunidades β , que en eucariotas son diferentes entre sí habiendo 7 subunidades α diferentes y 7 subunidades β diferentes. De esta manera se forman 3 cámaras diferenciadas, siendo la más interna (formada por la región de unión de los anillos β) la catalítica, mientras que las dos externas aseguran que sólo entren proteínas desplegadas a la cámara catalítica (Volker & Lupas, 2002; Wang & Le, 2019).

La degradación se lleva a cabo por 3 de las subunidades β : $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$, que son las que presentan actividad proteolítica en el proteasoma maduro, hidrolizando los enlaces peptídicos de aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos respectivamente. Además, los anillos de subunidades α forman una puerta cuyo

estado normal suele ser cerrado, estando así el proteasoma inactivo (Nandi et al., 2006; Volker & Lupas, 2002).

A este núcleo catalítico se pueden unir dos complejos reguladores 19S, formando el **proteasoma 26S** (figura 3), confiriéndole así especificidad de sustrato. Esto es así debido a que el complejo 19S, el cual incluye dos dominios denominados base y tapadera, contiene sitios de unión para sustratos ubiquitinados, no ubiquitinados, y para diversas enzimas que van a participar en el reciclaje de las cadenas de ubiquitina (base); y por otro lado, proteínas con actividad ATPasa encargadas de desplegar a las proteínas que van a ser degradadas (necesario por el estrecho tamaño de poro del proteasoma) y de la apertura de las puertas de la cámara catalítica (Jung et al., 2009).

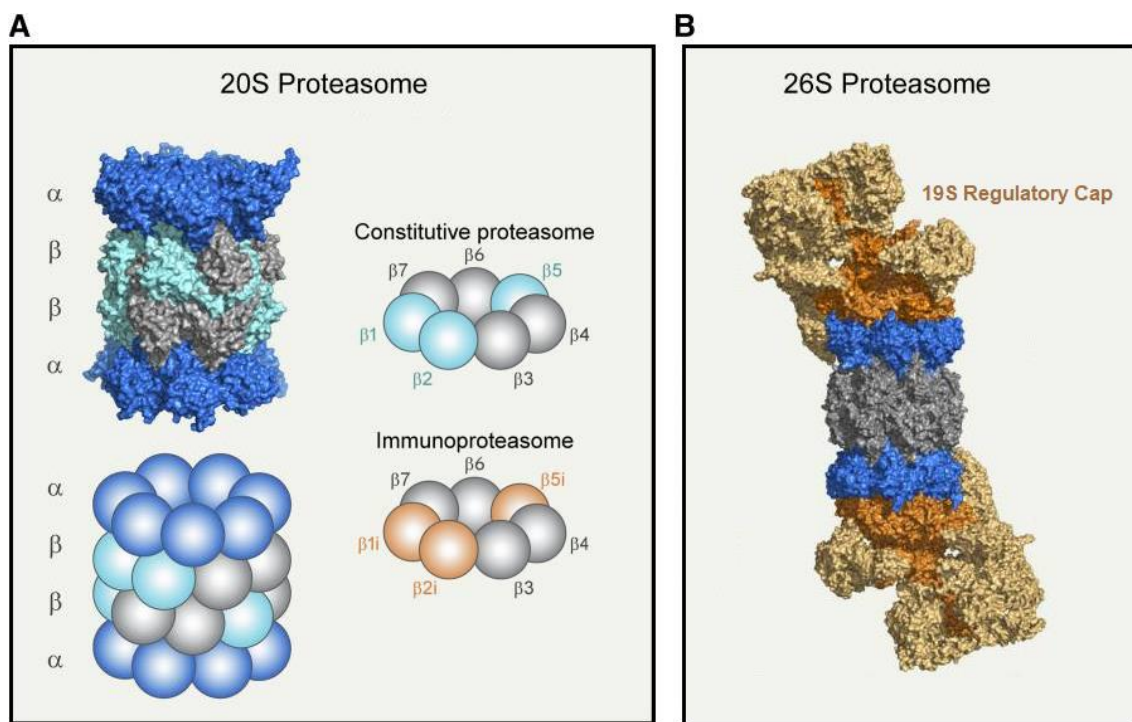


Figura 3. Estructura del proteasoma. **A** Estructuras (PDB 4r3o) y representación en dibujo del proteasoma 20S, destacando las diferentes combinaciones de subunidades β discutidas en el texto. **B** Estructura del proteasoma 26S (PDB 5gjr), con el proteasoma 20S en gris y azul y los complejos reguladores 19S en naranja oscuro (ATPasas) y naranja claro (subunidades no ATPasas). PDB, Protein Data Bank. Figura modificada de Thibaudeau & Smith, 2019.

En presencia de señales pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa o el interferón gamma, se puede generar un nuevo tipo de proteasoma denominado **immunoproteasoma**, donde cambia la partícula reguladora (pasa a ser la 11S) y el complejo 20S se forma *de novo* para incluir las subunidades

catálíticas inducibles en lugar de las constitutivas ($\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$). Este cambio va a provocar un aumento en la producción de péptidos con mayor afinidad por las proteínas del HLA-I (Kloetzel, 2001).

3. LA AUTOFAGIA

Como se ha comentado anteriormente el UPS se encarga de degradar principalmente a las proteínas solubles de vida-media corta, mientras que la mayor parte de los componentes celulares tienen una vida-media larga. Como alternativa a este sistema, existe un mecanismo de reciclaje de los orgánulos celulares, y de macromoléculas agregadas o modificadas, como hemos puesto de manifiesto recientemente para el caso de los productos finales de glucosilación avanzada (AGES) (Aragonès et al., 2020) permitiendo así la adaptación y supervivencia celular en presencia de condiciones adversas (Ravanan et al., 2017). Este mecanismo se conoce como autofagia, y se trata de un proceso catabólico que opera de manera constitutiva en la célula en condiciones normales, permitiendo el reciclaje de elementos intracelulares y la regulación metabólica (Ravanan et al., 2017; Yim & Mizushima, 2020).

La autofagia puede activarse en respuesta a diferentes estímulos tanto metabólicos, como la falta de nutrientes, o un bajo estado energético señalado por una disminución de la razón ATP/AMP. Además de estos estímulos clásicos, cada día existe más información sobre nuevos agentes y mecanismos que dan lugar a la activación de la autofagia, tanto en condiciones normales como patológicas, que en última instancia pueden estar condicionados por un estrés metabólico y/o energético. Generalmente, la activación de la autofagia provoca cambios en el metabolismo celular que promueven la adaptación a las condiciones adversas, o pueden llegar incluso a promover la muerte celular por autofagia, aunque este tipo de mecanismo de muerte celular no está aceptado de manera definitiva (Ravanan et al., 2017).

Se conocen tres formas principales de autofagia (figura 4), que se diferencian en la manera en que el cargo llega al lisosoma: **microautofagia**, **autofagia mediada por chaperonas** (CMA), y **macroautofagia** (Yim & Mizushima, 2020).

La **microautofagia** consiste en la invaginación de la membrana del lisosoma para captar directamente parte del contenido celular (Mizushima et al., 2008), un proceso cuya regulación no es aún bien conocida (Mijaljica et al., 2011).

La **CMA** implica la degradación de proteínas citosólicas solubles que contienen una secuencia consenso *KFERQ*. Este proceso no implica ni procesos de invaginación, ni de formación de estructuras de doble membrana (Kaushik & Cuervo, 2008). La secuencia consenso en la proteína a degradar es reconocida por la chaperona HSC70, que transporta el cargo hasta la membrana del lisosoma, donde el receptor de membrana LAMP-2A lo transporta al lumen lisosomal para ser degradado (Cuervo & Wong, 2014). Como vemos, mediante en estos dos tipos de autofagia el único orgánulo que participa de es el lisosoma.

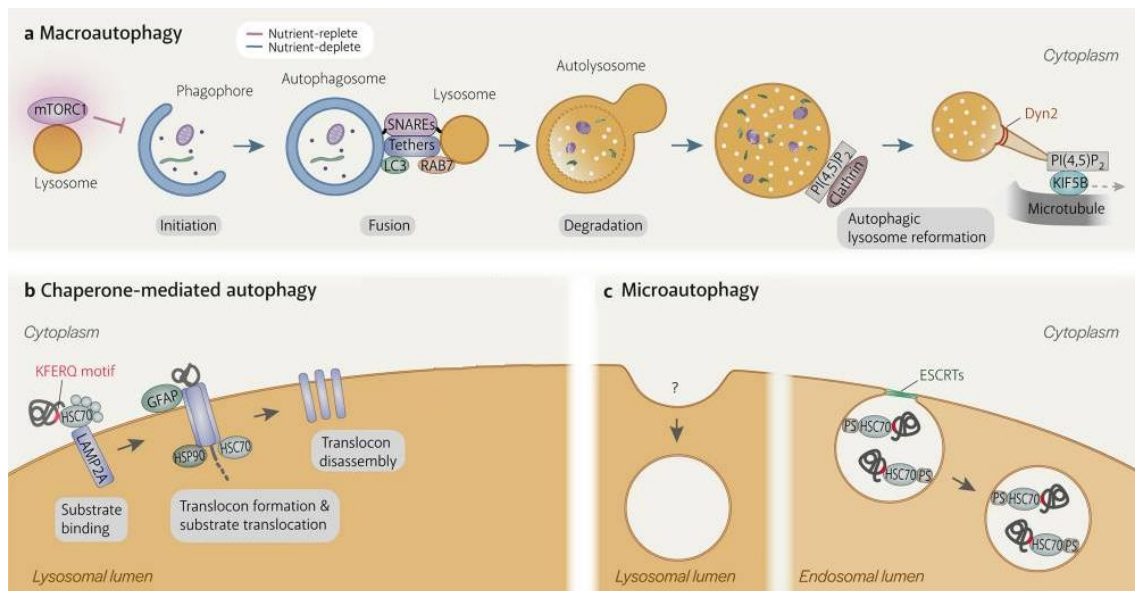


Figura 4. Procesos autofágicos. **a Macroautofagia**, el único que implica otro orgánulo (el autofagosoma), se induce cuando mTORC1 se inactiva debido a su disociación del lisosoma. Tras la maduración del fagóforo, el lisosoma se fusiona con la membrana externa del autofagosoma de manera dependiente de SNAREs, siendo facilitada por factores de unión como LC3. Las enzimas lisosomales degradan la membrana interna del autofagosoma y el material secuestrado. Finalmente, el autolisosoma se une a la red de microtúbulos, siendo transportado para su posterior transformación en nuevos lisosomas. **b Autofagia mediada por chaperonas (CMA)**, implica la traslocación de la proteína al interior del lisosoma mediante el complejo LAMP2A, siendo necesaria la presencia de una secuencia consenso en la proteína a degradar, que es identificada por la chaperona HSC70. **c Microautofagia**, se trata de la toma de material citosólico mediante la invaginación de la membrana lisosomal. El proceso a través del cual se da en lisosomas es aún ampliamente desconocido, a diferencia de lo que ocurre en los endosomas. En estos últimos se sabe que la chaperona HSC70 reconoce ciertos motivos en los sustratos, llevándolos al endosoma donde HSC70 se une a la fosfatidilserina. La deformación de la membrana y escisión de la vesícula se ejecuta por la maquinaria ESCRT. Figura modificada de Yim & Mizushima, 2020.

La **macroautofagia** (de ahora en adelante autofagia), representa el tipo más relevante de autofagia y comienza con la expansión de una membrana alrededor de material citoplásmico, esta membrana se denomina fagóforo y se va expandiendo hasta conformar una esfera con una única abertura. Una vez esta abertura se sella, pasa a denominarse autofagosoma, originando el autolisosoma o autofagolisosoma. De esta forma entran las hidrolasas ácidas al interior del autofagosoma, degradando tanto la membrana interna del mismo como el material que se había incluido previamente en su interior. (Ravanan et al., 2017; Yim & Mizushima, 2020). El mayor tamaño del autofagosoma (0.5-2µm) permite la degradación de materiales demasiado grandes para los otros procesos autofágicos, como son los agregados de proteína, el RE, mitocondrias, lisosomas dañados, peroxisomas, proteasomas, fagosomas o bacterias (Yim & Mizushima, 2020).

Dentro de este proceso podemos diferenciar varias etapas: **i)** formación del autofagosoma, **ii)** selección del cargo, **iii)** formación del autofagolisosoma; y **iv)** degradación del contenido. Todos estos pasos son importantes y los fallos en cualquiera de ellos pueden afectar al proceso completo (Ravanan et al., 2017).

3.1. FORMACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA

Como ya hemos comentado previamente, este proceso comienza con la expansión de una doble membrana lipídica para formar el autofagosoma. Esta etapa se puede subdividir en otras tres subetapas: iniciación, nucleación y elongación (Ravanan et al., 2017; Yim & Mizushima, 2020).

Para la etapa de **iniciación** se han propuesto diferentes orígenes para la membrana del fagóforo, aunque se observa una fuerte conexión con la membrana del RE llamado omegasoma, a partir del cual nuclearía (Biazik et al., 2015). Resulta esencial en esta etapa el estado de los complejos mTOR, se trata de dos complejos formados por subunidades diferentes pero que presentan en ambos casos la quinasa mTOR; en concreto, la autofagia se suele activar cuando el complejo mTORC1 se encuentra inhibido, lo cual suele ocurrir en condiciones de inanición celular (Ravanan et al., 2017; Villar & Durán, 2017; Yim & Mizushima, 2020). En condiciones normales mTORC1 se encuentra unido al lisosoma donde

Rheb lo activa, permitiendo así la fosforilación de ULK1 y Atg13 a través de RAPTOR (siendo todas estas subunidades del complejo mTORC1). De esta forma se produce una cascada de fosforilaciones que promueven la supervivencia y proliferación celular, al tiempo que se inhibe el complejo de activación de la autofagia y la traslocación al núcleo del factor de transcripción TEFB (Yim & Mizushima, 2020). En condiciones de inanición mTORC1 se inhibe, separándose del lisosoma y permitiendo la separación y activación del complejo ULK1 que va a iniciar la formación del autofagosoma. El complejo ULK1 activado lidera la formación del fagóforo, una estructura en forma de copa que va a dar lugar al autofagosoma (Ravanan et al., 2017).

Durante la **nucleación** resulta esencial la actividad del complejo VPS34-Beclina1, el cual genera fosfoinositol 3 fosfato (PI3P) mediante la fosforilación del fosfatidil inositol (PI), lo que va a permitir la nucleación y crecimiento del fagóforo. En este sentido el omegasoma representa un subdominio de la membrana del RE enriquecido en PI3P, lo que lo convierte también en un lugar potencial para que se produzca dicho evento (Axe et al., 2008).

El mecanismo de **elongación** se lleva a cabo mediante dos sistemas de conjugación similares a ubiquitina: el sistema de conjugación Atg5-Atg12 y el sistema LC3-PE. El sistema Atg5-Atg12 incluye otros miembros como Atg7 (similar a E1), Atg10 (similar a E2) y Atg16L1, dando lugar a complejos triméricos o multiméricos que promueven, entre otras cosas, la curvatura correcta del fagóforo y la lipidación de LC3 (Ravanan et al., 2017). El sistema LC3-PE también presenta otras subunidades como Atg4B (una proteasa de cisteína), Atg7 y Atg3 (similar a E2), formando el conjugado LC3B-I-PE se encarga de la elongación y sellado del fagóforo, dando lugar a la estructura de doble membrana que llamamos autofagosoma. Entonces se recluta el LC3B-II (se trata de LC3B-I conjugado con fosfatidiletanolamina) a las superficies internas y externas del autofagosoma a través de Atg5-Atg12 (Ravanan et al., 2017; Yim & Mizushima, 2020). Una vez allí, LC3B-II permanece hasta la fusión con el lisosoma, degradándose el que se encuentra en la cara interna y liberándose el de la cara externa. Aunque en la formación del autofagosoma LC3 no parece tener

un papel esencial, su ausencia afecta al tamaño, la eficiencia de formación y su fusión con el lisosoma (Yim & Mizushima, 2020).

3.2. SELECCIÓN DE CARGO

Aunque la autofagia es un proceso de degradación indiscriminado, en los últimos años se han encontrado evidencias de que existe autofagia selectiva, capaz de discriminar el sustrato a degradar. Actualmente se conocen varias proteínas que actúan como receptores de cargo específico, sin embargo, el más conocido es p62/SQSTM1 (p62 de ahora en adelante), un receptor capaz de oligomerizar y unirse, por un lado, a proteínas ubiquitinadas (dominio UBA), y por otro lado a LC3 (dominio LIR) (Lamark et al., 2017; Ramanan et al., 2017). Esta autofagia selectiva está altamente regulada, induciéndose de manera local en los sitios donde se acumulan los cargos seleccionados. Cuando estos cargos no están presentes la mayor parte de los receptores se degradan a través de la propia autofagia, además de mantenerse en un estado inactivo para impedir su agregación con otros materiales (Lamark et al., 2017). En el caso de p62 no sólo se aumenta su transcripción y pasa a un estado activado cuando se activa la autofagia selectiva, sino que se han descrito distintas modificaciones postraduccionales que afectan a su afinidad y habilidad de co-agregar con el cargo o de interaccionar con el fagóforo. Ejemplo de ello son los distintos sitios de fosforilación en esta proteína que promueven la degradación específica de agregados proteicos de alto peso molecular (Lamark et al., 2017; Lim et al., 2015; Matsumoto et al., 2011). La proteína p62 presenta una serie de residuos fosforilables a lo largo de su secuencia, de entre los cuales podemos destacar Ser405, que se encuentra en el dominio UBA. Esta fosforilación se da en respuesta a un estrés proteotóxico, y aumenta la afinidad del dominio UBA por las cadenas poli-ubiquitinadas. Resulta también interesante la fosforilación de Ser349, que aumenta la afinidad de p62 por KEAP1 secuestrándolo. De esta forma se induce la transcripción de genes de la respuesta oxidativa como *sqstm1*, aumentando así la cantidad de p62 disponible para la autofagia selectiva (Lim et al., 2015; Matsumoto et al., 2011).

3.3. FORMACIÓN DEL AUTOFAGOLISOSOMA Y DEGRADACIÓN

Para poder cumplir su función degradativa, el autofagosoma debe adquirir enzimas degradativas. Para ello, el autofagosoma puede fusionarse con endosomas tempranos y tardíos, formando un anfisoma que posteriormente se fusionará con el lisosoma dando lugar al autofagolisosoma; o, de manera alternativa, puede fusionarse directamente con el lisosoma (Ravanan et al., 2017; Yim & Mizushima, 2020). Este proceso requiere de la superación de una barrera de energía, lo cual se consigue mediante la implicación de complejos de proteínas SNARE que, al estar presentes en las dos membranas, van a facilitar la fusión de las mismas. Una vez que esto sucede, se liberan las enzimas degradativas en el interior del autofagolisosoma y se produce la degradación del cargo (Yim & Mizushima, 2020).

4. RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS (UPR)

Las proteínas mal plegadas se detectan mediante vías de respuesta al estrés, entre las que se incluyen la respuesta a choque térmico citoplasmática y la UPR originada tanto en la mitocondria como en el retículo endoplasmático (RE). La activación de estas vías conduce al alivio de la carga proteica para su plegamiento y a la resolución del estrés proteotóxico (García-González et al., 2018). En este contexto, el RE llega a controlar hasta un tercio de la carga proteica de la célula, dirigiendo su plegamiento, procesamiento y transporte. Se trata del orgánulo encargado de la síntesis y maduración de proteínas de membrana y de secreción, es por ello que se convierte en un foco de proteínas mal plegadas, dando lugar a un tipo de estrés específico, conocido como **estrés de RE** (García-González et al., 2018; Oakes & Papa, 2015).

Debido a lo anteriormente dicho, es entendible que en este orgánulo se haya desarrollado una compleja respuesta altamente conservada frente a la acumulación de proteínas mal plegadas. A través principalmente de la chaperona GRP78/BiP del RE, se da lugar a la activación coordinada de los tres sensores transmembrana que median la respuesta clásica de la UPR. Estos son: la enzima dependiente de inositol 1α (**IRE1 α**); el factor activador de la

transcripción 6 (**ATF6**); y la quinasa del retículo endoplasmático similar a PKR (**PERK**) (García-González et al., 2018; S. Huang et al., 2019). Esta activación coordinada permite la regulación de la proteostasis en el RE, disminuyendo el estrés de retículo a través de la inhibición de la maquinaria celular de traducción proteica, al tiempo que se promueve la transcripción de programas de expresión génica que aumentan la capacidad de plegamiento proteico del RE y se eliminan las proteínas mal plegadas irreversibles a través de la degradación asociada al RE (ERAD) (Almanza et al., 2019; S. Huang et al., 2019). En los casos en que el estrés de RE se vea prolongado en el tiempo o resulte demasiado severo, la sobre activación de la UPR da lugar a la activación de programas de muerte celular, puesto que la proteostasis no se puede restablecer (S. Huang et al., 2019). Sin embargo, no está aún muy claro, cómo se determina a nivel molecular la dicotomía entre supervivencia y apoptosis por parte de la UPR.

Como hemos visto, esta respuesta se divide en tres vías (figura 5) que, sin embargo, se encuentran interconectadas, algo en lo que haremos hincapié más adelante. A continuación, se describe de manera concisa el funcionamiento de estas vías.

En primer lugar, debemos describir el papel fundamental de GRP78, la cual además de su función de unión a calcio y de procesamiento de proteínas, como ya hemos adelantado tiene un rol clave como iniciadora de la señalización temprana del estrés de RE y de la UPR (Kopp et al., 2019, Schönthal, 2012). Originalmente se caracterizó como una proteína regulada por glucosa, de manera que la restricción de la misma resulta en la estimulación de la transcripción y traducción de GRP78. Posteriormente, numerosos estudios establecieron que se trata de una gran variedad de alteraciones celulares y microambientales las que provocan el aumento de expresión de GRP78, así como un empeoramiento del estrés de RE (Schönthal, 2012).

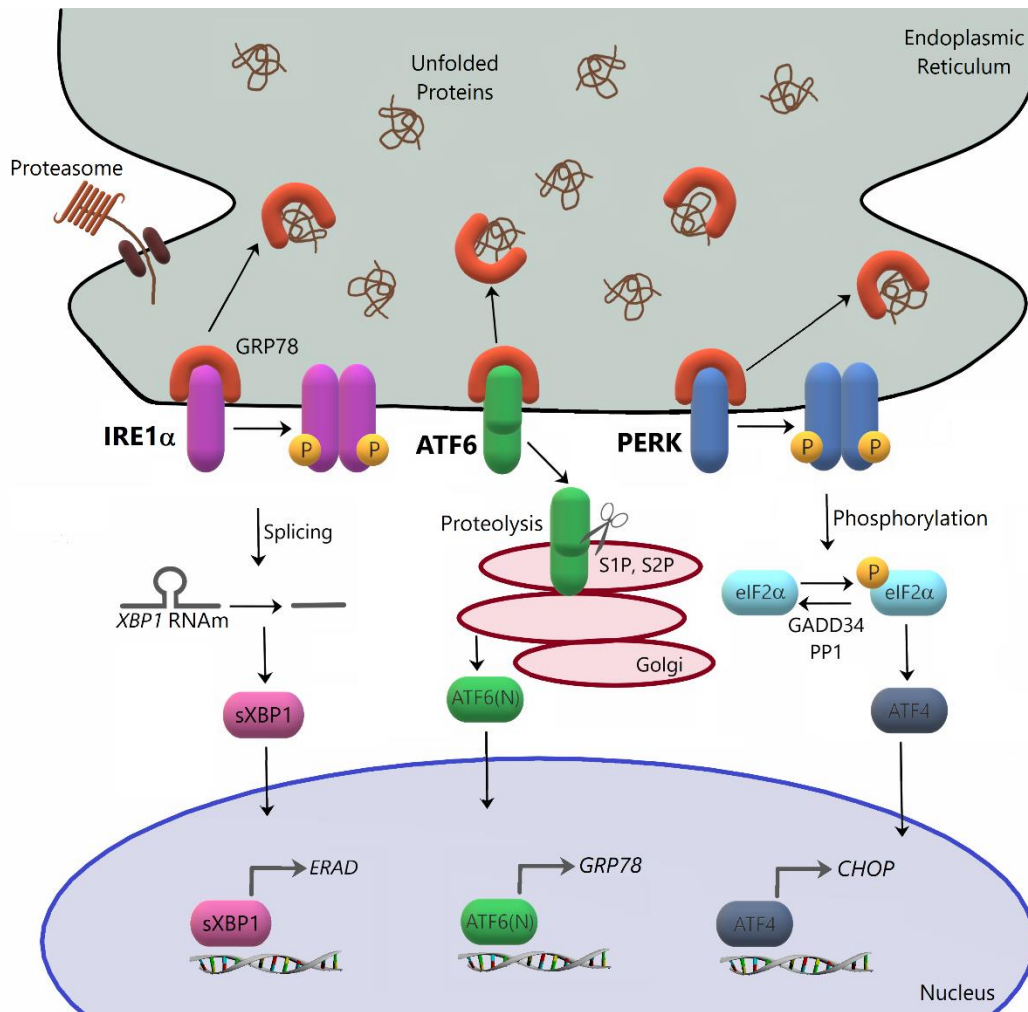


Figura 5. Rutas simplificadas de la UPR. La acumulación de proteínas mal plegadas activa 3 sensores presentes en el RE, dando lugar a las 3 vías de la UPR: **IRE1 α** que cataliza el splicing no canónico del ARN mensajero de *xbp1*, resultando en la proteína (sXBP1) que se trasloca al núcleo y controla la transcripción de, entre otros, los componentes del ERAD. **ATF6** que se activa mediante la proteólisis secuencial mediada por S1P y S2P en el aparato de Golgi. El ATF6 activado (ATF6(N)) funciona como un factor de transcripción e induce la expresión de varias chaperonas entre las que se encuentra GRP78. **PERK** que fosforila al factor de iniciación eucariótico 2 α (eIF2 α), bloqueando transitoriamente la síntesis general de proteínas y permitiendo la traducción del factor de transcripción ATF4. Este se trasloca al núcleo e induce la transcripción de varios genes implicados en el control de calidad del RE entre los cuales se encuentra el factor de transcripción pro-apoptótico CHOP.

De hecho, el aumento de la expresión de GRP78 se ha convertido en uno de los principales marcadores de la presencia del estrés de RE (Kopp et al., 2019, Kania et al., 2015).

Pertenciente a la familia de proteínas de choque térmico 70 (HSP70), se trata de una chaperona que, tradicionalmente se ha descrito en el RE pero recientemente se ha observado su presencia en otros compartimentos celulares como son el citosol, la mitocondria o el núcleo (Schönthal, 2012). En células no

estresadas, una fracción de GRP78 del lumen del RE se encuentra unida a los 3 sensores transmembrana mediadores de la UPR, manteniéndolos en un estado inactivo. Una vez se acumulan las proteínas mal plegadas, GRP78 se une a las mismas para cumplir su función de chaperona, de manera que quedan libres los dominios del lumen de estos sensores transmembrana, dando lugar a que se activen las tres vías de la UPR (Almanza et al., 2019; Kopp et al., 2019). A raíz de esta activación, una de las consecuencias es el aumento de expresión de GRP78 lo que no sólo va a ayudar al plegamiento de las proteínas, sino que sirve de retroalimentación negativa para poder volver a la inactivación de la UPR una vez se ha restablecido la homeostasis (Schönthal, 2012).

4.1. Vía de IRE1 α

IRE1 α representa el sensor de UPR más antiguo y conservado durante la evolución, el cual se identificó en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Al ser una proteína transmembrana de tipo I, presenta un dominio N-terminal en el lumen del RE que puede percibir el estado en que se encuentra el plegamiento de las proteínas, mientras que su dominio C-terminal efector se encuentra en el citoplasma, el cual posee tanto actividad proteína-quinasa serina/treonina como actividad endoribonucleasa (RNasa) (Schönthal, 2012). El genoma de mamíferos presenta dos isoformas de IRE1, IRE1 α e IRE1 β , siendo la primera la que se expresa de manera más abundante y ubicua. En presencia de estrés de RE, IRE1 α se activa mediante dimerización u oligomerización y se autofosforila, lo cual da lugar a la activación alostérica de su dominio RNasa (Schönthal, 2012; Tsuru et al., 2016). De esta forma, IRE1 α cataliza el *splicing* no convencional (citósólico) del mRNA que codifica para la proteína de unión a X-box 1 (XBP1), eliminando un intrón que contiene un codón de parada de la traducción. La posterior ligación por una RNA ligasa provoca que se genere una forma *spliceada* (procesada) del mRNA de Xbp1 (sXbp1) que codifica para una proteína más estable, de mayor tamaño y transcripcionalmente activa, la cual activa la expresión general de mediadores de la UPR como son chaperonas, componentes del ERAD y moléculas implicadas en la biogénesis del RE (Schönthal, 2012; Tsuru et al., 2016; Waldherr et al., 2019).

Además de esta función, la actividad RNAsa de IRE1 α cataliza la degradación de una gran cantidad de mRNAs y algunos pre-miRNAs. A este proceso se le llama deterioro regulado dependiente de IRE1 (RIDD) (Schönthal, 2012; Tsuru et al., 2016). Por otro lado, se sabe que IRE1 α es capaz de formar complejos de alto orden en la membrana del RE, pudiendo interactuar con una gran cantidad de proteínas, entre las que destacamos el factor asociado a TNFR 2 (TRAF2), con lo que se activa una señalización en cascada que da lugar a la activación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), que a su vez es capaz de inhibir a algunos miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2, al tiempo que activa proteínas pro-apoptóticas. En conjunto, estos dos sucesos van a dar lugar a la oligomerización de Bax y Bak, dando comienzo al proceso de apoptosis (Almanza et al., 2019; Schönthal, 2012; Tsuru et al., 2016).

4.2. Vía de ATF6

ATF6 presenta un motivo de cremallera de leucina básico (bZIP) y propiedades típicas de un factor de transcripción. Cuando GRP78 lo libera, se revelan unas secuencias de localización del Golgi, por lo que se produce su traslocación al aparato de Golgi (Almanza et al., 2019; Schönthal, 2012). Allí ATF6 se escinde mediante la proteasa residente en el Golgi de sitio 1 (S1P) que actúa a nivel de serina eliminando el dominio luminal del RE y, posteriormente se escinde mediante la proteasa de sitio 2 (S2P), la cual es una metaloproteasa que libera finalmente el factor de transcripción bZIP (pATF6) al citosol desde la membrana del Golgi (Schönthal, 2012). Una vez pATF6 llega al núcleo, activa la transcripción de numerosos programas genéticos, promoviendo el plegamiento y secreción de las proteínas y la ERAD, ayudando así a la eliminación del estrés del RE. Entre los genes cuya expresión activa ATF6 se encuentran GRP78 y GRP94 (otra chaperona de la familia de HSP70), XBP1 y CHOP (Almanza et al., 2019; Schönthal, 2012).

Aunque existen otros factores de transcripción de tipo bZIP activados de manera similar a ATF6, este se encuentra de manera generalizada en todos los tipos celulares a diferencia del resto, lo que hace pensar que la presencia de otros

factores responde a una necesidad de especificidad de tejido (Schönthal, 2012).

4.3. Vía de PERK

Al igual que en el caso de IRE1, la activación de PERK tras su liberación por parte de GRP78 implica su homodimerización y autofosforilación, tras lo cual es capaz de fosforilar a su sustrato principal, el factor de iniciación eucariótico 2 alfa (eIF2 α) (Schönthal, 2012). Esta fosforilación implica su inactivación, con lo cual se atenúa la síntesis global de proteínas, disminuyendo así la carga proteica del RE y permitiendo una mejor resolución del estrés citotóxico al que se encuentra sometido. Además, el hecho de que eIF2 α se encuentre fosforilado varía la eficiencia del codón de iniciación AUG, lo que permite que se transcriban de manera preferente una serie de pequeños mRNAs, entre los que se encuentra el del factor de transcripción 4 (ATF4), el cual estimula ciertos genes promotores de la recuperación y adaptación celular (Almanza et al., 2019; Bergmann & Molinari, 2018; Schönthal, 2012). Por otro lado, ATF4 también activa la expresión de la proteína homóloga a C/EBP (CHOP), una proteína pro-apoptótica cuyos niveles de expresión suelen ser casi inexistentes en condiciones normales. Sin embargo, cuando los niveles de estrés de RE son muy altos o mantenidos en el tiempo se ve estimulada su expresión, preparando su actuación para cuando este estrés resulte imposible de resolver (Almanza et al., 2019; Oakes & Papa, 2015; Schönthal, 2012). Es en ese momento en que CHOP promueve la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bim y reprime a otras anti-apoptóticas como Bcl-2. Por otra parte, CHOP activa a la proteína inducible por arresto del crecimiento y daño del ADN 34 (GADD34), la cual promueve la defosforilación de eIF2 α contribuyendo a la vuelta a la normalidad de los niveles generales de expresión de proteínas (Almanza et al., 2019; Oakes & Papa, 2015; Schönthal, 2012).

Además, una activación demasiado temprana de CHOP puede provocar que eIF2 α no esté fosforilado durante suficiente tiempo (por su efecto sobre GADD34), con lo que lo que en principio sería una función de vuelta a la normalidad, se convierte en un factor más de sobrecarga del RE, pudiendo

abocar a la apoptosis por estrés de RE (Almanza et al., 2019; Oakes & Papa, 2015; Schönthal, 2012).

Además de eIF2 α , PERK fosforila a otros sustratos, entre los que destaca el factor nuclear relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). Nrf2 es capaz de activar la transcripción de genes que van a proteger a la célula de un estrés oxidativo relacionado con la acumulación de proteínas mal plegadas y, por tanto, de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto sucede a través de la expresión de proteínas antioxidantes y enzimas detoxificadoras (Almanza et al., 2019; Schönthal, 2012).

Como hemos visto, las tres vías tienen un carácter dual pro-supervivencia / pro-apoptosis, y, aunque generalmente se asocia la vía de IRE1 α con la supervivencia y la vía de PERK con la apoptosis, en realidad los numerosos estudios realizados en este sentido apuntan a un equilibrio de señales. Este equilibrio tiene que ver con el tipo de estrés al que se ve sometida la célula, la duración en el tiempo del estrés, con la cinética de activación de las distintas vías y con la interacción con otros procesos celulares, especialmente con la autofagia (Bergmann & Molinari, 2018; DuRose et al., 2006; Waldherr et al., 2019). Es por ello de suma importancia entender estos procesos en un contexto general de multitud de situaciones interrelacionadas, que van a matizar los efectos que pueda tener la activación de una vía en concreto.

5. RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE EL UPS Y LA AUTOFAGIA

Durante mucho tiempo se pensó que el UPS y la autofagia eran procesos independientes, encargándose cada uno de la degradación de distintos tipos de proteínas. Sin embargo, el hecho de que el marcaje con ubiquitina sirva también como señal para la degradación vía autofagia sugirió la idea de la relación complementaria existente entre ambos procesos (Pohl & Dikic, 2019; Wang & Le, 2019). Además, trabajos de nuestro grupo y de otros grupos de investigación demuestran que la autofagia se ve aumentada en presencia del bloqueo del proteasoma tanto *in vitro* como *in vivo* (E. Gavilán et al., 2013; E. Gavilán, Giráldez, et al., 2015; E. Gavilán, Pintado, et al., 2015), lo que sugiere

que se trata de un mecanismo compensatorio, ya que la sobreestimulación de la autofagia mediante rapamicina protege de la muerte celular causada por este bloqueo tanto en modelos celulares como en ratones (Wang & Le, 2019).

No existe consenso, sin embargo, en el mecanismo subyacente a esta coordinación, habiendo diferentes hipótesis propuestas. Una de ellas es que al fallar el proteasoma, se activa la UPR a causa del estrés de RE que se genera debido a la acumulación de proteínas que no se están degradando (M. P. Gavilán, Pintado, et al., 2009). Esta activación conlleva la transcripción de varios genes relacionados con el plegamiento y degradación de proteínas, pudiendo de esta forma activarse la autofagia (Pohl & Dikic, 2019; Wang & Le, 2019). La forma en que se activan las vías de la UPR depende del tipo celular y de la forma de estrés concreto, por lo que los estudios apuntan a varias formas en que se llevaría a cabo la activación de la autofagia. Aunque existen datos que implican a las tres vías, son principalmente las vías de PERK e IRE1 α las más relevantes. En este sentido, la vía de PERK, a través de sus diferentes componentes promueve la transcripción de genes relacionados con la autofagia, como *lc3* y *atg12*, a través de ATF4, o *atg5*, a través de CHOP, así como la formación de autofagosomas dependiente de la fosforilación de eIF2 α (B'chir et al., 2013; Kouroku et al., 2007; Rouschop & Wouters, 2009; Rzymiski et al., 2010) Igualmente, la activación de la autofagia a través de la vía IRE1 α -TRAF2-JNK ha sido demostrada (Kouroku et al., 2007; Ron & Hubbard, 2008). La prevalencia de una u otra vía o la acción concertada de ambas es posible que dependan del contexto celular concreto (Wang & Le, 2019).

Entre los factores que pueden mediar la coordinación funcional entre ambos sistemas de control de calidad de las proteínas se encuentran las llamadas proteínas adaptadoras como p62, HDAC6 (*histone deacetylase 6*), NBR1 (*neighbour of BRCA1 gene*), NDP52 (*nuclear dot protein 52*), OPTN (*optineurin*), p97/VCP (*valosin-containing protein*), Alfy (*autophagy-linked FYVE protein*) y BAG (*Bcl-2-associated athanogene*) (Cecarini et al., 2016). Todas ellas actúan de manera directa o indirecta como nexos de unión entre ambos sistemas de degradación de proteínas poniendo en contacto el material a degradar y el sistema de degradación. En este sentido destacamos el papel del receptor p62, que se une preferentemente a sustratos ubiquitinados en el residuo K63 y también en K48 y es capaz de unirse por un lado al proteasoma a través de su

dominio PB1 o a la membrana autofágica a través de LC3 mediante la interacción de su dominio LIR. Los datos existentes indican que lo que parece determinar la vía degradativa a seguir es el estado que adquiera este receptor, pudiendo formar dímeros que van a procesarse por el proteasoma, u oligómeros que se degradarán por la vía autofágica (Pohl & Dikic, 2019). De esta manera, un bloqueo del proteasoma provocaría la acumulación de proteínas ubiquitinadas, dando lugar a la oligomerización de p62 unido a las mismas y, por tanto, a su degradación por la autofagia.

Por otro lado, recientemente se ha demostrado que además de ser la responsable del cargo del autofagosoma, p62 forma estructuras citosólicas esféricas en estado de gel que se desplazan por el citosol, pudiendo fusionarse con estructuras similares y que sirven como plataforma para la formación de autofagosomas (Kageyama et al., 2021).

Por lo tanto, todos estos resultados indican que p62 desempeña un papel clave en la relación funcional entre ambos sistemas de degradación de proteínas.

6. VÍAS Y PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA AUTOFAGIA

Como ya hemos visto, el estrés de RE resulta uno de los factores clave en el origen de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento. Para paliar este estrés, se activan las vías ya comentadas de respuesta al mismo (UPR y autofagia principalmente) (Almanza et al., 2019; Ravanan et al., 2017). Implicadas en la activación o inhibición e interconexión de estas vías, existen varias proteínas que, debido a la complejidad de su señalización y al efecto que tienen en la respuesta celular a este fenómeno, hemos decidido incluir un apartado específico para explicar concisamente cada una de ellas.

6.1. GSK-3

GSK-3 (quinasa 3 de la glucógeno sintasa) es probablemente la quinasa más compleja y con más sustratos presente en las células. En base a cálculos

teóricos, se estima que esta proteína podría tener más de 500 sustratos, aunque en realidad no son más de 100 los que han sido realmente identificados (Beurel et al., 2015; Linding et al., 2007). No fue hasta el descubrimiento de su relación con la fosforilación de la proteína tau (implicada en la enfermedad de Alzheimer) y su inhibición por litio que atrajo realmente la atención de investigadores y compañías farmacéuticas (Beurel et al., 2015; Hernandez et al., 2012).

A raíz de estos descubrimientos se ha avanzado en el conocimiento del funcionamiento de esta quinasa, cuyas numerosas acciones en el metabolismo celular han hecho que se la considere un interesante objetivo terapéutico para multitud de enfermedades (Beurel et al., 2015; Jope & Johnson, 2004). Y aunque se ha demostrado que la inhibición con litio representa una forma segura de tratar el trastorno bipolar (Beurel et al., 2015; Hernandez et al., 2012), lo cierto es que su implicación central en tantas vías de señalización y procesos celulares hacen necesario un conocimiento profundo de su modo de actuación concreto en cada uno de ellos y los posibles efectos secundarios en el resto de procesos.

Ampliamente extendida en los eucariotas, en mamíferos GSK-3 está muy relacionada con las quinasas de las familias CDK (quinasas dirigidas por ciclinas) y MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos). Sin embargo, a diferencia de ellas presenta una fuerte actividad en proteínas que presentan residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) seguidos de cuatro aminoácidos y otro residuo de serina o treonina ya fosforilado. Es decir, en muchos casos requiere de un *priming* o cebado de fosforilación de la proteína para reconocerla como sustrato y actuar sobre ella (Hermida et al., 2017). Además, esto permite una fosforilación secuencial de múltiples sitios separados entre sí por 4 aminoácidos, con lo que la actividad de GSK-3 suele implicar una fosforilación múltiple de la proteína diana (Beurel et al., 2015).

En mamíferos, GSK-3 presenta dos parálogos (GSK-3 α y GSK-3 β), codificados por genes diferentes, que a pesar de que difieren en sus terminaciones, comparten un dominio catalítico muy similar. Aunque tradicionalmente se han considerado como proteínas similares, puesto que los inhibidores conocidos afectan de manera parecida a las dos, diferentes estudios con ratones *knockout* y de

silenciamiento, han puesto de manifiesto que cada proteína puede presentar selectividad de sustratos y regular diferentes funciones celulares (Maurin et al., 2013). Por ejemplo, se han observado diferencias en la expresión de ambas proteínas durante el desarrollo del cerebro murino (Beurel et al., 2012), en el núcleo supraquiasmático durante el ritmo circadiano (Iwahana et al., 2004), así como entre diferentes estados de malignidad en células de cáncer de próstata (Darrington et al., 2012), y melanomas (Madhunapantula et al., 2013). Igualmente, se ha descrito un papel predominante de GSK-3 α , pero no de GSK-3 β , en la diferenciación (Beurel et al., 2011) y el mantenimiento de linfocitos Th17 (Gulen et al., 2012).

Debido a la multitud de sustratos de esta proteína, su regulación resulta compleja y es diferente dependiendo del caso concreto. Encontramos por tanto distintos mecanismos de regulación, como son la fosforilación de GSK-3, la disponibilidad de sustrato, la localización de esta enzima y sus sustratos y su incorporación en complejos proteicos (Jope & Johnson, 2004). Así, una de las formas más estudiadas de regulación es su inactivación al ser fosforilada. Cuando esto ocurre, la Ser fosforilada de GSK-3 provoca que su propio extremo N-terminal actúe como un pseudosustrato, asociándose con el dominio de unión a sustrato fosforilado y, por tanto, impidiendo su unión a ellos. Además de AKT, GSK-3 puede ser fosforilada por la proteína quinasa A (PKA), o la PKC, las cuales se activan por multitud de vías de señalización, lo que le confiere una gran versatilidad en cuanto a la integración de señales.

Resulta importante destacar que esta forma de inhibición no es completa (se trata de un mecanismo competitivo, por lo que en presencia de altas concentraciones de sustratos fosforilados puede haber actividad de GSK-3), ni común a todos los casos (es imprescindible conocer qué tipo de regulación está teniendo lugar en la vía estudiada) (Beurel et al., 2015; Jope & Johnson, 2004).

En el caso concreto de la respuesta a estrés de RE se sabe que GSK-3 β que además se encuentra en altas concentraciones en el tejido cerebral, está muy relacionada con el desarrollo de esta respuesta. Se sabe que la activación de GSK-3 β resulta necesaria para la activación de la caspasa-3, formando así parte del programa apoptótico que se promueve por la UPR cuando el estrés

proteotóxico resulta excesivo (L. Song et al., 2002). Dicha relación ha sido puesta de manifiesto *in vivo*, en estudios previos de nuestro grupo (E. Gavilán, Giráldez, et al., 2015). Sin embargo, GSK-3 β no sólo tiene un papel pro-apoptótico, sino que resulta esencial para la activación de TSC2, que inhibe a mTORC1, y de TIP60, una proteína que acetila a ULK1. De esta forma se promueve la activación de la autofagia por estrés de RE, modulando la UPR y frenando su carácter apoptótico (contribuye a mantener bajos los niveles de CHOP) para mantener la homeostasis celular (Beurel et al., 2015; Nie et al., 2016). Por tanto, GSK-3 β juega un papel complejo en el destino celular, dependiendo del contexto en el que se encuentre, de las vías activas en cada momento y de la duración del estrés.

Igualmente, su implicación en la regulación de la autofagia ha sido ampliamente demostrada. Por ejemplo, la inhibición de GSK-3 β induce la activación de la autofagia en células de cáncer de mama (C.-H. Choi et al., 2012; E. Gavilán et al., 2013), de próstata (Sun et al., 2016; J. Yang et al., 2010) y de pulmón (Ren et al., 2018). En este sentido, resultados *in vivo* de nuestro grupo de investigación han revelado que en respuesta al bloqueo del proteasoma, la activación de la autofagia podría estar mediada por la vía IGF1-AKT-GSK-3 β . El bloqueo del proteasoma en ratas jóvenes produjo la activación de esta vía, con la consiguiente inhibición de GSK-3 β , la activación de la autofagia y poca neurodegeneración. Por el contrario, en animales viejos no se activa dicha vía, manteniéndose activa GSK-3 β , no se activa la autofagia, se procesa caspasa-3 y se produce neurodegeneración más severa (E. Gavilán, Giráldez, et al., 2015). Por todo ello, podemos considerar que la proteína GSK-3 β podría estar regulando negativamente la activación de la autofagia en respuesta al bloqueo del proteasoma.

6.2. PI3K/AKT/mTOR

Las vías de señalización de PI3K/AKT y mTOR son dos vías altamente relacionadas con el crecimiento y la supervivencia celular, y están tan interconectadas que en muchos casos se las estudia como una única vía que interacciona con otras muchas (Heras-Sandoval et al., 2014).

6.2.1. PI3K

Las proteínas **PI3K** (fosfatidil inositol 3 quinasa) constituyen una familia de quinastas capaces de fosforilar a los fosfolípidos de tipo inositol. Se trata de heterodímeros activados por receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa. Estos receptores se autofosforilan y reclutan a PI3K a la membrana, activando de manera alostérica la subunidad catalítica de PI3K. Una vez activada, se produce la fosforilación del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI3), el cual recluta proteínas señalizadoras con un dominio de homología a pleckstrina, como es AKT (Heras-Sandoval et al., 2014; Vergadi et al., 2017; Xia & Xu, 2015).

6.2.2. AKT

AKT es una proteína de la familia de quinastas AGC (también conocida como proteína quinasa B, PKB) (Pearce et al., 2010). Al igual que GSK-3, se trata de una quinasa de amplio espectro en cuanto a sus sustratos y las diferentes funciones celulares en las que puede estar implicada. Su participación ha sido documentada en el crecimiento, proliferación, migración y progresión del ciclo celular, así como en la supervivencia celular, renovación de células madre, procesos de polaridad y diferenciación y metabolismo celular entre otros (Arboleda et al., 2003; Hennessy et al., 2005; Z.-Z. Yang et al., 2003).

En mamíferos existen 3 homólogos altamente conservados de AKT, con más de un 80% de identidad de secuencia, que se denominan AKT1, AKT2 y AKT3 (Hennessy et al., 2005; Liao & Hung, 2010; Manning & Cantley, 2007). Como se ha mencionado, para su activación AKT es reclutada en la membrana plasmática donde se une a PI3 y sufre un cambio conformacional que deja expuesto dos residuos críticos que son fosforilados y necesarios para su activación. El residuo de Thr308, en el dominio quinasa (AKT1), el cual es fosforilado por la quinasa 1 dependiente de fosfoinositido (PDK1), y otro residuo de Ser473, en el dominio hidrofóbico C-terminal, fosforilado por mTORC2. La fosforilación en Thr308 es en cierto grado dependiente de la fosforilación en Ser473 (H. Guo et al., 2014), y la fosforilación de ambos residuos es necesaria para una completa activación de esta quinasa (Alessi et al., 1996; Sarbassov et al., 2005).

Entre sus múltiples sustratos se encuentran las quinasas mTOR y GSK-3 (Heras-Sandoval et al., 2014). Como se ha comentado, la inactivación de GSK-3 por parte de AKT puede promover la supervivencia celular al impedir su participación en las vías de carácter pro-apoptótico (E. Gavilán et al., 2013), pero a la vez, puede impedir la activación de la autofagia, impidiendo la restauración de la proteostasis (E. Gavilán, Giráldez, et al., 2015), resaltando la complejidad de la señalización y sugiriendo tanto la importancia del tipo de estrés, como el tipo celular sobre el que actúa.

6.2.3. mTOR

Finalmente, **mTOR** es otra Ser/Thr quinasa, altamente conservada desde levaduras. La letalidad mostrada en mutaciones embrónicas resalta su papel fundamental en la supervivencia celular. La señalización a través de mTOR implica aspectos tan relevantes como el crecimiento, la proliferación y el metabolismo celular (figura 6) (Laplante & Sabatini, 2012).

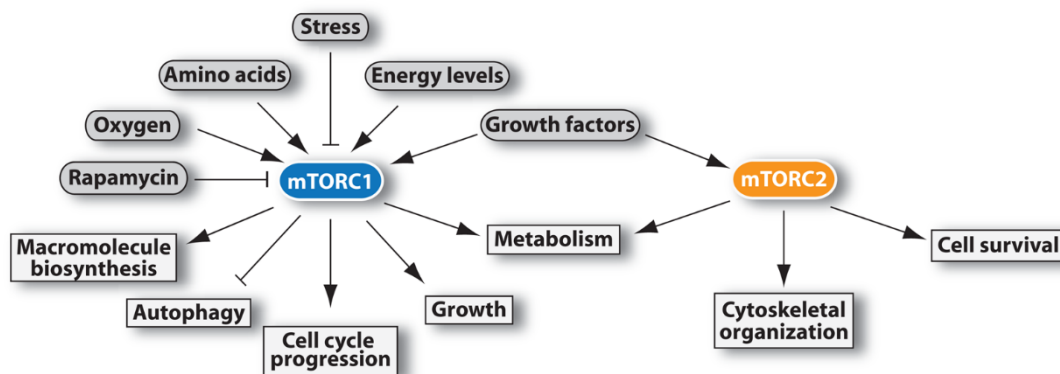


Figura 6. Visión general de mTORC1 y mTORC2. La quinasa mTOR forma parte de dos complejos llamados mTORC1 y mTORC2. El primero responde a aminoácidos, estrés, oxígeno, energía y factores de crecimiento, y es sensible a rapamicina. Promueve el crecimiento celular mediante la inducción de procesos anabólicos y la inhibición de procesos catabólicos, y dirige la progresión del ciclo celular. mTORC2 responde a factores de crecimiento y regula la supervivencia celular y el metabolismo, además del citoesqueleto. mTORC2 es insensible al tratamiento agudo con rapamicina, pero una exposición crónica puede afectar a su estructura. Figura tomada de Laplante & Sabatini, 2012.

Una característica de mTOR es que se encuentra altamente regulada, tanto positiva como negativamente, por múltiples factores y mecanismos. Esta quinasa realiza su función a través de dos complejos estructural y funcionalmente diferentes, que comparten a la quinasa mTOR: **mTORC1/raptor** y **mTORC2/rictor**. Ambos complejos fosforilan a diferentes sustratos con

consecuencias dispares para la célula (Heras-Sandoval et al., 2014; Z. Xu et al., 2020). La explicación de manera detallada de todos los mecanismos, proteínas y factores implicados en la regulación de mTOR, resultaría demasiado compleja, y es por ello, por lo que vamos a tratar de resumir aquellos aspectos que sean de mayor relevancia para comprender, en parte, los resultados de este trabajo.

Centrándonos en la autofagia, la actividad de mTORC1 juega un papel clave en la regulación de esta. De forma general, podemos decir que la inactivación de mTORC1 promueve la autofagia, mientras que su activación la impide. Por el contrario, la actividad de mTORC2 no juega un papel relevante en la regulación de la autofagia. En este sentido, la sensibilidad a rapamicina, es otra característica que diferencia a los complejos mTORC1 y mTORC2. En este caso, mTORC1 es sensible a la inhibición por rapamicina, mientras que mTORC2 parece ser insensible, al menos a dosis bajas (Soliman et al., 2010).

La actividad de mTOR puede ser regulada por diferentes mecanismos. Por un lado, mTOR puede ser fosforilado directamente en varios residuos como Thr2446 por AMPK inactivándolo (Cheng et al., 2004) y en Ser2448 por AKT activándolo (Sekulic et al., 2000), aunque también ha sido demostrado que el residuo Ser2448 puede ser fosforilado por S6K, una quinasa sustrato de mTOR (Chiang & Abraham, 2005). Además, mTOR también puede autofosforilarse en configuración cis en Ser2481 activándose (Soliman et al., 2010).

Por otro lado, AKT también puede fosforilar al inhibidor específico de mTORC1, PRAS40, provocando su liberación del complejo y su activación (Sancak et al., 2007). Del mismo modo, otra quinasa como AMPK, fosforila e inactiva a raptor, otro componente del complejo, inactivando a su vez a mTORC1.

Igualmente, la actividad de mTOR puede ser regulada por las proteínas supresoras de tumores TSC (complejo de esclerosis tuberosa), codificadas por dos genes diferentes y cuyos productos se asocian para formar el complejo TSC1-TSC2, que como se ha dicho regula la actividad de mTORC1. (J. Huang & Manning, 2008). Dicho complejo presenta múltiples sitios de fosforilación, que lo pueden activar o inhibir, inhibiendo o activando, respectivamente a mTORC1, a través de la actividad del dominio GAP (*GTPase-activating protein*) de TSC2 sobre la proteína Rheb, una GTPasa de la familia Ras (Inoki, Li, et al., 2003). De esta forma la inactivación de TSC2 dará lugar a la acumulación de Rheb-GTP, y

esto, a la activación de mTORC1. En este sentido, TSC2 puede ser fosforilado por AKT en varios residuos diferentes inactivándolo (Inoki et al., 2002), por GSK-3, de manera dependiente de AMPK (Inoki et al., 2006), así como por AMPK directamente, activándolo en ambos casos (Inoki, Zhu, et al., 2003).

La activación de mTORC1 provoca la fosforilación y activación de proteínas como S6K1/2 (S6 quinasa 1/2) y la fosforilación e inactivación de otras como 4E-BP1 (proteína de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota) promoviendo el crecimiento y la proliferación celular, así como la fosforilación e inhibición de ULK1, promoviendo en este caso la inhibición de la autofagia (figura 7).

Como se comentó anteriormente, mTORC2 es menos sensible a rapamicina y, aunque no se conoce bien su funcionamiento, se sabe que puede activar a AKT, mediante su fosforilación en Ser473, siendo él mismo activado por PI3K/AKT o, alternativamente, por la vía de señalización Ras/MEK/ERK (Heras-Sandoval et al., 2014).

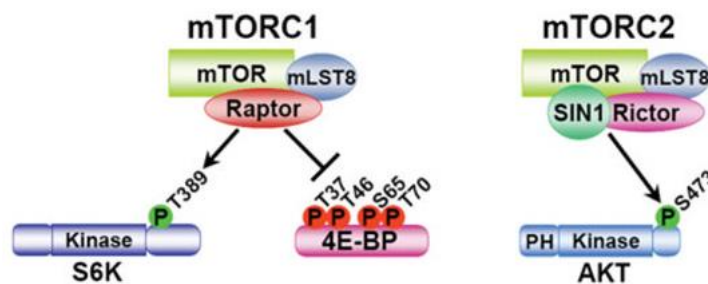


Figura 7. Fosforilaciones por los complejos mTORC. El complejo mTORC1 promueve el crecimiento celular e inhibe la autofagia a través de fosforilaciones en proteínas clave como S6K (que se activa debido a esta fosforilación) y 4E-BP (cuyo estado fosforilado provoca su inactivación). El funcionamiento de mTORC2 es menos conocido, aunque se sabe que fosforila a AKT, activándola, y provocando una retroalimentación positiva, puesto que él mismo es activado por la vía PI3K/AKT. Figura tomada de J. Huang & Manning, 2008.

En definitiva, la compleja regulación de mTORC1, proporciona un sensor capaz de integrar multitud de señales de diversas vías celulares, para adaptar de manera correcta la actividad de esta quinasa. Es decir, la modulación correcta de esta vía, atendiendo al contexto celular donde nos encontremos, permitirá tanto el crecimiento y la proliferación celular, en condiciones de bonanza nutricional y energética, o, por el contrario, podrá activar a la autofagia en situaciones de estrés metabólico, energético o proteotóxico, y a la vez regular su activación excesiva, lo que podría conducir a la muerte celular.

6.3. WNT/ β -CATENINA

La vía de señalización Wnt es otra vía que se encuentra altamente conservada y que juega un importante papel en numerosas actividades celulares. Se conoce su implicación en la comunicación celular, proliferación, migración y polaridad, así como en la homeostasis de células madre y el destino celular (Niehrs, 2012). Sus funciones se encuentran por tanto determinadas por el tipo celular y la etapa en que se encuentre la célula en ese momento. Esta vía de señalización suele dividirse a su vez en una vía canónica (dependiente de β -catenina), y en otra no canónica (independiente de β -catenina) (Lorzadeh et al., 2021; Niehrs, 2012). Puesto que en este trabajo nos centramos en la vía dependiente de β -catenina, y debido a la complejidad de ambas vías, nos ceñiremos solamente a la explicación de la vía canónica (figura 8).

En **ausencia de ligandos Wnt**, β -catenina es atrapada por el complejo de destrucción formado por las proteínas Axin, APC (*adenomatous polyposis coli*), GSK-3 β y CK1 α (caseína quinasa 1 α): **Axin-APC-GSK-3 β -CK1 α** . En estas condiciones, β -catenina es fosforilada y cebada primero por CK1 α , lo que permite la fosforilación posterior por GSK-3 β . Este fosfodegrón es reconocido por la ubiquitina ligasa β -TrCP200, que cataliza la poli-ubiquitinación de β -catenina, permitiendo así su degradación proteasomal, y en consecuencia la no translocación al núcleo y señalización.

En **presencia de ligandos Wnt**, para los que existen un total de 19 genes en humanos, estos se unen a los receptores Frizzled y a los co-receptores LRP5/6, activándolos. A continuación, LRP5/6 es fosforilado en dos sitios diferentes por GSK-3 β , uno de manera dependiente de CK1 α (sitio II), y el otro de manera independiente (sitio I) (Zeng et al., 2005), permitiendo el reclutamiento de la proteína Dvl (Dishevelled) a la membrana plasmática donde se activa por polimerización (Metcalf et al., 2010). Una vez activa, Dvl desestabiliza el complejo de destrucción, e inhibe la fosforilación de β -catenina por GSK-3 β (Taelman et al., 2010), resultando en la estabilización y acumulación de β -catenina en el citosol. Por lo tanto, β -catenina puede migrar al núcleo y formar un complejo activo de transcripción junto con los factores LEF (*lymphoid*

enhancer factor) y TCF (*T-cell factor*) (Lien & Fuchs, 2014) permitiendo la transcripción de diversos genes que participan en múltiples procesos celulares tales como c-myc, ciclina D1, Axina2, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o la interleucina 6 (IL-6), entre otros (Katoh & Katoh, 2007; Longo et al., 2002; Lorzadeh et al., 2021; Prossomariti et al., 2020; X. Zhang et al., 2001).

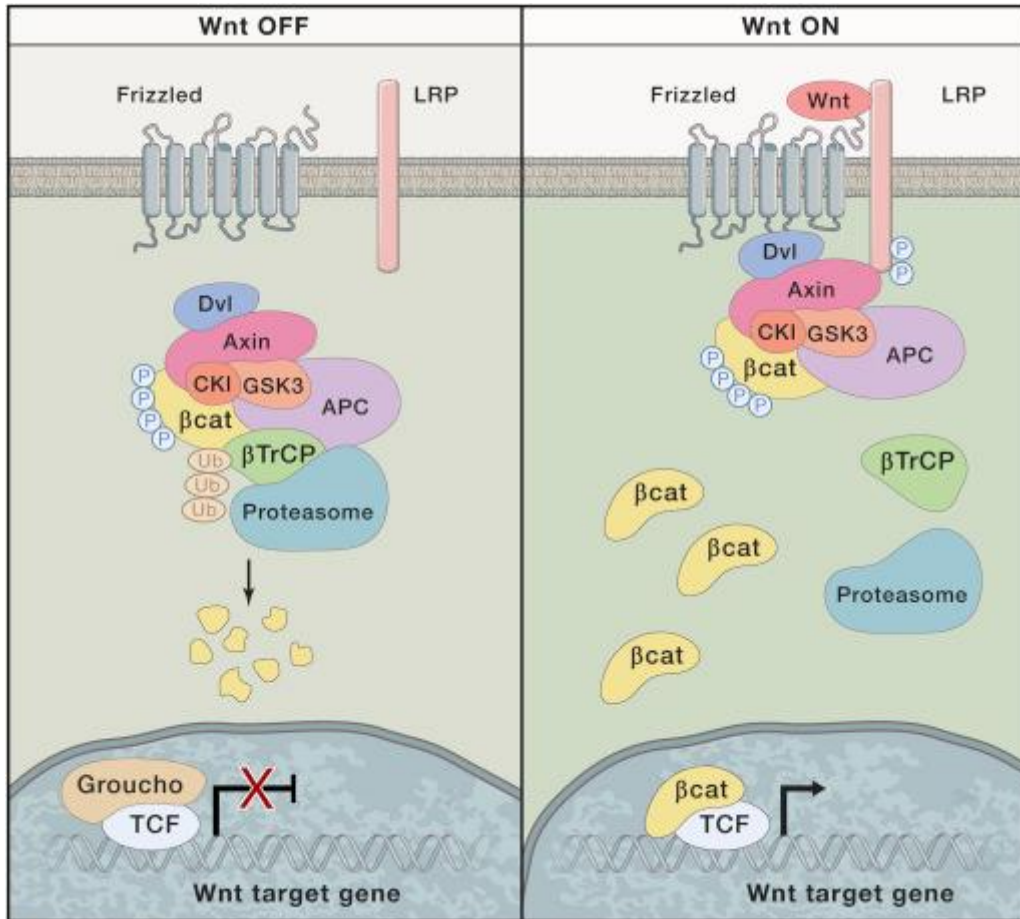


Figura 8. Señalización canónica de Wnt. Wnt OFF: En ausencia de ligandos Wnt, la β-catenina se degrada mediante un complejo de proteínas formado por Axin, APC, GSK-3 y CK1. Este complejo provoca la fosforilación de una secuencia conservada rica en Ser/Thr de la β-catenina, lo que permite su poli-ubiquitinación, que sirve como señal para su degradación por el proteasoma. La expresión de los genes diana de Wnt se encuentra reprimida debido a la unión del factor de células T (TCF) al represor Groucho. **Wnt ON:** La unión de los ligandos Wnt a sus receptores induce la asociación de Axin con el co-receptor LRP fosforilado, lo que provoca la desestabilización del complejo de destrucción gracias a la acción de la proteína Dvl. De esta manera la β-catenina se estabiliza, translocándose al núcleo, donde se une a TCF y aumenta la expresión de los genes diana. Figura tomada de Nusse & Clevers, 2017.

La interacción entre la vía Wnt/β-catenina y la autofagia es ampliamente conocida (Lorzadeh et al., 2021). Por un lado, cuando se activa la autofagia disminuyen los niveles de β-catenina, ya que esta presenta un dominio de interacción con LC3, lo que indica que β-catenina, además de ser degradada

por el proteasoma, es susceptible de ser degradada por la autofagia (Petherick et al., 2013). De manera opuesta, la inhibición de la vía Wnt aumenta la expresión de p62 y la acumulación del factor de transcripción EB (TFEB), implicado en la estimulación de la maquinaria autofágica y de la síntesis de lisosomas (Nàger et al., 2018). Por otro lado, se ha visto que β -catenina, mediante su interacción con TCF4, reprime la expresión transcripcional de p62, inhibiendo así la autofagia (Petherick et al., 2013). Además, la proteína Dvl, supone un sistema de regulación alternativo entre estos dos procesos, ya que puede estimular la señalización de mTOR a través de la inhibición de la fosforilación de GSK-3 β sobre TSC2. Además, Dvl es también sustrato de la degradación por autofagia y puede ser inactivada por ULK1 (Katoh & Katoh, 2017; Lorzadeh et al., 2021).

6.4. FOXO3

La familia de factores de transcripción FOXO (*forkhead box transcription factors*) son unos reguladores críticos de la homeostasis celular, las células madre y el envejecimiento. Estas proteínas suelen residir en el núcleo de células quiescentes donde actúan como reguladores de la transcripción genética, siendo relocalizados al citosol en presencia de factores de crecimiento celular donde se llevará a cabo su degradación por el proteasoma (Audesse et al., 2019; Farhan et al., 2017).

Pertenecientes a la familia FOXO, en mamíferos encontramos cuatro proteínas cuyas funciones se superponen entre sí, diferenciándose principalmente por su expresión específica en tejidos: **FOXO1**, **FOXO3**, **FOXO4** y **FOXO6**. FOXO1 y FOXO4 se encuentran principalmente en el tejido adiposo y en el corazón respectivamente, mientras que FOXO3 y FOXO6 aparecen en abundancia en el cerebro (Farhan et al., 2017; Webb & Brunet, 2014).

Estas proteínas se encuentran altamente reguladas e interconectadas con numerosas rutas relacionadas con el metabolismo y la resistencia a estrés. Así, en presencia de insulina y del factor de crecimiento similar a insulina (IGF), la ruta señalizadora PI3K-AKT se activa y las quinasas como AKT fosforilan a los factores FOXO en tres residuos conservados, con la consecuente translocación

al citosol y represión de su actividad (Farhan et al., 2017). Además de la regulación ejercida por AKT, las proteínas FOXO pueden ser modificadas post-traduccionalmente en otros residuos, generando un código que permita una regulación más fina frente a los diversos estímulos externos. Encontramos de esta forma fosforilaciones por otras quinasas como AMPK o JNK, acetilaciones, desacetilaciones, ubiquitinaciones y metilaciones (Webb & Brunet, 2014).

Diversos estudios (Audesse et al., 2019; Lee et al., 2019; L. Li et al., 2015) demuestran la relación entre los factores FOXO y la activación de la autofagia (figura 9). Se sabe que FOXO3 induce la expresión en el músculo de varios genes relacionados con algunas etapas del proceso de autofagia, como son *LC3*, *Ulk2* o *BENC1*, mientras que en neuronas promueve un tipo especial de autofagia, llamada mitofagia, encargada de degradar mitocondrias (Webb & Brunet, 2014). En este contexto resulta esperable, y así se ha demostrado, la interacción entre los factores FOXO y otros mecanismos reguladores de la autofagia. Por ejemplo, una sobreexpresión de FOXO3 aumenta los niveles de glutamina sintetasa, lo que inhibe la localización de mTORC1 en el lisosoma (siendo mTORC1 un inhibidor de la autofagia). Por otro lado, AKT es capaz también de inhibir los factores FOXO, provocando una inhibición indirecta de la autofagia además de la que provoca directamente al inhibir a beclina1 (Farhan et al., 2017; Webb & Brunet, 2014).

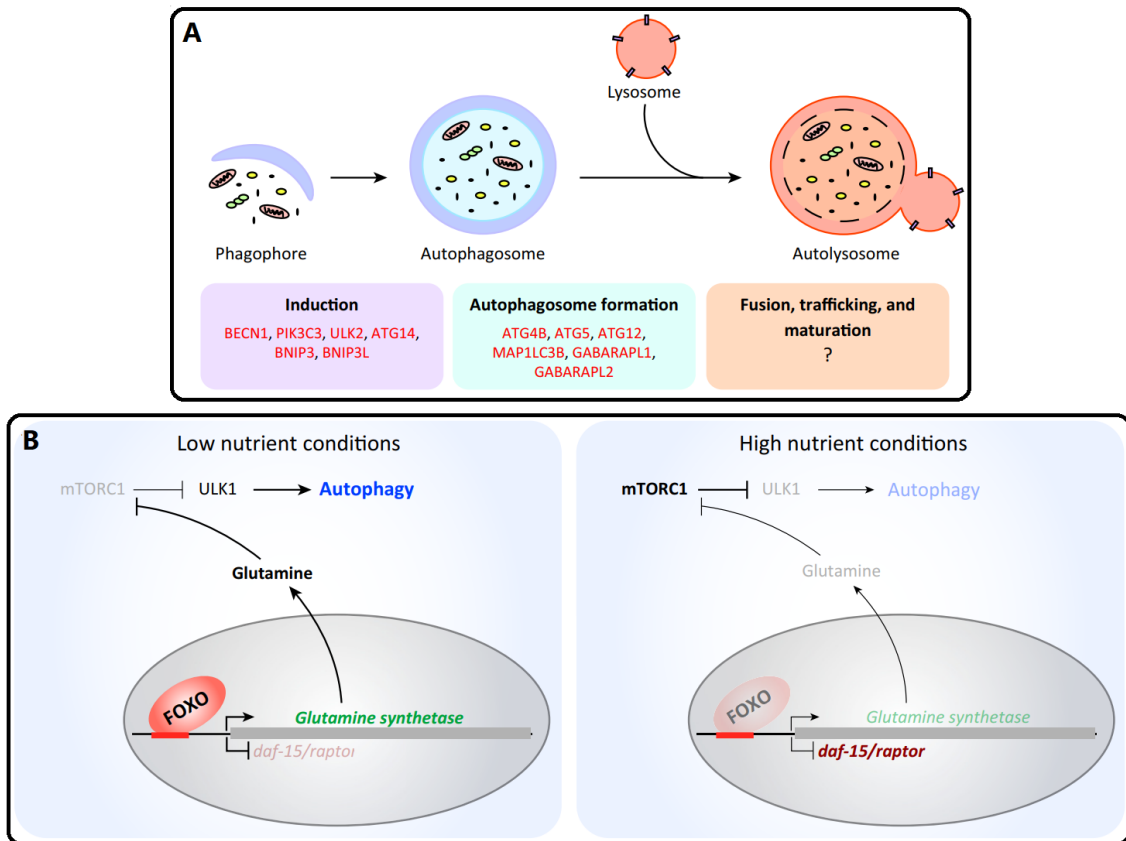


Figura 9. Relación de FOXO con la autofagia. **A** En células de mamífero FOXO regula la inducción de la autofagia (iniciación-nucleación) y la formación del autofagosoma (elongación). En rojo aparecen los genes regulados por FOXO en distintos tipos celulares. En cuanto a los procesos de fusión, tráfico y maduración del autolisosoma aún no se conoce la implicación de FOXO. **B** Interacción antagónica entre FOXO y mTORC1 en la autofagia. En condiciones de escasez de nutrientes, la quinasa ULK comienza la activación de la autofagia. Bajo estas condiciones, FOXO activa la transcripción de la glutamina sintetasa, que aumenta los niveles intracelulares de glutamina, bloqueando la actividad de mTORC1. En *Caenorhabditis elegans*, y posiblemente en vertebrados, FOXO/DAF-16 reprime la expresión de *daf-15/raptor*, un miembro imprescindible del complejo mTORC1. En condiciones ricas en nutrientes, la baja actividad de FOXO elimina la represión de *daf-15/raptor*. Además, los niveles reducidos de la glutamina sintetasa aumentan la actividad de mTOR, que impide la autofagia. Figura tomada de Webb & Brunet, 2014.

En concreto, en este trabajo nos hemos centrado en FOXO3 debido a su localización principal en el cerebro y a que su eliminación por sí sola tiene graves consecuencias que las otras proteínas FOXO no son capaces de suplir (Audesse et al., 2019; Webb & Brunet, 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES

En todos los casos, las células se incubaron a 37°C, en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂, y su manipulación se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar y material estéril. Para mantener una confluencia adecuada al crecimiento de cada línea celular, se subcultivaron entre 2 y 3 veces a la semana. Los subcultivos se realizaron recogiendo las células del frasco de cultivo mediante un rascador (*scraper*) o mediante el uso de Trypsin 0,25%-EDTA 1 mM (Biowest) y resuspendiéndolas en el medio correspondiente, haciendo diluciones 1:2, 1:5 ó 1:10 antes de sembrar en un frasco nuevo. El número de células y soporte utilizado en cada ensayo dependieron de las condiciones experimentales empleadas en cada caso.

1.1. Línea microglial BV2

Esta línea deriva de la microglía neonatal murina raf/myc-inmortalizada y es la más utilizada como sustitución de la microglía primaria en estudios de neurodegeneración. Estas células se mantuvieron de forma rutinaria en medio DMEM-F12 w/o L-glutamine (Biowest), suplementado con glutamina 2 mM (Biowest), suero fetal bovino inactivado 10% (SFB; Biowest), 100 U/ml de penicilina (Biowest) y 100 µg/ml de estreptomicina (Biowest).

1.2. Línea neuronal N2a

Las células neuronales de la línea N2a utilizadas en este trabajo provienen de neuroblastomas de ratón y fueron donadas por el Dr. Gopal Thinakaran (University of Chicago; USA). El mantenimiento de estas células se hizo, rutinariamente, en medio DMEM High Glucose w/L-glutamine (Biowest) (50%) y OPTIMEM 1 (Gibco) (50%), suplementado con L-glutamina 2 mM, SFB 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

2. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

2.1. Cultivo mixto de microglía y astrocitos

Estos cultivos primarios se realizaron según se describe en Jimenez y col. 2008. Las células se han extraído de la corteza y el hipocampo de ratones C57BL/6 neonatales (P1-P3). Para ello, se extrajo el cerebro tras la decapitación de los animales, retirando las meninges con cuidado para no dañar el tejido, se separaron cortezas e hipocampos del resto del cerebro y se mantuvieron en PBS (Biowest) frío con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina). Tras esto se realizó la homogenización suave del tejido mediante el uso de tijeras de cirugía en Tripsina-EDTA 1x en PBS (Biowest) (500µl para dos cerebros), se incubó a 37°C durante 5 min y se repitió el proceso hasta la completa homogenización. Posteriormente, se le añadió medio completo con SFB, para inhibir la tripsina, y esta suspensión de células se pasó por un filtro de nylon con diámetro de poro de 40 µm (Fisher Scientific). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 500.000 células por pocillo (área por pocillo: 1.77cm²; Nunc). Previamente, las placas se trataron con poli-D-lisina (Sigma) a una concentración de 100 µg/ml y a 37°C, durante un mínimo de 2 horas, y posteriormente se lavaron con agua destilada para retirar restos de poli-D-lisina. Para su mantenimiento se usó medio completo, compuesto por DMEM-F12, suplementado con SFB 10%, aminoácidos no esenciales 1x (Biowest), 10 µg/ml de gentamicina (Biowest), 2mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. A los 2 días, se retiró la mitad del medio y se repuso con medio nuevo. Cada 4 días a partir de este momento se renovaba todo el medio.

2.1.1. Aislamiento de microglía y astrocitos

Una vez obtenido un cultivo estable con poblaciones diferenciadas, entre los días 20 y 25, se realizó el proceso de aislamiento. En este proceso es importante aprovechar los factores liberados por las células, por lo que se recogió el medio

de cultivo (medio condicionado) y se reservó para poder usarlo en la siembra de las poblaciones aisladas. A continuación, se realizó un lavado de la placa con PBS estéril, eliminando así los posibles restos de suero y se añadió medio de aislamiento, compuesto por DMEM-F12 y Trypsin 0,25%-EDTA 1 mM (3:1). Una vez añadido este medio, se mantuvo a 37°C en un tiempo que variaba entre 10 y 45 min, durante el cual los astrocitos son capaces de levantarse del cultivo, mientras que la microglía se encuentra aún unida a la placa. Una vez se observaba esta separación, se añadía medio completo, inactivando así la tripsina, y se procedía a recoger el sobrenadante en el cual se encontraban los astrocitos. A la microglía que permanecía en la placa se le realizaba un lavado con PBS para finalmente añadirle el medio condicionado mezclado con medio nuevo de cultivo en una proporción 1:1. Por otro lado, los astrocitos se podrían sembrar, previa centrifugación a 800g durante 5 min y resuspendidos en medio completo, manteniéndolos como el cultivo primario (placas de 24 pocillos tratadas con poli-D-lisina, a 500.000 células/ pocillo). Sin embargo, en nuestros estudios se ha usado exclusivamente la microglía.

2.2. Cultivo de neuronas

Estos cultivos primarios se realizaron según se describe en García-Junco-Clemente y col. 2010. Estas células se obtuvieron a partir del hipocampo de fetos de ratones C57BL/6, cuando la madre se encuentra en el día 17 de gestación (T17). Al igual que en el caso anterior, se obtuvo el cerebro tras la decapitación, se retiraron las meninges y se separó el hipocampo, pero en este caso se mantuvieron en medio de disociación frío: HBSS (Biowest), glucosa 10mM (Sigma) y HEPES 10mM (Sigma). Una vez extraídos todos los hipocampos, se incubaron durante 3 min, a 37°C y agitación suave, con una solución de papaína 41 U/ml (Worthington) con L-cisteína 0.06% (p/v) (Sigma) en medio de disociación. Posteriormente, se lavaron 3 veces con Inhibidor de Tripsina 1mg/ml (Sigma) en medio de disociación, y se incubaron con dicho inhibidor durante 4 min, a 37°C y agitación suave. A continuación, se realizó una disgregación mecánica del tejido en presencia de medio de plaqueo: DMEM-F12, suplementado con glutamina 2mM, piruvato de sodio 1%, glucosa 20mM y suero

de caballo inactivado 10% (HS; Biowest). Finalmente, se sembraron las células en placas de 24 pocillos, previamente tratadas con poli-D-lisina, a una densidad de 50.000-80.000 células por pocillo, dependiendo del tipo de ensayo. Dos horas después de la siembra, se cambió el medio por medio de neuronas: Neurobasal (Gibco), B27 2% (Gibco), Glutamax 2mM (Gibco), 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Cada 2-3 días, se cambió parte del medio, retirando 1/10 y añadiendo 1/4 de medio de neuronas nuevo teniendo así en cuenta la evaporación del mismo.

3. ENSAYO DE ESTIMULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Para provocar los distintos tipos de estrés en las células hemos utilizado los siguientes compuestos:

Tunicamicina (TM). Inhibidor de la enzima UDP-N-acetilglucosamina-dolicol fosfato N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (GPT), capaz de bloquear de esta manera el paso inicial de la biosíntesis de glicoproteínas en el RE. La inhibición de esta enzima provoca una acumulación de glicoproteínas mal plegadas en el RE, dando lugar a lo que se conoce como estrés de RE. En nuestros experimentos se usa a una concentración de 5µg/ml, durante tiempos que van desde las 2 a las 8 horas.

3-metiladenina (3-MA). Forma parte del grupo de inhibidores de la enzima fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), un elemento clave a la hora de controlar la activación de m-TOR y, por tanto, de la autofagia cuando se utiliza en tiempos cortos y/o en un ambiente de privación de nutrientes. En nuestros experimentos se usa a una concentración de 5mM, añadiéndolo una hora antes que el MG-132 y manteniéndolo hasta el final del experimento.

MG132. ([Z-Leu-Leu-Leu-CHO]). Inhibidor reversible del proteasoma capaz de permear la membrana celular. Produce acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas, y a su vez provoca estrés de RE de manera indirecta al bloquear el proceso conocido como degradación de proteínas asociadas al RE (ERAD), haciendo que las proteínas mal plegadas queden retenidas en el RE. Para nuestros experimentos lo usamos a una concentración de 1µM durante tiempos

que van desde las 2 a las 8 horas, tomando normalmente como referencia las 6 horas.

GSK2656157 y **STF-083010**. Inhibidores de las vías de PERK e IRE1 α , respectivamente. En el primer caso se trata de un compuesto que compite con el ATP para inhibir selectivamente la activación de PERK, disminuyendo de esa manera la fosforilación y activación de sus sustratos (p-eIF2 α , ATF4 y CHOP), mientras que el segundo inhibidor es un compuesto capaz de permear la membrana que actúa directamente sobre IRE1 α e interrumpe esta vía de la UPR. En nuestros experimentos se usan a una concentración de 5 μ M el inhibidor de PERK y de 20 μ M el inhibidor de IRE, añadiéndolos 2 horas antes que el MG-132 y manteniéndolos hasta el final del experimento.

ICG-001. Inhibidor de la **β -catenina** permeable a la membrana que compite contra la β -catenina en su unión a CBP (*CREB binding protein*), evitando la regulación transcripcional de TCF/ β -catenina dependiente de CBP. En nuestros experimentos se usa a una concentración de 5 μ M, manteniéndolo hasta el final del experimento con MG132.

AR 0133418. Inhibidor de **GSK-3 β** que actúa compitiendo con el ATP en su unión a la quinasa GSK-3 β . En nuestros experimentos se usa a una concentración de 5 μ M, manteniéndolo hasta el final del experimento con MG132.

DMAT. (2-dimetilamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol). Inhibidor específico y de alta afinidad de la Caseína Kinasa 2 (CK2) que actúa compitiendo con el ATP. En nuestros experimentos se usa a una concentración de 20 μ M, añadiéndolo una hora antes que el MG-132 y manteniéndolo hasta el final del experimento.

Ácido 4-fenilbutírico (4-PBA). Agente antineoplásico, que induce la acetilación de histonas y se le asocia un efecto atenuante del estrés de RE. En nuestros experimentos se usa a una concentración de 0.5 μ M, añadiéndolo una hora antes que el MG-132 y manteniéndolo hasta el final del experimento.

Ácido valproico. Ácido graso de cadena corta ramificada usado en el tratamiento de numerosos desórdenes psicológicos, el cual se ha observado que puede disminuir el estrés de RE mediante la activación de las vías pro-supervivencia de la UPR. En nuestros experimentos se usa a una concentración de 0.5 μ M, añadiéndolo una hora antes que el MG-132 y manteniéndolo hasta el final del experimento.

Rapamicina. Inhibidor de mTORC1, capaz de promover de esta forma la activación de la autofagia. En nuestros experimentos se usa a una concentración de 200nM y manteniéndolo hasta el final del experimento o, si no es en combinación con MG132, un mínimo de 3 horas.

Bafilomicina. Inhibidor de la bomba de protones, que evita la resolución de la autofagia ya que no permite la acidificación del autofagosoma, bloqueándola en el paso intermedio en el cual ya se han creado estas vesículas, pero no se pueden degradar. En nuestros experimentos se usa a una concentración de 1 μ M, añadiéndolo al menos una hora antes que el MG-132 y manteniéndolo hasta el final del experimento.

Los diferentes tratamientos se realizaron en placas de 24 pocillos, donde se sembraron 45.000 células por pocillo en el caso de las líneas (BV2 y N2a), y 500.000 células por pocillo en el caso de cultivos primarios. Tras el mantenimiento y crecimiento de estos cultivos, llevamos a cabo el tratamiento de los mismos. En cada caso, el mantenimiento y tratamiento se realizó en el medio concreto de cada tipo celular (detallados en Apartados 1 y 2). Tras dicho tratamiento, se retiró el medio y se recogieron las células añadiéndoles el reactivo Tripure® (Roche) y, posteriormente, se extrajeron ARN y proteínas siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 5. Una vez obtenido el ADNc (Apartado 8), medimos mediante qPCR (Apartado 9) todos aquellos marcadores de interés.

4. ENSAYO DE TOXICIDAD EN CULTIVOS CELULARES, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

4.1. Fundamento

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas e individualmente a través de un capilar, por delante de un haz de luz láser focalizado. Puesto que la interferencia con este haz de luz produce una señal única, podemos cuantificar tanto características físicas como químicas de cada célula (Barrera-Ramírez et al., 2004). La presencia de fluorocromos en los anticuerpos específicos para antígenos de las células a estudiar produce la emisión de una luz policromática tras la incidencia de haz de láser. Conociendo los parámetros específicos de los fluorocromos y las características físicas de las células que interfieren con la luz proyectada sobre ellas, podemos desglosar gran cantidad de información de cada célula. Así pues, la luz dispersada hacia delante y lateralmente provee información sobre el tamaño y la complejidad/granularidad de la célula, respectivamente, pero también podemos obtener información de las características antigénicas (inmunofenotipo) de las células, e incluso de diferentes procesos o funciones celulares (ciclo celular, proliferación, apoptosis, fagocitosis, etc.) específico de cada célula. Este proceso presenta la gran ventaja de obtener información compleja de un gran número de células individuales en muy poco tiempo (en nuestros experimentos obtenemos información de en torno a 20.000 células por pocillo). En nuestro caso nos hemos centrado en el estudio de la muerte celular, cuyo procedimiento se explica en el siguiente apartado.

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha utilizado el citómetro de flujo analizador BD FACS Canto II (Becton Dickinson), del Servicio de Citometría de Flujo y Separación Celular, del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

4.2 Procedimiento

En este caso, los tratamientos se realizaron utilizando los medios correspondientes de cada tipo celular (Apartados 2 y 3), en placas de 24 pocillos y en ausencia de SFB, para no interferir en la supervivencia celular. Además de los distintos tratamientos ya descritos en el apartado 3, utilizamos estaurosporina (Sigma) a 0.5 $\mu\text{g/ml}$, como control positivo de apoptosis celular. Tras las horas de tratamiento adecuadas en cada caso, se recogieron todas las células (en suspensión y pegadas a la superficie de la placa) y se determinó la viabilidad de estas células mediante el kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Immunostep) y el citómetro de flujo BD FACS Canto II. Finalmente, los resultados se analizaron con el software FACSDiva™ (BD Bioscience).

Este kit se basa en un doble marcaje con Anexina V, conjugada con FITC (fluoresceína-5-isotiocianato), y que tiene gran afinidad por la fosfatidilserina, la cual queda expuesta hacia el exterior de las células durante el proceso de apoptosis; y con yoduro de propidio (PI) un agente intercalante que permite conocer la integridad de la membrana plasmática puesto que no es permeable a la misma. Debido a que esta integridad se ha perdido en las células que se encuentran tanto en necrosis como en apoptosis tardía, el PI puede acceder al núcleo celular y unirse al ADN. Por lo tanto, el marcaje simultáneo con PI y Anexina V permite discriminar y cuantificar las células viables (AnexinaV-/PI-), las células en apoptosis temprana (AnexinaV+/PI-), las células en apoptosis tardía (AnexinaV+/PI+) y las células necróticas (AnexinaV-/PI+).

5. AISLAMIENTO DE ARN Y PROTEÍNAS

El método empleado para la extracción de ARN y proteínas se basa en la diferente solubilidad de las distintas biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos (fenol y cloroformo). El proceso se ha llevado a cabo usando el reactivo Tripure® (Roche), que contiene tiocianato de guanidina, un agente caotrópico que rompe las membranas y desnatura las proteínas, incluyendo proteasas, ADNasas y ARNasas. Estas últimas son muy resistentes a la mayoría de agentes físicos, y su desnaturalización es fundamental para evitar la degradación del ARN.

Para obtener una extracción de ARN lo más adecuada posible, hemos de conseguir minimizar la actividad ribonucleasa en los estadios iniciales de la extracción. Para ello, es importante que tanto reactivos como material de trabajo estén libres de ARNasas, por lo que rutinariamente optamos por tratar el agua con dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma) a una concentración del 0.1% (p/v) (Fedorcsák et al., 1966), durante 12 horas; tras este periodo se elimina el DEPC en exceso por tratamiento térmico, ya que éste puede alterar el ARN por carboximetilación. Además, todos los reactivos y material fungible de origen comercial utilizados durante este proceso se adquieren libres de ARNasas.

Una vez añadido el Tripure, incubamos el homogenizado 10 min a temperatura ambiente, para permitir una disociación completa de los complejos núcleo-proteicos. Posteriormente, añadimos cloroformo (Sigma) (0.2ml por ml inicial de Tripure añadido), se agita fuertemente y de nuevo lo dejamos incubarse a temperatura ambiente durante al menos 5 min. A continuación, centrifugamos a 12000xg a 4°C durante 15 min, de esta forma la solución se separa en tres fases diferentes: la fase superior acuosa corresponde al ARN, mientras que las proteínas, lípidos y ADN se encuentran en la interfase y fase inferior orgánica. Con cuidado de no perturbar las fases, podemos aislar tanto el ARN (5.1) como las proteínas (5.2), las cuales se encuentran desnaturalizadas, por lo que solamente pueden utilizarse para estudios en WB. Aunque también es posible aislar el ADN, en nuestro caso no lo hemos utilizado para los estudios realizados en este trabajo.

5.1. Aislamiento de ARN

Para aislar el ARN, extrajimos la fase superior acuosa cuidadosamente y le añadimos isopropanol (Sigma) (0.5ml por ml inicial de Tripure añadido) y 0.5µl glicógeno (Thermo Scientific), que, mediante una incubación a -20°C toda la noche, promueve la precipitación del ARN. Al día siguiente, lo incubamos a temperatura ambiente durante 10 min, y lo centrifugamos a 12.000xg, durante 15min a 4°C. A continuación, realizamos un lavado del pellet de ARN obtenido con Etanol (Scharlau) preparado al 75% (v/v) con agua tratada con DEPC (1ml por cada ml de tripure), y realizamos una nueva centrifugación a 12.000xg,

durante 15 min a 4°C. Por último, dejamos secar por completo el pellet obtenido y lo resuspendemos en agua tratada con DEPC.

Este ARN purificado se puede cuantificar en un espectrofotómetro (NanoDrop; Thermo Scientific), gracias a la absorción por parte de las bases nitrogenadas a una longitud de onda de 260nm. Además, es conveniente determinar la razón de absorbancia a 260nm/280nm (longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos), lo que nos permite conocer el nivel de contaminación de proteínas presentes en la muestra de ARN purificado, siendo un valor óptimo aquel que se aproxime a 2.1.

Una vez se ha purificado y cuantificado, el ARN es almacenado a -80°C hasta su posterior utilización.

5.2. Aislamiento de proteínas totales

Partiendo de la solución trifásica del Apartado 5, utilizamos la fase intermedia y la fase orgánica inferior, una vez separada la fase acuosa, para extraer proteínas totales. En primer lugar, llevamos a cabo la precipitación del ADN genómico, para evitar la contaminación por parte del mismo de la muestra de proteínas. Para ello, añadimos etanol al 100%, (0.3 ml por cada ml inicial de Tripure) e invertimos el tubo varias veces para mezclarlo. Después, incubamos la muestra durante 2-3 min a temperatura ambiente, para permitir que el ADN precipite. Para completar este paso, centrifugamos a 2.000xg durante 5 min a 4°C y recuperamos el sobrenadante (donde están las proteínas) en un tubo nuevo. Para poder precipitar las proteínas, añadimos 1.5ml de isopropanol por cada ml de Tripure, lo mezclamos bien mediante inversión y lo dejamos precipitando a temperatura ambiente al menos 15 min, para posteriormente realizar un nuevo paso de centrifugación durante 10 min a 12.000xg a 4°C. Lavamos el precipitado obtenido con guanidina (Sigma) 0.3 M en 95% (v/v) de etanol (2ml por cada ml de Tripure), manteniéndolo en agitación durante 20 min a temperatura ambiente, para después centrifugarlo a 7.500xg durante 5 min a 4°C. Este proceso se repite dos veces más y luego realizamos un último lavado similar con 2ml de etanol absoluto por ml de Tripure utilizado, para eliminar los restos de guanidina. Finalmente, se deja secar el precipitado unos 10 min, hasta que se evapore todo el alcohol.

Para la solubilización de las proteínas usamos una solución de urea 8M (Applichem) y SDS 4% (Applichem), tamponado con 40mM Tris-HCl pH=7.5, y lo dejamos incubando toda la noche en agitación a temperatura ambiente, tras lo cual procedemos a su cuantificación por el método de Lowry (Apartado 6). Las proteínas solubilizadas y cuantificadas se congelan en diferentes alícuotas a -40°C hasta su uso.

6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY

Para la determinación de la concentración de proteínas utilizamos el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Construimos la curva patrón con concentraciones crecientes de albúmina de suero bovina (BSA; Sigma), obteniendo un rango de sensibilidad de 10-100 µg, y medimos la absorbancia a 750 nm. Como las muestras se han disuelto en SDS4%-UREA 8M, añadimos a la curva patrón el mismo porcentaje de ambos compuestos presente en las diluciones (normalmente 1:10) a las que tomamos las medidas. En algunos casos la concentración de proteínas presente en la muestra resulta tan baja que optamos por usar una variante de este método, llamada **micro-lowry** (modificación de (Fryer et al., 1986)). La curva patrón, por tanto, tiene un rango mucho menor, de 1 a 10 µg, y diluimos la muestra entre 10 y 40 veces en un volumen final de 100 µl. A cada reacción, le añadimos 25 µl de la mezcla cobretartrato, en una razón 1:1:100 de CuSO₄ al 5% (Panreac), NaKTartrato al 10% (Sigma) y Na₂CO₃ al 10% (Panreac) en NaOH 0.5N. Lo dejamos incubar a temperatura ambiente durante 10 min para, a continuación, añadirle el reactivo de Folin&Ciocalteu (Sigma) diluido en agua (1:1), e incubamos de nuevo a temperatura ambiente, durante 20 min. Finalmente, realizamos la lectura de la absorbancia de cada muestra, en este caso a una longitud de onda de 595nm. En cualquiera de los dos métodos, mediante la realización de la curva patrón inferimos las concentraciones de cada muestra.

7. WESTERN BLOT (WB)

7.1. Fundamento

Mediante esta técnica somos capaces no sólo de detectar, sino de cuantificar proteínas presentes en las muestras de proteínas totales extraídas en los apartados anteriores. Para ello se utilizan como soporte para la separación de las mismas los geles de acrilamida, que nos van a permitir establecer un tamaño de poro a través del cual pasen las proteínas separándose en función de su movilidad electroforética, que dadas las condiciones en que se lleva a cabo esta técnica, depende de su tamaño. Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), probablemente la más usada es aquella que se lleva a cabo en condiciones desnaturizantes según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Para asegurar la desnaturización de las proteínas durante todo el proceso y que su carga neta sea negativa, la electroforesis se realiza en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS; Panreac). Esto es imprescindible no sólo para permitir la movilidad dentro del gel, sino para asegurarnos de que se da hacia el polo positivo, por lo que este detergente se va a encontrar tanto en la composición del gel, como en los distintos tampones usados durante el proceso.

La poliacrilamida se forma a partir de la copolimerización entre los reactivos acrilamida (Serva) y bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida; Sigma), en presencia de PSA (persulfato de amonio; Sigma), que actúa como catalizador de la polimerización, y TEMED (Tetrametiletilendiamina; Sigma), que inicia la reacción. Como ya hemos comentado, en estos geles, podemos variar el diámetro de poro fácilmente. Para ello cambiamos las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, lo que nos permite resolver proteínas de diferentes tamaños. En este trabajo, los geles preparados han variado entre 10, 12, 14 o 16% de acrilamida.

7.2. Procedimiento

Para llevar a cabo la electroforesis, las proteínas deben estar preparadas con un tampón específico, llamado tampón de carga: SDS 2.3%, beta-mercaptoetanol (Sigma) 10%, glicerol (Sigma) 20% y azul de bromofenol (Sigma) 0.005%, en tampón 10 mM Tris-HCl a pH 6.8.

Para la preparación del gel, usamos el sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad), que nos permite preparar nuestros geles a la concentración deseada, combinando los reactivos descritos anteriormente, y con el número de pocillos que sean necesarios, según las condiciones de cada experimento (normalmente 15 pocillos). La electroforesis se lleva a cabo en tampón 25 mM Tris-HCl a pH 8.4 con Glicina 0.19 M (Appllichem) y SDS 0.1% (p/v), sometiéndola a un voltaje constante de 90V.

Una vez finalizada la electroforesis, transferimos las proteínas retenidas en el gel de poliacrilamida a una membrana. Esta membrana puede ser de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amersham) o de PVDF (Inmobilon-P, Millipore), ambas con 0.45 micras de diámetro de poro. El sistema de soporte utilizado nos permite realizar la transferencia sumergida en el tampón de transferencia [glicina 190mM, metanol 20% (v/v) (Scharlau), SDS 0.005%, en 25mM Tris-HCl, pH 8.4], a 310 mA constantes durante 60-120 min. Al terminar la transferencia, teñimos la membrana con solución de Rojo Ponceau's (Sigma), preparado al 0.1% con ácido acético 5% (Panreac) en agua, para poder observar las proteínas transferidas. Después, la lavamos con TPBS [Tween-20 (Sigma) 0.1% (v/v) en PBS] y pasamos a bloquearla con leche desnatada (Bio-Rad) al 5% en TPBS, durante 30-60min a temperatura ambiente. En el caso de usar una membrana de PVDF, es necesario activarla sumergiéndola en metanol antes de usarla para la transferencia y no se puede teñir con la solución de Rojo Ponceau's. Tras el bloqueo, se incuba la membrana con el anticuerpo primario correspondiente en leche al 1% en TPBS, durante toda la noche a 4°C. La concentración y características más relevantes de cada anticuerpo empleado se detallan en la Tabla 1. Al día siguiente, retiramos el exceso de anticuerpo con tres lavados de 5 min de TPBS e incubamos la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente (el cual se encuentra unido a peroxidasa de rábano, HRP, que reaccionará con el reactivo de revelado), durante una hora a temperatura

ambiente. Tras dicha hora de incubación, volvemos a lavar con TPBS para retirar el exceso de anticuerpo secundario. Finalmente, para visualizar las proteínas marcadas, usamos el reactivo Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) que contiene el sustrato de la peroxidasa y, mediante el sistema de captación IQ LAS 4000 MINI GOLD, recogemos la señal quimioluminiscente producida, que será proporcional a la cantidad de proteína específica de la muestra. Por último, la intensidad de las bandas se cuantifica utilizando el software PCBAS v2.0 / LabImage.

Anticuerpo	Especie Huésped	Dilución De Trabajo	Tamaño De Banda	Proveedor
AKT	Conejo	1:1.000	60KDa	Cell Signaling
P-AKT (Ser 473)	Conejo	1:1.000	60KDa	Cell Signaling
P-AKT (Thr 308)	Conejo	1:1.000	60KDa	Cell Signaling
β-ACTINA	Ratón	1:10.000	42KDa	Sigma-Aldrich
β-CATENINA	Conejo	1:1.000	92KDa	Cell Signaling
P-β-CATENINA	Conejo	1:4.000	95KDa	Abcam
CASPASA3 CLEAVED	Conejo	1:1.000	17-19KDa	Cell Signaling
CHOP	Ratón	1:1.000	27KDa	Cell Signaling
FOXO3	Conejo	1:1.000	97kDa	Cell Signaling
p-FOXO3	Conejo	1:1.000	97KDa	Cell Signaling
GAPDH	Conejo	1:10.000	38KDa	Cell Signaling
GRP78 / BiP	Conejo	1µg/ml	78KDa	Cell Signaling
GSK3 CLONE 4G-1E	Ratón	0.5µg/ml	46-51KDa	Millipore
P-GSK-3β (Ser 9)	Conejo	1:1.000	46KDa	Cell Signaling
IRE1α (14 C10)	Conejo	1:1.000	130KDa	Cell Signaling
LC3B	Conejo	1:1.000	14-16KDa	Cell Signaling
mTOR	Conejo	1:1.000	289KDa	Cell Signaling
P-mTOR (Ser 2448)	Conejo	1:1.000	289KDa	Cell Signaling
P62 / SQSTM1	Conejo	1:1.000	60KDa	Cell Signaling
P-P62 (Ser 403)	Conejo	1:1.000	62KDa	Cell Signaling
PS6K	Conejo	1:800	70KDa	Santa Cruz
SAPK-JNK	Conejo	1:1.000	46-54KDa	Cell Signaling
P-SAPK-JNK (Thr 183/Tyr185)	Conejo	1:1.000	47-54KDa	Cell Signaling
UBIQUITIN	Conejo	1:1.000	"smear"	Cell Signaling
P-ULK1 (Ser 757)	Conejo	1:1.000	140-150KDa	Cell Signaling
XBPI	Conejo	1:1.000	29-40KDa	Abcam

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados para la técnica de Western Blot. En esta tabla se detallan los datos más importantes de cada uno. Para su revelado se usan los anticuerpos secundarios de Conejo y Ratón (Cell Signaling) a una concentración 1:10.000; los cuales están unidos a peroxidasa de rábano (HRP).

8. RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción es el proceso por el cual obtenemos ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm), gracias a la enzima transcriptasa inversa. El ADNc es una biomolécula mucho más estable que el ARN, por lo que nos permite un manejo más cómodo y seguro de la muestra. Este ADNc se consigue a partir de un molde de ARN en presencia de un cebador, mediante la actividad de la enzima transcriptasa inversa, que sintetiza una hebra de ADN complementaria y genera un híbrido ARN-ADN, el cual, por degradación del ARN, quedará como ADN monocatenario.

Para la reacción de retrotranscripción, partimos del RNA resuspendido en agua con DEPC (ver Apartado 5.1) y utilizamos el "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystem), que contiene los siguientes reactivos: mezcla de cebadores aleatorios (10X), mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP) (25X), enzima transcriptasa inversa (50 U/ μ l) y tampón de retrotranscripción (10X), que asegura unas condiciones óptimas para el funcionamiento de la enzima. La combinación de los reactivos del kit da lugar a una mezcla de reacción que se mezcla con nuestra muestra de ARNm en proporción 1:1, de manera que cada reactivo queda a una concentración final 1X y la enzima retrotranscriptasa a 2.5 U/ μ l. Por último, en un termociclador (MasterCycler Gradient, Eppendorf), se incuba durante 10 min a 25°C, para permitir la hibridación de los cebadores con sus secuencias complementarias, seguido de 2 horas a 37°C, para que tenga lugar la reacción de retrotranscripción y, en definitiva, sintetice el ADNc a partir del ARNm. Dicho ADNc obtenido se conserva a -20°C hasta su utilización.

Con el fin de comprobar que la cantidad de ADNc obtenida tras la reacción de retrotranscripción es la misma en todas las muestras, se lleva a cabo la amplificación de uno o varios genes *housekeeper* (ej. GAPDH, 18S, beta-Actina) y se comparan los niveles de este gen en todas las muestras.

9. qPCR EN TIEMPO REAL

9.1. Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy utilizada en biología molecular debido a sus numerosas aplicaciones y a su gran sensibilidad. Se denomina RT-PCR cuando se parte de ADNc, obtenido a partir de ARNm mediante retrotranscripción (Apartado 8). A diferencia de otras técnicas convencionales de PCR, en estas PCR cuantitativas (qPCR) a tiempo real, el análisis de las muestras amplificadas se produce durante la misma reacción, monitorizando una señal fluorescente asociada al producto de PCR. En este sentido, la RT-qPCR es una técnica útil para la cuantificación de cantidades muy pequeñas de ARN. Para ello, se utilizan termocicladores que son capaces de amplificar y detectar la fluorescencia simultáneamente, como el termociclador de tiempo-real ABI-Prism 7900 (Applied Biosystems), utilizado en el presente trabajo. Este sistema combina un termociclador, un detector de fluorescencia y un software específico de amplificación.

El método utilizado para cuantificar la expresión de ARNm en este trabajo consiste en el uso de sondas de hidrólisis o sondas *Taqman*, que son sondas de hibridación específicas, es decir, permiten la detección exclusiva de secuencias específicas. Se tratan de oligonucleótidos de 20-24 bases de longitud, que se unen complementariamente a una secuencia interna dentro del fragmento de ADN a amplificar. Estas sondas están marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo donador (*reporter*), como FAM, y en el extremo 3' con un aceptor o sustancia absorbente (*quencher*), normalmente TAMRA, que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. De esta forma, el espectro de emisión del primero ha de solapar con el espectro de absorción del segundo. Mientras que la sonda está intacta, no se detecta fluorescencia ya que la energía se transfiere vía FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transfer*) del fluoróforo de baja longitud de onda en un extremo (*reporter*) al fluoróforo de alta longitud en el otro extremo (*quencher*), apantallando la fluorescencia de baja longitud de onda. Durante la fase de elongación, la sonda que ha hibridado con su secuencia complementaria va a estar unida a una cadena simple de ADN, y flanqueada por cebadores específicos de la secuencia estudio. Cuando la Taq-polimerasa

alcanza la sonda, su actividad exonucleasa 5'-3' libera al fluoróforo donador, cuya fluorescencia puede ser captada al estar separado del *quencher*. Esta fluorescencia es captada por el detector y su intensidad es proporcional a la presencia de secuencias diana en la muestra analizada.

Las reacciones de RT-PCR a tiempo real se caracterizan por el momento en el proceso de amplificación en el que la señal fluorescente se registra como estadísticamente significativa, distinguiéndose del ruido de fondo o fluorescencia *background*. A mayor número de copias iniciales, antes se detectará un aumento significativo en la fluorescencia (Bustin, 2000, 2002; Ginzinger, 2002). Este punto se define como ciclo *threshold* (**Ct**) y siempre ocurre durante la fase exponencial de amplificación. De esta forma la cuantificación no se afecta porque alguno de los componentes de la reacción se vuelva limitante, y los replicados muestran resultados uniformes y reproducibles. La señal registrada se normaliza con la fluorescencia de referencia o calibradores para permitir correcciones en las fluctuaciones de fluorescencia provocadas por cambios en la concentración o el volumen, y se obtiene un valor de Ct para cada muestra. Para la cuantificación de los niveles de ADNc, se ha utilizado el método de comparación de Ct (Ramos et al., 2006), usando un *housekeeper* (GAPDH, normalmente), como gen de referencia. Los valores de Ct fueron calculados con el software proporcionado por Applied Biosystems (SDS 1.7). Según este método, la cantidad de ADNc (unidades de expresión de la diana estudiada), normalizada con el *housekeeper* viene dada por la siguiente ecuación: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

9.2. Procedimiento

Hemos utilizado sondas Taqman suministradas por Applied Biosystems, que ya han pasado previamente controles de calidad, garantizando la especificidad por la secuencia diana y la eficiencia de amplificación. Para llevar a cabo la RT-PCR utilizando estas sondas, preparamos la mezcla de reacción de la siguiente manera: 10µl de Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) (2X), 1µl de Taqman® Gene Expression Assay (Applied Biosystem) (20X), 8µl de agua milliQ y 1µl de ADNc. El vial comercial TaqMan Gene Expresión Assay (20X) ("Sonda Taqman"), contiene los cebadores específicos del gen que

se pretende cuantificar y una sonda Taqman MGB, marcada con FAM™ en el extremo 5' y el quencher en el 3'. La concentración dentro del vial es de 18 µM para cada primer y 5 µM para la sonda.

Una vez preparada esta mezcla de reacción en cada pocillo (V=20µl), en placas de 96 pocillos, realizamos la amplificación en el ABI PRISM Sequence Detection Systems 7900, y el análisis de los resultados se realiza con el programa ABI Prism 7900 SDS Software. Las sondas Taqman y otros cebadores utilizados para cuantificar la expresión de ARNm de los diferentes marcadores analizados en este trabajo se encuentran detalladas en las Tablas 2 y 3.

Sonda Taqman (ratón)	Referencia
ATG5	Mm01187303_m1
ATG7	Mm00512209_m1
DERLIN1	Mm00470296_g1
EDEM2	Mm00467468_m1
GAPDH	Mm99999915_g1
GRP78	Mm00517691_m1
IL1β	Mm00434228_m1
IL6	Mm00446190_m1
LC3	Mm00782868_sH
OS9	Mm00617153_m1
P62	Mm00500417_m1
TNFα	Mm00443258_m1
VEGF	Mm00437306_m1

Tabla 2. Sondas Taqman para RT-qPCR. Sondas utilizadas para la cuantificación de la expresión de los genes de interés.

Gen Diana	Secuencia del Cebador UP	Secuencia del Cebador LO
ATF6	GGACCAGGTGGTGCAGAG	GACAGCTCTGCGCTTTGG
CHOP	CCTAGCTGGCTGACAGAGG	CTGCTCCTTCTCCTTCATGC
sXbp1	GCTTGTGATTGAGAACCAGG	GGCCTGCACCTGCTGCGGACTC

Tabla 3. Cebadores para RT-qPCR. En esta tabla se detallan las secuencias de los cebadores usados para la detección del ARNm de algunos genes estudiados.

10. INMUNOFLUORESCENCIA PARA CÉLULAS DE CULTIVO

Las técnicas inmunocitoquímicas permiten detectar la presencia de moléculas de interés en las células de estudio, gracias a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. En este trabajo hemos realizado estudios de visualización, colocalización y contaje de células, tanto en astrocitos como en neuronas primarias en cultivo. Las células, tras los diferentes tratamientos, se procesan siempre en paralelo, con el fin de minimizar la variabilidad en el inmunomarcaje. Además, en todos los casos, se realizan controles negativos, de manera paralela y omitiendo la incubación con anticuerpos primarios, para demostrar la especificidad de los anticuerpos empleados. En ningún caso, los controles negativos producen inmunotinción, por lo que no existen uniones inespecíficas de anticuerpos secundarios en las muestras estudiadas. A continuación, se describe el protocolo utilizado para la inmunotinción de células de cultivo usando marcajes múltiples con anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos y posteriormente analizados mediante microscopía confocal.

10.1. Marcaje inmunofluorescente múltiple para células de cultivo

Tanto los astrocitos primarios como las neuronas primarias, tras los tratamientos oportunos, se han fijado con paraformaldehído (PFA) 4% (Scharlau), durante 20 min a temperatura ambiente. Tras ello, se realizan 3 lavados con PBS y se mantienen a 4°C, en presencia de PBS + azida sódica 0.02%, hasta su posterior uso. Todos los lavados se realizan durante 10 minutos cada uno, mediante agitación suave. Mientras que las diferentes incubaciones (permeabilización, bloqueo y anticuerpos) se realizan en estático.

En primer lugar, para eliminar los restos de azida sódica, se realizan 3 lavados con PBS y, seguidamente, se lleva a cabo la permeabilización de las membranas celulares, para que los anticuerpos puedan acceder al interior celular. Esta permeabilización se realiza incubando las células, durante 1 hora a temperatura ambiente, con PBT [0.1% Tritón X-100 (v/v), en PBS]. Posteriormente, se realiza una incubación con la solución de bloqueo (5% BSA en PBT), durante 1-3 horas, a temperatura ambiente. Tras este bloqueo, procedemos a la incubación con los anticuerpos primarios, que se realizará en presencia de BSA

1% en PBT, con la concentración adecuada de anticuerpo primario, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizan 3 lavados con PBT y se procede a la incubación con los anticuerpos secundarios, en presencia también de BSA 1% en PBT, durante 1 hora a temperatura ambiente. A partir de este momento, todos los pasos se realizan en oscuridad, ya que los anticuerpos secundarios llevan acoplados los fluorocromos. Después, se realizan 3 lavados con PBT y, en los casos en que se requiera visualizar los núcleos celulares, se realiza una tinción con el fluorocromo azul DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico), incubándolo a una concentración 1/2000 (0.05µg/ml) en PBS, durante 5 min a temperatura ambiente. Este fluorocromo se une de manera específica al ADN en aquellas regiones ricas en A-T. Finalmente, se realiza un lavado de 5 min con PBS y otro con H₂O milliQ, para eliminar las posibles sales que puedan quedar. Por último, se procede a realizar el montaje en un portaobjetos con el medio de montaje *Dako Fluorescent Mounting Medium* (Dako), y se mantienen estas muestras a 4°C, en oscuridad.

10.2. Obtención y procesamiento de imágenes mediante Microscopía Confocal

Las imágenes de fluorescencia se han obtenido con un microscopio de fluorescencia directo Olympus BX-61 para esterología, (NewCast) del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Se trata de un microscopio óptico con un láser como fuente de iluminación, así como un sistema electrónico que permite la obtención de imágenes digitales de Super imágenes (haciendo un barrido del portaobjetos). Hemos utilizado el software VIS para la adquisición de imágenes. Por último, las imágenes digitales se han procesado mediante el programa informático ImageJ.

10.2.1. Cuantificación de neuronas

Para experimentos de toxicidad neuronal optamos por este método en lugar de la citometría de flujo debido a que las neuronas primarias no soportan el proceso de preparación de la muestra para este otro método. Para llevarlo a cabo, se realizan tratamientos de 24-48 horas sobre cultivos primarios de neuronas

(Apartado 2.2), tras lo cual realizamos una inmunocitoquímica, utilizando los anticuerpos MAP2 (Millipore, cuya especie huésped es Conejo y usado a una concentración de 1:1.000) y NeuN (Chemicon, cuya especie huésped es Ratón, usado a una concentración de 1:1.000). MAP2 es una proteína de citoesqueleto, que nos permite visualizar la neurona completa, con todas sus ramificaciones. NeuN es una proteína nuclear, y nos permite reconocer el núcleo neuronal. Los anticuerpos secundarios usados para estos marcadores son Anti-IgG Ratón y Anti-IgG Conejo, ambos de Nanoprobe usados a una concentración de 1:500. Con este marcaje somos capaces de visualizar y cuantificar específicamente las neuronas del cultivo tratado, y comparar el número de neuronas existente tras los tratamientos realizados.

Así pues, para la cuantificación del número de neuronas utilizamos la herramienta "Cell Counter" de ImageJ, en el que contamos las neuronas NeuN+/MAP2+.

11. VISUALIZACIÓN DE COMPARTIMENTOS ACÍDICOS MEDIANTE NARANJA DE ACRIDINA

El naranja de acridina es una tinción capaz de intercalarse en los ácidos nucleicos que presenta propiedades metacromáticas, de manera que dependiendo de a lo que esté unido y de las condiciones de pH en las que se encuentre, es capaz de emitir luz en diferentes longitudes de onda. Así, cuando se une a ADN de doble cadena emite fluorescencia verde, mientras que cuando entra en compartimentos acídicos como el lisosoma, debido a los niveles de pH tan bajos, emite luz naranja. Por ello es un compuesto ampliamente usado para la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo. En nuestro caso nos interesa el análisis del flujo autofágico, y por tanto de los compartimentos acídicos.

Por ello, tras los tratamientos ya descritos en el Apartado 3 en líneas celulares sembradas en lamelas, se procedió a su tinción con este compuesto. Para esto, las células, una vez finalizado el tratamiento apropiado, se lavaron con PBS y se incubaron durante 10 min en oscuridad con un medio de tinción que contiene 0.1 mg/ml de naranja de acridina (Molecular Probes, Alcobendas, España). El excedente se eliminó lavando las lamelas con PBS 3 veces, 5 min cada vez, en

oscuridad. Seguidamente se tomaron las imágenes con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61, Barcelona, Spain) y el software LASX (Leica Application Suite X).

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos de este trabajo se han repetido un mínimo de 3 veces. El método de análisis estadístico varía según las muestras empleadas y se ha desarrollado con los programas Statgraphics v3.1, GraphPad Prism 5 y SPSS.

Para las muestras que se ajustan a una distribución normal, comparamos los datos mediante el test ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido del test de comparación múltiple *Tukey*, si comparamos varios grupos entre sí, o mediante el test "t de Student", si se trata de dos poblaciones independientes. Para los datos que siguen una distribución normal, los resultados mostrados reflejan el valor medio de los experimentos realizados respecto al grupo control, representándose la media del grupo \pm la desviación estándar (SD). Con estas representaciones, podemos conocer la distribución que siguen los datos dentro de cada grupo. Los análisis estadísticos de correlaciones entre variables se han realizado mediante el coeficiente de correlación de Pearson (para datos cuya distribución sigue la normalidad) o desiguados por un análisis de regresión lineal. En cualquier caso, consideramos que las diferencias son estadísticamente significativas cuando obtenemos un valor $p < 0,05$, y mostramos el nivel de significación de la siguiente manera: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) o $p < 0,0001$ (****).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1. ANTECEDENTES

La alteración de la proteostasis representa una de las características del proceso normal de envejecimiento, que alcanza su máxima expresión en las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento como son el Alzheimer y el Parkinson entre otras. Aunque los diferentes agregados de proteínas están muy bien caracterizados desde un punto de vista bioquímico, se desconoce las causas que los originan y la respuesta de las células a la presencia de estos agregados. Las proteínas se ven expuestas a lo largo de su vida a diferentes factores que pueden causar un mal plegamiento y agregación de las mismas, entre los que se incluyen errores traduccionales, presencia de polimorfismos y distintos tipos de estrés que conllevan modificaciones como puede ser la oxidación de las mismas (Morimoto & Cuervo, 2014). Las proteínas mal plegadas suponen una serie de consecuencias negativas para la célula, ya que sus regiones hidrófobas expuestas tienden a la agregación con las regiones hidrófobas de otras proteínas, y estos agregados pueden ser directamente citotóxicos, ya sea mediante la desorganización de las membranas como a través de la interacción con componentes celulares. También suponen una mayor demanda de los sistemas encargados de mantener la proteostasis, con lo que ciertos componentes de estas rutas ven reducida su disponibilidad haciendo que otras proteínas, en principio no relacionadas con las proteínas originalmente mal plegadas, vean comprometida su estabilidad.

Los mecanismos implicados en el mantenimiento de la proteostasis, que abarcan reguladores de la traducción, del plegamiento, tráfico, secreción y degradación proteica, disminuyen su eficiencia a lo largo del envejecimiento del organismo. Las células envejecidas presentan una mayor acumulación de productos proteicos que contienen modificaciones oxidativas tales como carbonilaciones, metioninas oxidadas y glicaciones, así como proteínas agregadas y *cros-linkeadas*, resultando en una disminución de las poblaciones de enzimas catalíticamente activas (Korovila et al., 2017). Esta acumulación de proteínas mal plegadas en individuos envejecidos es un factor importante en la decadencia del tejido y la pérdida de viabilidad. (M. P. Gavilán et al., 2006; Martínez-Vicente et al., 2005).

En este trabajo, y en base a estudios previos de nuestro grupo, nos hemos centrado en el estudio del tejido nervioso, el cual sufre alteración de la proteostasis y neuroinflamación, tanto durante el envejecimiento normal, como en el desarrollo de ciertas enfermedades neurodegenerativas (E. Gavilán, Pintado, et al., 2015; M. P. Gavilán, Castaño, et al., 2009; M. P. Gavilán et al., 2006, 2007; M. P. Gavilán, Pintado, et al., 2009; Pintado et al., 2012, 2017). Sin embargo, un aspecto aún no bien conocido es saber si los mecanismos celulares implicados en el mantenimiento de la proteostasis, tanto en condición basal como en estrés proteico, son similares en todas las células, o, por el contrario, existen diferencias moleculares específicas de células en la respuesta a dicho estrés. En este sentido, es especialmente relevante el estudio en las células microgliales, puesto que la mayor parte de los estudios de los sistemas de degradación de proteínas han sido realizados en neuronas. Hasta donde conocemos este es el primer estudio comparativo realizado de manera simultánea entre microglía y neuronas en relación con la respuesta al estrés proteico inducido por la inhibición del proteasoma (IP). Los resultados obtenidos son relevantes en el contexto del envejecimiento, tanto normal como patológico, donde el estrés proteico es un marcador molecular común.

2. OBJETIVOS

Para avanzar en esta cuestión, hemos estudiado los mecanismos implicados en el mantenimiento de la proteostasis celular en dos líneas inmortalizadas de ratón, una de fenotipo microglial (BV2), y otra de fenotipo neuronal (N2a), analizando las posibles diferencias que existen entre ambas líneas. Además, y como posible continuación futura de este trabajo, hemos iniciado el estudio en cultivos primarios tanto de neuronas como de microglía, con la idea de comprobar si las diferencias observadas en las líneas celulares ocurren de manera similar en un modelo más fisiológico como son los cultivos primarios.

Los objetivos concretos planteados en este trabajo han sido:

1. Estudiar de manera comparativa los sistemas celulares implicados en el mantenimiento de la proteostasis celular en microglía y neuronas sometidas a estrés proteico.

1.1. Implicación de los sistemas de degradación de proteínas en la proteostasis celular.

1.2. Estudio de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y de marcadores del sistema de degradación de proteínas asociado al retículo endoplásmico (ERAD).

1.3. Estudio de la respuesta autofágica.

2. Caracterizar de manera comparativa la implicación de proteínas/vías moleculares que participan en el mantenimiento de la proteostasis en situación de estrés proteico en microglía y neuronas.

2.1. mTOR.

2.2. AKT.

2.3. GSK-3 β .

2.4. FOXO3

2.5. β - catenina.

3. Evaluar la contribución de las diferentes proteínas/rutas en el mantenimiento de la viabilidad celular en situación de estrés proteico.

3.1. mTOR.

3.2. UPR.

3.3. GSK-3 β .

3.4. β - catenina.

3.5. Caseína quinasa 2.

4. Evaluar el efecto de la IP sobre la viabilidad celular de cultivos primarios de microglía y neuronas, y caracterizar los marcadores más relevantes.

RESULTADOS

1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS SISTEMAS CELULARES IMPLICADOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA PROTEOSTASIS CELULAR EN MICROGLÍA Y NEURONAS SOMETIDAS A ESTRÉS PROTEICO

1.1. Implicación de los sistemas de degradación de proteínas en la proteostasis celular

Con la idea de calibrar el peso de los sistemas de degradación de proteínas en el mantenimiento de la proteostasis celular, determinamos en primer lugar y de forma general, cómo afectan diferentes modelos de estrés proteico a la viabilidad de ambas líneas celulares.

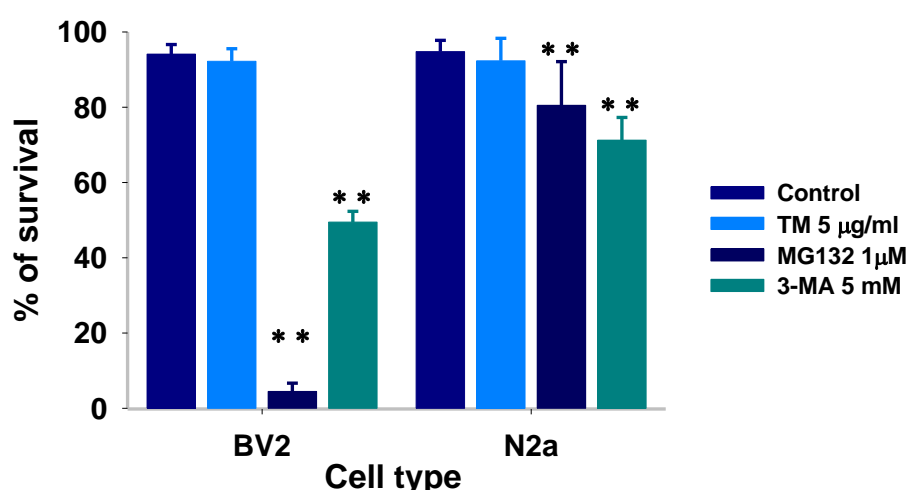


Figura 1. Viabilidad celular frente a diferentes modelos de estrés. En la gráfica se muestran los porcentajes de viabilidad celular obtenidos mediante citometría de flujo tras distintos tratamientos en las líneas celulares BV2 y N2a. TM 5µg/ml. MG132 1µM. 3-MA 5mM. ** p <0.01, con respecto al control.

Como se muestra en la figura 1, el tratamiento con **TM**, un compuesto que produce estrés de RE, no afectó de manera significativa a la viabilidad de ambas líneas celulares durante el tiempo ensayado. Por el contrario, la IP con el compuesto **MG-132** produjo una disminución significativa de la viabilidad celular en ambas líneas, con respecto al control, aunque esta fue más severa en la línea microglial BV2 que en la neuronal N2a. Como se observa en la

gráfica, la viabilidad se redujo hasta el 5% en BV2, mientras que permaneció en torno a un 80% en la línea N2a. Por último, la inhibición de la autofagia con el compuesto **3-MA**, también disminuyó de manera significativa la viabilidad en ambas líneas celulares, siendo significativamente mayor en BV2 que en N2a (50% y 65% en BV2 y N2a, respectivamente).

Estos datos sugieren que tanto el proteasoma como la autofagia juegan un papel relevante en el mantenimiento de la proteostasis celular en la línea neuronal N2a, mientras que la línea microglial BV2 parece ser más dependiente del proteasoma que de la autofagia.

1.1.1. Análisis de la cinética de muerte celular inducida por la IP

En base a los resultados anteriores y considerando que el efecto diferencial más relevante lo obtuvimos con la IP, decidimos caracterizar con mayor profundidad este fenómeno en los dos tipos celulares, analizando para ello la cinética de muerte inducida por MG132. Este estudio nos aportará información sobre la cinética de la sensibilidad en ambas líneas, y así poder estudiar con más detalle los mecanismos celulares implicados en el proceso de muerte celular. Para ello, en estudios piloto, realizamos curvas de supervivencia en presencia de diferentes concentraciones de MG132 (datos no mostrados), eligiendo finalmente la concentración de 1 μ M como la más adecuada, y analizamos la viabilidad celular a diferentes tiempos mediante citometría de flujo.

La IP produjo una disminución moderada pero significativa en la viabilidad celular de la línea N2a a partir de las 6 horas de tratamiento. Sin embargo, en la línea BV2 la disminución fue más severa, siendo significativa a tiempos muy cortos (2 horas de tratamiento; figura 2). En concreto, sobre las 4 horas la mortalidad alcanzó aproximadamente el 50% de la población, llegando hasta el 90-95% entre las 6 y 8 horas. Estos datos nos indican que las células de la microglía son muy sensibles a la IP.

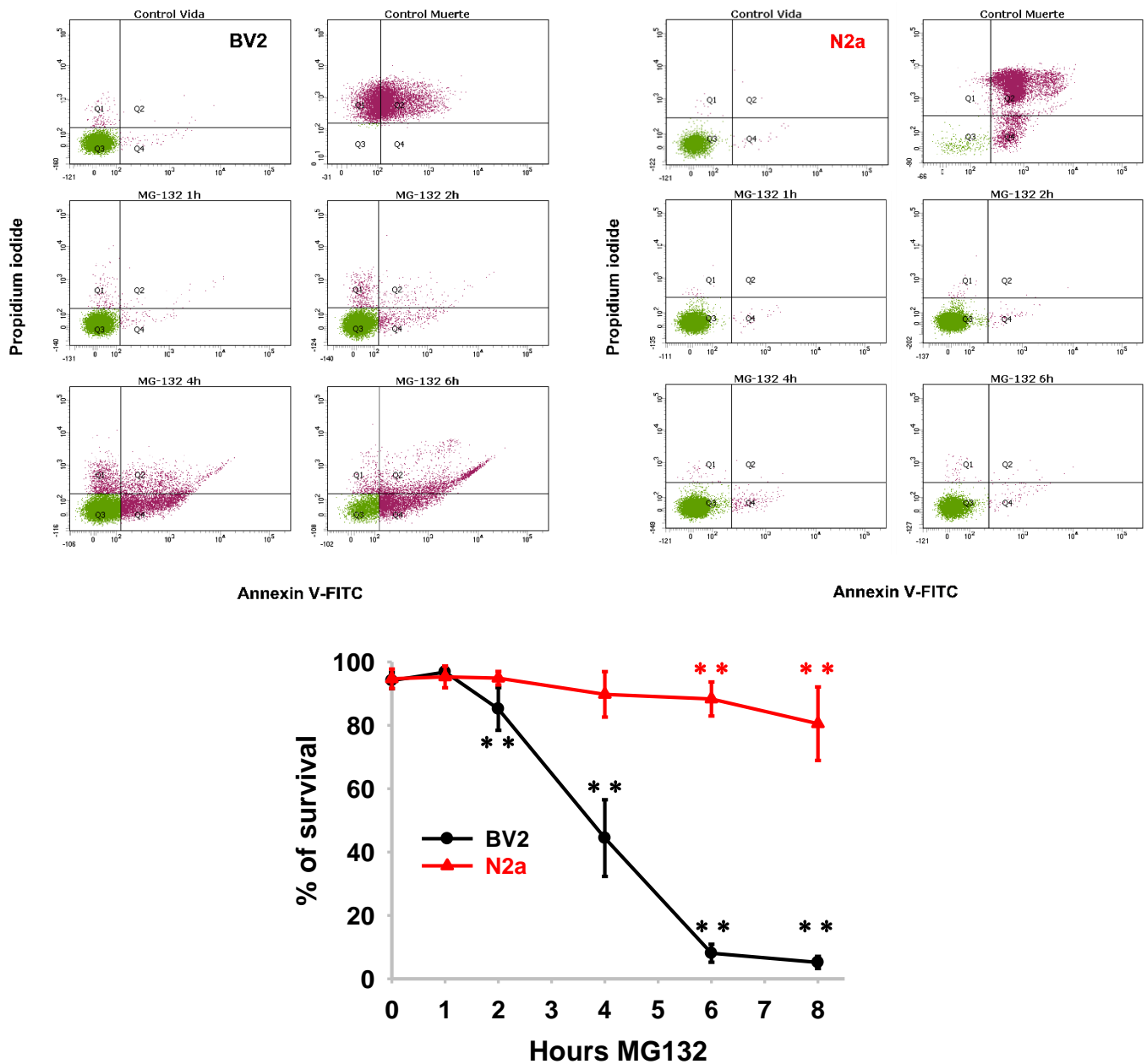


Figura 2. Efecto de la IP sobre la supervivencia celular a lo largo del tiempo. En la imagen superior se muestra la dispersión de los eventos medidos mediante citometría de flujo, correspondiente a las células BV2 (cuadrantes izquierdos) y N2a (cuadrantes derechos). En el cuadrante Q3 de cada gráfica, coloreado de verde, se muestran las células viables, negativas para anexina V y yoduro de propidio. En los cuadrantes Q4 y Q2 se muestran las células en apoptosis temprana y tardía respectivamente, primero positivas para anexina V (marcador de apoptosis) y posteriormente también positivas para yoduro de propidio. En el cuadrante Q1 se muestran las células necróticas, negativas para anexina V y positivas para yoduro de propidio. Todos los cuadrantes que muestran muerte celular se han coloreado de morado. En la parte superior se muestran los controles, no incubados con MG-132. En la parte inferior observamos la supervivencia tras un tratamiento prolongado (6 horas) con $1\mu\text{M}$ de MG-132. En la gráfica se muestra la cuantificación de la viabilidad celular a lo largo del tiempo en ambas líneas celulares incubadas con $1\mu\text{M}$ de MG-132 a diferentes tiempos. Se observa una afectación más temprana y severa en la línea BV2 a diferencia de la línea N2a, que ve reducida su supervivencia de manera significativa, pero de forma más modesta y tardía. ($n > 5$). ** $p < 0.01$, con respecto al control.

Con el fin de conocer el tipo de muerte celular inducida por la IP analizamos el nivel de expresión de caspasa-3 procesada. Como se observa en la figura 3, la línea N2a no mostró procesamiento de caspasa-3 detectable en el rango de tiempo estudiado, posiblemente debido al bajo grado de afectación de estas. Sin embargo, para la línea BV2 la presencia de caspasa-3 procesada fue significativa desde las 4 horas, aumentando en el rango de 4 a 8 horas. Por tanto, los datos bioquímicos corroboran los datos de citometría, y además sugieren que la muerte celular inducida por la IP en la línea microglial podría ser en parte apoptótica.

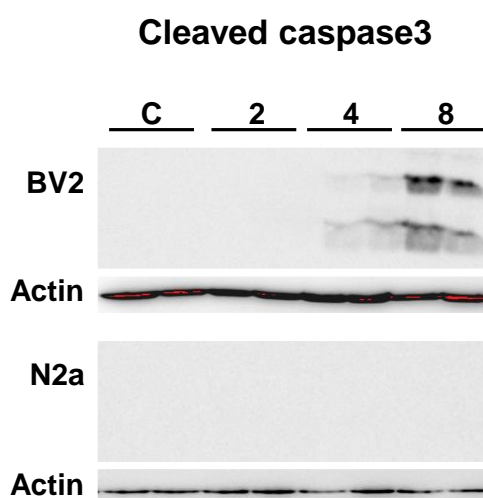


Figura 3. Expresión de caspasa-3 procesada en respuesta a la IP. La detección cualitativa de caspasa-3 procesada se realizó mediante Western blot (WB) en las líneas celulares estudiadas, tras su tratamiento con 1 μ M de MG-132 durante 2, 4 y 8 horas (n>3). Se observa cómo tan sólo en la línea microglial se puede detectar la presencia de caspasa-3 procesada a partir de las 4 horas.

1.2. Estudio de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y de marcadores del sistema de degradación de proteínas asociado al retículo endoplásmico (ERAD)

Resultados previos de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto de manera consistente que la IP, tanto *in vivo* (E. Gavilán, Pintado, et al., 2015; M. P. Gavilán et al., 2006; M. P. Gavilán, Pintado, et al., 2009) como *in vitro* (E. Gavilán et al., 2013), produce estrés de RE y la consiguiente activación de la UPR. Esta respuesta va encaminada en primer lugar a reestablecer la proteostasis, aliviando así la situación de estrés. Sin embargo, si el estrés es muy intenso y/o sostenido en el tiempo, esta misma respuesta puede iniciar el proceso de apoptosis eliminando así las células más dañadas. Dado el efecto

diferencial de la IP sobre la viabilidad celular de las líneas BV2 y N2a mostrado anteriormente, decidimos analizar la cinética de activación de la UPR inducida por la IP.

Como se comenta en la sección de introducción la UPR se activa a través de tres vías. Es por ello que hemos analizado, tanto a nivel transcriptómico como proteómico, marcadores específicos de cada una de las vías de señalización. Los marcadores analizados han sido: **i)** el factor de transcripción procesado Xbp1 (**sXbp1**) para la vía de IRE1 α ; **ii)** la expresión de la chaperona **Grp78/BIP** para la vía de ATF6 α ; y **iii)** la expresión del factor de transcripción pro-apoptótico **CHOP** para la vía de PERK.

1.2.1. Vía IRE-1 α

Como se muestra en la figura 4, la IP produjo una estimulación temprana e intensa del procesamiento del ARNm de *xbp1* en la línea N2a, aumentando la cantidad del ARNm procesado (*sxbp1*) de manera significativa y tiempo dependiente. Por el contrario, en la línea BV2, no se observó la estimulación de este procesamiento, sino que la cantidad *sxbp1* disminuyó significativamente durante la primera hora tras la IP, observándose un modesto, pero significativo aumento a las 4 horas.

La vía de IRE1- α también puede dar lugar a la activación de la quinasa terminal c-jun (JNK), mediante la formación de un complejo IRE1- α -TRAF2-ASK1 (Nishitoh et al., 2002; Urano et al., 2000). El análisis de esta rama de la vía puso de manifiesto que ambas líneas celulares la activan, pero con ligeras diferencias entre ellas. Ambas líneas activaron de manera significativa ambas quinasas (JNK46 y JNK54), sin embargo, en la línea BV2 la estimulación fue similar para las dos quinasas, mientras que en la línea N2a, se estimuló con mayor intensidad JNK46 (figura 5).

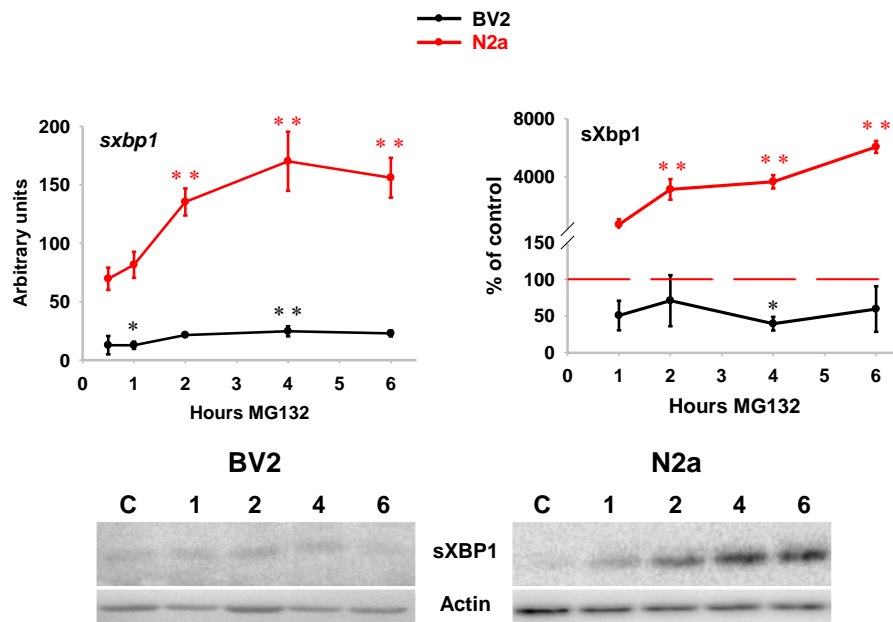


Figura 4. Activación de la rama IRE1 α -sXbp1 en presencia de IP. En la gráfica superior izquierda se muestra la cuantificación del ARNm procesado de Xbp1 (sxbp1) en ambas líneas tratadas con 1 μ M de MG-132 durante 1, 2, 4 y 6 horas. Como se observa se produce un aumento intenso y significativo sólo en la línea neuronal. En la gráfica superior derecha se muestra la cuantificación de la proteína procesada, analizada mediante WB como los mostrados en la parte inferior de la imagen. El análisis transcriptómico y proteómico se realizó de manera simultánea en las mismas muestras (n>3). * p <0.05; ** p <0.01, con respecto al control.

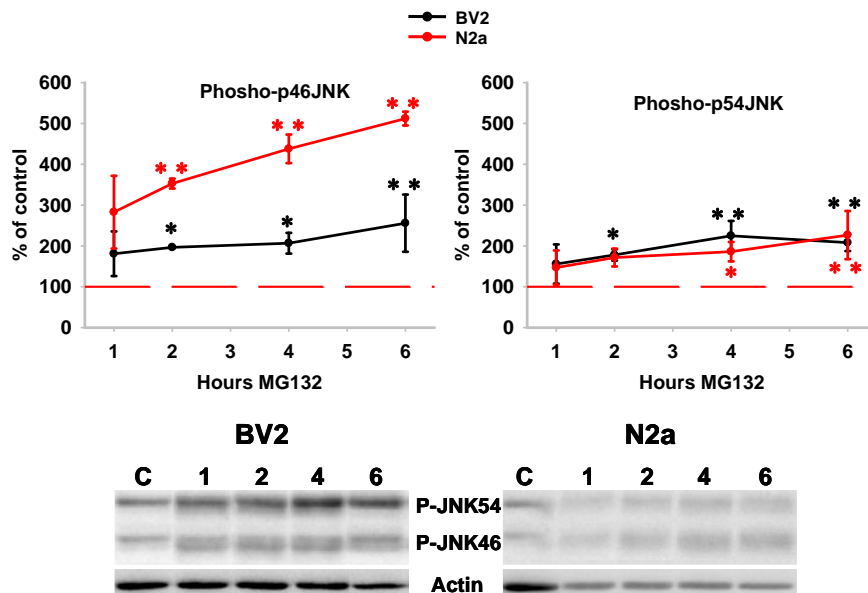


Figura 5. Activación de la rama IRE1- α /TRAF2/ASK1 en presencia de IP. En las gráficas se muestra la cuantificación de las isoformas fosforiladas de la proteína JNK, JNK46 (superior izquierda) y JNK54 (superior derecha), en ambas líneas celulares tratadas con 1 μ M de MG-132 durante 1, 2, 4 y 6 horas y analizadas mediante WB como los mostrados en la parte inferior de la imagen. (n>3). * p <0.05; ** p <0.01, con respecto al control.

1.2.2. Vía PERK

La IP estimuló la expresión transcripcional de *chop* de manera significativa y tiempo dependiente en ambas líneas celulares, con mayor intensidad en N2a que en BV2 (figura 6). Igualmente, a nivel de proteína observamos un aumento significativo en ambas líneas. Sin embargo, este fue más temprano e intenso en la línea BV2.

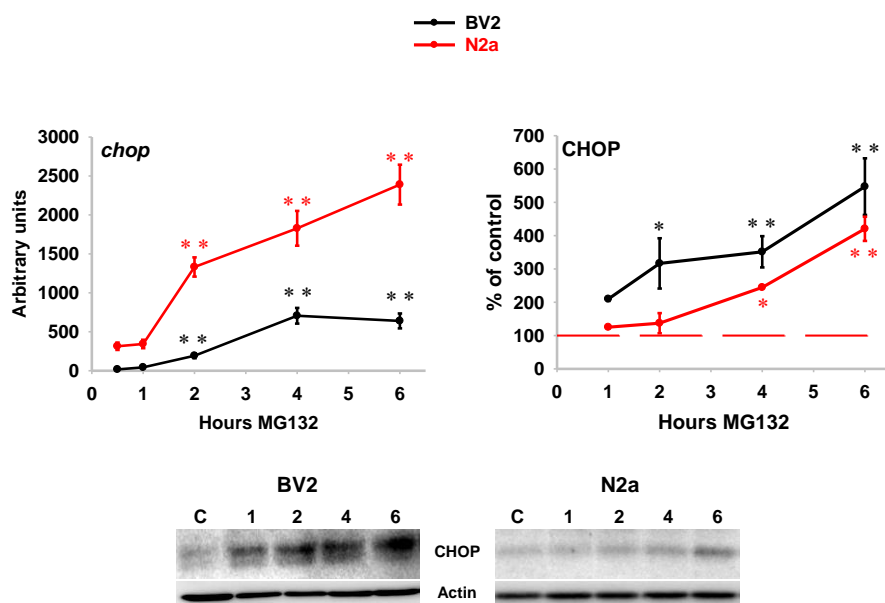


Figura 6. Activación de la vía de PERK en presencia de IP. En la gráfica superior izquierda se muestra la cuantificación del ARNm de *chop* en ambas líneas tratadas con 1 μ M de MG132 durante 1, 2, 4 y 6 horas. Como se observa la cinética de activación fue similar en ambas líneas, pero más intensa en la línea N2a. En la gráfica superior derecha se muestra la cuantificación de la proteína CHOP, analizada mediante WB como los mostrados en la parte inferior de la imagen. El análisis transcriptómico y proteómico se realizó de manera simultánea en las mismas muestras (n>3). * p <0.05; ** p <0.01, con respecto al control.

1.2.3 Vía ATF-6 α

Por último, la expresión de *grp78*, el marcador más característico del estrés de RE, también aumentó de manera significativa y tiempo dependiente en ambas líneas celulares, siendo más intenso en N2a. Sin embargo, el nivel de proteína solo aumentó de manera significativa a las 6 horas, en ambas líneas celulares, siendo mayor en BV2 (figura 7).

En resumen, los resultados indican una actividad transcripcional más intensa en la línea N2a en respuesta a la IP, así como una activación diferente de la UPR en ambas líneas. Mientras que en **N2a** se produce una **activación canónica** con

un claro predominio de la vía de **IRE1 α -sXbp1**, en la línea **BV2** la activación de la UPR no es completa, no activándose la vía IRE1 α -sXbp1, y mostrando un claro predominio de la vía de **PERK-CHOP**.

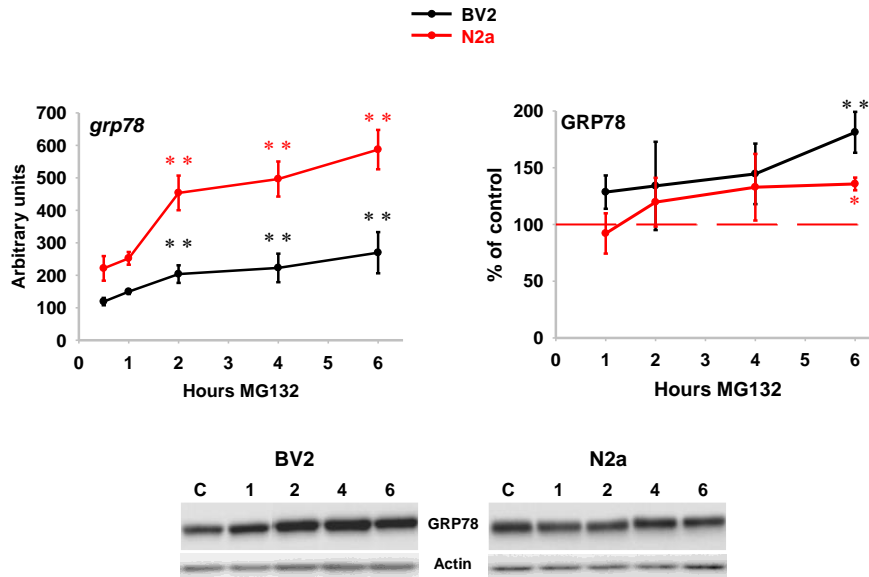


Figura 7. Activación de la vía ATF6 en presencia de IP. En la gráfica superior izquierda se muestra la cuantificación del ARNm de *grp78* en ambas líneas tratadas con 1 μ M de MG-132 durante 1, 2, 4 y 6 horas. Como se observa la cinética de activación fue similar en ambas líneas, pero más intensa en la línea N2a. En la gráfica superior derecha se muestra la cuantificación de la proteína GRP78, analizada mediante WB como los mostrados en la parte inferior de la imagen. El análisis transcriptómico y proteómico se realizó de manera simultánea en las mismas muestras (n>3). * p <0.05; ** p <0.01, con respecto al control.

1.2.4. Relación entre la expresión de marcadores de la UPR y la viabilidad celular

Un aspecto relevante en relación con la activación o no de las diferentes vías de la UPR, es su mayor o menor relación con un perfil más pro- o anti-apoptótico. Por un lado, la vía de IRE1 α -sXbp1 tiene un carácter predominantemente de pro-supervivencia, mientras que la vía de PERK-CHOP se asocia a un perfil más pro-apoptótico (Sano & Reed, 2013).

Como se muestra en la figura 8, nuestros resultados indican una relación inversa entre la activación de la vía de PERK-CHOP y la supervivencia celular. El aumento en la expresión del factor pro-apoptótico CHOP, se relaciona de manera inversa con la supervivencia celular en la línea microglial. En concreto, entre las 2 y las 4 horas se produce una disminución significativa en la viabilidad celular en la línea BV2, coincidiendo con el pico máximo de expresión transcripcional de *chop*, y el aumento progresivo de la proteína. Por el contrario,

a pesar de que la expresión transcripcional de *chop* fue mayor en la línea N2a, no se observó una relación con la muerte celular. Es decir, la viabilidad se mantuvo, mientras que la expresión de *chop* aumentó de manera tiempo dependiente. Estos datos sugerirían que la expresión de *chop* no parece ser el único factor relacionado con la muerte celular.

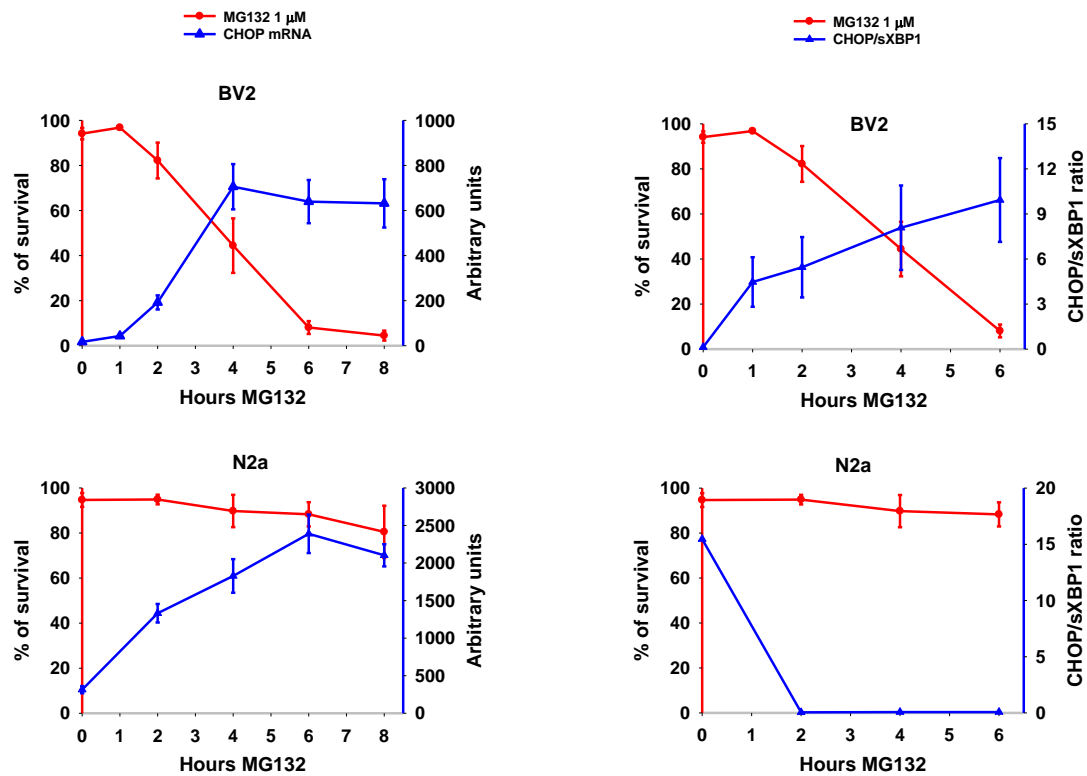


Figura 8. Relación entre la expresión de marcadores de la UPR y la viabilidad celular en respuesta a la IP. Como se muestra en las gráficas, existe una buena relación inversa entre la expresión transcripcional de *chop* y la supervivencia celular en la línea BV2 (gráfica superior izquierda), pero no en la línea N2a (gráfica inferior izquierda), a pesar de que la expresión transcripcional fue casi 3 veces mayor en la línea neuronal que en la microglial. Sin embargo, si se observa una buena relación inversa entre la supervivencia celular y la razón de proteínas pro- y anti-apoptóticas CHOP/sXbp1 tanto en la línea BV2 (gráfica superior derecha), como en la línea N2a (gráfica inferior derecha).

Como se ha comentado anteriormente, la inducción de la UPR implica la activación tanto de vías pro- y anti-apoptóticas. En este sentido, otra de las diferencias observadas entre ambas líneas celulares es el nivel de expresión del factor de transcripción anti-apoptótico sXbp1. La expresión de esta proteína se mantuvo por debajo del nivel control en la línea BV2, mientras que aumentó de forma rápida, intensa y sostenida en el tiempo en la línea N2a. Por lo tanto, si comparamos la razón de proteínas CHOP/sXBP1 (pro-apoptosis/pro-

supervivencia) con la viabilidad celular, observamos una buena relación inversa en ambas líneas celulares (figura 8). Mientras que en BV2 observamos un aumento de la razón y una menor supervivencia, en N2a, observamos una disminución de la razón y una mayor supervivencia. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la diferencia en la cinética de activación de la UPR entre ambas líneas celulares da lugar a diferentes equilibrios entre factores pro- y anti-apoptóticos que podrían determinar en parte el destino celular hacia vida o muerte.

Con la idea de profundizar un poco más sobre la relación entre el balance de factores pro- y anti-apoptóticos y la viabilidad celular en respuesta al estrés de RE, analizamos los mismos marcadores en ambas líneas, pero utilizando TM, una droga que induce de manera más directa estrés de RE.

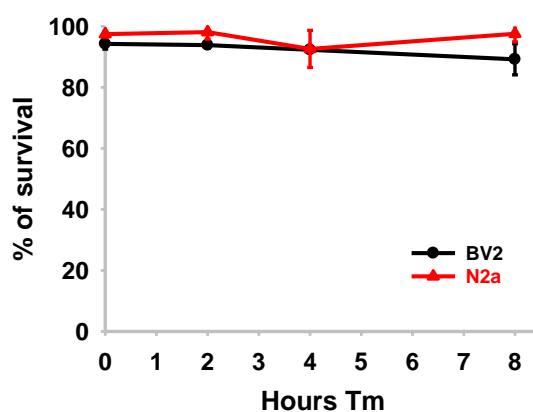


Figura 9. Efecto del tratamiento con TM sobre la supervivencia celular. Mediante citometría de flujo se observa que el tratamiento con TM (5 μ g/ml) a lo largo del tiempo no afecta a la viabilidad celular en ninguno de los tipos celulares estudiados.

Como era de esperar, el estudio cinético confirmó que la incubación con TM no afectó de manera significativa la viabilidad de ninguna de las dos líneas celulares (figura 9), a pesar de producir estrés de RE, como se pone de manifiesto por la activación de la UPR (figura 10).

En este caso, ambas líneas celulares experimentaron una activación canónica de la UPR, pero más tardía que la observada con la IP. La activación de la UPR fue evidente a partir de las 4 horas de incubación, y significativamente diferente

con respecto al control sólo a las 8 horas, indicando que la cinética de activación de la UPR es dependiente del agente estresante (figura 10).

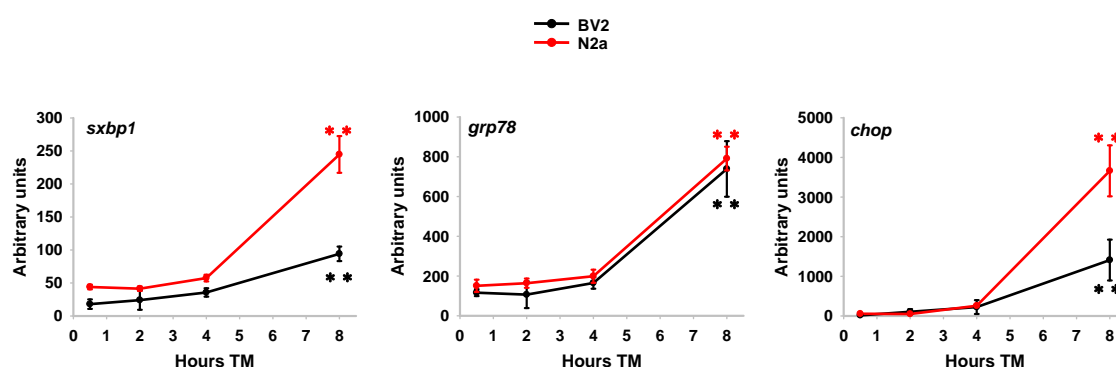


Figura 10. Expresión transcripcional de marcadores de las vías de la UPR mediada por TM. La incubación con TM induce estrés de RE en ambas líneas celulares y produce la activación canónica de la UPR. La expresión de *sxbp1* (gráfica superior izquierda), *grp78* (gráfica superior derecha) y *chop* (gráfica inferior), se indujo de manera tardía y tiempo dependiente en ambas líneas celulares, llegando a ser significativa a las 8 horas. (n>3). ** p <0.01, con respecto al control.

De manera similar a lo observado con la IP, la expresión de *grp78* fue parecida en ambas líneas, mientras que la expresión de *sxbp1* y *chop* varió de una línea a otra. De nuevo, la expresión de ambos marcadores fue significativamente mayor en la línea N2a con respecto a BV2. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la razón *chop/sxbp1* entre ambas líneas celulares, siendo el valor promedio a las 8 horas de 14 y 14.7 para las líneas N2a y BV2, respectivamente.

Por tanto, estos resultados apoyan la idea de que la diferente susceptibilidad a distintas drogas, o de las diferentes líneas celulares a la IP, depende del balance entre mediadores pro- y anti-apoptóticos, consecuencia a su vez de que la activación de la UPR sea o no canónica, y/o de la cinética e intensidad de activación de las diferentes vías.

1.2.5. Caracterización de la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD)

Otro aspecto que analizamos ha sido la ERAD mediante el análisis transcripcional de marcadores componentes de esta vía. Para ello estudiamos la cinética de expresión transcripcional de marcadores específicos como son

edem2 y *os9*, genes que codifican para proteínas implicadas en el reconocimiento de glucoproteínas mal plegadas, y *derlin 1*, que codifica para una proteína de la membrana del RE implicada en la retrotranslocación de ciertas proteínas mal plegadas desde el lumen del RE al citosol (Patel et al., 2020).

En general, como se muestra en la figura 11 la cinética de expresión de los marcadores del ERAD no se modificó de manera significativa, ni con respecto al control, ni entre las dos líneas celulares. Solamente, la expresión de *edem2* mostró una tendencia diferente en BV2 y N2a, alcanzando un ligero pero significativo aumento a las 6 horas, en la línea BV2. Estos datos indican que a diferencia de la UPR la ERAD no parece modificarse, al menos a nivel transcripcional, de manera importante por la IP en ninguna de las dos líneas celulares.

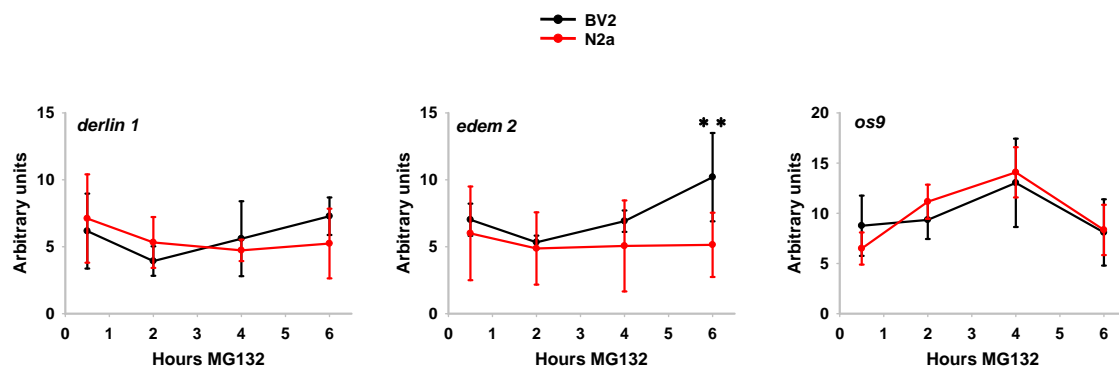


Figura 11. Expresión de marcadores del ERAD. Se muestra la cinética de expresión transcripcional de marcadores del ERAD en las líneas tratadas con 1 μM de MG132 durante 1, 2, 4 y 6 horas. *Derlin 1*, implicada en la traslocación de proteínas mal plegadas, y de las lectinas *edem 2* y *os9*, ambas implicadas en el reconocimiento de glucoproteínas mal plegadas. (n>3). ** p <0.01, con respecto al control.

1.3. Estudio de la respuesta autofágica

El siguiente objetivo que nos planteamos fue estudiar la relación funcional entre el proteasoma y la autofagia (Ruano, 2021). Este punto es de gran relevancia puesto que la restauración rápida y eficiente de la proteostasis es un factor clave para preservar la viabilidad celular como hemos puesto de manifiesto en estudios previos *in vivo* (E. Gavilán, Pintado, et al., 2015; M. P. Gavilán, Pintado, et al., 2009).

1.3.1. La autofagia basal es mayor en las células BV2

En primer lugar, determinamos el estado basal de la autofagia en ambas líneas celulares. Para ello analizamos la expresión del marcador de autofagosomas LC3II y de la proteína implicada en la carga de los mismos, p62. Como se observa en la figura 12, la expresión de ambas proteínas fue mayor en la línea N2a que en BV2. Igualmente, la presencia de compartimentos ácidos, marcados con naranja de acridina, y que se corresponden mayoritariamente con lisosomas/autofagolisosomas, fue más intenso en la línea N2a que en BV2. Estos datos parecen indicar que la actividad autofágica basal es mayor en la línea N2a que en BV2.

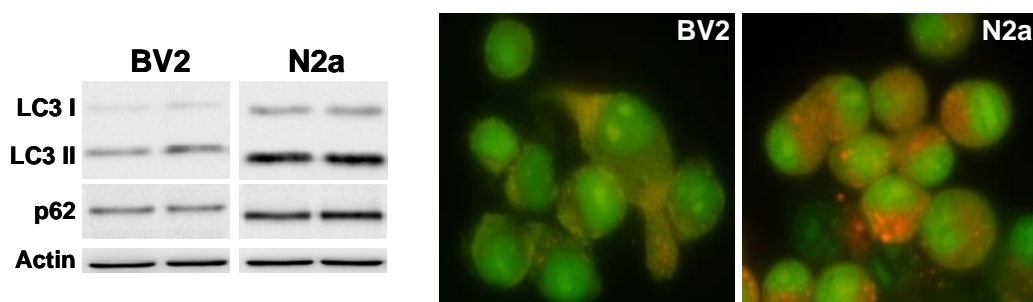


Figura 12. Expresión de marcadores de autofagia en condición basal en las líneas BV2 y N2a. En la parte izquierda de la figura se muestran los niveles de expresión de las proteínas LC3 I y II (marcador de autofagosomas) y de p62, en ambas líneas celulares (n=2). En la figura de la derecha se muestran imágenes de microscopía de las células teñidas con naranja de acridina, marcador de compartimentos ácidos (lisosomas/autofagolisosomas), que se muestran en color naranja.

Sin embargo, como se muestra en la figura 13, el análisis del flujo autofágico basal mediante el bloqueo de la degradación de los autofagosomas con el inhibidor de la bomba de protones de la ATPasa vacuolar bafilomicina A1, produjo la acumulación de las proteínas LC3II y p62 en ambas líneas celulares, siendo mayor en BV2 (8.1 y 2.9 veces con respecto al control, para LC3II y p62, respectivamente), que en N2a (1.5 y 1.3 veces). Por lo tanto, estos datos parecen indicar que el flujo autofágico basal es más rápido en BV2 que en N2a, lo que apoyaría que el nivel de autofagia basal es mayor en la línea microglial.

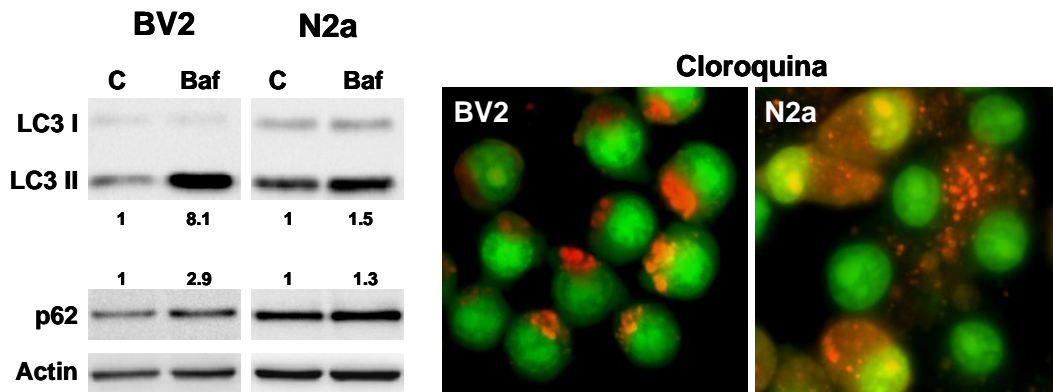


Figura 13. Efecto de la inhibición de la degradación lisosomal sobre la expresión de marcadores de autofagia en las líneas BV2 y N2a. En la parte izquierda de la figura se observan los niveles de proteínas de marcadores autofágicos (LC3 I y II, y p62) en ausencia o presencia de bafilomicina A1, ($n=2$). En la parte derecha se muestran imágenes de microscopía de las líneas tratadas con cloroquina, que impide la fusión del lisosoma y el autofagosoma bloqueando la resolución de la autofagia, tras la tinción con naranja de acridina. En ambos casos se puede observar un mayor efecto de este bloqueo en las células microgliales, indicando que el flujo basal es más rápido en BV2 que en N2a.

1.3.2. La cinética de activación de la autofagia en respuesta a la IP es diferente en ambas líneas celulares

Una vez caracterizado el estado basal de la autofagia, evaluamos cómo afecta la IP a la actividad autofágica en ambas líneas. Para ello, analizamos en primer lugar la expresión transcripcional de varios genes de autofagia. Como se muestra en la figura 14, la IP produjo cambios significativos, aunque de poca magnitud en la expresión de *atg5* (marcador pre-autofagosoma) y *LC3* (marcador autofagosoma).

Ambos genes se expresan de forma más abundante en la línea N2a que en BV2 y solamente se observaron diferencias, modestas pero significativas, en la expresión de *atg5* y *LC3* a las 4 horas en N2a, y de *LC3* a las 4 y 6 horas en la línea BV2. Por el contrario, la expresión de *p62* (marcador de carga del autofagosoma), mostró un efecto claramente dependiente de la línea celular, aumentando su expresión de manera transitoria y significativa en BV2, pero sin modificarla en la línea N2a. Estos resultados indican una regulación transcripcional diferente en ciertos genes de autofagia en respuesta a la IP en ambas líneas celulares.

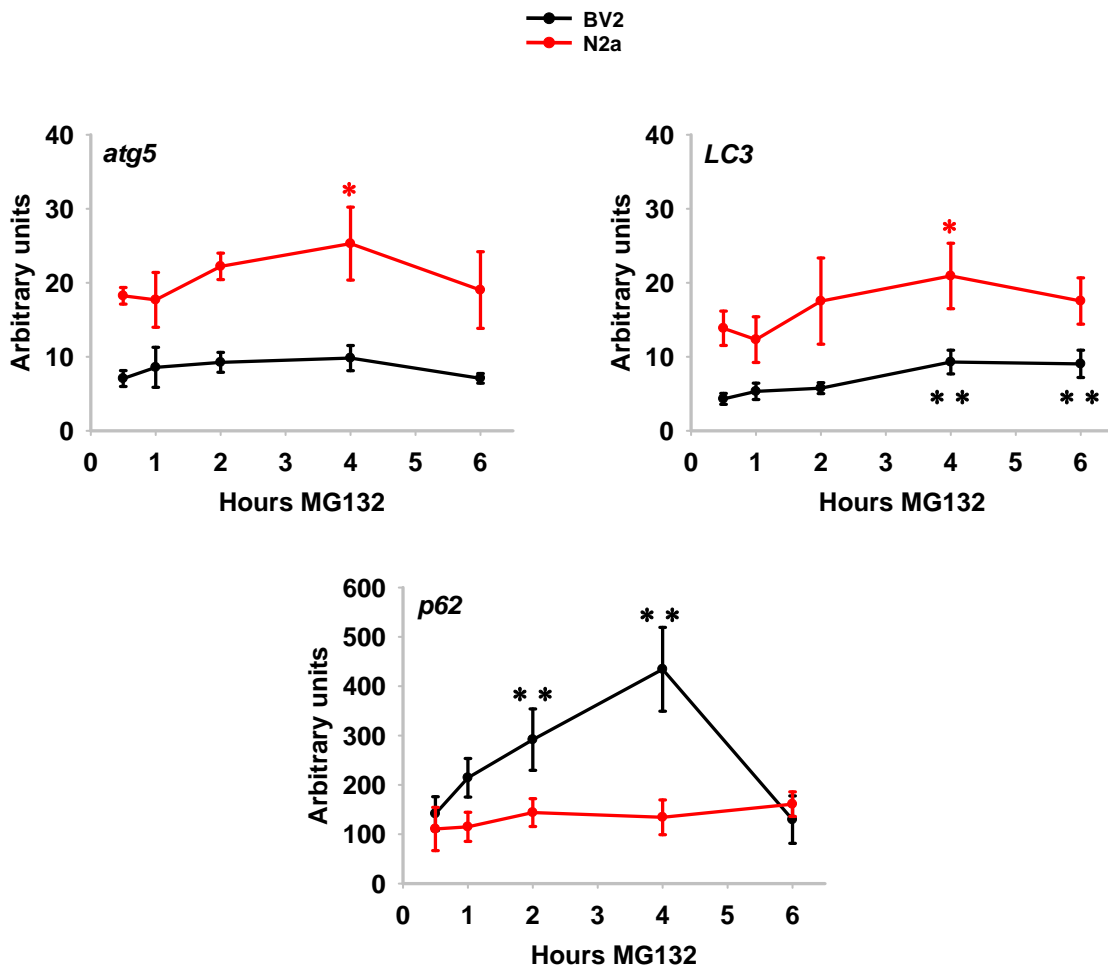


Figura 14. Expresión transcripcional de genes relacionados con la autofagia en respuesta a la IP. En la parte superior se muestra la cinética de expresión de los genes *atg5* (izquierda) y *LC3* (derecha), y en la parte inferior la de *p62*, en las células tratadas con $1\mu\text{M}$ de MG-132 durante 1, 2, 4 y 6 horas. En el caso de *atg5* y *LC3* no se observa un aumento transcripcional importante. En el caso de *p62* aumenta de manera intensa y transitoria solo en BV2. ($n>3$). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, con respecto al control.

Igualmente analizamos la cinética de activación de la autofagia inducida por la IP, mediante el análisis de las proteínas LC3II y p62. La IP modificó de forma tiempo dependiente la cantidad de LC3II en ambas líneas, pero con un perfil diferente. Por un lado, en la línea neuronal se observó un aumento rápido y transitorio en el contenido de LC3II, alcanzando el máximo en la primera hora, para ir descendiendo hasta el valor basal a las 4 horas. Por el contrario, en la línea BV2, la cantidad de LC3II aumentó de manera progresiva en las 4 primeras horas, descendiendo hasta el nivel basal a las 6 horas (figura 15).

Por otro lado, al igual que lo observado a nivel transcripcional, la cantidad de proteína p62 aumentó de manera significativa y tiempo dependiente, con respecto al control, en ambas líneas celulares, siendo más intensa en la línea BV2.

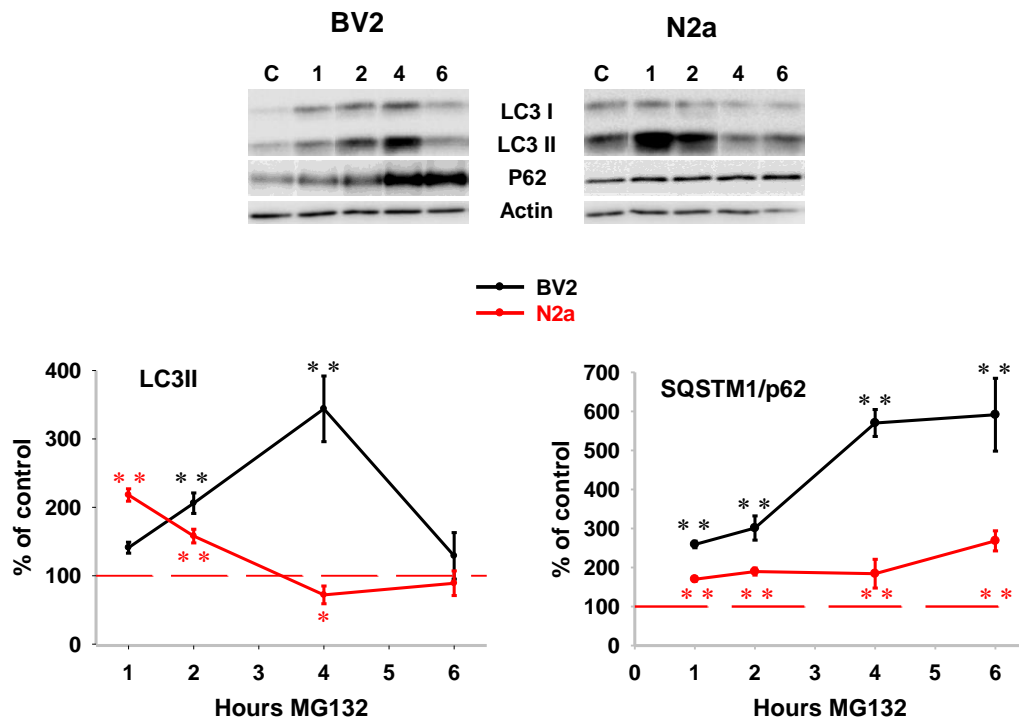


Figura 15. Efecto de la IP sobre la cinética de expresión de las proteínas autofágicas LC3 II y p62. En la imagen superior se muestran WB representativas de la expresión de LC3 I y II (parte superior), y de p62 (parte media) en las células tratadas con $1\mu\text{M}$ de MG-132 durante 1, 2, 4 y 6 horas. Se observa una acumulación más tardía de LC3 II en BV2, entre las 2 y 4 horas, mientras que en N2a esta acumulación es más temprana, en las 2 primeras horas. En cuanto a p62 observamos una acumulación tiempo dependiente en ambas líneas, siendo mucho mayor en BV2. En la parte inferior se muestran las gráficas correspondientes a la cuantificación de los niveles de expresión de ambas proteínas, normalizadas por la expresión de actina, en las dos líneas celulares. ($n>3$). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, con respecto al control.

Estos datos demuestran, al igual que lo observado para la UPR, una cinética de activación de la autofagia diferente en ambas líneas: más rápida en la línea N2a y más lenta, pero más intensa, en la línea BV2.

1.3.3. La proteína p62 no se regula por fosforilación en Ser405 en la línea BV2 en respuesta a la IP

Una diferencia llamativa entre ambas líneas celulares es la acumulación de la proteína p62 que se observa de manera importante en BV2, pero no en N2a

(figura 16). Normalmente, la resolución de la autofagia va acompañada por una disminución en el contenido de LC3 II y p62, puesto que ambas proteínas se incorporan al autofagosoma y son degradadas tras la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma (autolisosoma) (Pankiv et al., 2007). De hecho, la degradación de p62 es considerado como un marcador del aumento del flujo autofágico (Bjørkøy et al., 2009; Mathew et al., 2009).

Como muestran nuestros resultados, la cantidad de LC3 II disminuye entre las 4 y 6 horas, mientras que la de p62 aumenta. Una posible explicación a esta discrepancia podría ser la mayor expresión transcripcional observada para este gen de manera exclusiva en la línea BV2 (figura 15). Sin embargo, otra posible explicación podría ser la existencia de diferencias en la regulación por fosforilación de p62 que comprometa su degradación autofágica. Para abordar esta posibilidad, analizamos el contenido de p62 fosforilada en Ser405 en ambas líneas celulares. Esta modificación pos-traducciona regula la degradación autofágica de las proteínas poli-ubiquitinadas agregadas, las cuales no pueden ser degradadas de manera eficiente por el proteasoma. Estudios moleculares han puesto de manifiesto que la fosforilación en Ser405 aumenta la afinidad de unión entre el dominio asociado a ubiquitina (UBA) de la proteína p62 y los agregados de proteínas poli-ubiquitinadas, promoviendo así la formación de agregomas, su posterior inclusión en el autofagosoma, y finalmente su degradación por la vía autofágica (Matsumoto et al., 2011). Como se observa en la figura 16, el contenido de la proteína p62, fosforilada en Ser405 (fosfo-Ser405-p62), aumentó en la línea N2a de forma temprana, sostenida y con mayor intensidad que en BV2, donde la presencia de fosfo-Ser405-p62, fue prácticamente indetectable en las primeras horas, aumentando ligeramente entre las 4 y 6 horas. Consecuentemente, la razón fosfo-Ser405-p62/p62, aumentó de manera significativa con respecto al control, y se mantuvo constante a lo largo del tiempo ensayado en la línea N2a. Por el contrario, en la línea BV2 esta razón se mantuvo ligeramente por debajo de la condición control, sin llegar a ser significativamente diferente.

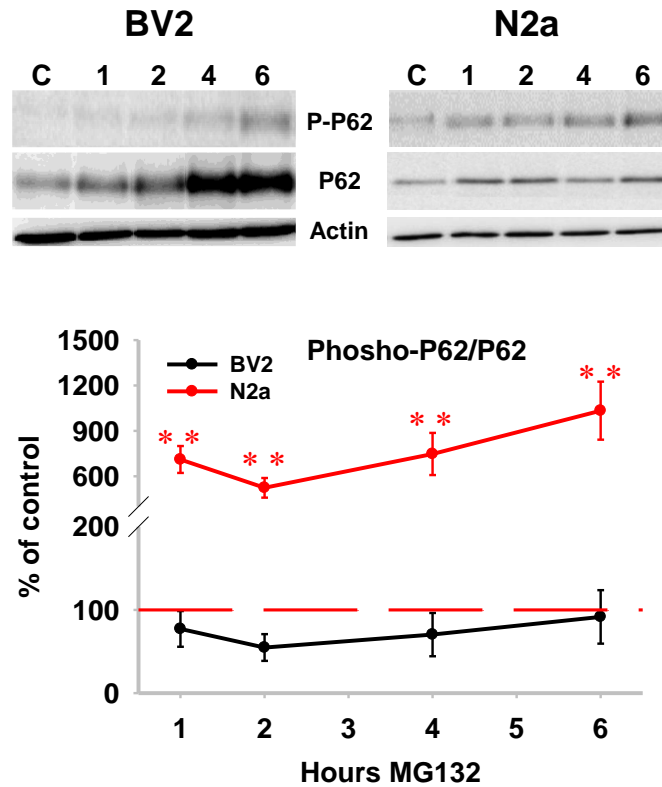


Figura 16. Perfil de expresión de fosfo-Ser405-p62 (P-P62) en respuesta a la IP. En la imagen superior se muestran WB representativas de la expresión p62 fosforilado en Ser405 (parte superior), y de p62 (parte media) en las células tratadas con 1 μ M de MG-132 durante 1, 2, 4 y 6 horas. Se observa la ausencia, o un nivel muy bajo de p62 fosforilado en Ser405 en BV2 frente a una acumulación de p62. En la línea N2a, se observa un aumento sostenido a lo largo del tiempo de p62 fosforilado en Ser405 y la ausencia de acumulación de p62. En la gráfica inferior se muestra la razón entre p62 fosforilado en Ser405 y p62, donde podemos observar que en N2a esta razón es significativamente mayor a todos los tiempos ensayados, mientras que no se modifica en BV2. (n>3). ** p < 0.01, con respecto al control.

El menor nivel de fosfo-Ser405-p62 observado en BV2, podría ser debido a una menor actividad de las quinasas implicadas en esta regulación (Lim et al., 2015; Matsumoto et al., 2011; Pilli et al., 2012). Sin embargo, otra posibilidad podría ser una degradación muy rápida como consecuencia del mayor flujo autofágico que hemos observado en BV2, puesto que como se ha mencionado, tanto la proteína LC3 II como fosfo-Ser405-p62 son degradadas simultáneamente en el autofagolisosoma (Pankiv et al., 2007). Con el fin de evaluar esta posibilidad, analizamos la razón entre LC3 II y fosfo-Ser405-p62 en ambas líneas sometidas a la IP, y a las que se les bloqueó la degradación lisosomal con bafilomicina A1. Como se observa en la figura 17, la razón LC3 II/fosfo-Ser405-p62 aumentó de manera considerable en la línea BV2 tras el bloqueo de la degradación autofágica con bafilomicina A1, en comparación con la IP solamente. Este

aumento en la razón de ambas proteínas se debió principalmente a la acumulación de LC3 II, sugiriendo, que el bajo nivel de fosfo-Ser405-p62 no es debido a una mayor degradación autofágica de la proteína, puesto que se acumula LC3 II pero no fosfo-Ser405-p62. Por el contrario, en la línea N2a, esa misma razón permaneció prácticamente constante, tanto en ausencia como en presencia de bafilomicina A1, indicando que la degradación de LC3II y fosfo-Ser405-p62 ocurre de manera simultánea en esta línea.

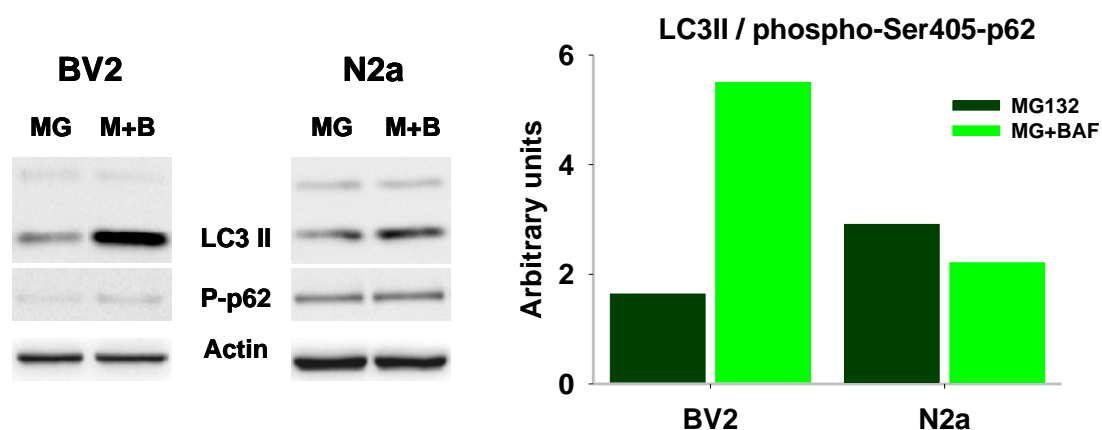


Figura 17. Efecto de la inhibición de la degradación lisosomal sobre las proteínas LC3 II y fosfo-Ser405-p65 en células BV2 y N2a sometidas a la IP. A la izquierda se muestran WB representativas de las proteínas LC3 II (parte superior) y de fosfo-Ser405-p62 (parte media) en células sometidas a la IP con 1 μ M de MG-132 (MG), y células sometidas a la IP y el bloqueo de la degradación lisosomal con bafilomicina A1 con 1 μ M de MG-132 + 1 μ M bafilomicina A1, a las 6 horas. (M+B). En la gráfica de la derecha, se muestra la cuantificación de la razón entre LC3 II y fosfo-Ser405-p62, en ambas situaciones y líneas celulares. Como se puede ver dicha razón se modifica de manera importante en BV2, mientras que permanece constante en N2a.

1.3.4. Las células BV2, pero no las N2a, acumulan proteínas poli-ubiquitinadas de alto peso molecular en respuesta a la IP

Los resultados anteriores sugieren, que a pesar de que la línea BV2 tenga un flujo autofágico basal más intenso que las células N2a, tal vez la carga de los autofagosomas sea menos efectiva en la línea BV2. Para comprobar este punto, analizamos la cinética de eliminación de las proteínas poli-ubiquitinadas en ambas líneas. Estas proteínas de alto peso molecular generalmente dan lugar a la formación de los agrosomas de manera dependiente de fosfo-Ser405-p62. Como se comentó anteriormente, son reconocidas por el dominio UBA de la proteína p62, previa fosforilación en Ser405, para su carga y degradación en los autofagosomas (Lim et al., 2015; Matsumoto et al., 2011). Como se muestra en la figura 18, la IP produjo una acumulación tiempo dependiente de proteínas

poli-ubiquitinadas de alto peso molecular en la línea BV2, mientras que dicha acumulación no se observó en la línea N2a.

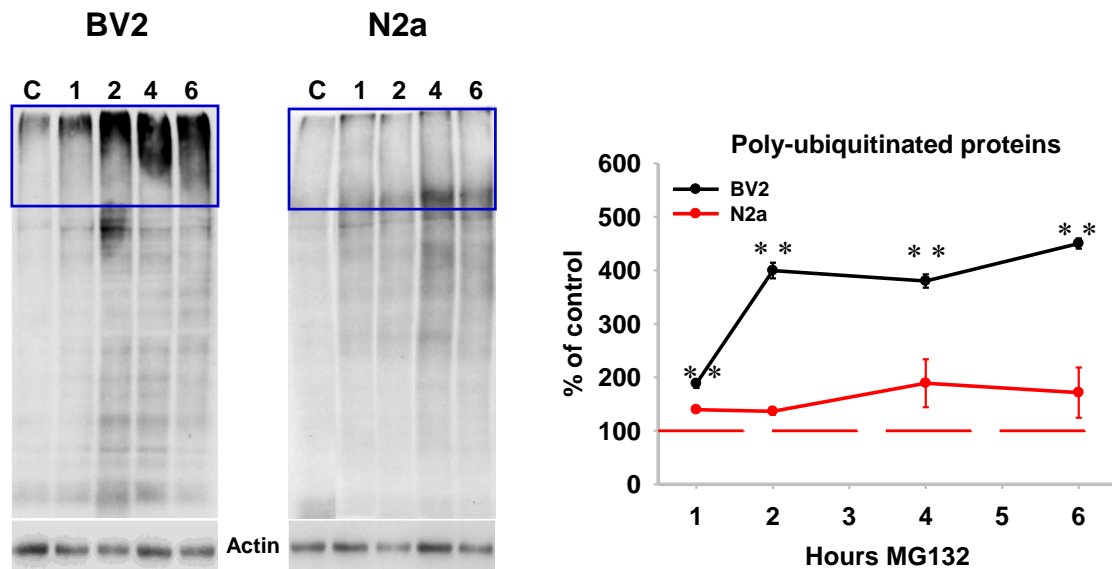


Figura 18. Acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas en células BV2 y N2a sometidas a la IP. En la imagen de la derecha se muestra un WB representativo de las proteínas poli-ubiquitinadas en células tratadas con 1 μ M de MG-132 durante 1, 2, 4 y 6 h. La acumulación fue mayor y tiempo dependiente en la línea BV2, mientras que en la línea N2a, no se observó una acumulación evidente, en particular en las proteínas de alto peso molecular (rectángulo azul). A la derecha se muestra la gráfica de la cuantificación de las proteínas poli-ubiquitinadas de alto peso molecular, incluidas en el rectángulo azul, en ambas líneas celulares. Se observa un aumento significativo, temprano y sostenido en BV2, mientras que en N2a hay un ligero aumento constante sin llegar a ser significativo. La cuantificación de todas las proteínas poli-ubiquitinadas mostró un patrón similar. (n>3). ** p <0.01, con respecto al control.

Por lo tanto, estos datos apoyan de forma sólida que la cooperación funcional entre ambos sistemas de degradación de proteínas es más eficiente en la línea neuronal que en la línea microglial, sugiriendo que la activación de la autofagia en respuesta a la IP en la línea BV2 podría estar encaminada a otra función diferente a la recuperación de la proteostasis.

1.3.5. La estimulación y la inhibición de la autofagia rescata y aumenta la viabilidad celular en respuesta a la IP en las células BV2 y N2a, respectivamente

Con la idea de profundizar un poco más en la cooperación funcional entre ambos sistemas de degradación de proteínas, y en base a los resultados obtenidos, evaluamos el efecto de la rapamicina y el 3-MA, compuestos que

activan e inhiben respectivamente a la autofagia, sobre la viabilidad celular en respuesta a la IP. De acuerdo con la cinética de viabilidad observada anteriormente, los experimentos se realizaron a un único tiempo de 6 y 8 horas en la línea BV2 y N2a, respectivamente.

Como se observa en la figura 19, a pesar del mayor flujo autofágico que presentan las células BV2 en situación basal, la rapamicina estimuló aún más el flujo autofágico (ver inserto en la figura 19), y no afectó a la viabilidad celular en la condición basal. Además, la estimulación de la autofagia en situación de estrés proteico produjo un rescate parcial, pero significativo, de la muerte celular inducida por la IP en BV2. En concreto, la supervivencia pasó de un 8% a un 32% en ausencia y en presencia de rapamicina, respectivamente.

Por el contrario, la inhibición de la autofagia con 3-MA en la línea N2a, afectó de manera significativa a la viabilidad celular basal, reduciéndola en un 30% como ya mostramos en la figura 1. Sin embargo, la inhibición de la autofagia a la vez que la IP, disminuyó de forma más severa y significativa la viabilidad de las células N2a, pasando de un 82% a un 38%, en ausencia y en presencia de 3-MA, respectivamente. Estos resultados apoyan de manera indirecta la idea de que la autofagia en la línea BV2 es más rápida pero menos eficiente en el mantenimiento de la proteostasis celular con respecto a la línea neuronal N2a.

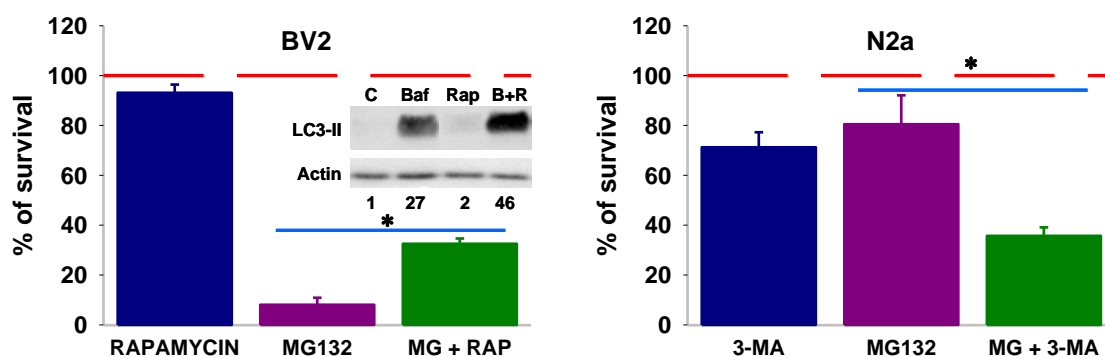


Figura 19. Efecto de la estimulación o inhibición de la autofagia sobre la viabilidad celular en BV2 y N2a sometidas a la IP. En la gráfica de la izquierda se muestra el efecto de la estimulación de la autofagia con rapamicina en células BV2 sometidas a la IP. La rapamicina aumentó parcialmente la supervivencia celular de manera significativa en BV2. En el inserto se muestra la expresión de LC3 II, en células controles y tratadas con bafilomicina (Baf), y en células tratadas con rapamicina (Rap) y Rap más Baf, para comprobar que la rapamicina aumenta el flujo autofágico de manera significativa a pesar de que las células BV2 tengan un flujo basal muy elevado. En la gráfica de la izquierda se muestra el efecto de la inhibición de la autofagia con 3-MA en células N2a sometidas a la IP. La inhibición de la autofagia disminuye aún más y de manera significativa la supervivencia celular en la línea N2a. (n=3). * p <0.05, con respecto al tratamiento con MG-132.

2. CARACTERIZACIÓN COMPARATIVA DE PROTEÍNAS/VÍAS MOLECULARES QUE PARTICIPAN EN EL MANTENIMIENTO DE LA PROTEOSTASIS EN SITUACIÓN DE ESTRÉS PROTEICO EN MICROGLÍA Y NEURONAS

En base a las diferencias observadas entre las dos líneas celulares en relación con la actividad autofágica en respuesta a la IP, decidimos evaluar diferentes vías celulares que pudieran estar implicadas en la regulación de dicha actividad en situación de estrés proteico. El interés de este punto consiste en conocer si existen diferencias entre las posibles vías que pudieran participar en la regulación de la autofagia en las dos líneas celulares. En concreto nos centramos en el estudio de las proteínas: mTOR, GSK-3 β , Akt, FOXO3a y β -catenina.

2.1. mTOR

La proteína mTOR es un regulador importante de la actividad autofágica en situación de escasez nutricional, que puede actuar a varios niveles tales como regular la expresión de ULK1 y Atg13, o la translocación nuclear del factor de transcripción TFEB, tras su activación en la superficie del lisosoma, entre otras acciones (Saffig & Puertollano, 2021). Como se comenta en la sección de Introducción, la fosforilación de mTOR en diferentes residuos, puede dar lugar a la activación o inhibición de su actividad serina/treonina quinasa, regulando positiva o negativamente la activación de la autofagia. Por lo tanto, con la idea de conocer de forma general el estado de activación de mTOR en ambas líneas celulares, analizamos el grado de fosforilación en Ser2448 en respuesta a la IP. Esta fosforilación está mediada por la quinasa AKT y produce la activación de la quinasa mTOR, regulando negativamente la autofagia. Como se muestra en la figura 20, la IP en la línea BV2 produjo una disminución transitoria y significativa en la cantidad de mTOR fosforilado en Ser 2448 entre las 2 y las 4 horas, sugiriendo la inactivación transitoria de mTOR, la cual recupera su nivel basal a las 6 horas. Por el contrario, en la línea N2a la IP produjo una disminución más temprana, significativa y sostenida en el tiempo en la cantidad de proteína

mTOR fosforilada en Ser 2448, sugiriendo su inactivación a lo largo del tiempo ensayado.

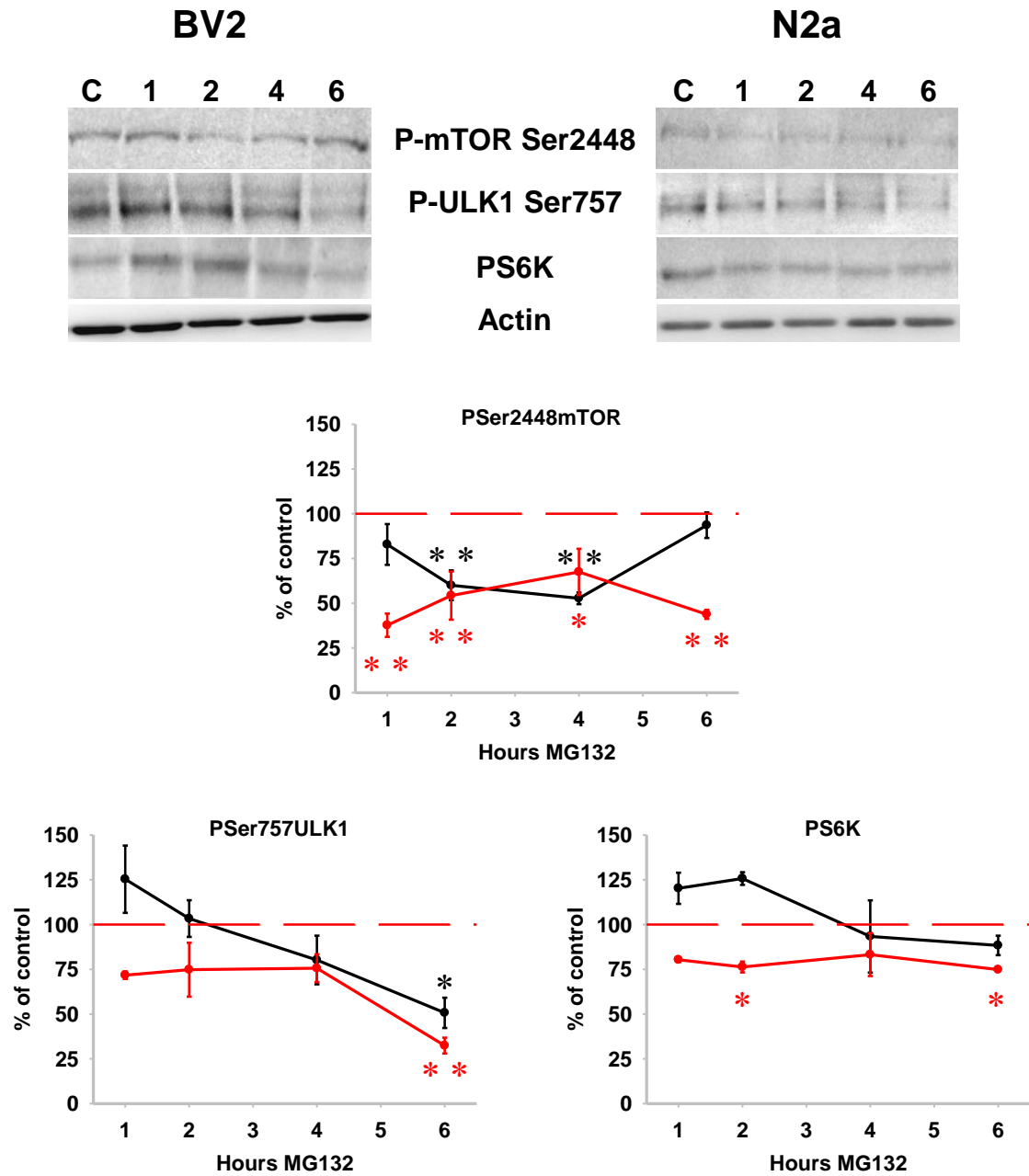


Figura 20. Estado de fosforilación de mTOR y sus dianas ULK1 y S6 en respuesta a la IP. En la parte superior se muestra un WB representativo del estado de fosforilación en Ser2448 de la quinasa mTOR (superior), así como el estado de fosforilación de dos de sus proteínas dianas como son ULK1 (medio) y S6K (inferior), en células tratadas con 1 μ M MG-132 durante 1, 2, 4, y 6 horas. En las gráficas de la parte inferior se muestran las cuantificaciones de las diferentes proteínas, presentadas por líneas celulares: fosfo-Ser2448-mTOR (superior), fosfo-Ser757-ULK1 (inferior izquierda) y fosfo-S6K (inferior derecha). (n>3). * p <0.05, ** p <0.01, con respecto al control.

Sin embargo, estudios recientes indican que los resultados de fosforilación de mTOR en Ser2448, deben ser considerados con cautela, dada la complejidad en la regulación de esta proteína (Figueiredo et al., 2017). Es por ello, que analizamos también el estado de fosforilación de proteínas dianas de mTOR como son S6K y ULK1. Como se muestra en la figura 20, la cantidad de proteína fosforilada de S6K y ULK1 se mantuvo por encima del valor control para ambas proteínas en BV2 durante las primeras 4 horas, disminuyendo de manera significativa a las 6 horas solamente ULK1. Por el contrario, en la línea N2a ambas proteínas se mantuvieron por debajo del valor control durante todo el tiempo ensayado, siendo significativa a partir de las 4 horas para fosfo-S6K y a las 6 horas para fosfo-ULK1.

En conjunto, estos resultados sugieren que la IP no produce una inactivación intensa y sostenida de la proteína mTOR, lo que indicaría que mTOR no tendría un papel relevante en la activación de la autofagia en respuesta a la IP. No obstante, aunque modesta si observamos diferencias entre ambas líneas celulares con una mayor implicación en la línea N2a.

2.2. AKT

La proteína AKT es una Ser/Thr proteína quinasa que desempeña funciones esenciales en la respuesta celular a factores de crecimiento y frente a situaciones de estrés. Puesto que la proteína AKT puede fosforilar directamente a mTOR (Sekulic et al., 2000), o a sus proteínas reguladoras TSC1/2 (J. Huang & Manning, 2008; Inoki et al., 2002), regulando de manera indirecta su actividad quinasa, analizamos el nivel de fosforilación de AKT en ambas líneas sometidas a la IP. La actividad de la proteína AKT está regulada principalmente por fosforilación en 2 residuos: Ser473 y Thr308, siendo completamente activa cuando ambos residuos están fosforilados. La fosforilación en Thr308, catalizada por PDK1, es imprescindible para que la proteína tenga actividad quinasa, mientras que la fosforilación en Ser473, catalizada principalmente por mTORC2, la estabiliza, facilitando así la fosforilación en Thr308 (Pearce et al., 2010). Como se muestra en la figura 21, ambas líneas presentaron un comportamiento inverso en relación con la fosforilación de AKT.

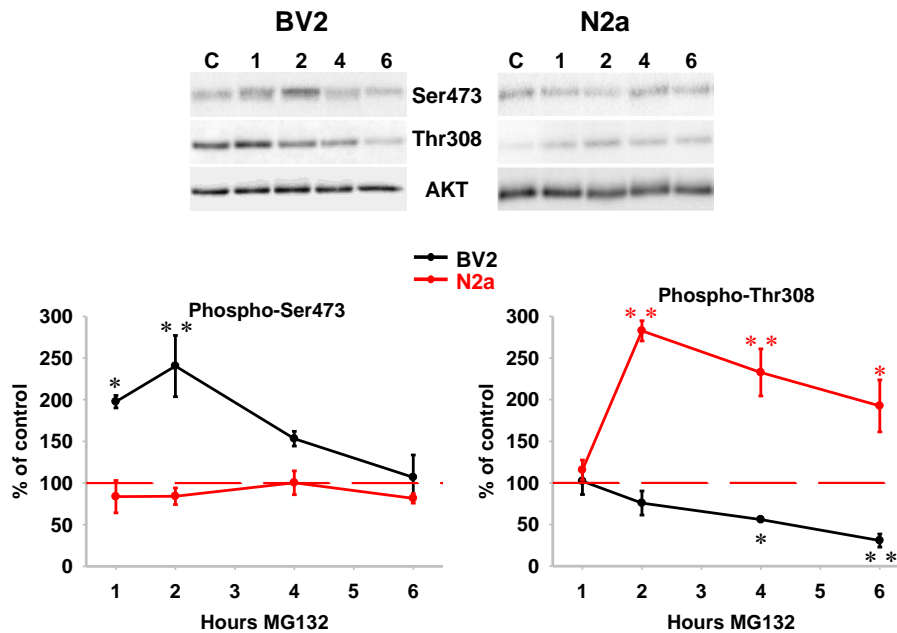


Figura 21. Perfil de fosforilación de AKT en respuesta a la IP. En la parte superior se muestra un WB representativo del estado de fosforilación de la proteína AKT, analizado mediante el estudio de la fosforilación en los residuos Ser473 (superior) y Thr308 (medio), en células tratadas con $1\mu\text{M}$ de MG-132 durante 1, 2, 4, y 6 horas. En las gráficas de la parte inferior se muestra la cuantificación de las diferentes formas fosforiladas de AKT presentadas por líneas celulares: fosfo-Ser473 (izquierda) y fosfo-Thr308 (derecha). ($n>3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, con respecto al control.

En la línea BV2, la IP produjo un aumento rápido y significativo en la fosforilación en Ser473, catalizada por mTORC2, que se mantuvo hasta las 4 horas, volviendo al nivel basal a las 6 horas. Sin embargo, la fosforilación en Thr308 experimentó una disminución tiempo dependiente con respecto al control, siendo significativa a partir de las 4 horas. Por el contrario, en la línea neuronal N2a la IP aumentó de manera significativa, más tardía y sostenida la fosforilación en Thr308, catalizada por PDK1, desde las 2 a las 6 horas, sin modificar de manera significativa la fosforilación en Ser473. Estos resultados sugieren que la respuesta a la IP por parte de esta proteína es opuesta en ambas líneas celulares: mayor y menor actividad AKT en la línea N2a y BV2, respectivamente. Además, sugieren la **activación de PDK1, y no de mTORC2**, en N2a, y la **activación de mTORC2 e inactivación de PDK1** en BV2.

2.3. GSK-3 β

Como se comenta en el apartado de Introducción, otra proteína implicada en la regulación de la autofagia es la quinasa GSK-3. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la inhibición de la actividad de GSK-3 β produce

activación de la autofagia en células tumorales (E. Gavilán et al., 2013; E. Gavilán, Giráldez, et al., 2015), una relación que también sugieren estudios *in vivo* (E. Gavilán, Pintado, et al., 2015). Además, esta quinasa también regula por fosforilación al complejo TSC1/2 (Evangelisti et al., 2020; J. Huang & Manning, 2008) y es sustrato de la quinasa AKT. Por todo ello, investigamos su estado de activación en respuesta a la IP. Un aspecto que nos llamó la atención con respecto a esta proteína es la mayor abundancia de la isoforma GSK-3 α en la línea BV2, y de la isoforma GSK-3 β en la línea N2a. Sin embargo, actualmente desconocemos la posible relevancia fisiológica que pudiera tener este hecho.

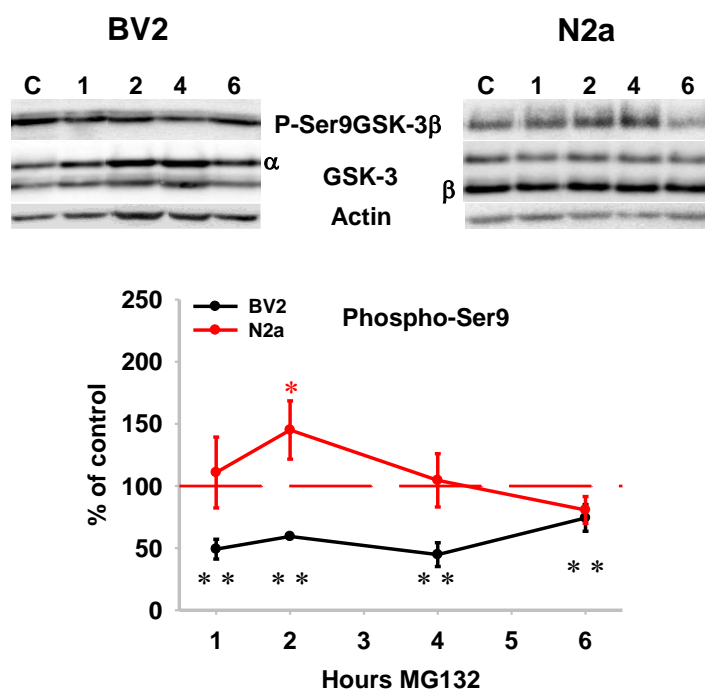


Figura 22. Efecto de la IP sobre la fosforilación de GSK-3 β en Ser9. En la parte superior se muestra un WB representativo del estado de fosforilación de la proteína GSK-3 β , analizado mediante el estudio de la fosforilación en el residuo de Ser9 (superior), así como el contenido de GSK-3 α / β (medio) en células tratadas con 1 μ M de MG-132 durante 1, 2, 4, y 6 horas. En la gráfica de la parte inferior se muestra la cuantificación de la forma fosforilada en Ser9. Nótese la activación sostenida en la línea BV2. (n>3). * p < 0.05, ** p < 0.01, con respecto al control.

Como se observa en la figura 22, la línea BV2 mostró una disminución significativa, temprana y sostenida, en el contenido de GSK-3 β fosforilada en Ser9, mientras que en la línea N2a, se observó un aumento temprano y transitorio en el contenido de GSK-3 β fosforilada en Ser9, siendo significativo a las 2 horas. Estos resultados serían compatibles con la menor actividad quinasa AKT observada en BV2 y la mayor actividad en N2a, e indicarían una actividad sostenida de la proteína GSK-3 β en la línea BV2 y una inhibición transitoria en la línea N2a.

2.4. FOXO3

La proteína FOXO3 juega un papel muy relevante en la regulación de la proteostasis celular, estimulando tanto la autofagia como la actividad del proteasoma, con resultados muy diversos en función del tipo celular, la situación metabólica o el estado de desarrollo (Webb & Brunet, 2014). En el caso concreto de la autofagia, la presencia de FOXO3 estimula la actividad autofágica actuando a diferentes niveles (Audesse et al., 2019; Zhao et al., 2007). Los niveles de FOXO3 están regulados en parte por fosforilación por AKT, lo que produce su exportación desde el núcleo y posterior degradación en el citosol, regulando a la baja su actividad transcripcional. Es por ello que analizamos los niveles de FOXO3 y fosfo-FOXO3 en ambas líneas celulares.

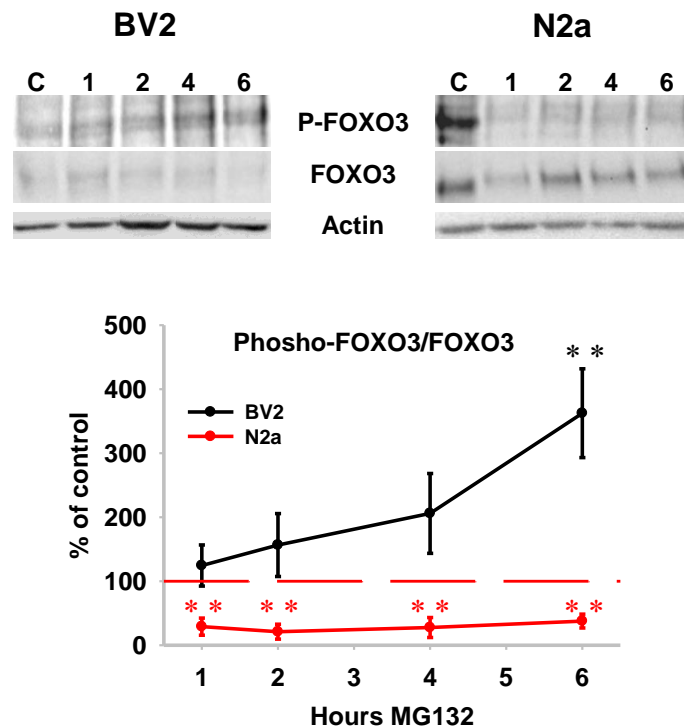


Figura 23. Efecto de la IP sobre la fosforilación de la proteína FOXO3. En la parte superior se muestra un WB representativo del estado de fosforilación de la proteína FOXO3, analizado mediante el estudio de la fosforilación en el residuo Thr32/Ser253/Ser315 (superior), así como el contenido de FOXO3 (medio) en células tratadas con 1 μ M de MG-132 durante 1, 2, 4, y 6 horas. En la gráfica de la parte inferior se muestra la cuantificación de la razón fosfo-FOXO3/FOXO3. Nótese la activación sostenida en la línea N2a ($n > 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, con respecto al control.

Como se muestra en la figura 23, la IP produjo un aumento tiempo dependiente en la razón fosfo-FOXO3/FOXO3 en las células BV2, siendo significativa a las 6 horas. Sin embargo, en la línea N2a se observó una disminución significativa, temprana y sostenida de dicha razón, traduciéndose en una disminución de la proteína FOXO3 en la línea BV2 y su mantenimiento en la línea N2a. Estos

resultados indican que la IP produce la activación sostenida de la proteína FOXO3 en la línea neuronal, y una inactivación tiempo dependiente en la línea microglial.

2.5. β -catenina

Finalmente, analizamos el estado de activación de otra proteína implicada en la regulación de la autofagia, como es la proteína de la vía Wnt/ β -catenina (Petherick et al., 2013). Esta proteína es además diana de GSK-3 β , la cual estimula su degradación tras fosforilarla. Como se observa en la figura 24, la IP en la línea BV2 produjo un aumento significativo y tiempo dependiente en el contenido de β -catenina, que no se observó en la línea N2a. Además, la cantidad de β -catenina fosforilada experimentó un aumento similar en ambas líneas celulares durante las 2 primeras horas, seguida luego de una disminución brusca en la línea BV2, a pesar de que la proteína GSK-3 β se mantuvo activa durante todo el periodo ensayado.

Por el contrario, en la línea N2a la cantidad de β -catenina fosforilada siguió aumentando de manera tiempo dependiente, manteniéndose constante la cantidad de β -catenina total. Estos resultados sugieren que la IP produce la estabilización y acumulación de β -catenina en la línea BV2 y no en N2a, apoyando la activación sostenida de esta vía en las células microgliales.

Para comprobar de manera indirecta si la acumulación de β -catenina en las células BV2 es funcional, es decir se transloca al núcleo y estimula la transcripción de sus genes dianas, analizamos la expresión de 2 genes controlados por β -catenina como son el factor de crecimiento del endotelio vascular (*vegf*) (X. Zhang et al., 2001) y la interleucina 6 (*IL-6*) (Longo et al., 2002). Como se muestra en la figura 25, la expresión transcripcional de ambos genes aumentó en la línea BV2 a todos los tiempos ensayados, mientras que en la línea N2a la expresión de *vefg* no se vio modificada y la de *IL-6* disminuyó con respecto al control.

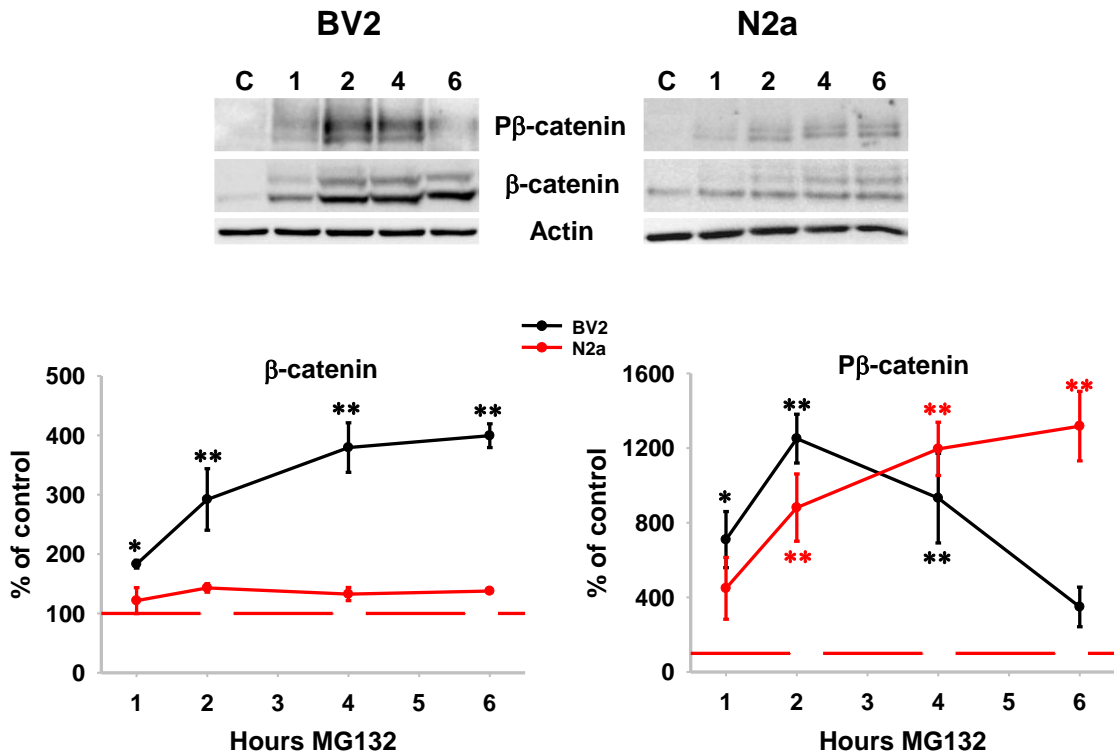


Figura 24. Estado de la proteína β-catenina en respuesta a la IP. En la parte superior se muestra un WB representativo del estado de fosforilación de la proteína β-catenina, analizado mediante el estudio de la fosforilación en los residuos Ser33/Ser37/Thr41 (superior), así como el contenido de β-catenina, en células tratadas con 1 μM de MG-132 durante 1, 2, 4, y 6 horas. En las gráficas de la parte inferior se muestran las cuantificaciones de β-catenina (izquierda) y de fosfo-β-catenina (derecha). Nótese el aumento tiempo dependiente de β-catenina en BV2. (n>3). * p <0.05, ** p <0.01, con respecto al control.

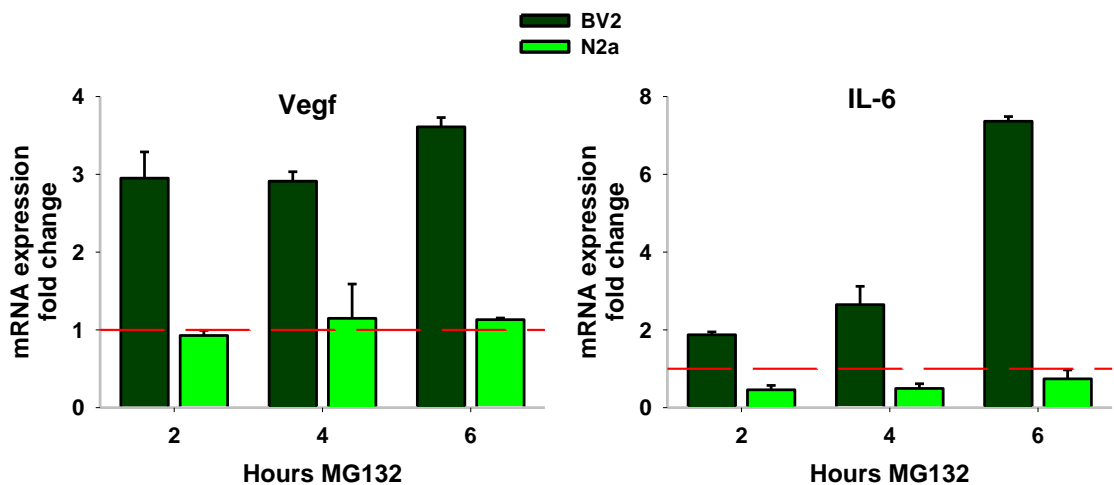


Figura 25. Perfil transcripcional de los genes que codifican para Vegf e IL-6 en respuesta a la IP. En la gráfica se muestra el nivel de expresión, con respecto a la expresión basal, en respuesta a la IP. La expresión de *vegf* (izquierda) e *IL-6* (derecha) se analizó mediante RT-qPCR en ambas líneas celulares tratadas con 1 μM de MG-132 durante 1, 2, 4 y 6 horas. Se puede observar un aumento significativo en la expresión de ambos genes sólo en la línea BV2, donde se acumula β-catenina, mientras que en la línea N2a, no se modifica (*vegf*) o disminuye (*IL-6*), la expresión de estos genes. (n>=3).

Además, el aumento observado en la expresión de *IL-6* inducido por la IP fue específico, puesto que otras citoquinas como *TNF- α* , e *IL-1 β* , no solo no aumentaron su expresión, sino que la disminuyeron de forma significativa (figura 26), sugiriendo que la línea microglial adopta un perfil anti-inflamatorio en respuesta a la IP. Por lo tanto, estos datos apoyan de manera sólida que la IP produce una activación robusta y sostenida de la vía Wnt/ β -catenina en la línea BV2, mientras que no parece verse afectada en la línea N2a.

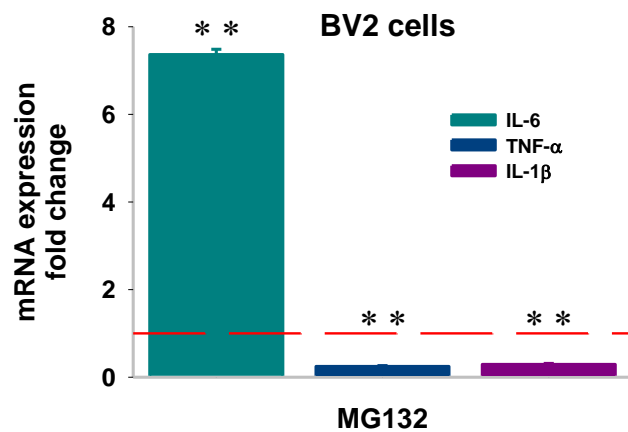


Figura 26. Perfil transcripcional de los genes que codifican para IL-6, TNF- α e IL-1 β en respuesta a la IP. En la gráfica se muestra el nivel de expresión, con respecto a la expresión basal, en respuesta a la IP. Mediante RT-qPCR se analizó la expresión de IL-6 y de TNF- α e IL-1 β (no asociadas a β -catenina), en células BV2 tratadas con 1 μ M de MG-132 a durante 6h. Nótese el perfil opuesto entre IL-6 y TNF- α e IL-1 β . (n=3). ** p < 0.01, con respecto al control.

En resumen, todos estos resultados demuestran que las diferentes proteínas/vías analizadas se regulan de manera diferente en ambas líneas celulares en respuesta a la IP. En general, los resultados serían compatibles con el mantenimiento de la actividad autofágica en la línea N2a y con una regulación transitoria a la baja en la línea BV2, lo que podría contribuir también a la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas de alto peso molecular observada en BV2. Por otro lado, las células microgliales parecen activar de manera preferente la vía **PDK1-AKT-GSK-3 β - β -catenina**, mientras que la línea neuronal activa preferentemente la vía **mTORC2-AKT-FOXO3** en respuesta a la IP.

3. CONTRIBUCIÓN DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS/RUTAS EN EL MANTENIMIENTO DE LA VIABILIDAD CELULAR EN SITUACIÓN DE ESTRÉS PROTEICO

Nuestros resultados indican que la susceptibilidad, así como la respuesta molecular a la IP, es diferente en ambas líneas celulares. En este sentido, la activación de la UPR en respuesta a la IP mostró un perfil más pro-apoptótico en la línea BV2, en contraposición con un perfil más anti-apoptótico en la línea N2a. Igualmente, la estimulación de la autofagia en las células BV2 es más lenta pero más intensa que en N2a. Sin embargo, su estimulación con rapamicina las rescata parcialmente de la muerte inducida por la IP, mientras que en las células N2a, la inhibición de la autofagia aumenta la muerte celular. Además, la regulación por fosforilación en Ser405 de la proteína p62, que regula la carga de los autofagosomas, no se observa en la línea BV2. Por último, la IP promueve la activación de la vía PDK1-AKT-GSK-3 β - β -catenina en BV2 y la vía mTORC2-AKT-FOXO3 en N2a. En base a este comportamiento diferencial entre las dos líneas y la diferente sensibilidad a la IP, nos planteamos evaluar el grado de implicación de las diferentes proteínas/vías en el mantenimiento de la viabilidad celular en respuesta a la IP, centrándonos en: **i)** estrés de RE/UPR; **ii)** las proteínas GSK-3 β y β -catenina; y **iii)** la fosforilación de la proteína p62. Para realizar este objetivo, utilizamos herramientas farmacológicas que inhiben la señalización de estas proteínas/vías.

3.1. Estrés de RE y UPR

Para evaluar el papel del estrés de RE y de la UPR en la viabilidad celular en respuesta a la IP, realizamos un primer abordaje utilizando un par de compuestos reguladores generales del estrés de RE y de amplio uso en investigación. Por un lado, el ácido **4-PBA**, una droga utilizada en el tratamiento de desórdenes del ciclo de la urea, y que actúa también como una chaperona química que atenúa el estrés de RE, así como la activación de la UPR, (Kolb et al., 2015). Por otro lado, el **ácido valproico**, utilizado para el tratamiento de la epilepsia y los trastornos del estado de ánimo. Aunque los mecanismos de acción del ácido valproico no son completamente conocidos, se han propuesto varias vías sobre

las que podría actuar, incluyendo entre ellas a la UPR (A. J. Kim et al., 2005). En condición basal, la incubación con ambos compuestos no afectó a la viabilidad de ninguna de las líneas celulares (datos no mostrados). Igualmente, el tratamiento con cualquiera de los dos compuestos, 4-PBA o ácido valproico, no mejoró la viabilidad celular en situación de estrés proteico inducido por la IP, en la línea BV2, ni la disminuyó en el caso de las células N2a (figura 27). Este resultado sugiere que la atenuación inespecífica del estrés de RE y/o de la UPR no parece tener repercusión sobre la viabilidad celular en nuestro modelo de estrés.

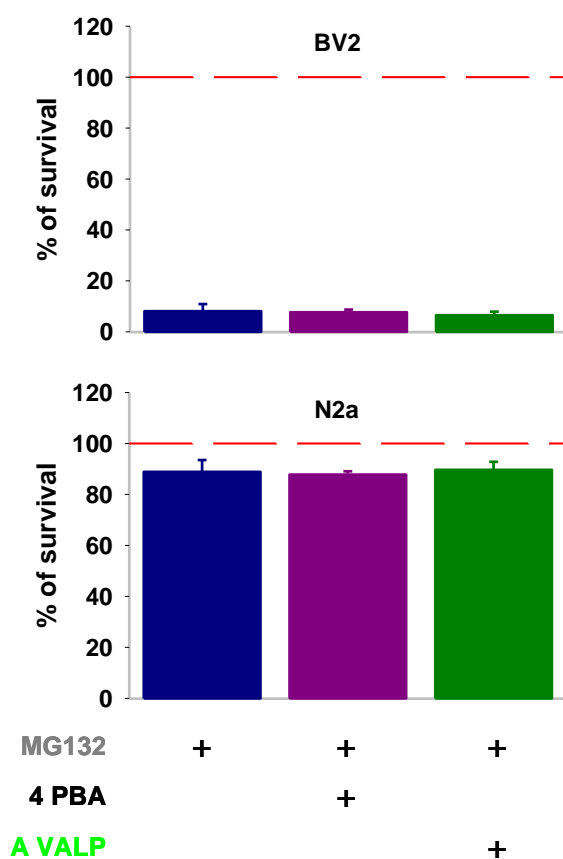


Figura 27. Efecto del tratamiento con 4PBA y ácido valproico sobre la viabilidad celular en respuesta a la IP. Las células fueron tratadas con 4PBA o ácido valproico en presencia de MG-132 1µM durante 6horas. La supervivencia celular se analizó por citometría de flujo. Ninguno de los tratamientos modificó en ningún sentido la supervivencia celular ni en BV2 (gráfica superior), ni en N2a (gráfica inferior). (n=3).

Puesto que tanto el 4-PBA como el ácido valproico no tienen como diana específica el estrés de RE/UPR, sino que podrían tener otras dianas adicionales, y teniendo en cuenta el perfil de activación de la UPR en ambas líneas,

utilizamos inhibidores más específicos. En concreto, utilizamos los compuestos **STF-083010** (inhibidor de la vía de IRE1- α) y **GSK2606414** (inhibidor de la vía de PERK). En la condición control, ambos compuestos disminuyeron la viabilidad celular en la línea BV2 (aproximadamente un 20% tras 6 horas de incubación), mientras que sólo el compuesto GSK2606414, disminuyó en torno a un 10 % la viabilidad en N2a (datos no mostrados). En este caso, y teniendo en cuenta las diferencias en la cinética de activación de la UPR observada en ambas líneas celulares, realizamos el estudio a las 2 y a las 6 horas, con la idea de obtener mayor información sobre posibles diferencias que pudieran ser debidas al tiempo de incubación.

Como se muestra en la figura 28, la inhibición de la vía de IRE-1 α sensibilizó de manera significativa a las células BV2 y N2a a las 2 horas. Sin embargo, a las 6 horas de tratamiento la supervivencia en las células BV2 fue significativamente mayor, mientras que en las N2a no se observaron diferencias significativas. Por otro lado, la inhibición de la vía de PERK sensibilizó de manera significativa a ambas líneas celulares, observándose una disminución de la viabilidad celular tanto a las 2, como a las 6 horas de tratamiento. Estos resultados no parecen demostrar de manera clara cuál podría ser la implicación de estas vías de la UPR en la respuesta a la IP. En este sentido, un aspecto importante a considerar es que la inhibición de las vías por separado produce efectos cruzados en la otra vía a nivel transcripcional (datos no mostrados; ver Siwecka et al., 2021). Es por ello que analizamos el efecto combinado de ambos inhibidores. En este caso y visto los efectos diferenciales en función del tiempo de incubación y la línea celular, realizamos el estudio a un tiempo intermedio de 5 horas en ambas líneas. Como se observa en la figura 29, la acción combinada de ambos compuestos afectó de manera significativa y similar a la viabilidad celular de las dos líneas celulares en situación control. Sin embargo, el bloqueo simultáneo de ambas vías en situación de estrés proteico aumentó significativamente la viabilidad celular en la línea BV2, mientras que la disminuyó en la línea N2a.

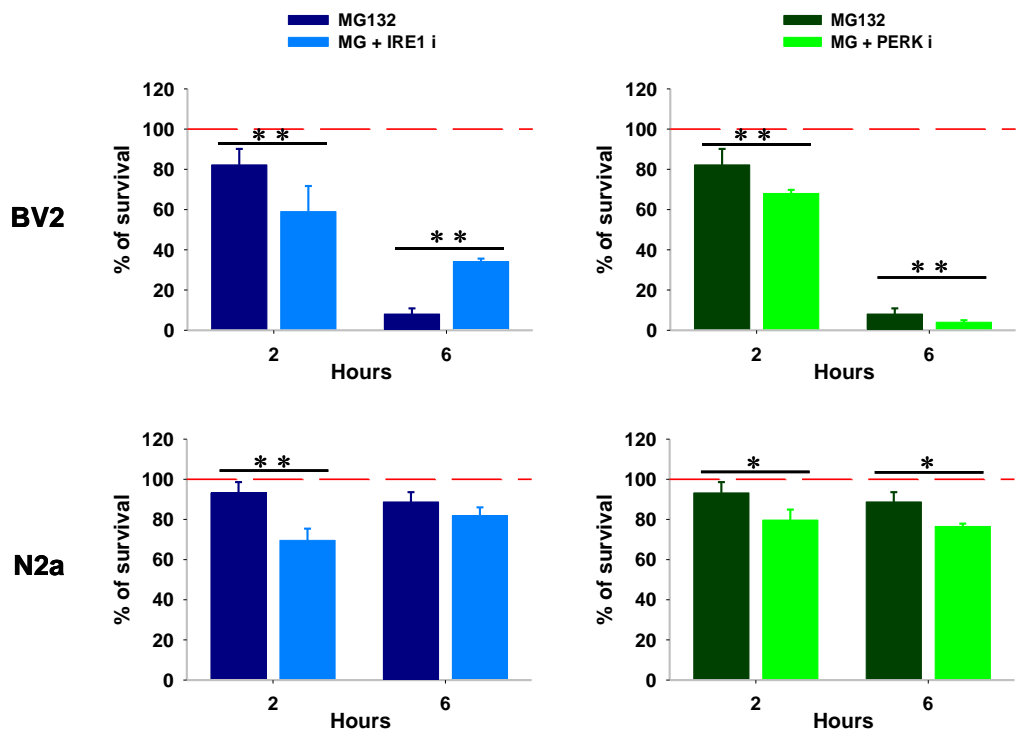


Figura 28. Efecto del tratamiento con STF-083010 o GSK2606414 sobre la viabilidad celular en respuesta a la IP. Las células fueron tratadas con STF-083010 (IRE1 i; gráficas de la izquierda) o GSK2606414 (PERK i; gráficas de la derecha) en presencia de 1 μ M de MG-132 durante 2 y 6 horas. La supervivencia celular se analizó por citometría de flujo. (n=3). * p <0.05, ** p <0.01, con respecto al control, o a MG-132.

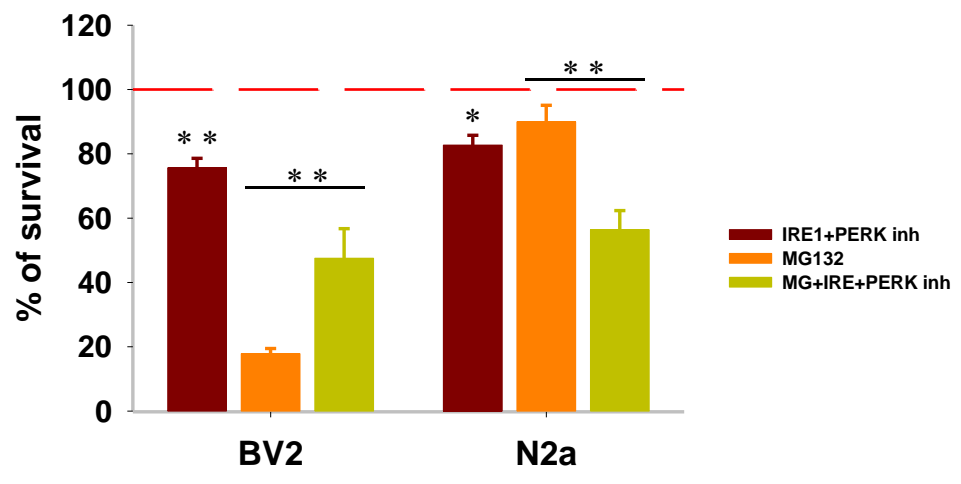


Figura 29. Efecto del tratamiento combinado con STF-083010 y GSK2606414 sobre la viabilidad celular en respuesta a la IP. En la gráfica se muestran los datos de viabilidad celular obtenidos tras el tratamiento combinado con STF-083010 y GSK2606414 en presencia y en ausencia de 1 μ M de MG-132 durante 5 horas. La supervivencia celular se analizó por citometría de flujo. Nótese el efecto opuesto del tratamiento combinado sobre la viabilidad celular en respuesta a la IP. (n=3). * p <0.05, ** p <0.01, con respecto al control, o a MG-132.

Estos resultados apoyarían el perfil diferencial de activación de la UPR en respuesta a la IP mostrado anteriormente. En este sentido, el perfil pro-apoptótico observado en la línea BV2 se revierte parcialmente al bloquear la activación de la UPR, mientras que el perfil anti-apoptótico en la línea N2a se pierde al bloquear la activación de la UPR. Además, parecen indicar que tanto la activación de la UPR como la activación de la autofagia, pueden tener un papel más relevante en la línea N2a que en BV2 en el mantenimiento de la homeostasis proteica y la viabilidad celular tras la IP.

3.2. GSK-3 β

La inhibición de la proteína GSK-3 β , se llevó a cabo mediante el compuesto **AR-0133418/GSK-3 β inhibitor VIII**, utilizado previamente por nuestro grupo de investigación (E. Gavilán et al., 2013). En primer lugar, probamos diferentes dosis y tiempos para establecer las condiciones más idóneas para cada línea celular. La dosis de 5 μ M no afectó de manera significativa a la viabilidad de ambas líneas, ni a las 4 ni a las 8 horas de incubación. Sin embargo, la dosis de 20 μ M, disminuyó significativamente la viabilidad de ambas líneas en la condición basal, siendo mayor el efecto en BV2 (40.9 \pm 4.6 de viabilidad) que en N2a (75.9 \pm 4.7 de viabilidad), lo que sugiere que las células BV2 son más dependientes de la actividad de GSK-3 β . En base a estos datos y datos previos, elegimos la dosis de 5 μ M y 8 horas de incubación para evaluar su efecto.

Como se muestra en la figura 30, la inhibición de GSK-3 β en presencia de MG132, recuperó parcialmente, pero de manera significativa, la muerte celular inducida por la IP en la línea BV2. Por el contrario, en la línea N2a no se observó ningún efecto a esta dosis. Para descartar si la ausencia de efecto en la línea N2a pudiera deberse a una cuestión de dosis, repetimos el experimento con la dosis de 20 μ M. En este caso, la inhibición de GSK-3 β en presencia de MG132, disminuyó de manera significativa la viabilidad celular en la línea N2a. Sin embargo, a pesar de que el efecto del inhibidor sobre la viabilidad celular en BV2 fue más severo que en N2a en la condición control, la inhibición de GSK-3 β en presencia de MG132, también mejoró la viabilidad celular de manera muy modesta pero significativa a la dosis de 20 μ M.

Estos datos sugieren que la proteína GSK-3 β presenta un comportamiento diferente en ambas líneas celulares tanto en estado basal, como en situación de estrés proteico, apoyando los resultados bioquímicos mostrados anteriormente. En concreto, la actividad de GSK-3 β parece ejercer un efecto negativo sobre la viabilidad celular en situación de estrés proteico en la línea BV2, mientras que en la línea N2a parece jugar un papel protector.

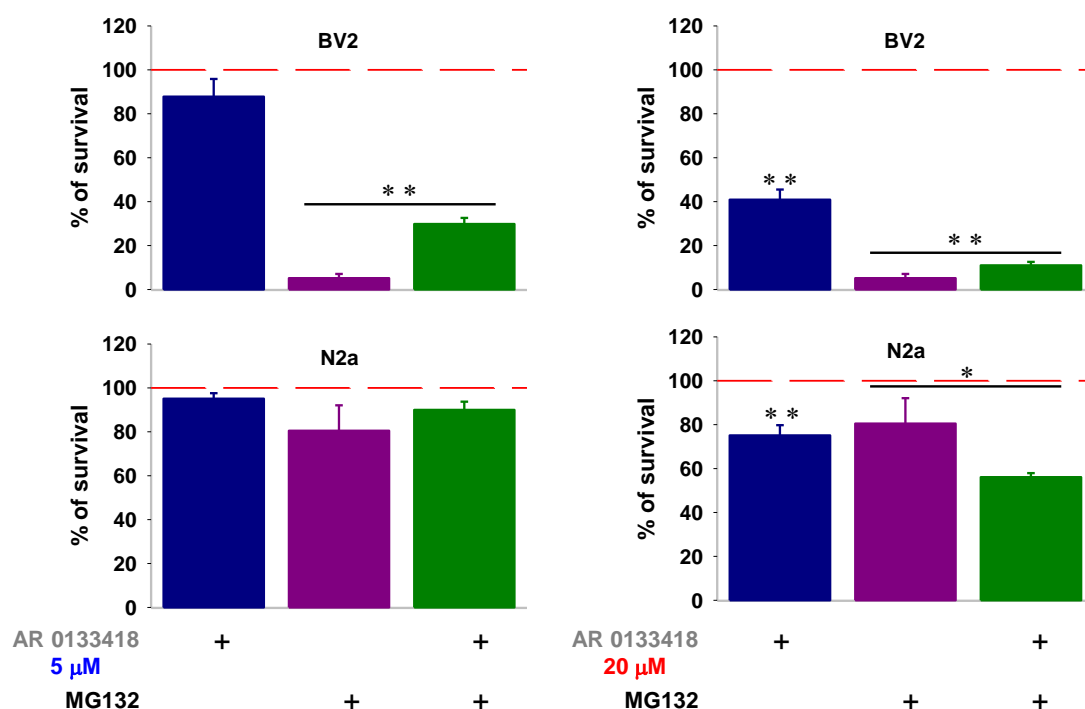


Figura 30. Efecto de la inhibición de GSK-3 β sobre la viabilidad celular en respuesta a la IP. En las gráficas de la izquierda se muestran los datos de viabilidad celular obtenidos tras el tratamiento con el inhibidor de GSK-3 β AR-0133418 (5 μ M durante 8 horas), en presencia y ausencia de 1 μ M de MG132 en BV2 (gráfica superior) y N2a (gráfica inferior). En las gráficas de la derecha se muestran los mismos resultados pero con una concentración de 20 μ M del inhibidor. Nótese el efecto citotóxico en ambas líneas celulares a esta concentración mayor. La supervivencia celular se analizó por citometría de flujo. (n=3). * p < 0.05, ** p < 0.01, con respecto al control, o a MG132.

3.3. β -catenina

El efecto de la vía Wnt/ β -catenina se analizó utilizando para ello el inhibidor de β -catenina **ICG-001**. Dicho compuesto no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular en la condición control en ninguna de las líneas. Sin embargo, como se observa en la figura 31, la inhibición farmacológica de esta vía no afectó a la viabilidad de la línea N2a en situación de estrés proteico. Por el contrario, produjo un efecto moderado pero significativo, en la supervivencia en la línea BV2, pasando de un 5 a un 15 % de viabilidad.

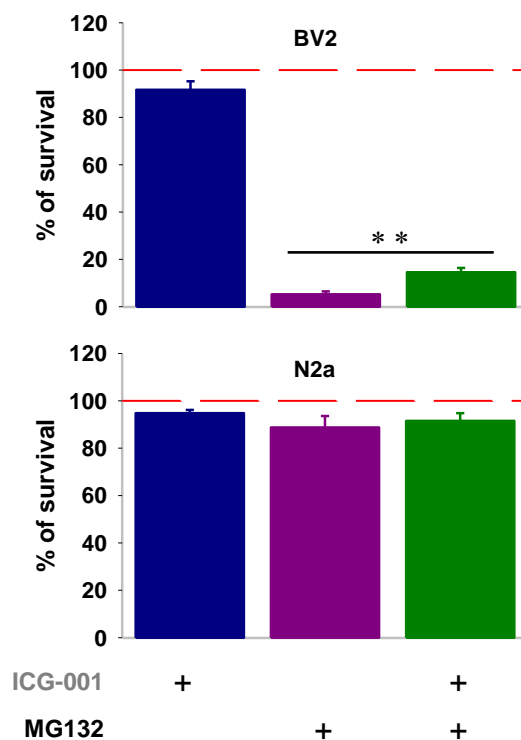


Figura 31. Efecto de la inhibición de β -catenina sobre la viabilidad celular en respuesta a la IP. En esta figura se muestran los datos de viabilidad celular obtenidos mediante citometría de flujo de las células tratadas con el inhibidor de β -catenina ICG-001 (5 μ M, durante 6 horas) en ausencia y presencia de 1 μ M de MG132. Se observa un leve efecto positivo pero significativo en la viabilidad de BV2, mientras que en N2a no tiene efecto. (n=3). ** p <0.01, con respecto a MG-132.

Puesto que una de las dianas de la proteína GSK-3 β es la proteína β -catenina, y nuestros resultados bioquímicos demuestran que la vía GSK-3 β / β -catenina se encuentra sobre-activada en respuesta a la IP en las células BV2, decidimos evaluar el efecto conjunto de ambos inhibidores sobre la viabilidad celular en BV2 (figura 32). En este caso, la inhibición conjunta de ambas proteínas mejoró de manera considerable y significativa la viabilidad de BV2 en situación de estrés proteico, recuperándose hasta un 49% de viabilidad, lo que indica que tienen un efecto aditivo ambos inhibidores.

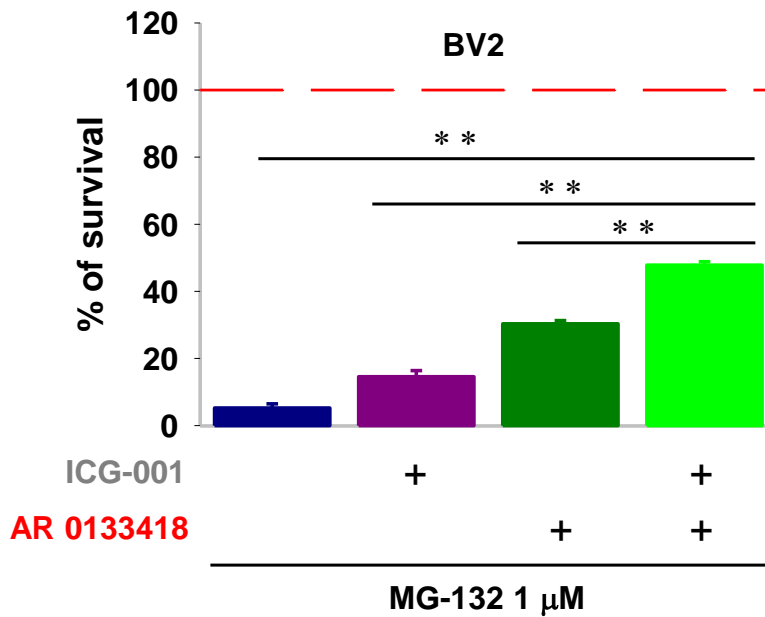


Figura 32. La inhibición conjunta de GSK-3 β y β -catenina rescata parcialmente la viabilidad de la línea microglial en respuesta a la IP. En la gráfica se observan los datos de viabilidad obtenidos mediante citometría de flujo al tratar la línea BV2 con los inhibidores de GSK3 (AR 0133418 5 μ M) y de β -catenina (ICG-001 5 μ M) en presencia de 1 μ M de MG132, durante 6 horas. (n=3). ** p <0.01, con respecto a MG-132, ICG-001 y AR 0133418.

En resumen, estos datos sugieren que la activación robusta y sostenida de la vía Wnt/ β -catenina observada exclusivamente en la línea BV2, podría ejercer un efecto nocivo en condiciones de estrés proteico.

3.4. Caseína quinasa 2

Por último, analizamos el efecto de la inhibición de la proteína caseína quinasa 2 (CQ2). Esta proteína es una serina/treonina quinasa altamente conservada en todos los organismos eucariotas con multitud de proteínas dianas entre las que se encuentran p62 y β -catenina (Silva-Pavez & Tapia, 2020). Puesto que tanto p62 como β -catenina exhibieron un comportamiento diferente en ambas líneas en respuesta a la IP, estudiamos cómo afecta la inhibición de esta quinasa a la viabilidad celular en nuestro modelo de estrés proteico. Para ello utilizamos el inhibidor selectivo de CQ2 **DMAT** para evaluar su implicación sobre la viabilidad celular. Como se muestra en la figura 34, la inhibición de CQ2, disminuyó de manera significativa la viabilidad celular en la línea BV2 en la condición control, sin afectar a la línea neuronal N2a. Sin embargo, en situación de estrés proteico la inhibición de CQ2 mejoró la viabilidad celular de manera significativa en BV2

tras la IP, no observándose ningún efecto sobre la línea N2a. Por tanto, estos resultados parecen indicar que la actividad de CQ2 en la línea BV2 presenta efectos opuestos sobre la viabilidad celular en situación control y de estrés proteico.

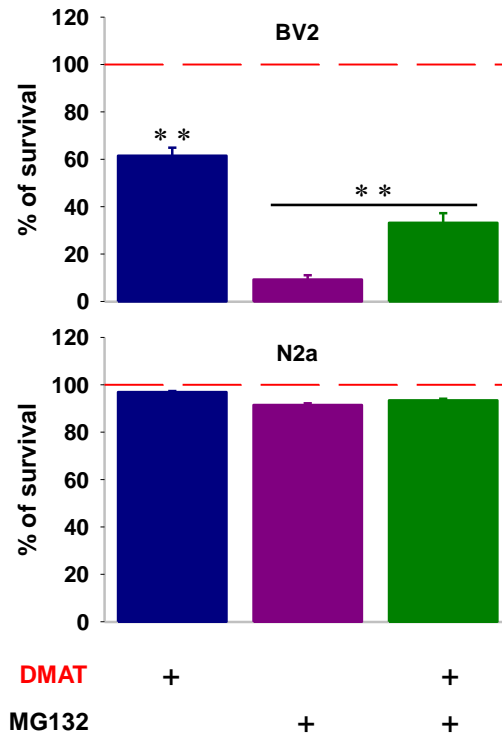


Figura 33. Efecto de la inhibición de CQ2 sobre la viabilidad celular en respuesta a la IP. En la figura se muestra el tratamiento con el inhibidor de la CQ2, DMAT, en ausencia y presencia de 1 μ M de MG132 durante 6 horas de tratamiento. La viabilidad se analizó mediante citometría de flujo. Las células BV2 (gráfica superior) fueron más sensibles que las neuronales (gráfica inferior) a la incubación con DMAT en la situación control. El tratamiento conjunto con DMAT y MG132 recupera parcialmente la viabilidad celular de manera significativa en la línea microglial, sin afectar a la línea neuronal. (n=3). ** p < 0.01, con respecto al control, o a MG132.

4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA IP SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE CULTIVOS PRIMARIOS DE MICROGLÍA Y NEURONAS

4.1. Estudio de la respuesta a la IP en cultivos primarios de microglía y neuronas

Los resultados mostrados anteriormente demuestran que existen diferencias en la respuesta al estrés proteico entre la línea microglial BV2, y la línea de origen neuronal N2a. Sin embargo, la línea BV2 es una línea celular inmortalizada mientras que la línea N2a deriva de un neuroblastoma, y, por tanto, conserva características propias de una célula tumoral. Con la idea de comprobar si las diferencias observadas se deben principalmente al fenotipo celular (microglía versus neurona) y no al carácter tumoral de las células N2a, evaluamos en cultivos primarios de microglía y de neuronas la respuesta a la IP. En este caso, y dada la dificultad para trabajar con cultivos primarios, analizamos aquellos marcadores que consideramos más relevantes, en función de lo observado en los estudios con las líneas celulares. En cualquier caso, los resultados mostrados son resultados preliminares que esperamos poder ampliar y desarrollar con más profundidad en el futuro.

4.1.1. Las células microgliales son más sensibles a la IP

Para el estudio de los cultivos primarios de microglía y neuronas determinamos en primer lugar las dosis de MG132 más adecuadas mediante experimentos pilotos. Las dosis de 1 y 10 μM no afectaron a la viabilidad celular ni a las 2, ni a las 6 horas de tratamiento, a ninguno de los tipos celulares (datos no mostrados). Sin embargo, la dosis de 10 μM sí tuvo efecto a las 8 horas en las células de microglía. Es por ello que elegimos las dosis de 10 y 20 μM de MG132 y un tiempo de incubación de 8 horas.

Como se muestra en la figura 34, las células de microglía fueron más sensibles a la IP que las neuronas. La disminución en la viabilidad celular fue significativamente mayor para ambas dosis, y dosis dependiente, en las células microgliales. En cambio, las neuronas mostraron una tendencia a la baja, pero

sin llegar ser significativa. Por ejemplo, para la dosis de 20 μ M de MG132, la viabilidad en las células microgliales disminuyó de manera significativa hasta el 44.6 \pm 7.8 %, mientras que en las neuronas bajó ligeramente hasta el 85.2 \pm 17.7 %, de manera no significativa. Por tanto, estos datos apoyan los resultados obtenidos en las líneas celulares, en el sentido de que la microglía es más sensible que las neuronas al estrés proteico.

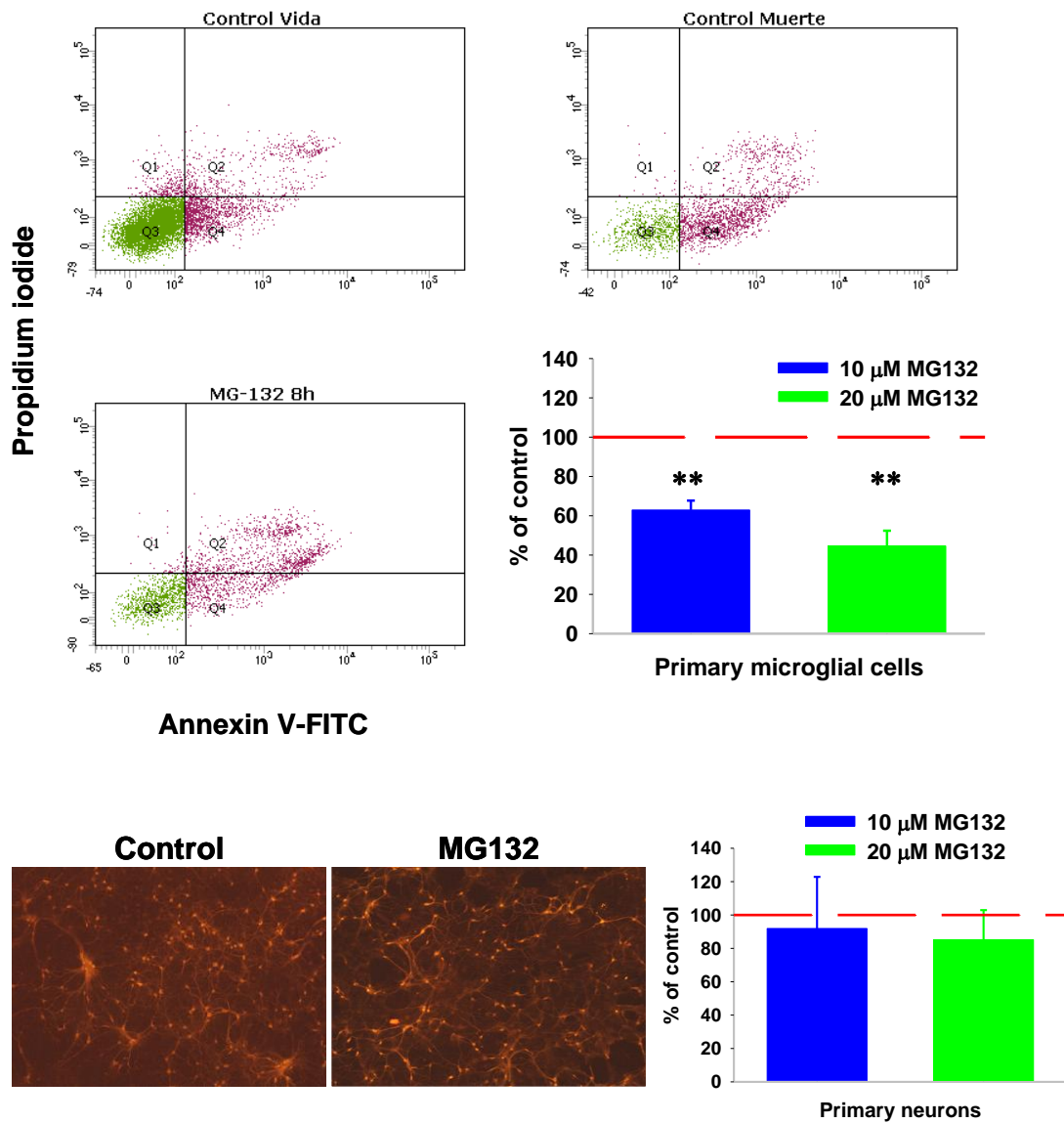


Figura 34. Efecto de la IP sobre la viabilidad celular en cultivos primarios de microglía y neuronas. En la parte de la izquierda se muestra la gráfica donde se recoge la cuantificación de la viabilidad celular, determinada por citometría de flujo, de la microglía primaria incubada con diferentes dosis de MG132. Se observa una disminución dosis dependiente de la viabilidad celular. En la parte inferior se muestra un ejemplo representativo del análisis por citometría. En verde se muestra el cuadrante con células viables, en morado los cuadrantes con células en apoptosis temprana y tardía y necrosis). En la parte derecha superior se muestra la gráfica de cuantificación de la viabilidad neuronal determinada por marcaje por inmunofluorescencia con MAP2 y NeuN tras el tratamiento con 20 μ M de MG132 durante 8 horas. Nótese la ausencia evidente de pérdida de marcaje en los cultivos neuronales. (n=3). ** p < 0.01, con respecto al control, o a MG132.

4.1.2. La activación de la UPR, la respuesta autofágica y la actividad β -catenina, difieren entre microglía y neuronas en respuesta a la IP

Una vez establecida la mayor sensibilidad a la IP por parte de la microglía, analizamos el efecto de la IP sobre el estrés de RE y la consecuente activación de la UPR. Como se muestra en la figura 35, la IP produjo una activación transcripcional significativa de la chaperona *grp78*, tanto en microglía como en neuronas, indicando la existencia de estrés de RE y la activación de la UPR.

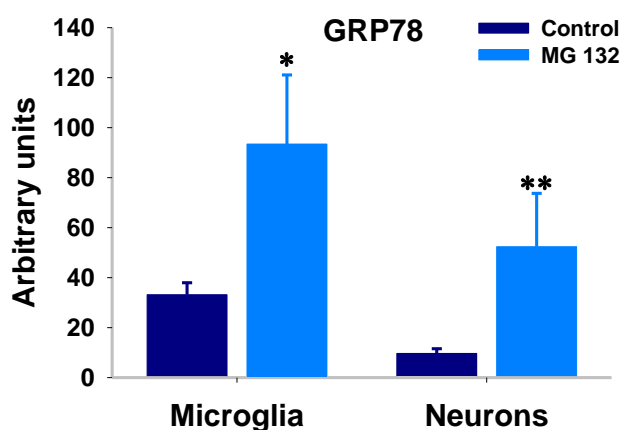


Figura 35. Expresión transcripcional de GRP78 en cultivos primarios de microglía y neuronas en respuesta a la IP. Mediante RT-qPCR se analizó la activación de la UPR, tomando como marcador a *grp78*, en cultivos primarios de microglía y neuronas incubados con 20 μ M de MG132 durante 8 horas. En ambos tipos celulares se observa un aumento significativo de la expresión de este marcador con respecto a los cultivos controles. (n=2 microglía; n=3 neuronas). * p <0.05 ** p <0.01, con respecto al control.

Igualmente, analizamos la expresión de los otros marcadores de la UPR, correspondientes a las vías de IRE1 α y PERK. Los resultados demostraron que, en los cultivos primarios, a diferencia de lo observado en las líneas celulares, la cantidad de *sxbp1* fue baja y similar en microglía y neuronas en respuesta a la IP. Sin embargo, la expresión de *chop*, fue más de cuatro veces superior en la microglía, y muy escasa en los cultivos neuronales (datos no mostrados). Es por ello que la razón *chop/sxbp1*, fue significativamente mayor en las células microgliales que en las neuronas (figura 36).

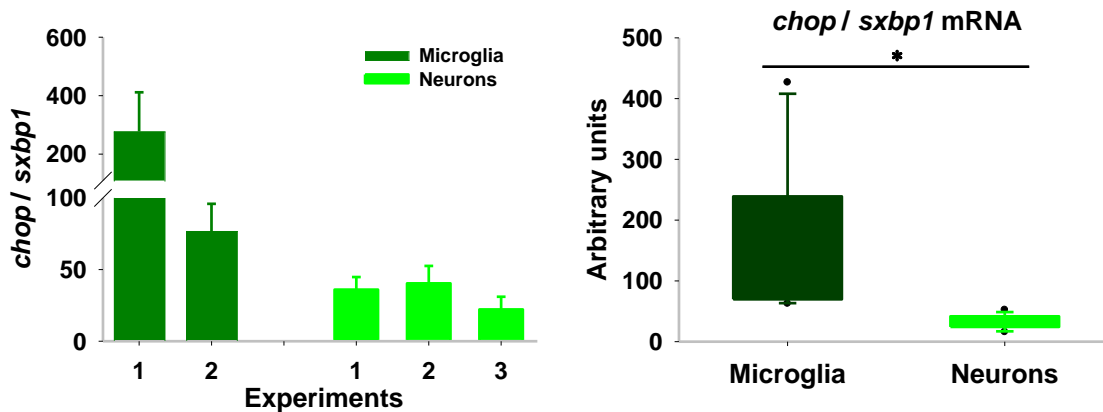


Figura 36. Razón chop/sxpb1 en cultivos primarios de microglía y neuronas en respuesta a la IP. En la figura de la izquierda se muestra la razón entre la expresión transcripcional de chop y sxpb1 obtenida por RT-qPCR, en los experimentos independientes. En la gráfica de la derecha se muestra la media de los experimentos independientes. (n=2 microglía; n=3 neuronas). * p <0.05 ** p <0.01, con respecto al control.

Estos resultados apoyan la existencia de diferencias en la activación de la UPR en respuesta a la IP entre microglía y neuronas. En concreto, tanto la microglía como las neuronas parecen comportarse de manera similar a las líneas celulares, sugiriendo por tanto que la microglía parece mostrar un perfil más pro-apoptótico, mientras que las neuronas uno más anti-apoptótico, con respecto a la activación de la UPR.

Por otro lado, el perfil de activación de la autofagia en la condición basal fue similar al observado en las líneas celulares. Aunque, en este caso no podemos asegurar que el flujo autofágico sea mayor en la microglía. Igualmente, y en base a la cantidad de LC3 II, la activación de la autofagia en respuesta a la IP fue más intensa en las neuronas que en la microglía, mostrando estas una mayor cantidad de LC3 II (autofagosomas) (figura 37). Además, el contenido de proteínas poli-ubiquitinadas fue mayor en las células microgliales que en las neuronas, así como la cantidad de β -catenina. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en cultivos celulares, el contenido de fosfo-Ser405-p62 fue mayor en microglía que en neuronas.

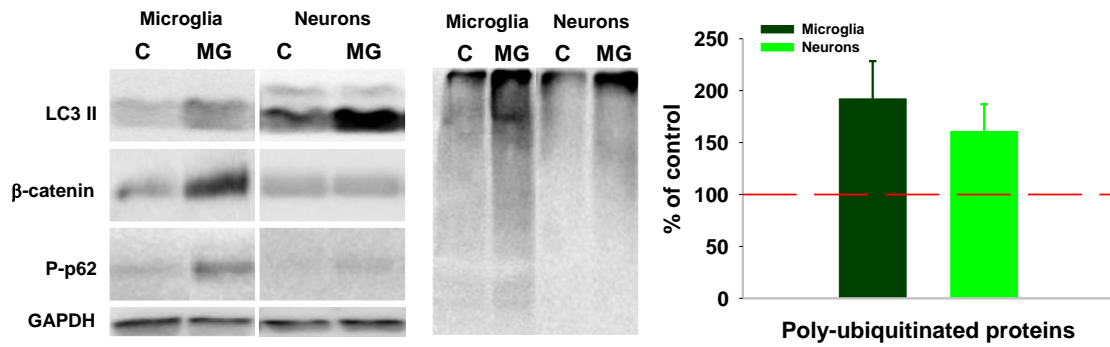


Figura 37. Efecto de la IP sobre diferentes marcadores moleculares en cultivos primarios de microglía y neuronas. En la imagen de la derecha se muestran WBs representativos de marcadores de autofagosomas (LC3 II), de la vía Wnt/ β -catenina (β -catenina) y del estado de fosforilación de la proteína adaptadora p62 fosforilada en Ser405 (P-p62), en microglía y neuronas. En la imagen del centro se muestra un WB representativo de la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas en microglía y neuronas en respuesta a la IP. En la gráfica de la derecha, se muestra la cuantificación de las proteínas poli-ubiquitinadas a partir de WBs como el mostrado. Nótese la mayor acumulación no significativa en microglía. (n=2 microglía; n=3 neuronas).

En resumen, y aunque se trata de experimentos preliminares que deben ser ampliados y repetidos, los resultados obtenidos en los cultivos primarios apoyarían de manera general los datos obtenidos en los cultivos celulares e indicarían que las diferencias observadas entre las líneas BV2 y N2a se deben principalmente a la naturaleza celular y no al carácter tumoral de la línea N2a.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La proteostasis celular constituye un factor clave en el mantenimiento de la supervivencia celular. Esta implica a diferentes procesos que van desde la síntesis de las proteínas, el plegamiento, las modificaciones postraduccionales y la degradación de las mismas. En las células eucariotas la proteostasis se mantiene gracias a diferentes sistemas de control de calidad que incluyen a las chaperonas moleculares, el UPS, la autofagia y la ERAD (Kaushik & Cuervo, 2015). Un correcto funcionamiento y coordinación de todos ellos garantizará que las proteínas se sinteticen, plieguen, ensamblen, alcancen su destino, ejerzan su actividad y finalmente se degraden adecuadamente según las necesidades celulares. Como dato relevante, incluso en condiciones óptimas, en torno a un 30% de las proteínas recién sintetizadas son degradadas como consecuencia de un plegamiento incorrecto (Glembotski, 2007). Por lo tanto, cualquier factor que perturbe los procesos mencionados anteriormente va a dar lugar a la alteración de la proteostasis, generando una situación de estrés celular denominada de forma general como proteotoxicidad o estrés proteico (Brancolini & Iuliano, 2020).

Centrándonos en los sistemas de degradación de proteínas como elementos implicados en el mantenimiento de la proteostasis celular, y generalizando, podemos decir que el UPS se encarga de la degradación de proteínas intracelulares solubles, incluyendo una gran cantidad y diversidad de ellas, tanto proteínas mal plegadas, como dañadas, en exceso, o proteínas reguladoras de diferentes procesos celulares. Por otro lado, la autofagia estaría más implicada en la degradación de proteínas agregadas, insolubles y que no pueden ser degradadas por el UPS, además de la renovación de orgánulos celulares (W.-X. Ding & Yin, 2008; Rechsteiner & Hill, 2005; Schreiber & Peter, 2014).

Un aspecto de gran relevancia, y que cada día está mejor caracterizado, es la relación funcional entre el UPS y la autofagia (Ruano, 2021). En este sentido, la estimulación de la actividad autofágica en respuesta a una disminución de la actividad proteasomal ha sido ampliamente descrita por nuestro grupo y otros muchos grupos de investigación en diferentes tejidos (Dong et al., 2013; E. Gavilán, Giráldez, et al., 2015; Pintado et al., 2017), así como en diferentes líneas

celulares (Bao et al., 2017; Cha-Molstad et al., 2015; E. Gavilán et al., 2013; Jiang et al., 2015; Min et al., 2014; Zheng et al., 2009, 2011). Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a esta cooperación aún no se conocen completamente y pueden ser dependientes tanto del agente que ocasiona el estrés celular como del tipo celular donde ocurra. (E. Gavilán, Pintado, et al., 2015; Korolchuk et al., 2010; Ruano, 2021).

En los últimos años nuestro laboratorio ha estudiado de manera detallada y extensa la respuesta al estrés celular originado por la acumulación de proteínas, identificando las alteraciones que se producen en dichas respuestas como consecuencia del envejecimiento (E. Gavilán, Pintado, et al., 2015; M. P. Gavilán, Castaño, et al., 2009; M. P. Gavilán et al., 2006, 2007; M. P. Gavilán, Pintado, et al., 2009; Pintado et al., 2012, 2017). Sin embargo, un aspecto que aún no conocemos en profundidad es si la respuesta al estrés proteico es similar en todos los tipos celulares o, por el contrario, existen diferencias debidas al fenotipo celular. Es por ello, por lo que en este trabajo hemos caracterizado la respuesta a una situación de estrés proteico en dos tipos celulares del tejido nervioso como son las células microgliales y las neuronas. De forma general, las células de la microglía son las células principales del sistema inmunitario en el sistema nervioso y desempeñan funciones fagocíticas y de soporte, mientras que las neuronas son las encargadas de mantener la actividad funcional del sistema nervioso. Nuestro **principal objetivo** ha sido evaluar la respuesta a una situación de estrés proteico por parte de ambos tipos celulares con la idea de conocer si existen diferencias en la respuesta al mismo, y así poder avanzar en el conocimiento de las posibles diferencias en dicha respuesta entre la microglía y las neuronas.

El modelo de estrés proteico utilizado ha consistido en la IP, un modelo de amplio uso en nuestro laboratorio, y que se ha aplicado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Es importante destacar, que la gran mayoría de este tipo de estudios se han realizado en neuronas, siendo muy escasos los realizados en microglía. Además, y hasta donde conocemos, este es el primer estudio comparativo realizado entre microglía y neuronas en relación con la respuesta al estrés proteico inducido por la IP. Este aspecto es de gran interés en el contexto del

envejecimiento, tanto normal como patológico, donde la disminución de la actividad proteasomal y autofágica ha sido descrita ampliamente.

De manera global, nuestros resultados indican que **existen diferencias moleculares relevantes** entre las células de la microglía y las neuronas en respuesta a la IP. Tanto la **respuesta al estrés de RE**, como el **papel de la autofagia** difieren entre ambos tipos celulares. Igualmente, las **vías de señalización** activadas son diferentes, lo que podría explicar la **diferente sensibilidad y respuesta al estrés proteico**.

1. DIFERENTE SUSCEPTIBILIDAD AL ESTRÉS PROTEICO

Uno de los resultados más evidentes que se ha obtenido en este trabajo ha sido la **mayor susceptibilidad** que presentan las **células microgliales** al estrés proteico. Es importante resaltar que este efecto ha sido observado tanto en la línea celular como en cultivos primarios, por lo que sugiere que la microglía es menos resistente al estrés proteico que las neuronas. Como se ha comentado, la proteostasis es mantenida principalmente por el UPS y la autofagia. Nuestros resultados indican que las células microgliales son más dependientes de la actividad proteasomal que de la autofagia, mientras que las neuronas parecen ser dependientes de ambos sistemas de degradación. De hecho, la eliminación del proteasoma 26S, específicamente en neuronas, en un ratón *knockout* condicional para *Psmc1* (Bedford et al., 2008), o de la autofagia, en dos ratones *knockouts* para *Atg7* (Komatsu et al., 2006) y *Atg5* (Hara et al., 2006) produce neurodegeneración masiva y la aparición de cuerpos de inclusión en ausencia de ningún estrés adicional. Por el contrario, la eliminación de *Atg7* en microglía no produce degeneración microglial (I. Choi et al., 2020), lo que apoyaría la mayor dependencia del proteasoma en las células microgliales como sugieren los resultados de este trabajo.

Esta diferencia en la relevancia de los sistemas de degradación de proteínas ha sido observada también por otros grupos de investigación en diferentes tipos celulares. Por ejemplo, en astrogliá con respecto a neuronas (Tydlacka et al., 2008), o en neuronas versus astrocitos y microglía (Hipp et al., 2005; Lisak et al.,

2011). Por otro lado, en cultivos mixtos de neuronas y astroglia, la IP produce oxidación de ácidos nucleicos tanto en neuronas como en astroglia, siendo mayor en neuronas (Q. Ding et al., 2004), aunque en este trabajo no se evaluó el efecto sobre la viabilidad celular. Igualmente, se ha descrito que la IP con MG132 en cultivos primarios de astrocitos produce la formación del agregoma, pero una disminución modesta en la viabilidad celular, mientras que en cultivos primarios de oligodendrocitos se observó una muerte apoptótica masiva (Goldbaum et al., 2006). No obstante, la mayor resistencia de las neuronas a la IP también puede ser dependiente del tipo neuronal. En un estudio previo demostramos que la viabilidad neuronal se veía reducida en un 50% en células SH-SY5Y0.5 (células humanas dopaminérgicas derivadas de un neuroblastoma) tras 24 horas de incubación con 0.5 μ M de MG132 (Diaz-Corrales et al., 2012).

La mayor vulnerabilidad de la microglía al estrés proteico también ha sido puesta de manifiesto mediante otras aproximaciones como la incubación de células BV2 con fracciones solubles S1 de hipocampo de enfermos de Alzheimer (Sanchez-Mejias et al., 2016). En este caso la mortalidad de las células BV2 fue dependiente del nivel de estrés proteico. Así, las fracciones solubles S1 de enfermos en estadio Braak II no fueron tóxicas, mientras que las de enfermos Braak V-VI, resultaron altamente tóxicas, debido principalmente a las formas solubles de fosfo-tau y no a las formas oligoméricas de A β . Por tanto, los resultados de este trabajo podrían tener relevancia en el contexto de la progresión de la enfermedad de Alzheimer donde se observa una degeneración microglial, a medida que progresa la enfermedad desde el estadio Braak II a Braak V-VI (Sanchez-Mejias et al., 2016). Sin embargo, se desconocen los mecanismos de muerte que pudieran estar implicados en este caso, y, por tanto, sería muy interesante el estudio de los mismos en modelos patológicos.

La mayor sensibilidad de la microglía al estrés proteico podría ser entendida desde un punto de vista funcional y evolutivo, considerando que las células microgliales son células con capacidad proliferativa, mientras que las neuronas son células diferenciadas post-mitóticas, que no se renuevan, y que no pueden "diluir" el efecto de la acumulación de moléculas tóxicas u orgánulos dañados a través de la división celular. Es por ello, que en neuronas sería esperable una

respuesta más eficiente, que le confiera una mayor capacidad de resistencia a situaciones de estrés en general, y al proteico en particular.

En resumen, todos estos resultados nos indican que la respuesta al estrés proteico es **dependiente del tipo celular**, lo que podría estar relacionado con la **función fisiológica** de cada tipo celular (ver más adelante).

2. MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS FRENTE AL ESTRÉS PROTEICO

La disfunción del proteasoma representa una agresión severa para la célula que puede llegar a comprometer su viabilidad como hemos demostrado en trabajos previos, y en este trabajo en particular. Sin embargo, las células poseen mecanismos para reestablecer la proteostasis y reducir al mínimo los daños que pueda ocasionar el estrés proteico. Estos mecanismos homeostáticos se ven disminuidos por la edad haciendo que las células sean más vulnerables (E. Gavilán, Pintado, et al., 2015; M. P. Gavilán et al., 2006). No obstante, y como se ha comentado anteriormente, un aspecto aún no bien caracterizado es conocer si estos mecanismos homeostáticos son similares en todas las células o muestran diferencias específicas de células. Nuestros resultados han puesto de manifiesto que existen diferencias importantes en la respuesta a la IP en ambas líneas celulares, y que podrían estar mediadas por diferentes vías de señalización.

2.1. UPR

La IP produce acumulación de proteínas en el RE, provocando lo que se conoce como estrés de RE (M. P. Gavilán, Pintado, et al., 2009). A nivel molecular, el estrés de RE se pone de manifiesto por la activación de la UPR, cuyo marcador más relevante es la inducción transcripcional de la chaperona Grp78 (M. P. Gavilán et al., 2006). La UPR se activa para reestablecer la proteostasis del RE, actuando a varios niveles: deteniendo transitoriamente la traducción de proteínas; promoviendo el replegamiento de las proteínas mal plegadas y/o

desplegadas; y degradando aquellas que estén mal plegadas a través de la ERAD. Sin embargo, en situaciones en las que la célula experimenta un estrés de RE sostenido, en el tiempo o muy intenso, la UPR puede dirigirse hacia la apoptosis (Senft & Ronai, 2015).

Nuestros resultados demuestran que en respuesta al estrés proteico tanto la microglía como las neuronas experimentan estrés de RE y activan a la UPR. Sin embargo, la activación difiere de manera significativa en ambos tipos celulares. La principal diferencia observada entre neuronas y microglía recae, por un lado, en la vía de **IRE1 α -sXbp1**, la cual se activa de manera intensa y rápida en neuronas, pero prácticamente no se activa en la microglía. Por otro lado, la vía de **PERK-CHOP** se activa con mayor intensidad en la microglía que en las neuronas. El perfil de activación microglial en respuesta a la IP, y en concreto la ausencia o activación débil de la vía IRE1 α -sXbp1, coincide perfectamente con los resultados previos de Studencka-Turski et al., 2019, tanto en cultivos primarios de microglía, como en la propia línea BV2. En concreto, estos autores no observan procesamiento de *xbp1* en cultivos microgliales y un procesamiento escaso en la línea BV2. Sin embargo, y a diferencia de nuestro estudio, no analizaron la presencia de la proteína. Igualmente, observan una activación muy intensa de la vía de PERK-CHOP, con un aumento importante en la proteína pro-apoptótica CHOP, disminución en la viabilidad celular, y la presencia de caspasa-3 activa. Por lo tanto, **la ausencia de activación, o la activación débil de la vía IRE1 α -sXbp1 en respuesta al estrés de RE parece ser una característica diferencial de la microglía en respuesta al estrés proteico.**

La implicación de esta vía en la supervivencia celular ha sido puesta de manifiesto en otros tipos celulares. Por ejemplo, la pérdida de función de la rama de sXbp1 aumenta la toxicidad al estrés proteico en un modelo de tautopatía humana en neuronas de *Caenorhabditis elegans*, mientras que su activación constitutiva mejora de manera considerable la patología (Waldherr et al., 2019). Igualmente, la activación sostenida de IRE1 α en células de melanoma mejora la supervivencia frente a la apoptosis inducida por estrés de RE (Tay et al., 2014), y disminuye los procesos apoptóticos que sufren las células de cartílago en pacientes de osteoartritis (F.-J. Guo et al., 2014). Por el contrario, la inhibición de IRE1 α y la consiguiente reducción del *splicing* de *xbp1*, aumenta la mortalidad

en el tratamiento con anti-estrógenos en células de cáncer de mama (Rajapaksa et al., 2015).

No obstante, hay que considerar que el mecanismo que determina la transición entre supervivencia y apoptosis en respuesta al estrés de RE, no se conoce con detalle, y puede que no sea dependiente solamente de la activación preferencial de una u otra rama de la UPR, o del cambio de la actividad de una vía sobre otra. En este sentido, existen resultados que indican que la activación o no de la apoptosis sería dependiente del tiempo de inicio relativo de la activación de las vías **IRE1 α -sXbp1** y **PERK-CHOP**. Es decir, la activación más temprana e intensa de la vía IRE1 α -sXbp1, con respecto a la vía de PERK-CHOP, determinaría supervivencia, mientras que lo contrario determinaría apoptosis (Walter et al., 2015), un mecanismo que es perfectamente compatible con nuestros resultados y que refuerza la idea de que **la cinética de activación de una vía con respecto a otra puede ser uno de los factores determinantes en el binomio supervivencia/muerte.**

Por otro lado, un aspecto interesante por identificar es la causa/s de la nula o débil activación de la vía IRE1 α -sXbp1. En este sentido, uno de los factores que ha sido descrito como regulador de la actividad RNasa de la proteína IRE1 α , es la proteína GSK-3 β . En concreto se ha demostrado que la inhibición de GSK-3 β , aumenta el procesamiento de *sxbp1* inducido por TM (S. Kim et al., 2015). Nuestros resultados demuestran que la fosforilación de la proteína GSK-3 β en Ser9 (inactiva) disminuye, con respecto al control, de manera temprana y significativa en respuesta a la IP durante todo el tiempo ensayado en la línea BV2. Por el contrario, en la línea neuronal GSK-3 β se inhibe de manera transitoria durante las 2 primeras horas del tratamiento, coincidiendo con el aumento de la forma procesada de *sxbp1*. Un análisis preliminar en nuestro modelo indica que la inhibición de GSK-3 β , en la línea BV2 aumenta la cantidad de *sxbp1*, pasando de $1,8 \pm 0,3$ a $2,9 \pm 1,2$ a las 4 horas con MG132 y MG132 + el inhibidor de GSK-3 β , respectivamente. Por tanto, el perfil diferencial en la actividad de la proteína GSK-3 β , sería compatible, desde un punto de vista temporal, con el procesamiento de *sxbp1* observado en ambas líneas celulares. Esto nos permitiría especular sobre la posibilidad de que la actividad mantenida de la proteína GSK-3 β , inducida por la IP en la línea BV2, podría ser una de las causas

de la menor actividad de la vía IRE1 α -sXbp1. Sin embargo, no podemos descartar la existencia de otros mecanismos alternativos y/o complementarios.

Dada la importancia de la activación de la vía IRE1 α -sXbp1 en relación con la supervivencia celular en nuestro modelo de estrés proteico, una cuestión importante es conocer la relevancia fisiológica de la débil o nula activación de esta vía. Los resultados disponibles en la literatura indican que, desde un punto de vista funcional, la activación de la vía IRE1 α -sXbp1 es un requisito imprescindible para que los linfocitos B maduren, y más relevante aún, para su diferenciación terminal: el paso de linfocitos B activados a células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Calfon et al., 2002; Reimold et al., 2001). Los ratones deficientes en Xbp1, poseen un número normal de linfocitos B activados, forman centros germinales normales, proliferan y secretan citoquinas. Sin embargo, no secretan anticuerpos de ningún isotipo. Estos datos sugieren que la vía IRE1 α -sXbp1, tiene un papel regulador selectivo de la función secretora, un aspecto importante en células donde dicha actividad es relevante, como sería el caso de la microglía (ver más adelante).

Por último, y con respecto a la vía de IRE1 α , nuestros resultados indican que otra vía de señalización vinculada a esta proteína (IRE1 α -TRAF2-JNK) se activa en ambas líneas celulares. La actividad de esta vía se asocia con la activación de la apoptosis por el procesamiento de caspasa-3 (Sano & Reed, 2013), lo que reforzaría la implicación de la proteína IRE1 α en la mayor vulnerabilidad de las células BV2 al estrés proteico. En este caso, las células microgliales activarían preferentemente la vía **IRE1 α -TRAF2-JNK** frente a la vía **IRE1 α -sXbp1**, mientras que las neuronas activarían ambas con un predominio de la vía IRE1 α -sXbp1 sobre IRE1 α -TRAF2-JNK. Es importante resaltar que en el caso de las neuronas observamos una mayor activación de la isoforma pJNK46 (JNK1) con respecto a pJNK54 (JNK2), lo cual podría estar relacionado con la activación de la autofagia en la línea neuronal (ver más adelante). En resumen, y en base a todos estos resultados proponemos que uno de los factores responsables de la mayor vulnerabilidad de la microglía al estrés proteico podría recaer en las diferencias cualitativas y cinéticas de la activación de la UPR (figura 1).

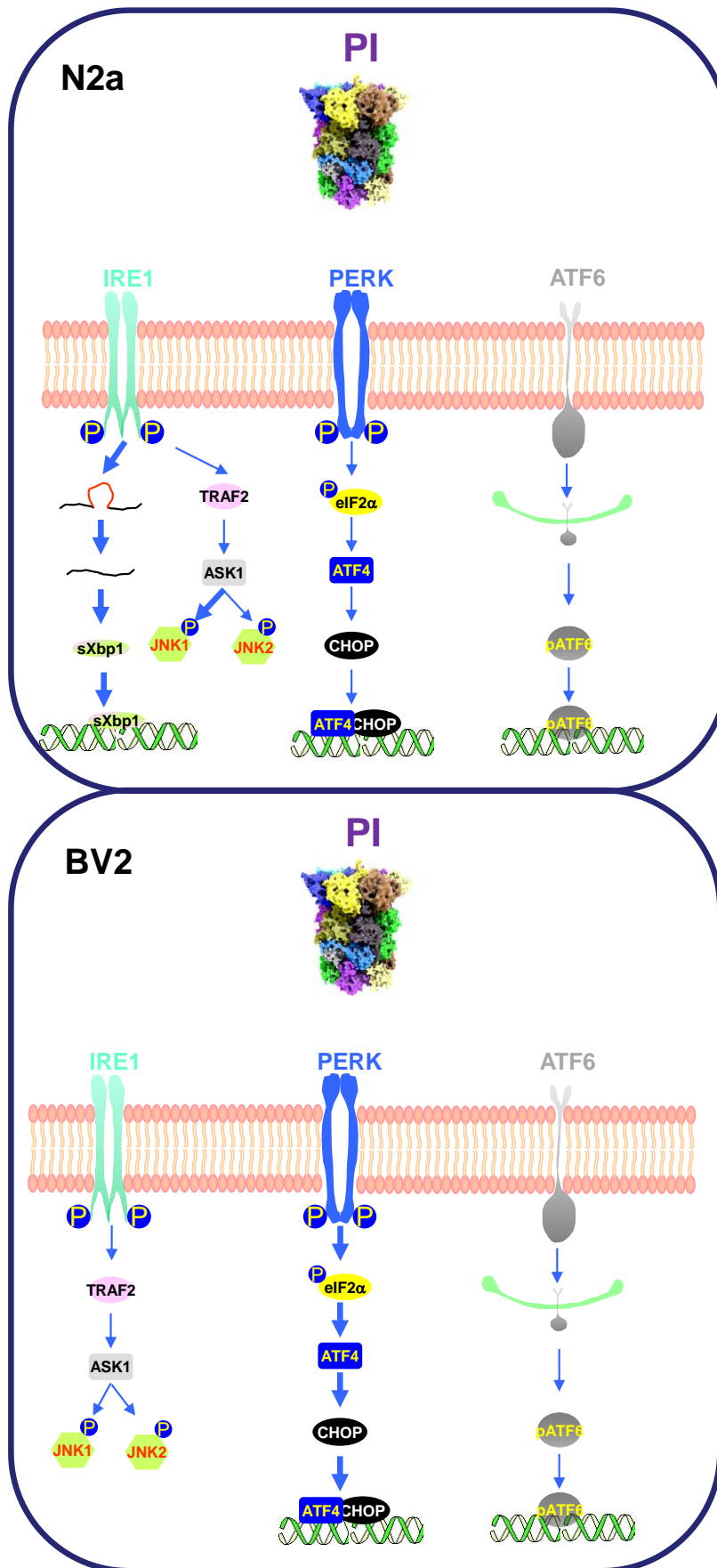


Figura 1. Activación diferencial de las vías de la UPR en ambas líneas celulares. Arriba se muestra un resumen de los resultados de la activación de las vías de la UPR en la línea neuronal (N2a), donde se ha observado una activación canónica, siendo preferencial las dos ramas de la vía IRE1 α : IRE1 α -sXbp1 e IRE1 α -TRAF2-JNK-1. En la parte inferior se representa la activación de estas vías en la línea microglial (BV2), donde se ha observado una activación más intensa de la vía de PERK-CHOP y una activación preferencial de la vía IRE1 α -TRAF2-JNK y la ausencia de activación de la vía IRE1 α -sXbp1.

2.2. AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso catabólico cuya activación ha sido tradicionalmente relacionada con la escasez de nutrientes. Sin embargo, y de manera similar a lo que ocurrió con el UPS, la implicación de la autofagia se hace cada día más presente en multitud de procesos celulares, más allá de la renovación de orgánulos y la obtención de nutrientes y energía. En este trabajo nos hemos centrado en el papel de la autofagia como mecanismo implicado en el mantenimiento de la proteostasis celular tanto en situación basal como de estrés proteico. Resultados previos de nuestro grupo, tanto *in vitro* (E. Gavilán et al., 2013) como *in vivo* (E. Gavilán, Pintado, et al., 2015), han puesto de manifiesto la relación funcional entre el UPS y la autofagia, así como su relevancia en el mantenimiento de la proteostasis y la supervivencia celular (Ruano, 2021). Como se ha comentado, la mayoría de los estudios sobre el papel de la autofagia en la proteostasis celular han sido realizados en neuronas. Las neuronas parecen ser más dependientes de una actividad basal constitutiva de la autofagia que otras células, y su activación no parece ser tan dependiente de la carencia de nutrientes, pudiendo desempeñar un papel más relevante en el mantenimiento de la proteostasis u otras funciones celulares (Maday & Holzbaur, 2016; Mizushima et al., 2004). Por el contrario, poco se conoce sobre este papel en la microglía. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las células microgliales, al igual que las neuronas, activan la autofagia en respuesta a la IP. Además, el tratamiento con rapamicina también estimuló la actividad autofágica de la microglía, como ha sido puesto de manifiesto previamente por otro grupo (Han et al., 2013). Por lo tanto, podemos decir que la actividad autofágica microglial, al igual que la de las neuronas, se activa tanto en respuesta al estrés proteico, como por el efecto de activadores clásicos como la rapamicina.

Por otro lado, nuestros resultados indican que las células microgliales tienen un flujo autofágico más rápido que el de las neuronas en condición basal. Sin embargo, en situación de estrés proteico, ambas líneas estimulan la autofagia, aunque con diferente intensidad e implicación en el mantenimiento de la proteostasis. Por un lado, tal como sugieren los datos cinéticos y de flujo

autofágico para los marcadores LC3 II y p62, las neuronas parecen estimular con menor intensidad, pero con más rapidez, la actividad autofágica. Una cinética que es suficiente para evitar la acumulación de proteínas inducida por la IP. Por el contrario, las células microgliales presentan una activación más intensa, pero más tardía y con un flujo autofágico mayor que el observado en las neuronas. A pesar de ello, las células microgliales acumulan proteínas poli-ubiquitinadas de alto peso molecular de manera tiempo dependiente. Estos datos apoyarían la idea de que el papel de la autofagia neuronal estaría más implicado en el mantenimiento de la proteostasis celular, mientras que podría ser menos relevante en la microglía. De hecho, la inhibición de la autofagia en las neuronas sometidas a estrés proteico disminuyó de manera significativa la viabilidad celular, mientras que la estimulación con rapamicina de la autofagia en las células microgliales produjo un aumento modesto de la misma.

En base a estos resultados proponemos que la relación funcional entre el UPS y la autofagia es un factor clave en el mantenimiento de la proteostasis y la viabilidad celular en condiciones de estrés proteico en las neuronas. Sin embargo, no parece ser de especial relevancia para este fin en las células microgliales.

La menor implicación de la autofagia microglial en la eliminación de agregados proteicos, y el restablecimiento de la proteostasis, podría ser debido a varios factores.

Por un lado, nuestros resultados sugieren que uno de los factores responsables de la menor eficiencia de la autofagia microglial en la eliminación de proteínas poli-ubiquitinadas inducidos por la IP, podría ser el menor grado de fosforilación en Ser405 de la proteína p62. La fosforilación de este residuo ha sido descrita que aumenta la afinidad de la proteína p62 por las cadenas de poli-ubiquitina, permitiendo la estabilización de estas en una estructura denominada *sequestosoma* y su posterior cargo en el autofagosoma para su degradación lisosomal (Matsumoto et al., 2011). De hecho, las neuronas presentan una fosforilación de p62 en Ser405 alta y sostenida en el tiempo, la ausencia de proteínas poli-ubiquitinadas, y no acumulan p62, sugiriendo la degradación simultánea de fosfo-Ser405-p62, LC3 II y el cargo del autofagosoma. Por el

contrario, la microglía presenta un contenido en fosfo-Ser405-p62 bajo y tardío, así como la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas y p62 no fosforilado, sugiriendo que los autofagosomas que se están degradando carecen de p62 y de carga de proteínas poli-ubiquitinadas. No obstante, es cierto que en los cultivos primarios observamos una mayor fosforilación en fosfo-Ser405-p62 en la microglía, aunque presenta mayor acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas. A pesar de que estos resultados son preliminares, y necesitaríamos aumentar el número de experimentos para obtener una conclusión sólida, podrían sugerir que existan diferencias entre las líneas celulares y los cultivos primarios en las quinasas implicadas en la regulación de p62. Por ejemplo, p62 puede ser fosforilado en Ser405 tanto por la caseína quinasa 2 (Matsumoto et al., 2014), como por TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) (Pilli et al., 2012), además de ser fosforilado en Ser409 por ULK1 (Lim et al., 2015), aumentando en todos los casos su afinidad por las cadenas de poli-ubiquitina. Por lo tanto, diferencias en la regulación de p62 por diferentes quinasas, podrían explicar la diferencia observada entre la línea BV2 y la microglía primaria, así como entre microglía y neuronas, en respuesta a la IP.

Por otro lado, el papel de la autofagia microglial no es bien conocido aún. Nuestros resultados apoyan de manera sólida la idea de que la autofagia microglial no parece estar implicada en el mantenimiento de la proteostasis celular en respuesta a la IP, lo que nos lleva a plantearnos **cuál puede ser el papel de la autofagia en las células microgliales**. En este sentido, además de la función canónica de la autofagia, que implicaría la formación del autofagosoma dependiente de ULK1-Atg7 y la palmitoilación de LC3, se ha descrito otra **función no canónica** de la autofagia en macrófagos y microglía, denominada **fagocitosis asociada a LC3** (LAP de sus siglas en inglés). La activación de LAP, es dependiente de proteínas de la autofagia canónica como LC3, Atg7 o Atg5, pero no de ULK1 (Berglund et al., 2020; I. Choi et al., 2020; Heckmann et al., 2019), y estaría relacionada con la función principal de estas células como es la actividad fagocítica (ver Jülg et al., 2021; Plaza-Zabala et al., 2017). La fagocitosis es un mecanismo evolutivamente conservado, al igual que la autofagia, por el cual una célula reconoce, engulle y degrada material extracelular en los lisosomas mediante una vía que comparte similitudes morfológicas y mecanismos con la autofagia. Tanto la autofagia como la

fagocitosis se basan en la formación de estructuras vesiculares transitorias, denominadas autofagosomas y fagosomas, que envuelven material intracelular o extracelular, respectivamente, para ser finalmente degradado en los lisosomas. Sin embargo, mientras que la autofagia está presente en la mayoría de las células, la fagocitosis parece haber quedado restringida principalmente a un conjunto de células del sistema inmune como macrófagos, microglía, células dendríticas y neutrófilos (Sierra et al., 2013).

La relación entre la autofagia y la fagocitosis se ha puesto de manifiesto de manera clara en macrófagos (Vernon & Tang, 2013). Diferentes estudios realizados en macrófagos sugieren que la autofagia y la fagocitosis podrían ser procesos complementarios e interdependientes. Por ejemplo, se ha demostrado en **macrófagos** que la autofagia regula a la fagocitosis modulando la expresión en la membrana celular de receptores scavengers encargados de captar el material extracelular, y mediar su incorporación intracelular (Bonilla et al., 2013). Por otro lado, se ha observado que la unión de partículas a los *Toll-like receptors* (TLRs) de **macrófagos** murinos, estimula su fagocitosis, así como la inducción y translocación de LC3 y beclina 1, de manera ATG5 y ATG7 dependiente, a la membrana del fagosoma para facilitar su fusión con el lisosoma (Sanjuan et al., 2007). Igualmente, la activación de TLR4 por LPS induce la activación de la autofagia en **macrófagos**, y aumenta la co-localización de las bacterias fagocitadas en los fagosomas con los autofagosomas para su eliminación (Gutierrez et al., 2004; Lee et al., 2019; Y. Xu et al., 2007).

Con respecto a la **microglía**, trabajos muy recientes también han puesto de manifiesto la implicación de la **autofagia microglial** en el proceso de degradación del material extracelular incorporado por fagocitosis, característico de diferentes patologías neurodegenerativas. Por un lado, la degradación de **α -sinucleína** liberada por las neuronas, es dependiente de la actividad autofágica de la microglía (*α -sinucleinofagia*) (I. Choi et al., 2020). Igualmente, se ha descrito *in vivo* la participación de la autofagia microglial en la degradación del péptido **A β** fagocitado por la microglía en el hipocampo de ratones transgénicos modelos de la enfermedad de Alzheimer 5XFAD (Heckmann et al., 2019) y APP/PS1 (Lu et al., 2021), así como la degradación de la **mielina** fagocitada en modelos de esclerosis múltiple (Berglund et al., 2020).

En todos los casos, el bloqueo de la autofagia además de disminuir la capacidad degradativa del material fagocitado empeoró los síntomas analizados en cada uno de los estudios como son neurodegeneración, integridad sináptica, o encefalomiелitis, respectivamente.

En conjunto, estos estudios demuestran de forma clara que la fagocitosis y la autofagia son procesos relacionados que pueden ser especialmente relevantes en células del sistema inmune implicadas en la eliminación de agentes patógenos, como es el caso de la microglía. Sin embargo, un aspecto importante aún por conocer con más detalles es el mecanismo de activación de la autofagia no canónica en las células microgliales.

Todos estos datos, y en relación con los resultados mostrados en este trabajo, nos permiten especular sobre la posibilidad de que la activación de la autofagia microglial en respuesta a la IP vaya **encaminada principalmente a la degradación de material externo incorporado por fagocitosis más que a la degradación de proteínas intracelulares acumuladas como consecuencia de la IP**. En este caso, proponemos que el estímulo externo que activaría la autofagia en las células BV2, podrían ser las propias células BV2 que mueren por apoptosis inducida por la IP, una especie de **canibalismo celular** (Deegan et al., 2013), lo que encajaría con la activación más tardía y tiempo dependiente que se observa en esta línea. Es decir, **el principal factor que activaría a la autofagia microglial sería la fagocitosis más que la IP**. La IP produciría estrés de RE que daría lugar a la muerte apoptótica de la microglía (proceso temprano que se observa a las 2 horas), como consecuencia de la activación preferente de la **vía PERK-CHOP** de la UPR. Las células apoptóticas estimularían la fagocitosis en las células vivas y se activaría la autofagia (activación más tardía que en neuronas y con pico a las 3 horas); la sobrecarga de proteínas aumentaría el estrés proteico de la microglía que degeneraría (Sanchez-Mejias et al., 2016), entrando en un círculo vicioso. Además, la activación intensa de la autofagia podría ser otro factor que aumentaría aún más la muerte celular como ha sido descrito previamente para la microglía (Arroyo et al., 2013). En este sentido, hemos observado (datos no mostrados) cómo la inhibición de la autofagia con 3-MA en células BV2 sometidas a la IP, aumenta la supervivencia celular, lo que

indicaría una posible contribución de la autofagia a la muerte celular inducida por la IP (datos no mostrados).

Por lo tanto, el estudio de la relación funcional entre la actividad fagocítica y la autofagia en células de la microglía sometidas a estrés proteico es un aspecto aún pendiente por evaluar, que sería de especial relevancia en el contexto de las patologías neurodegenerativas, donde el estrés proteico es un marcador constante y relevante.

2.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Otro aspecto analizado en este trabajo ha sido el estudio de diferentes vías de señalización que pudieran estar implicadas en la regulación de la autofagia en respuesta a la IP. Las vías que se han analizado han sido seleccionadas en base a resultados previos de nuestro grupo, así como resultados de otros grupos de investigación disponibles en la literatura. De forma general, los datos obtenidos en este trabajo indican que existen diferencias importantes en la señalización celular en respuesta a la IP entre la línea microglial y neuronal.

Comenzando por una vía clásica de activación de la autofagia como es la **vía de mTOR**, los datos indican que esta vía podría participar en la activación de la autofagia en respuesta a la IP, principalmente en neuronas y en menor grado en microglía. Tanto en neuronas como en microglía se observa una inactivación de mTOR, lo que sería compatible con la activación de la autofagia (Ganley et al., 2009). Sin embargo, la cinética de inactivación de mTOR es diferente en ambas líneas celulares. Mientras que en las neuronas la inactivación de **mTOR** es temprana y sostenida, en la microglía es más tardía y transitoria. De hecho, el nivel de fosforilación de dos sustratos de mTORC1, como son fosfo-S6 o fosfo-ULK1, no se modifica en la línea microglial o lo hace de manera muy tardía, respectivamente. Este dato podría sugerir una **menor dependencia de mTORC1, por parte de la microglía, en la activación de la autofagia en respuesta a la IP**, aunque como hemos mostrado, estas células responden a la inhibición de mTORC1 con rapamicina.

Por otro lado, el comportamiento de la **proteína AKT** fue diferente en ambas líneas celulares. La microglía mostró un predominio de la forma fosforilada en Ser473 y una disminución tiempo dependiente en la cantidad de AKT fosforilado en Thr308. Sin embargo, las neuronas mostraron un predominio en la forma fosforilada de AKT en Thr308, sin modificación aparente de la cantidad de AKT fosforilado en Ser473. Teniendo en cuenta que la fosforilación en Ser473 está mediada por el complejo mTORC2 (Sarbasov et al., 2005) y la de Thr308 por PDK1 (Alessi et al., 1997), nuestros datos sugieren que la IP activa de forma célula dependiente a diferentes vías de señalización implicadas en la regulación de la proteína AKT. Por un lado, **la microglía estimularía e inhibiría a mTORC2 y PDK1, respectivamente, mientras que las neuronas estimularían a PDK1 y no afectarían a mTORC2.**

Los datos disponibles en la literatura indican que la fosforilación en Thr308 es en cierto grado dependiente de la fosforilación en Ser473 (H. Guo et al., 2014). Aunque la proteína AKT1 necesita de ambos residuos fosforilados para tener su máxima actividad (Alessi et al., 1996), y a diferencia de la isoforma AKT2, los dos residuos fosforilados se localizan en la misma molécula, en lugar de en proteínas diferentes como ocurre para AKT2. No obstante, también se ha observado en respuesta a la insulina, la existencia de proteínas AKT1 fosforiladas en un solo residuo; bien en Ser473 o en Thr308 (H. Guo et al., 2014). Esta diferencia en el residuo fosforilado en AKT parece ser importante en la determinación de la especificidad de sus sustratos. Por ejemplo, AKT fosforilado solo en Thr308, puede fosforilar a GSK-3 β y TSC2, pero no a FOXO1/FOXO3a, para lo cual es necesario la fosforilación en Ser473, sola o en combinación con Thr308 (Guertin et al., 2006; Jacinto et al., 2006). Todos estos datos nos permiten especular con la posibilidad de que la diferencia en la fosforilación de AKT entre microglía y neuronas en respuesta a la IP podría representar un punto de bifurcación que permitiría regular de manera diferente los sustratos situados corriente abajo, así como la función señalizada por las diferentes vías.

Esta idea se ve además reforzada por los resultados que indican que la fosforilación de AKT en Ser473 o en Thr308, depende del **grado de severidad del estrés de RE**, mediante un mecanismo no bien conocido pero que implicaría la interacción de GRP78 con AKT (Yung et al., 2011). En resumen, un estrés de RE

severo daría lugar al bloqueo de la fosforilación en Thr308. Nuestros resultados muestran que las células BV2 sufren un estrés de RE más severo, que se manifiesta en una menor supervivencia celular, y una disminución tiempo dependiente en el contenido de AKT fosforilada en Thr308. Por el contrario, la línea neuronal mostró un estrés de RE menos severo, con menos muerte celular, y un aumento en la fosforilación en Thr308.

Por otro lado, un estudio reciente ha puesto de manifiesto que la vía **PI3K-AKT-FOXO3**, regula la activación de LAP en células microgliales, de forma que la activación de esta vía en respuesta al LPS, **activa** la vía PI3K-AKT-FOXO3, suprimiendo tanto la autofagia canónica como la no canónica. Por el contrario, la inhibición de esta vía estimula ambos tipos de autofagia en respuesta al LPS (Lee et al., 2019). Estos resultados serían compatibles con los observados en este trabajo (aunque el estímulo es diferente: IP frente a LPS), en el sentido de que las células microgliales inhiben la vía PI3K-AKT-FOXO3. Sin embargo, un estudio previo similar puso de manifiesto lo contrario a lo descrito anteriormente, demostrando que la activación de los TLR4 por LPS **estimulaba** tanto la autofagia canónica como la LAP, aunque en este caso no se examinaron las posibles vías de señalización (Han et al., 2013). En general los pocos datos disponibles sobre el papel de la autofagia microglial, y sus mecanismos de regulación, no son aún muy consistentes, debido a que posiblemente varíen en función del agente implicado en su activación. Nuestros resultados nos indican que la regulación de la proteína AKT es compleja, proporcionando una gran versatilidad a la hora de integrar diferentes señales y las consecuencias fisiológicas resultantes. Es por ello que los resultados obtenidos en este trabajo deben ser considerados con cautela y evaluados con mayor profundidad, mediante aproximaciones farmacológicas y moleculares.

No obstante, nuestros resultados indicarían que en la línea microglial **la disminución temprana y tiempo dependiente del contenido de AKT fosforilado en Thr308**, podría explicar la **disminución en la fosforilación de GSK-3 β en Ser9** (activación), lo que podría contribuir a la no activación o activación débil de la vía IRE1 α -sXbp1 (S. Kim et al., 2015). Por el contrario, el **aumento de AKT fosforilado en Ser473**, podría ser responsable de la **mayor fosforilación, y regulación a la baja, de FOXO3, y este a su vez ser responsable en parte de la activación de**

LAP en las células microgliales. Por otro lado, en la línea neuronal **la fosforilación de AKT en Thr308** podría ser responsable de **la fosforilación temprana y transitoria de GSK-3 β en Ser9** (inactivación), lo que contribuiría a estimular la vía IRE1 α -sXbp1, mientras que la no variación en la fosforilación de **Ser473** podría **explicar la falta de fosforilación de FOXO3 (activo), siendo este otro factor que puede contribuir a la activación de la autofagia canónica.**

Además, como se comenta anteriormente, AKT fosforilado en Thr308 puede fosforilar a TSC2 y a GSK-3 β , inhibiendo a ambas proteínas. A su vez, GSK-3 β fosforila a TSC2, activándolo en este caso (Bhaskar & Hay, 2007; J. Huang & Manning, 2008). Por tanto, en la **línea N2a** mTORC2 estaría sujeto a una **doble regulación negativa; i)** por parte de AKT fosforilado en Thr308, y **ii)** por la inhibición de GSK-3 β , fosforilado en Ser9 por AKT Thr308, lo que sería compatible con la no variación de la cantidad de AKT fosforilado en Ser473. Por el contrario, en la **línea BV2**, se produciría una **doble regulación positiva; i)** por la disminución en AKT fosforilado en Thr308, y **ii)** por la activación sostenida de GSK-3 β , lo que sería compatible con el aumento en la cantidad de AKT fosforilado en Ser473.

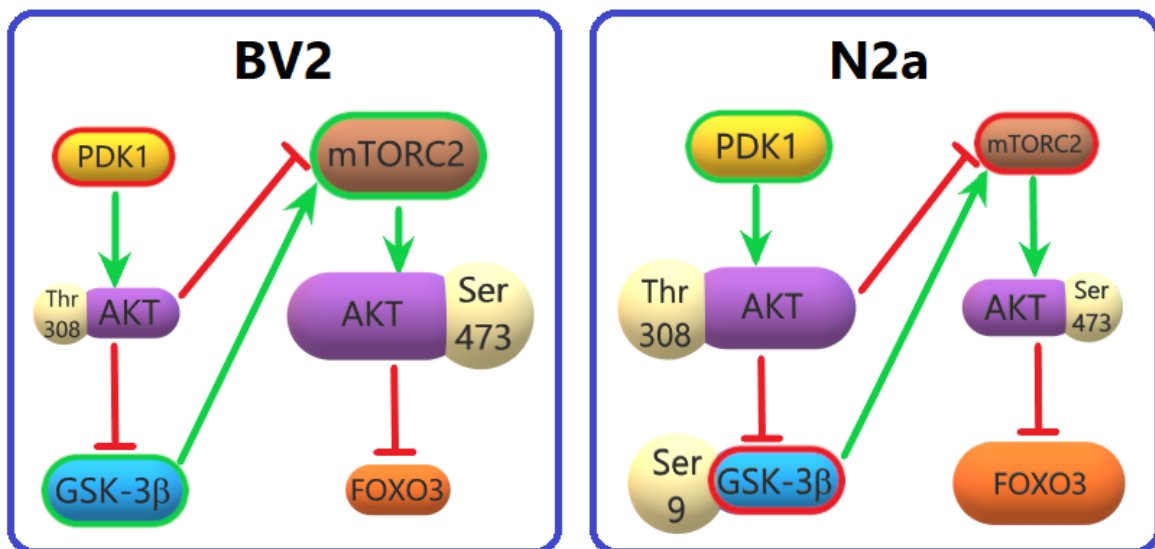


Figura 2. Vías de señalización preferenciales en cada línea celular. En este esquema aparecen las fosforilaciones predominantes en cada línea (indicadas por el tamaño relativo) y el estado de activación/inhibición de PDK1 y mTORC2 (siendo el estado activado indicado por un resalto en color verde, y el inhibido, por uno en color rojo).

En resumen, los datos obtenidos en este trabajo apoyarían la idea de que **la fosforilación diferencial de AKT en Ser473 o en Thr308, determinan la especificidad del sustrato**, y por tanto la elección de una u otra vía de señalización con consecuencias funcionales diferentes en nuestro modelo de IP.

Por último, con respecto a la proteína **β -catenina**, nuestros resultados indican un perfil completamente diferente entre microglía y neuronas. Por un lado, la microglía acumula β -catenina de manera tiempo dependiente, indicando su estabilización y activación, mientras que la neurona mantiene constante los niveles de β -catenina, sugiriendo su degradación y no activación de esta vía. Esta idea se ve apoyada por el perfil transcripcional diferencial, entre microglía y neuronas, de genes dianas de β -catenina, como *vegf* e *IL-6*.

Como hemos visto anteriormente, en neuronas la proteína AKT en neuronas está fosforilada en Thr308 y fosforilaría a GSK-3 β en Ser9, produciendo una inhibición transitoria, que tras su liberación podría fosforilar a β -catenina y facilitar su degradación. De hecho, nuestros resultados muestran una acumulación de β -catenina fosforilada en neuronas de manera tiempo dependiente, siendo más acentuada a partir de las 2 horas, mientras que el contenido de β -catenina permanece constante, indicando por tanto que la vía la vía **AKT/GSK-3 β / β -catenina no se activa en neuronas** en respuesta a la IP.

Por el contrario, en la microglía la proteína AKT fosforilada en Ser473 y la disminución tiempo dependiente en Thr308, daría lugar a una menor actividad quinasa, o a una selección de sustrato que no incluiría a GSK-3 β (Jacinto et al., 2006), resultando en una mayor actividad quinasa GSK-3 β , lo que se traduciría en un mayor grado de fosforilación de β -catenina y su degradación. Sin embargo, a diferencia de las neuronas, el contenido en β -catenina fosforilada comienza a decaer a partir de las 2 horas, a la vez que se acumula β -catenina.

Como se comenta en la Introducción, esta proteína forma parte de la vía Wnt/ β -catenina y en ausencia de ligandos Wnt es degradada a través de la formación de un complejo de destrucción que incluye además de β -catenina a las proteínas Axina1, ACP, las quinasas GSK-3 β y CK1 α , la proteína fosfatasa 2A y la ubiquitina ligasa β -TrCP. La fosforilación de β -catenina por CK1 α en Ser 45, es necesaria para la posterior fosforilación por GSK-3 β en Ser33, Ser37 y Thr41 (Liu et

al., 2002), lo que origina un sitio de unión para la ubiquitina ligasa β -TrCP, que ubiquitina a β -catenina y es finalmente degradada por el proteasoma (Aberle et al., 1997; Stamos & Weis, 2013). Por lo tanto, en base a estos datos proponemos que la **vía AKT/GSK-3 β /** β -**catenina** en microglía presenta un **mecanismo de regulación diferente** al observado en neuronas en respuesta a la IP. En este sentido, la caída en la fosforilación podría ser debida a varios motivos.

En primer lugar, la señalización por ligandos Wnt produce, a través de la proteína Dvl, la desestabilización del complejo de destrucción y la inhibición de la fosforilación de β -catenina por GSK-3 β , así como la relocalización celular de GSK-3 β en el interior de compartimentos acídicos que se corresponden con endosomas multivesiculares, un proceso retroalimentado por la acumulación de β -catenina, impidiendo en definitiva, que GSK-3 β pueda seguir fosforilándola (Taelman et al., 2010). La presencia de receptores para ligandos Wnt ha sido demostrada tanto en microglía (Halleskog et al., 2011; Matias et al., 2019), como en la propia línea BV2 (Wang et al., 2017), donde el ligando Wnt3a parece desempeñar un papel fundamental en respuesta a diferentes estímulos.

En segundo lugar, aunque la proteína GSK-3 β , permanece activa durante todo el tiempo ensayado, la fosforilación de β -catenina en Ser33, Ser37 y Th41 es dependiente de la fosforilación previa del residuo Ser45 por CK1 α , por lo que una inhibición de la actividad CK1 α , sería compatible con una menor fosforilación de β -catenina y una actividad sostenida de GSK-3 β .

Por último, el complejo de destrucción de β -catenina está regulado por uno de sus componentes que es la proteína fosfatasa 2A. La regulación por parte de esta proteína es bastante compleja y existen evidencias tanto a favor de una regulación negativa, como de una regulación positiva (Thompson & Williams, 2018). En cualquier caso, sí se ha demostrado que la proteína fosfatasa 2A defosforila a β -catenina favoreciendo su estabilización (Su et al., 2008; W. Zhang et al., 2009).

En resumen, existen varias posibilidades que podrían explicar la activación sostenida de GSK-3 β y de la vía Wnt/ β -catenina en respuesta a la IP. Serán

necesarios más experimentos para intentar clarificar cuál de estas posibilidades es la más probable en nuestro modelo de estrés proteico.

Otro aspecto interesante, y que difiere entre microglía y neurona es que la proteína β -catenina es un **sustrato preferencial del proteasoma**, por lo que su degradación a través de este no sería compatible con nuestro modelo, donde se encuentra inhibido. Sin embargo, se ha demostrado que la degradación de β -catenina puede ser también llevada a cabo por la autofagia. Por ejemplo, la privación de nutrientes activa a la autofagia produciendo la atenuación de la vía Wnt/ β -catenina gracias a la degradación autofágica de β -catenina (Petherick et al., 2013). Igualmente, la estimulación de la autofagia con trehalosa disminuyó el contenido de β -catenina (Korolchuk et al., 2009). Por lo tanto, la no acumulación de β -catenina en las neuronas podría ser debido a que está siendo degradada a través de la autofagia. Sin embargo, la acumulación de β -catenina en la microglía, además de indicar la activación de esta vía, apoyaría la idea de que la autofagia microglial desempeñaría un papel no canónico, y estaría destinada principalmente a la degradación de material externo captado por fagocitosis, de ahí que no degrade a β -catenina, de la misma forma que no degrada a las proteínas poli-ubiquitinadas, ni a p62. En este sentido, otro aspecto a evaluar sería la posible implicación de β -catenina en la **activación de LAP en la microglía**.

Por último, en este trabajo, además de caracterizar diferentes vías de señalización inducidas por la IP, hemos tratado de evaluar cuál/es de estas vías pueden ejercer un papel relevante en el mantenimiento de la viabilidad celular. En base a nuestros datos pensamos que, en el caso de las neuronas, la supervivencia frente a la IP se sostuvo sobre dos pilares básicos: **i) la activación de la UPR**, con predominio del perfil anti-apoptótico; y **ii) la activación canónica de la autofagia**. De hecho, tanto la inhibición farmacológica de las vías IRE1 α y PERK, así como de la autofagia, resultó en una mayor mortalidad celular inducida por la IP en las neuronas.

La activación de la autofagia por las diferentes vías de la UPR ha sido demostrada de manera inequívoca (Ruano, 2021; Senft & Ronai, 2015), por lo que se podrían estar retroalimentando ambos sistemas. En particular, la vía de

IRE1 α podría jugar un papel central en la regulación de la autofagia en respuesta a la IP en ambos tipos celulares. Por un lado, observamos que la vía **IRE1 α -sXbp1** se activa de manera sostenida en neuronas y no en microglía, y se sabe que la activación sostenida del *splicing* de *xbp1* induce la autofagia estimulando la transcripción de Beclin 1 en células endoteliales (Margariti et al., 2013). Igualmente, el factor de transcripción sXbp1 se une a la región promotora del factor de transcripción TFEB, implicado en la coordinación de la activación de la autofagia y la biosíntesis lisosomal, como ha sido recientemente puesto de manifiesto en el hígado de ratas sometidas a ayuno, estimulando la actividad autofágica (Z. Zhang et al., 2021). Por otro lado, la inhibición farmacológica de JNK en células sometidas a la IP evitó la activación de la autofagia y aumentó la muerte celular, sugiriendo que la activación de la vía **IRE1 α -TRAF2-JNK**, puede ser relevante en la estimulación de la autofagia mediada por el estrés de RE en respuesta a la IP (W.-X. Ding et al., 2007). Además, se ha observado que la isoforma JNK1 (46 kDa), pero no JNK2 (54 kDa), es la responsable de la activación de la autofagia inducida en condiciones de escasez de nutrientes (Wei et al., 2008). En base a estos resultados, podemos proponer que el diferente patrón de activación de la vía **IRE1 α -TRAF2-JNK**, entre neuronas y microglía, con un predominio de activación de JNK1 en las neuronas, podría representar otra diferencia a nivel molecular que pudiera estar determinando el perfil de activación de la autofagia entre ambas líneas celulares. Sin embargo, queda por determinar que este efecto sea similar en nuestro modelo de IP.

En el caso de la microglía la activación de la UPR mostró un perfil pro-apoptótico, y de hecho al inhibir su activación mejoró ligeramente la supervivencia celular. Igualmente, la estimulación canónica de la autofagia con rapamicina, mejoró la viabilidad celular, lo que vuelve a apoyar la idea de que la activación que observamos en la microglía en respuesta a la IP es no canónica y pudiera estar dirigida a la degradación de material extracelular (**LAP**). Por otro lado, la inhibición de GSK-3 β , β -catenina y en especial ambas a la vez, mejoró también la viabilidad celular, lo que sugiere que la activación sostenida de esta vía puede ser otro factor que contribuya a la muerte celular y/o a la activación de LAP. En este sentido, ha sido descrita que la activación moderada de la vía Wnt/ β -catenina ejerce un efecto protector mientras que la sobre expresión de β -catenina resulta en el efecto contrario (Z. Li et al., 2019).

Esta idea se ve apoyada por la mejora en la supervivencia de las células incubadas con DMAT (inhibidor de CK2). Esta quinasa puede fosforilar a β -catenina estabilizándola y enviándola al núcleo, favoreciendo así su activación (D. H. Song et al., 2000, 2003). Por lo tanto, la inhibición de CK2 podría estar atenuando en cierto grado la activación de β -catenina y mejorando la viabilidad celular.

En resumen, nuestros resultados ponen de manifiesto diferencias significativas tanto a nivel molecular como funcional entre la microglía y las neuronas en respuesta al estrés proteico. En concreto, la función de la autofagia es diferente en ambas líneas celulares, así como la activación de diversas vías de señalización que pudieran estar regulando esta diferencia funcional. Además, este trabajo deja abierta diversas líneas de investigación, tales como determinar de manera exacta la/s vía/s de señalización de la activación de la autofagia en ambos tipos celulares en respuesta al estrés proteico, o evaluar el papel de la proteína quinasa AKT en la regulación de la autofagia canónica y no canónica.

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. Las células microgliales son más dependientes del UPS que de la autofagia para mantener la proteostasis celular, mientras que las neuronas dependen de ambos sistemas, manteniendo una colaboración funcional muy efectiva entre ambos.
2. La microglía es más sensible al estrés proteico que las neuronas. Esta diferencia puede ser entendida desde un punto de vista evolutivo, puesto que la microglía tiene capacidad proliferativa mientras que las neuronas son células diferenciadas post-mitóticas.
3. En respuesta a la IP, la microglía activa a la UPR de manera menos eficiente y con un carácter más pro-apoptótico. Por el contrario, las neuronas la activan de manera canónica y con un perfil más anti-apoptótico. En concreto, las células microgliales mostraron un predominio de las vías de ATF6 α y PERK-CHOP, sin activar la vía de IRE1 α -sXbp1, mientras que las neuronas mostraron una activación completa de la UPR con un predominio de la vía de IRE1 α -sXbp1.
4. Este perfil de activación específico del tipo celular parece estar implicado en la diferente susceptibilidad al estrés proteico entre células de la microglía y neuronas.
5. La microglía tiene un flujo autofágico más rápido, pero menos eficiente que las neuronas, en la degradación de las proteínas intracelulares poli-ubiquitinadas. Es por ello por lo que la autofagia microglial podría estar más enfocada a la degradación de material extracelular incorporado

por fagocitosis. De nuevo, esta diferencia podría contribuir a la diferente sensibilidad a la IP entre la microglía y las neuronas.

6. En respuesta a la IP, la microglía activa de manera preferente la vía de AKT/GSK-3 β / β -catenina, mientras que las neuronas activan la vía AKT/FOXO3. El punto de bifurcación podría recaer sobre el patrón diferente de fosforilación de la proteína AKT. Una cuestión relevante será por tanto, determinar si esta diferencia en la señalización podría estar relacionada con el posible papel diferencial que juega la autofagia en microglía y neuronas.
7. Puesto que una de las funciones más relevantes de la microglía es su capacidad fagocítica, nuestros resultados junto con los de otros grupos de investigación nos llevan a pensar que las células de la microglía no están programadas para sobrevivir frente a una situación de estrés proteico, sino más bien para morir y renovarse.

CONCLUSIONS

1. Microglial cells have a higher dependency of UPS than of autophagy to keep cellular proteostasis, while neurons need both systems equally, maintaining a functional collaboration that proves to be highly effective.
2. Microglia have a higher sensitivity to protein stress than neurons. This can be understood from an evolutive point of view, since microglia present a proliferative capacity, while neurons are post-mitotic differentiated cells.

3. As an answer to IP, activation of UPR in microglia tends to be less efficient and presents a more pro-apoptotic nature. On the other hand, in neurons there is a canonical activation with a mostly pro-apoptotic profile. Specifically, microglial cells presented a prevalence of the ATF6 α and PERK-CHOP pathways, while neurons had a complete activation of UPR with a prevalence of the IRE1 α -sXbp1 pathway.
4. This differential profile of activation, specific to the cell type, may contribute to the higher sensibility to protein stress in microglia compared to neurons.
5. The autophagic flux in microglia is faster, but less efficient at degradation of poli-ubiquitinated intracellular proteins than in neurons. The reason underneath this lower efficiency may be that the microglial autophagy is focused on degrading external material that has entered the cell by phagocytosis. This difference in aims may contribute to the higher sensibility to proteasomal inhibition in microglia compared to neurons.
6. As an answer to IP, the AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway is strongly activated in microglial cells, while in neurons the activated pathway is the AKT/FOXO3. The cross point for divergence in these pathways may be the pattern of phosphorylation of AKT. An important issue would be to determinate if this difference in signalling may contribute to the differential role of autophagy in both cell lines.
7. Taking into consideration that one of the main functions of microglia is its phagocytic activity, our results and those of other groups lead us to think that microglia is not programmed to solve and survive to this kind of stress, but to die and renew themselves.

SUMMARY

SUMMARY

In this work we address the study of mechanisms involved in proteostasis preservation in two different types of nervous system cell, such as microglia and neurons. To do so, we use a proteotoxic stress model based on the protein accumulation after blocking the proteasome with MG132, a reversible inhibitor of proteasome.

The most relevant results show that the mechanisms involved, as well as the stress response, are different in the two cell types. On one hand, blocking proteasome induces cell stress that manifests itself as endoplasmic reticulum stress, resulting in the unfolded protein response (UPR) activation. UPR is an homeostatic response, that aims to alleviate the stress situation and/or induce cell death by apoptosis when damage is too severe. Neurons show a fast, complete and efficient activation of UPR, particularly of the IRE1 α -Xbp1 branch -which is involved in cell survival- that in turn promotes a fast recovery of homeostasis and very low levels of cell death. On the other hand, microglia have not an efficient activation of UPR, specially of IRE1 α -Xbp1 branch, while the PERK-CHOP branch is activated in a strong and sustained way. This branch is involved in cell death, so its activation in microglia leads to an early and massive apoptosis of these cells.

Another element that we have approached is the functional relation between proteasome and autophagy. It is essential that there exists an efficient cooperation of both protein degrading systems for cell survival in a proteic stress environment, as this group has already demonstrated with *in vitro* and *in vivo* studies. In this case, our results show that microglial cells have a higher basal autophagic flux than neurons. However, in a context of proteic stress, neurons present a fast and mild rise of the autophagic flux that is enough to eliminate polyubiquitinated proteins. By contrast, microglia do not degrade polyubiquitinated proteins that keep accumulating as time goes by, although there is a strong and slow rise of the flux. This makes us think that the activation of autophagy in microglia is not a response to proteasome inhibition, but to another stimulus. As one of the main goals of microglia is phagocytosis, and the fact that there are studies indicating that microglial autophagy contributes to A β , α -synuclein and myelin residues -typical features of pathologies like Alzheimer

disease, Parkinson or ELA, respectively- degradation after their intake by phagosomes from extracellular medium, we propose the stimulus activating microglial autophagy is autophagocytosis of the same microglial cells that are dying because of the RE stress previously mentioned.

At last, we have also studied the activation state of different pathways that may be involved in autophagy activation. On the whole, our data clearly indicates that there are differences in the activation state of these pathways in both cell types.

On one hand, mTORC1 pathway in neurons is active throughout the total length of the essay, which is compatible with a continued autophagic activity, while in microglia its activation is delayed and short-lived, matching with the behaviour of the autophagy in those cells. Besides that, the AKT-GSK-3 β - β -catenin pathway also shows a differential behaviour. In neurons, AKT seems to be activated by the PI3K-PDK1 pathway, whereas in microglia this pathway is inhibited, and AKT gets activated by mTORC2 pathway. These data suggest that there may be different levels of activation of this protein and/or selection of substrates. In fact, even though AKT is activated in both cell types, GSK-3 β protein is active in microglia through all the length of the essay, while it is temporarily inhibited in neurons. Lastly, β -catenin protein -which is the effector of the Wnt/ β -catenin pathway- shows alternative behaviours in both cell types. In neurons we find no activation of this pathway and it leads us to think that β -catenin is being degraded by autophagy. In contrast, in microglia there is a time dependant accumulation of this protein that suggests a canonical activation of the Wnt/ β -catenin pathway. In addition, this pathway can modulate autophagy too, so this could be a regulatory mechanism of autophagy regarding the material to degrade.

In sum, these data can be interpreted from an evolutive point of view as far as neurons are post-mitotic cells, differentiated and with no proliferative capacity. Thus, it is reasonable that the activated pathways are focused in the degradation of the intracellular material accumulation, alleviating in this way the stress and allowing neuron survival. By contrast, microglial cells have a proliferative capacity, and their function is to oversee the extracellular medium, removing pathogen or cytotoxic agents from the cerebral parenchyma. In such a case it would be likely that the efforts were focused on degrading extracellular

material captured by phagocytosis, hence cell survival not being one of the aims.

Our results are compatible with studies on patients of Alzheimer disease where a microglial degeneration is observed, parallel with the advance of the Braak stages of this pathology.

BIBLIOGRAFÍA

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *The EMBO Journal*, *16*(13). <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3797>
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO Journal*, *15*(23), 6541–6551.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R. J., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Ba. *Current Biology*, *7*(4). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00122-9)
- Allegri, R. F. (2020). Moving from neurodegenerative dementias, to cognitive proteinopathies, replacing “where” by “what”.... *Dementia & Neuropsychologia*, *14*(3). <https://doi.org/10.1590/1980-57642020dn14-030005>
- Almanza, A., Carlesso, A., Chinthra, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Bellerocche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., ... Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*, *286*(2). <https://doi.org/10.1111/febs.14608>
- Aragonès, G., Dasuri, K., Olukorede, O., Francisco, S. G., Renneburg, C., Kumsta, C., Hansen, M., Kageyama, S., Komatsu, M., Rowan, S., Volkin, J., Workman, M., Yang, W., Daza, P., Ruano, D., Dominguez-Martín, H., Rodríguez-Navarro, J. A., Du, X., Brownlee, M. A., ... Taylor, A. (2020). Autophagic receptor p62 protects against glycation-derived toxicity and enhances viability. *Aging Cell*, *19*(11). <https://doi.org/10.1111/acel.13257>
- Arboleda, M. J., Lyons, J. F., Kabbinavar, F., Bray, M. R., Snow, B. E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B. Y., & Slamon, D. J. (2003). Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Research*, *63*(1), 196–206.

- Arroyo, D. S., Soria, J. A., Gaviglio, E. A., Garcia-Keller, C., Cancela, L. M., Rodriguez-Galan, M. C., Wang, J. M., & Iribarren, P. (2013). Toll-like receptor 2 ligands promote microglial cell death by inducing autophagy. *The FASEB Journal*, 27(1). <https://doi.org/10.1096/fj.12-214312>
- Audesse, A. J., Dhakal, S., Hassell, L.-A., Gardell, Z., Nemtsova, Y., & Webb, A. E. (2019). FOXO3 directly regulates an autophagy network to functionally regulate proteostasis in adult neural stem cells. *PLOS Genetics*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008097>
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., & Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 182(4). <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, 353(6294). <https://doi.org/10.1126/science.aac4354>
- Bao, X., Ren, T., Huang, Y., Ren, C., Yang, K., Zhang, H., & Guo, W. (2017). Bortezomib induces apoptosis and suppresses cell growth and metastasis by inactivation of Stat3 signaling in chondrosarcoma. *International Journal of Oncology*, 50(2), 477–486. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3806>
- Barrera-Ramírez, L., Drago Serrano, M. E., Pérez Ramos, J., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F., Sainz Espuñes, T. del R., & Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42–55.
- B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., & Bruhat, A. (2013). The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Research*, 41(16), 7683–7699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt563>
- Bedford, L., Hay, D., Devoy, A., Paine, S., Powe, D. G., Seth, R., Gray, T., Topham, I., Fone, K., Rezvani, N., Mee, M., Soane, T., Layfield, R., Sheppard, P. W., Ebendal, T., Usoskin, D., Lowe, J., & Mayer, R. J. (2008). Depletion of 26S Proteasomes in Mouse Brain Neurons Causes Neurodegeneration and Lewy-

- Like Inclusions Resembling Human Pale Bodies. *Journal of Neuroscience*, 28(33). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2218-08.2008>
- Berglund, R., Guerreiro-Cacais, A. O., Adzemovic, M. Z., Zeitelhofer, M., Lund, H., Ewing, E., Ruhrmann, S., Nutma, E., Parsa, R., Thessen-Hedreul, M., Amor, S., Harris, R. A., Olsson, T., & Jagodic, M. (2020). Microglial autophagy-associated phagocytosis is essential for recovery from neuroinflammation. *Science Immunology*, 5(52). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abb5077>
- Bergmann, T. J., & Molinari, M. (2018). Three branches to rule them all? UPR signalling in response to chemically versus misfolded proteins-induced ER stress. *Biology of the Cell*, 110(9). <https://doi.org/10.1111/boc.201800029>
- Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>
- Beurel, E., Mines, M. A., Song, L., & Jope, R. S. (2012). Glycogen synthase kinase-3 levels and phosphorylation undergo large fluctuations in mouse brain during development. *Bipolar Disorders*, 14(8). <https://doi.org/10.1111/bdi.12023>
- Beurel, E., Yeh, W.-I., Michalek, S. M., Harrington, L. E., & Jope, R. S. (2011). Glycogen Synthase Kinase-3 Is an Early Determinant in the Differentiation of Pathogenic Th17 Cells. *The Journal of Immunology*, 186(3). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003511>
- Bhaskar, P. T., & Hay, N. (2007). The Two TORCs and Akt. *Developmental Cell*, 12(4). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.020>
- Biazik, J., Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Eskelinen, E.-L. (2015). Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy*, 11(3). <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017178>
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., & Johansen, T. (2009). Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1 (pp. 181–197). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03612-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03612-4)
- Bonilla, D. L., Bhattacharya, A., Sha, Y., Xu, Y., Xiang, Q., Kan, A., Jagannath, C., Komatsu, M., & Eissa, N. T. (2013). Autophagy Regulates Phagocytosis by

- Modulating the Expression of Scavenger Receptors. *Immunity*, 39(3). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.026>
- Brancolini, C., & Iuliano, L. (2020). Proteotoxic Stress and Cell Death in Cancer Cells. *Cancers*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/cancers12092385>
- Bustin, S. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169–193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- Bustin, S. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1), 23–39. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0290023>
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., & Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867). <https://doi.org/10.1038/415092a>
- Cecarini, V., Bonfili, L., Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Angeletti, M., Keller, J. N., & Eleuteri, A. M. (2016). The fine-tuning of proteolytic pathways in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(18), 3433–3451. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2238-6>
- Cha-Molstad, H., Sung, K. S., Hwang, J., Kim, K. A., Yu, J. E., Yoo, Y. D., Jang, J. M., Han, D. H., Molstad, M., Kim, J. G., Lee, Y. J., Zakrzewska, A., Kim, S.-H., Kim, S. T., Kim, S. Y., Lee, H. G., Soung, N. K., Ahn, J. S., Ciechanover, A., ... Kwon, Y. T. (2015). Amino-terminal arginylation targets endoplasmic reticulum chaperone BiP for autophagy through p62 binding. *Nature Cell Biology*, 17(7), 917–929. <https://doi.org/10.1038/ncb3177>
- Cheng, S. W. Y., Fryer, L. G. D., Carling, D., & Shepherd, P. R. (2004). Thr2446 Is a Novel Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Phosphorylation Site Regulated by Nutrient Status. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 15719–15722. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300534200>
- Chiang, G. G., & Abraham, R. T. (2005). Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) at Ser-2448 Is Mediated by p70S6 Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27). <https://doi.org/10.1074/jbc.M501707200>

- Choi, C.-H., Lee, B.-H., Ahn, S.-G., & Oh, S.-H. (2012). Proteasome inhibition-induced p38 MAPK/ERK signaling regulates autophagy and apoptosis through the dual phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(4), 759–764. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.095>
- Choi, I., Zhang, Y., Seegobin, S. P., Pruvost, M., Wang, Q., Purtell, K., Zhang, B., & Yue, Z. (2020). Microglia clear neuron-released α -synuclein via selective autophagy and prevent neurodegeneration. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15119-w>
- Cuervo, A. M., & Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research*, 24(1). <https://doi.org/10.1038/cr.2013.153>
- Darrington, R. S., Campa, V. M., Walker, M. M., Bengoa-Vergniory, N., Gorrondo-Etxebarria, I., Uysal-Onganer, P., Kawano, Y., Waxman, J., & Kypka, R. M. (2012). Distinct expression and activity of GSK-3 α and GSK-3 β in prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 131(6). <https://doi.org/10.1002/ijc.27620>
- Deegan, S., Saveljeva, S., Gorman, A. M., & Samali, A. (2013). Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(14). <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1173-4>
- Diaz-Corrales, F. J., Miyazaki, I., Asanuma, M., Ruano, D., & Rios, R. M. (2012). Centrosomal aggregates and Golgi fragmentation disrupt vesicular trafficking of DAT. *Neurobiology of Aging*, 33(10). <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.014>
- Ding, Q., Dimayuga, E., Markesbery, W. R., & Keller, J. N. (2004). Proteasome inhibition increases DNA and RNA oxidation in astrocyte and neuron cultures. *Journal of Neurochemistry*, 91(5). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02802.x>
- Ding, W.-X., Ni, H.-M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D. B., Ron, D., & Yin, X.-M. (2007). Linking of Autophagy to Ubiquitin-Proteasome System Is Important for the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Viability. *The American Journal of Pathology*, 171(2). <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070188>

- Ding, W.-X., & Yin, X.-M. (2008). Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy*, 4(2), 141–150. <https://doi.org/10.4161/auto.5190>
- Dong, S., Jia, C., Zhang, S., Fan, G., Li, Y., Shan, P., Sun, L., Xiao, W., Li, L., Zheng, Y., Liu, J., Wei, H., Hu, C., Zhang, W., Chin, Y. E., Zhai, Q., Li, Q., Liu, J., Jia, F., ... Wang, C. (2013). The REGγ Proteasome Regulates Hepatic Lipid Metabolism through Inhibition of Autophagy. *Cell Metabolism*, 18(3), 380–391. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.012>
- DuRose, J. B., Tam, A. B., & Niwa, M. (2006). Intrinsic Capacities of Molecular Sensors of the Unfolded Protein Response to Sense Alternate Forms of Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology of the Cell*, 17(7). <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0055>
- Evangelisti, C., Chiarini, F., Paganelli, F., Marmioli, S., & Martelli, A. M. (2020). Crosstalks of GSK3 signaling with the mTOR network and effects on targeted therapy of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118635>
- Farhan, M., Wang, H., Gaur, U., Little, P. J., Xu, J., & Zheng, W. (2017). FOXO Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(7). <https://doi.org/10.7150/ijbs.20052>
- Fedorcsák, I., Ehrenberg, L., Baltscheffsky, H., Marøy, K., Brunvoll, J., Bunnenberg, E., Djerassi, C., & Records, R. (1966). Effects of Diethyl Pyrocarbonate and Methyl Methanesulfonate on Nucleic Acids and Nucleases. *Acta Chemica Scandinavica*, 20, 107–112. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.20-0107>
- Figueiredo, V. C., Markworth, J. F., & Cameron-Smith, D. (2017). Considerations on mTOR regulation at serine 2448: implications for muscle metabolism studies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(14), 2537–2545. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2481-5>
- Fryer, H. J. L., Davis, G. E., Manthorpe, M., & Varon, S. (1986). Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. *Analytical Biochemistry*, 153(2), 262–266. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90090-4)

- Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1-ATG13-FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18). <https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200>
- García-González, P., Cabral-Miranda, F., Hetz, C., & Osorio, F. (2018). Interplay Between the Unfolded Protein Response and Immune Function in the Development of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02541>
- Gavilán, E., Giráldez, S., Sánchez-Aguayo, I., Romero, F., Ruano, D., & Daza, P. (2015). Breast cancer cell line MCF7 escapes from G1/S arrest induced by proteasome inhibition through a GSK-3 β dependent mechanism. *Scientific Reports*, 5(1), 10027. <https://doi.org/10.1038/srep10027>
- Gavilán, E., Pintado, C., Gavilán, M. P., Daza, P., Sánchez-Aguayo, I., Castaño, A., & Ruano, D. (2015). Age-related dysfunctions of the autophagy lysosomal pathway in hippocampal pyramidal neurons under proteasome stress. *Neurobiology of Aging*, 36(5). <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.02.025>
- Gavilán, E., Sánchez-Aguayo, I., Daza, P., & Ruano, D. (2013). GSK-3 β signaling determines autophagy activation in the breast tumor cell line MCF7 and inclusion formation in the non-tumor cell line MCF10A in response to proteasome inhibition. *Cell Death & Disease*, 4(4), e572–e572. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.95>
- Gavilán, M. P., Castaño, A., Torres, M., Portavella, M., Caballero, C., Jiménez, S., García-Martínez, A., Parrado, J., Vitorica, J., & Ruano, D. (2009). Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects. *Journal of Neurochemistry*, 108(1). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05762.x>
- Gavilán, M. P., Pintado, C., Gavilán, E., Jiménez, S., Ríos, R. M., Vitorica, J., Castaño, A., & Ruano, D. (2009). Dysfunction of the unfolded protein response increases neurodegeneration in aged rat hippocampus following proteasome inhibition. *Aging Cell*, 8(6). <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00519.x>

- Gavilán, M. P., Revilla, E., Pintado, C., Castaño, A., Vizuete, M. L., Moreno-González, I., Baglietto-Vargas, D., Sánchez-Varo, R., Vitorica, J., Gutiérrez, A., & Ruano, D. (2007). Molecular and cellular characterization of the age-related neuroinflammatory processes occurring in normal rat hippocampus: potential relation with the loss of somatostatin GABAergic neurons. *Journal of Neurochemistry*, *103*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04787.x>
- Gavilán, M. P., Vela, J., Castaño, A., Ramos, B., del Río, J. C., Vitorica, J., & Ruano, D. (2006). Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus. *Neurobiology of Aging*, *27*(7). <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.010>
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Experimental Hematology*, *30*(6), 503–512. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8)
- Glembotski, C. C. (2007). Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart. *Circulation Research*, *101*(10), 975–984. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.161273>
- Goldbaum, O., Vollmer, G., & Richter-Landsberg, C. (2006). Proteasome inhibition by MG-132 induces apoptotic cell death and mitochondrial dysfunction in cultured rat brain oligodendrocytes but not in astrocytes. *Glia*, *53*(8). <https://doi.org/10.1002/glia.20348>
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J., & Sabatini, D. M. (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Developmental Cell*, *11*(6). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.007>
- Gulen, M. F., Bulek, K., Xiao, H., Yu, M., Gao, J., Sun, L., Beurel, E., Kaidanovich-Beilin, O., Fox, P. L., DiCorleto, P. E., Wang, J., Qin, J., Wald, D. N., Woodgett, J. R., Jope, R. S., Carman, J., Dongre, A., & Li, X. (2012). Inactivation of the Enzyme GSK3 α by the Kinase IKKi Promotes AKT-mTOR Signaling Pathway that Mediates Interleukin-1-Induced Th17 Cell Maintenance. *Immunity*, *37*(5). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.019>

- Guo, F.-J., Xiong, Z., Lu, X., Ye, M., Han, X., & Jiang, R. (2014). ATF6 upregulates XBP1S and inhibits ER stress-mediated apoptosis in osteoarthritis cartilage. *Cellular Signalling*, 26(2). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.018>
- Guo, H., Gao, M., Lu, Y., Liang, J., Lorenzi, P. L., Bai, S., Hawke, D. H., Li, J., Dogruluk, T., Scott, K. L., Jonasch, E., Mills, G. B., & Ding, Z. (2014). Coordinate phosphorylation of multiple residues on single AKT1 and AKT2 molecules. *Oncogene*, 33(26). <https://doi.org/10.1038/onc.2013.301>
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., & Deretic, V. (2004). Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis Survival in Infected Macrophages. *Cell*, 119(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.038>
- Halleskog, C., Mulder, J., Dahlström, J., Mackie, K., Hortobágyi, T., Tanila, H., Kumar Puli, L., Färber, K., Harkany, T., & Schulte, G. (2011). WNT signaling in activated microglia is proinflammatory. *Glia*, 59(1), 119–131. <https://doi.org/10.1002/glia.21081>
- Han, H.-E., Kim, T.-K., Son, H.-J., Park, W. J., & Han, P.-L. (2013). Activation of Autophagy Pathway Suppresses the Expression of iNOS, IL6 and Cell Death of LPS-Stimulated Microglia Cells. *Biomolecules and Therapeutics*, 21(1). <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.089>
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., & Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095). <https://doi.org/10.1038/nature04724>
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356). <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science*, 295(5561). <https://doi.org/10.1126/science.1068408>

- Heckmann, B. L., Teubner, B. J. W., Tummers, B., Boada-Romero, E., Harris, L., Yang, M., Guy, C. S., Zakharenko, S. S., & Green, D. R. (2019). LC3-Associated Endocytosis Facilitates β -Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer's Disease. *Cell*, 178(3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.056>
- Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y., & Mills, G. B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(12). <https://doi.org/10.1038/nrd1902>
- Heras-Sandoval, D., Pérez-Rojas, J. M., Hernández-Damián, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cellular Signalling*, 26(12). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.019>
- Hermida, M. A., Dinesh Kumar, J., & Leslie, N. R. (2017). GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Advances in Biological Regulation*, 65. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.06.003>
- Hernandez, F., Lucas, J. J., & Avila, J. (2012). GSK3 and Tau: Two Convergence Points in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33(s1). <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129025>
- Hipp, M. S., Kalveram, B., Raasi, S., Groettrup, M., & Schmidtke, G. (2005). FAT10, a Ubiquitin-Independent Signal for Proteasomal Degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(9). <https://doi.org/10.1128/MCB.25.9.3483-3491.2005>
- Huang, J., & Manning, B. D. (2008). The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochemical Journal*, 412(2). <https://doi.org/10.1042/BJ20080281>
- Huang, S., Xing, Y., & Liu, Y. (2019). Emerging roles for the ER stress sensor IRE1 α in metabolic regulation and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 294(49). <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007036>
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., & Guan, K.-L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development*, 17(15). <https://doi.org/10.1101/gad.1110003>

- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, 4(9). <https://doi.org/10.1038/ncb839>
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C., He, X., MacDougald, O. A., You, M., Williams, B. O., & Guan, K.-L. (2006). TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell*, 126(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.055>
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K.-L. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell*, 115(5). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00929-2)
- Iwahana, E., Akiyama, M., Miyakawa, K., Uchida, A., Kasahara, J., Fukunaga, K., Hamada, T., & Shibata, S. (2004). Effect of lithium on the circadian rhythms of locomotor activity and glycogen synthase kinase-3 protein expression in the mouse suprachiasmatic nuclei. *European Journal of Neuroscience*, 19(8). <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03322.x>
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J., & Su, B. (2006). SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell*, 127(1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.033>
- Jiang, S., Park, D. W., Gao, Y., Ravi, S., Darley-Usmar, V., Abraham, E., & Zmijewski, J. W. (2015). Participation of proteasome-ubiquitin protein degradation in autophagy and the activation of AMP-activated protein kinase. *Cellular Signalling*, 27(6), 1186–1197. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.02.024>
- Jope, R. S., & Johnson, G. V. W. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(2). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.12.004>
- Jülg, J., Strohm, L., & Behrends, C. (2021). Canonical and Noncanonical Autophagy Pathways in Microglia. *Molecular and Cellular Biology*, 41(3). <https://doi.org/10.1128/MCB.00389-20>

- Jung, T., Catalgol, B., & Grune, T. (2009). The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(4). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.04.001>
- Kageyama, S., Gudmundsson, S. R., Sou, Y.-S., Ichimura, Y., Tamura, N., Kazuno, S., Ueno, T., Miura, Y., Noshiro, D., Abe, M., Mizushima, T., Miura, N., Okuda, S., Motohashi, H., Lee, J.-A., Sakimura, K., Ohe, T., Noda, N. N., Waguri, S., ... Komatsu, M. (2021). p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20185-1>
- Kato, M., & Kato, M. (2007). WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network: Fig. 1. *Clinical Cancer Research*, 13(14). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2316>
- Kato, M., & Kato, M. (2017). Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3071>
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2008). Chaperone-Mediated Autophagy. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_15
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Proteostasis and aging. *Nature Medicine*, 21(12). <https://doi.org/10.1038/nm.4001>
- Kim, A. J., Shi, Y., Austin, R. C., & Werstuck, G. H. (2005). Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *Journal of Cell Science*, 118(1). <https://doi.org/10.1242/jcs.01562>
- Kim, S., Joe, Y., Kim, H. J., Kim, Y.-S., Jeong, S. O., Pae, H.-O., Ryter, S. W., Surh, Y.-J., & Chung, H. T. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress-Induced IRE1 α Activation Mediates Cross-Talk of GSK-3 β and XBP-1 To Regulate Inflammatory Cytokine Production. *The Journal of Immunology*, 194(9). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401399>
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Ulrich Hartl, F. (2013). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>

- Kloetzel, P.-M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(3). <https://doi.org/10.1038/35056572>
- Kolb, P. S., Ayaub, E. A., Zhou, W., Yum, V., Dickhout, J. G., & Ask, K. (2015). The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.01.015>
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., & Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095). <https://doi.org/10.1038/nature04723>
- Korolchuk, V. I., Mansilla, A., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2009). Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates. *Molecular Cell*, 33(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.021>
- Korolchuk, V. I., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2010). Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Letters*, 584(7), 1393–1398. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.047>
- Korovila, I., Hugo, M., Castro, J. P., Weber, D., Höhn, A., Grune, T., & Jung, T. (2017). Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biology*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.008>
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R. J., Kominami, E., & Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death & Differentiation*, 14(2). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401984>
- Kwon, Y. T., & Ciechanover, A. (2017). The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(11). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.09.002>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lamark, T., Svenning, S., & Johansen, T. (2017). Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays in Biochemistry*, 61(6). <https://doi.org/10.1042/EBC20170035>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell*, 149(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Lee, J.-W., Nam, H., Kim, L. E., Jeon, Y., Min, H., Ha, S., Lee, Y., Kim, S.-Y., Lee, S. J., Kim, E.-K., & Yu, S.-W. (2019). TLR4 (toll-like receptor 4) activation suppresses autophagy through inhibition of FOXO3 and impairs phagocytic capacity of microglia. *Autophagy*, 15(5). <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1556946>
- Li, L., Tan, J., Miao, Y., Lei, P., & Zhang, Q. (2015). ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(5). <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0166-x>
- Li, Z., Chen, S., Chen, S., Huang, D., Ma, K., & Shao, Z. (2019). Moderate activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes the survival of rat nucleus pulposus cells via regulating apoptosis, autophagy, and senescence. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(8). <https://doi.org/10.1002/jcb.28518>
- Liao, Y., & Hung, M.-C. (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. *American Journal of Translational Research*, 2(1), 19–42.
- Lien, W.-H., & Fuchs, E. (2014). Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes & Development*, 28(14). <https://doi.org/10.1101/gad.244772.114>
- Lim, J., Lachenmayer, M. L., Wu, S., Liu, W., Kundu, M., Wang, R., Komatsu, M., Oh, Y. J., Zhao, Y., & Yue, Z. (2015). Proteotoxic Stress Induces Phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to Regulate Selective Autophagic Clearance of Protein Aggregates. *PLOS Genetics*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004987>
- Linding, R., Jensen, L. J., Ostheimer, G. J., van Vugt, M. A. T. M., Jørgensen, C., Miron, I. M., Diella, F., Colwill, K., Taylor, L., Elder, K., Metalnikov, P., Nguyen, V., Pasculescu, A., Jin, J., Park, J. G., Samson, L. D., Woodgett, J. R., Russell, R. B., Bork, P., ... Pawson, T. (2007). Systematic Discovery of In Vivo

Phosphorylation Networks. *Cell*, 129(7).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.052>

Lisak, R. P., Nedelkoska, L., Studzinski, D., Bealmear, B., Xu, W., & Benjamins, J. A. (2011). Cytokines regulate neuronal gene expression: Differential effects of Th1, Th2 and monocyte/macrophage cytokines. *Journal of Neuroimmunology*, 238(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.06.010>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Longo, K. A., Kennell, J. A., Ochocinska, M. J., Ross, S. E., Wright, W. S., & MacDougald, O. A. (2002). Wnt Signaling Protects 3T3-L1 Preadipocytes from Apoptosis through Induction of Insulin-like Growth Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41). <https://doi.org/10.1074/jbc.M206402200>

Lorzadeh, S., Kohan, L., Ghavami, S., & Azarpira, N. (2021). Autophagy and the Wnt signaling pathway: A focus on Wnt/ β -catenin signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118926>

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.

Lu, J., Zhang, C., Lv, J., Zhu, X., Jiang, X., Lu, W., Lu, Y., Tang, Z., Wang, J., & Shen, X. (2021). Antiallergic drug desloratadine as a selective antagonist of 5HT_{2A} receptor ameliorates pathology of Alzheimer's disease model mice by improving microglial dysfunction. *Aging Cell*, 20(1). <https://doi.org/10.1111/accel.13286>

Maday, S., & Holzbaur, E. L. F. (2016). Compartment-Specific Regulation of Autophagy in Primary Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 36(22). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4401-15.2016>

Madhunapantula, S. v., Sharma, A., Gowda, R., & Robertson, G. P. (2013). Identification of glycogen synthase kinase 3a as a therapeutic target in

- melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 26(6).
<https://doi.org/10.1111/pcmr.12156>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 129(7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Margariti, A., Li, H., Chen, T., Martin, D., Vizcay-Barrena, G., Alam, S., Karamariti, E., Xiao, Q., Zampetaki, A., Zhang, Z., Wang, W., Jiang, Z., Gao, C., Ma, B., Chen, Y.-G., Cockerill, G., Hu, Y., Xu, Q., & Zeng, L. (2013). XBP1 mRNA Splicing Triggers an Autophagic Response in Endothelial Cells through BECLIN-1 Transcriptional Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(2). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.412783>
- Martinez-Vicente, M., Sovak, G., & Cuervo, A. M. (2005). Protein degradation and aging. *Experimental Gerontology*, 40(8–9). <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.07.005>
- Mathew, R., Karp, C. M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., DiPaola, R. S., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2009). Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell*, 137(6), 1062–1075. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.048>
- Matias, D., Dubois, L. G., Pontes, B., Rosário, L., Ferrer, V. P., Balça-Silva, J., Fonseca, A. C. C., Macharia, L. W., Romão, L., e Spohr, T. C. L. de S., Chimelli, L., Filho, P. N., Lopes, M. C., Abreu, J. G., Lima, F. R. S., & Moura-Neto, V. (2019). GBM-Derived Wnt3a Induces M2-Like Phenotype in Microglial Cells Through Wnt/ β -Catenin Signaling. *Molecular Neurobiology*, 56(2). <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1150-5>
- Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., & Nukina, N. (2011). Serine 403 Phosphorylation of p62/SQSTM1 Regulates Selective Autophagic Clearance of Ubiquitinated Proteins. *Molecular Cell*, 44(2). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.039>
- Maurin, H., Lechat, B., Dewachter, I., Ris, L., Louis, J. v, Borghgraef, P., Devijver, H., Jaworski, T., & van Leuven, F. (2013). Neurological characterization of mice deficient in GSK3 α highlight pleiotropic physiological functions in cognition and pathological activity as Tau kinase. *Molecular Brain*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-27>

- Metcalf, C., Mendoza-Topaz, C., Mieszczanek, J., & Bienz, M. (2010). Stability elements in the LRP6 cytoplasmic tail confer efficient signalling upon DIX-dependent polymerization. *Journal of Cell Science*, 123(9). <https://doi.org/10.1242/jcs.067546>
- Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7(7). <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.14733>
- Min, H., Xu, M., Chen, Z., Zhou, J., Huang, M., Zheng, K., & Zou, X. (2014). Bortezomib induces protective autophagy through AMP-activated protein kinase activation in cultured pancreatic and colorectal cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(1), 167–176. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2451-7>
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182). <https://doi.org/10.1038/nature06639>
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3). <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0704>
- Morimoto, R. I., & Cuervo, A. M. (2014). Proteostasis and the Aging Proteome in Health and Disease. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 69(Suppl 1). <https://doi.org/10.1093/gerona/glu049>
- Nàger, M., Sallán, M. C., Visa, A., Pushparaj, C., Santacana, M., Macià, A., Yeramian, A., Cantí, C., & Herreros, J. (2018). Inhibition of WNT-CTNNB1 signaling upregulates SQSTM1 and sensitizes glioblastoma cells to autophagy blockers. *Autophagy*, 14(4). <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1423439>
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., & Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of Biosciences*, 31(1). <https://doi.org/10.1007/BF02705243>

- Nie, T., Yang, S., Ma, H., Zhang, L., Lu, F., Tao, K., Wang, R., Yang, R., Huang, L., Mao, Z., & Yang, Q. (2016). Regulation of ER stress-induced autophagy by GSK3 β -TIP60-ULK1 pathway. *Cell Death & Disease*, 7(12). <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.423>
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12). <https://doi.org/10.1038/nrm3470>
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., & Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & Development*, 16(11), 1345–1355. <https://doi.org/10.1101/gad.992302>
- Nusse, R., & Clevers, H. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, 169(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
- Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2015). The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649>
- Ohtake, F., Tsuchiya, H., Saeki, Y., & Tanaka, K. (2018). K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.1716673115>
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., & Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24131–24145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>
- Patel, C., Saad, H., Shenkman, M., & Lederkremer, G. Z. (2020). Oxidoreductases in Glycoprotein Glycosylation, Folding, and ERAD. *Cells*, 9(9), 2138. <https://doi.org/10.3390/cells9092138>

- Pearce, L. R., Komander, D., & Alessi, D. R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/nrm2822>
- Petherick, K. J., Williams, A. C., Lane, J. D., Ordóñez-Morán, P., Huelsken, J., Collard, T. J., Smartt, H. J., Batson, J., Malik, K., Paraskeva, C., & Greenhough, A. (2013). Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk. *The EMBO Journal*, 32(13). <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.123>
- Pilli, M., Arko-Mensch, J., Ponpuak, M., Roberts, E., Master, S., Mandell, M. A., Dupont, N., Ornatowski, W., Jiang, S., Bradfute, S. B., Bruun, J.-A., Hansen, T. E., Johansen, T., & Deretic, V. (2012). TBK-1 Promotes Autophagy-Mediated Antimicrobial Defense by Controlling Autophagosome Maturation. *Immunity*, 37(2). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.015>
- Pintado, C., Gavilán, M. P., Gavilán, E., García-Cuervo, L., Gutiérrez, A., Vitorica, J., Castaño, A., Ríos, R. M., & Ruano, D. (2012). Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation leads to the accumulation of ubiquitinated proteins and increases susceptibility to neurodegeneration induced by proteasome inhibition in rat hippocampus. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-87>
- Pintado, C., Macías, S., Domínguez-Martín, H., Castaño, A., & Ruano, D. (2017). Neuroinflammation alters cellular proteostasis by producing endoplasmic reticulum stress, autophagy activation and disrupting ERAD activation. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08722-3>
- Plaza-Zabala, A., Sierra-Torre, V., & Sierra, A. (2017). Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030598>
- Pohl, C., & Dikic, I. (2019). Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science*, 366(6467). <https://doi.org/10.1126/science.aax3769>
- Prossomariti, A., Piazzì, G., Alquati, C., & Ricciardiello, L. (2020). Are Wnt/ β -Catenin and PI3K/AKT/mTORC1 Distinct Pathways in Colorectal Cancer? *Cellular and*

Molecular Gastroenterology and Hepatology, 10(3).
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.04.007>

Rajapaksa, G., Nikolos, F., Bado, I., Clarke, R., Gustafsson, J.-Å., & Thomas, C. (2015). ER β decreases breast cancer cell survival by regulating the IRE1/XBP-1 pathway. *Oncogene*, 34(31). <https://doi.org/10.1038/onc.2014.343>

Ramos, B., Baglietto-Vargas, D., Rio, J. C. del, Moreno-Gonzalez, I., Santa-Maria, C., Jimenez, S., Caballero, C., Lopez-Tellez, J. F., Khan, Z. U., Ruano, D., Gutierrez, A., & Vitorica, J. (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1 \times APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 27(11), 1658–1672. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.022>

Ravanan, P., Srikumar, I. F., & Talwar, P. (2017). Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sciences*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.029>

Rechsteiner, M., & Hill, C. P. (2005). Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends in Cell Biology*, 15(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.11.003>

Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallese, E. M., Friend, D., Grusby, M. J., Alt, F., & Glimcher, L. H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 412(6844). <https://doi.org/10.1038/35085509>

Ren, J., Liu, T., Han, Y., Wang, Q., Chen, Y., Li, G., & Jiang, L. (2018). GSK-3 β inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in non-small cell lung cancer. *Diagnostic Pathology*, 13(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0708-x>

Ron, D., & Hubbard, S. R. (2008). How IRE1 Reacts to ER Stress. *Cell*, 132(1), 24–26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.017>

Rouschop, K., & Wouters, B. (2009). Regulation of Autophagy Through Multiple Independent Hypoxic Signaling Pathways. *Current Molecular Medicine*, 9(4), 417–424. <https://doi.org/10.2174/156652409788167131>

- Ruano, D. (2021). Proteostasis Dysfunction in Aged Mammalian Cells. The Stressful Role of Inflammation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.658742>
- Rzymiski, T., Milani, M., Pike, L., Buffa, F., Mellor, H. R., Winchester, L., Pires, I., Hammond, E., Ragoussis, I., & Harris, A. L. (2010). Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene*, 29(31), 4424–4435. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.191>
- Saffig, P., & Puertollano, R. (2021). How Lysosomes Sense, Integrate, and Cope with Stress. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(2), 97–112. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.09.004>
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Molecular Cell*, 25(6). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.003>
- Sanchez-Mejias, E., Navarro, V., Jimenez, S., Sanchez-Mico, M., Sanchez-Varo, R., Nuñez-Diaz, C., Trujillo-Estrada, L., Davila, J. C., Vizuite, M., Gutierrez, A., & Vitorica, J. (2016). Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathologica*, 132(6). <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1630-5>
- Sanjuan, M. A., Dillon, C. P., Tait, S. W. G., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J. L., Withoff, S., & Green, D. R. (2007). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*, 450(7173). <https://doi.org/10.1038/nature06421>
- Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*, 307(5712). <https://doi.org/10.1126/science.1106148>

- Schönthal, A. H. (2012). Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica*, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/857516>
- Schreiber, A., & Peter, M. (2014). Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(1), 163–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.019>
- Sekulic, A., Hudson, C. C., Homme, J. L., Yin, P., Otterness, D. M., Karnits, L. M., & Abraham, R. T. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Research*, 60(13), 3504–3513.
- Senft, D., & Ronai, Z. A. (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(3). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.01.002>
- Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., & Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00006>
- Silva-Pavez, E., & Tapia, J. C. (2020). Protein Kinase CK2 in Cancer Energetics. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00893>
- Siwecka, N., Rozpędek-Kamińska, W., Wawrzynkiewicz, A., Pytel, D., Diehl, J. A., & Majsterek, I. (2021). The Structure, Activation and Signaling of IRE1 and Its Role in Determining Cell Fate. *Biomedicines*, 9(2), 156. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020156>
- Soliman, G. A., Acosta-Jaquez, H. A., Dunlop, E. A., Ekim, B., Maj, N. E., Tee, A. R., & Fingar, D. C. (2010). mTOR Ser-2481 Autophosphorylation Monitors mTORC-specific Catalytic Activity and Clarifies Rapamycin Mechanism of Action. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096222>

- Song, D. H., Dominguez, I., Mizuno, J., Kaut, M., Mohr, S. C., & Seldin, D. C. (2003). CK2 Phosphorylation of the Armadillo Repeat Region of β -Catenin Potentiates Wnt Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26). <https://doi.org/10.1074/jbc.M212260200>
- Song, D. H., Sussman, D. J., & Seldin, D. C. (2000). Endogenous Protein Kinase CK2 Participates in Wnt Signaling in Mammary Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31). <https://doi.org/10.1074/jbc.M909107199>
- Song, L., de Sarno, P., & Jope, R. S. (2002). Central Role of Glycogen Synthase Kinase-3 β in Endoplasmic Reticulum Stress-induced Caspase-3 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47). <https://doi.org/10.1074/jbc.M206047200>
- Stamos, J. L., & Weis, W. I. (2013). The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007898>
- Studencka-Turski, M., Çetin, G., Junker, H., Ebstein, F., & Krüger, E. (2019). Molecular Insight Into the IRE1 α -Mediated Type I Interferon Response Induced by Proteasome Impairment in Myeloid Cells of the Brain. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02900>
- Su, Y., Fu, C., Ishikawa, S., Stella, A., Kojima, M., Shitoh, K., Schreiber, E. M., Day, B. W., & Liu, B. (2008). APC Is Essential for Targeting Phosphorylated β -Catenin to the SCF β -TrCP Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*, 32(5). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.023>
- Sun, A., Li, C., Chen, R., Huang, Y., Chen, Q., Cui, X., Liu, H., Thrasher, J. B., & Li, B. (2016). GSK-3 β controls autophagy by modulating LKB1-AMPK pathway in prostate cancer cells. *The Prostate*, 76(2), 172–183. <https://doi.org/10.1002/pros.23106>
- Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.-L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., Sabatini, D. D., & de Robertis, E. M. (2010). Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell*, 143(7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.034>

- Tay, K. H., Luan, Q., Croft, A., Jiang, C. C., Jin, L., Zhang, X. D., & Tseng, H.-Y. (2014). Sustained IRE1 and ATF6 signaling is important for survival of melanoma cells undergoing ER stress. *Cellular Signalling*, 26(2). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.008>
- Thibaudeau, T. A., & Smith, D. M. (2019). A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 71(2). <https://doi.org/10.1124/pr.117.015370>
- Thompson, J., & Williams, C. (2018). Protein Phosphatase 2A in the Regulation of Wnt Signaling, Stem Cells, and Cancer. *Genes*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/genes9030121>
- Tsuru, A., Imai, Y., Saito, M., & Kohno, K. (2016). Novel mechanism of enhancing IRE1 α -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep24217>
- Tydlacka, S., Wang, C.-E., Wang, X., Li, S., & Li, X.-J. (2008). Differential Activities of the Ubiquitin-Proteasome System in Neurons versus Glia May Account for the Preferential Accumulation of Misfolded Proteins in Neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(49). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4393-08.2008>
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science*, 287(5453), 664–666. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>
- Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K., & Tsatsanis, C. (2017). Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *The Journal of Immunology*, 198(3). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601515>
- Vernon, P. J., & Tang, D. (2013). Eat-Me: Autophagy, Phagocytosis, and Reactive Oxygen Species Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(6). <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4810>
- Villar, V. H., & Durán, R. v. (2017). Glutamoptosis: A new cell death mechanism inhibited by autophagy during nutritional imbalance. *Autophagy*, 13(6). <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1299315>

- Volker, C., & Lupas, A. N. (2002). *Molecular Evolution of Proteasomes* (pp. 1–22). https://doi.org/10.1007/978-3-642-59414-4_1
- Waldherr, S. M., Strovass, T. J., Vadset, T. A., Liachko, N. F., & Kraemer, B. C. (2019). Constitutive XBP-1s-mediated activation of the endoplasmic reticulum unfolded protein response protects against pathological tau. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12070-3>
- Walter, F., Schmid, J., DÜssmann, H., Concannon, C. G., & Prehn, J. H. M. (2015). Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBP1 and PERK/ATF4 signalling rather than a switch between signalling branches determine cell survival. *Cell Death & Differentiation*, *22*(9). <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.241>
- Wang, Y., & Le, W.-D. (2019). Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System. In *Autophagy: Biology and Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1206). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_25
- Wang, Y., Liao, J., Tang, S.-J., Shu, J., & Zhang, W. (2017). HIV-1 gp120 Upregulates Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Expression in BV2 Cells via the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*, *62*(2). <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0931-z>
- Webb, A. E., & Brunet, A. (2014). FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(4). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.003>
- Wei, Y., Pattinre, S., Sinha, S., Bassik, M., & Levine, B. (2008). JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Molecular Cell*, *30*(6). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.001>
- Xia, P., & Xu, X.-Y. (2015). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *American Journal of Cancer Research*, *5*(5), 1602–1609.
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.-D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejaska, K. E., & Eissa, N. T. (2007). Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity. *Immunity*, *27*(1). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.022>

- Xu, Z., Han, X., Ou, D., Liu, T., Li, Z., Jiang, G., Liu, J., & Zhang, J. (2020). Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2). <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10257-8>
- Yang, J., Takahashi, Y., Cheng, E., Liu, J., Terranova, P. F., Zhao, B., Thrasher, J. B., Wang, H.-G., & Li, B. (2010). GSK-3 β promotes cell survival by modulating Bif-1-dependent autophagy and cell death. *Journal of Cell Science*, 123(6), 861–870. <https://doi.org/10.1242/jcs.060475>
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Hemmings-Mieszczak, M., Feng, J., Brodbeck, D., Perentes, E., & Hemmings, B. A. (2003). Protein Kinase Ba/Akt1 Regulates Placental Development and Fetal Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34). <https://doi.org/10.1074/jbc.M302847200>
- Yim, W. W.-Y., & Mizushima, N. (2020). Lysosome biology in autophagy. *Cell Discovery*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0141-7>
- Yung, H. W., Charnock-Jones, D. S., & Burton, G. J. (2011). Regulation of AKT Phosphorylation at Ser473 and Thr308 by Endoplasmic Reticulum Stress Modulates Substrate Specificity in a Severity Dependent Manner. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017894>
- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., & He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, 438(7069). <https://doi.org/10.1038/nature04185>
- Zhang, W., Yang, J., Liu, Y., Chen, X., Yu, T., Jia, J., & Liu, C. (2009). PR55a, a Regulatory Subunit of PP2A, Specifically Regulates PP2A-mediated β -Catenin Dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.013698>
- Zhang, X., Gaspard, J. P., & Chung, D. C. (2001). Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by the Wnt and K-ras Pathways in Colonic Neoplasia. *Cancer Research*, 61(16), 6050. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/16/6050.abstract>

- Zhang, Z., Qian, Q., Li, M., Shao, F., Ding, W.-X., Lira, V. A., Chen, S. X., Sebag, S. C., Hotamisligil, G. S., Cao, H., & Yang, L. (2021). The unfolded protein response regulates hepatic autophagy by sXBP1-mediated activation of TFEB. *Autophagy*, *17*(8). <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1788889>
- Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S. H., & Goldberg, A. L. (2007). FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. *Cell Metabolism*, *6*(6). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.004>
- Zheng, Q., Li, J., & Wang, X. (2009). Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, *1*(2), 127–142.
- Zheng, Q., Su, H., Tian, Z., & Wang, X. (2011). Proteasome malfunction activates macroautophagy in the heart. *American Journal of Cardiovascular Disease*, *1*(3), 214–226.