

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II



PAPEL DE TSC2/mTORC1 EN PROLIFERACION, AUTOFAGIA Y ESTRES
DE RETICULO ENDOPLASMATICO
EN CELULA β PANCREATICA

TESIS DOCTORAL DE:

ALBERTO BARTOLOMÉ HERRANZ

DIRIGIDA POR:

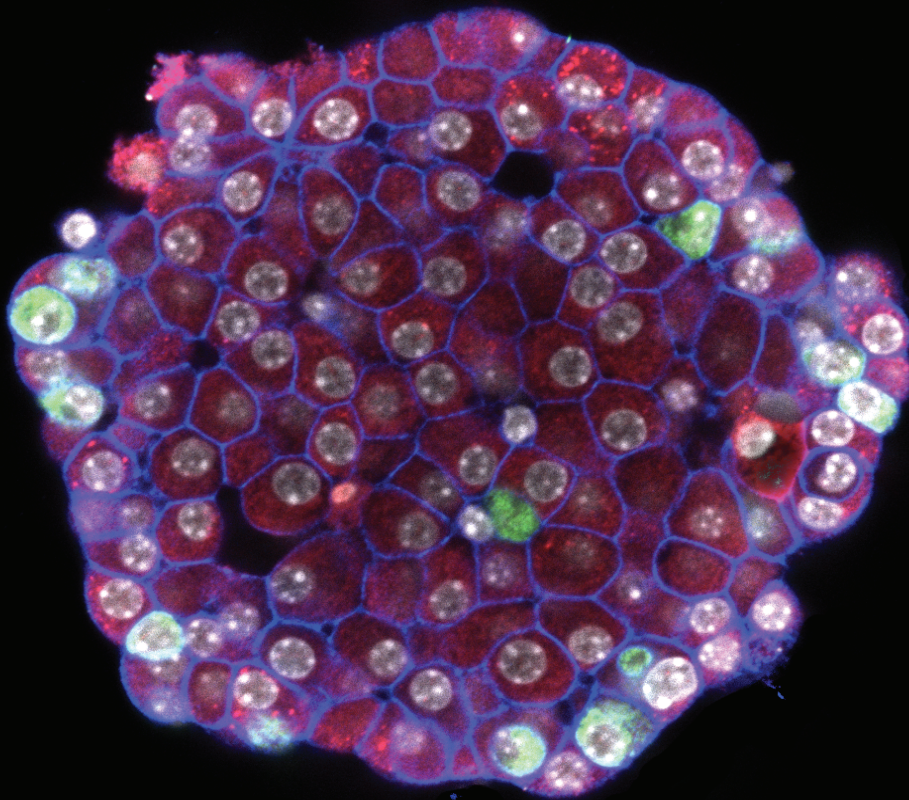
**MANUEL BENITO DE LAS HERAS
CARLOS GUILLÉN VIEJO**

Madrid, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

Papel de TSC2/mTORC1 en proliferación, autofagia y estrés de retículo endoplasmático en célula β pancreática



TESIS DOCTORAL

Alberto Bartolomé Herranz
Madrid, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**Papel de TSC2/mTORC1 en proliferación,
autofagia y estrés de retículo endoplasmático
en célula β pancreática**

TESIS DOCTORAL

ALBERTO BARTOLOMÉ HERRANZ

Madrid, 2012

Foto de portada:

Inmunofluorescencia en microscopio confocal, islote de Langerhans aislado y marcado con anticuerpos para insulina (células β , rojo), glucagón (célula α , verde), β -catenina (membranas, azul) y núcleos (blanco).



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Manuel Benito de las Heras y el Dr. Carlos Guillén Viejo.

Opta al grado de doctor:
Alberto Bartolomé Herranz

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte mediante la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario. Así como a los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación SAF2008/00031 y SAF2011/22555, además de un proyecto de la Sociedad Española de Diabetes para Jóvenes Investigadores y la financiación del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), del Instituto de Salud Carlos III.

*“Hazlo o no lo hagas,
pero no lo intentes”*

— Maestro Yoda

Índice

Abreviaturas

1. Introducción.....1

1.1 Diabetes tipo 2 y papel de la célula β pancreática en la homeostasis metabólica 3

1.1.1 La diabetes en la actualidad 3

1.1.2 Fisiopatología de la diabetes tipo 2..... 4

1.1.3 Papel de la célula β en la homeostasis metabólica .. 6

1.1.3.1 Estructura anatómica de los islotes de Langerhans.....6

1.1.3.2 Función de la célula β pancreática: secreción de insulina.....7

1.1.3.3 Plasticidad de la masa de célula β8

1.1.4 El fracaso de la célula β 9

1.2 Señalización celular 11

1.2.1 La insulina y su receptor 11

1.2.1.1 La insulina..... 11

1.2.1.2 El receptor de insulina y sus isoformas..... 11

1.2.1.3 El receptor de insulina en célula β pancreática..... 13

1.2.2 Señalización de la insulina 14

1.2.2.1 Sustratos del receptor de insulina..... 14

1.2.2.4 Ruta Ras-MAPK 17

1.2.2.4 Factores de transcripción de la familia *forkhead box*..... 17

1.2.3 Modulación de la señalización por el estatus energético 19

1.2.3.1 Señalización de la glucosa en célula β 19

1.2.3.2 AMPK, importancia en célula β 19

1.2.4 El complejo TSC1-TSC2..... 21

1.2.4.1 Estructura y función.....21

1.2.4.2 El complejo TSC1-TSC2 como nexo de integración de señales 22

1.2.5 mTORC1 25

1.2.5.1 Estructura de los complejos de mTOR.....25

1.2.5.2 Regulación de mTORC1 26

1.2.5.3 Dianas clásicas de mTORC1 26

1.2.5.4 Retroalimentación negativa sobre la señalización de insulina.....27

1.2.5.5 mTORC1 y autofagia 28

1.2.5.6 mTORC1 y mitocondria 28

1.2.6 Importancia del complejo TSC1-TSC2/mTORC1 en célula β29

1.2.6.1 Complejo TSC1-TSC2 29

1.2.6.2 mTORC1 y efectos observados por tratamiento con rapamicina 30

1.2.6.3 Dianas de mTORC1 30

1.3 Eventos moleculares de importancia en muerte o supervivencia de célula β 33

1.3.1 Apoptosis 33

1.3.1.1 Introducción a la apoptosis..... 33

1.3.1.2 Apoptosis en célula β 34

1.3.2 Acumulación de proteínas defectuosas..... 34

1.3.2.1 Acumulación de amilina..... 34

1.3.2.2 Insulina 35

1.3.2.3 Agregados proteicos de origen diverso 36

1.3.3 Estrés de retículo endoplasmático 37

1.3.3.1 Estrés de retículo endoplasmático y el “*unfolded protein response*” 37

1.3.3.2 Apoptosis inducida por estrés de RE, papel de las proteínas de la familia de Bcl-2..... 38

1.3.3.3 Estrés de RE y UPR en célula β 39

1.3.4 Autofagia 41

1.3.4.1 Definición y función..... 41

1.3.4.2 Regulación de autofagia 42

1.3.4.3 Componentes moleculares de la maquinaria autofágica 44

1.3.4.2 Regulación de la autofagia por estrés de RE..... 46

1.3.4.3 Autofagia selectiva de mitocondrias 47

1.3.4.4 Autofagia y célula β 48

1.3.5 Otras teorías sobre el fracaso de la célula β 49

1.3.5.1 Efecto gluco-lipotóxico 49

1.3.5.2 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo..... 50

2. Hipótesis y objetivos51

3. Material y métodos55

3.1 Animales.....	57	3.4.2 RT-PCR.....	72
3.1.1 Trabajo con modelos animales	57	3.4.2.1 Valoración de ácidos nucleicos	72
3.1.2 Cría y genotipaje de animales	57	3.4.2.2 Síntesis de ADNc por retrotranscripción.....	73
3.1.2.1 Mantenimiento del modelo β Tsc2 ^{-/-}	57	3.4.2.3 PCR y electroforesis en geles de agarosa	73
3.1.2.2 Obtención de ADN de cola de ratón.....	58	3.4.3 PCR cuantitativa	74
3.1.4 Establecimiento una línea de célula β a partir de animales IR^{loxP/loxP}.....	59	3.5 Análisis de la expresión de proteínas.....	75
3.2 Cultivos celulares.....	61	3.5.1 Extractos proteicos.....	75
3.2.1 Líneas celulares y medios de cultivo.....	61	3.5.1.1 Obtención de extractos proteicos	75
3.2.2 Condiciones de cultivo, mantenimiento y experimentación	61	3.5.1.2 Valoración de proteínas.....	75
3.2.2.1 Condiciones de cultivo	61	3.5.1.3 Defosforilación con fosfatasa- λ	75
3.2.2.2 Congelación, criopreservación y descongelación de líneas celulares.....	62	3.5.2 Western-blot	76
3.2.2.3 Condiciones de experimentación.....	62	3.5.2.1 Preparación de muestras para electroforesis	76
3.2.2.4 Micoplasma.....	62	3.5.2.2 Electroforesis en geles de SDS-PAGE.....	76
3.2.4 Transfección transitoria de células en cultivo.....	63	3.5.2.3 Transferencia a membranas de PVDF.....	76
3.2.4.1 Transfección de ARNi.....	63	3.5.2.4 Bloqueo e incubación con anticuerpos.....	77
3.2.4.2 Transfección de ADN plasmídico.....	63	3.5.2.5 Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia ..	77
3.2.4 Deleción <i>in vitro</i> del IR por expresión de Cre recombinasa	64	3.5.2.6 Borrado de membranas de PVDF.....	78
3.2.5 Generación de líneas celulares por infección retroviral o lentiviral	64	3.5.3 Inmunoprecipitación.....	78
3.3 Técnicas de ADN recombinante.....	66	3.5.4 Fraccionamiento celular y aislamiento de orgánulos ..	78
3.3.1 Cultivo de bacterias.....	66	3.5.4.1 Aislamiento de retículo endoplasmático	78
3.3.1.1 Cultivo en placa de agar-LB	66	3.5.4.1 Aislamiento de mitocondrias para detección de proteínas oxidadas	79
3.3.1.2 Cultivo en LB líquido.....	66	3.6 Técnicas de imagen	80
3.3.1.2 Congelación (<i>glycerol-stock</i>).....	66	3.6.1 Inmunofluorescencia de células en cultivo.....	80
3.3.2 Purificación de plásmidos y transformación de bacterias	67	3.6.2 Inmunohistoquímica de secciones pancreáticas.....	80
3.3.3.1 Regeneración de las columnas para purificación de plásmidos.....	67	3.6.2.1 Fijación de páncreas y obtención de cortes.....	80
3.3.3.2 Transformación de bacterias.....	67	3.6.2.2 Desparafinización e hidratación de cortes.....	81
3.3.4 Clonaje y trabajo con enzimas de restricción	67	3.6.2.3 Inmunofluorescencia para área de célula β	81
3.3.4.1 Diseño y anillamiento de oligonucleótidos	67	3.6.3 Inmunofluorescencia con islotes aislados.....	82
3.3.4.2 Digestión con enzimas.....	68	3.6.3.1 Fijación y preparación de islotes	82
3.3.4.3 Purificación de bandas de geles de agarosa.....	69	3.6.3.2 Incubación con anticuerpo y montaje.....	82
3.3.4.4 Ligación y cribado de colonias positivas	69	3.6.4 Microscopio invertido.....	83
3.3.4.5 Secuenciación	70	3.6.5 Microscopio confocal.....	84
3.3.5 Producción de partículas virales	70	3.6.6 Microscopía electrónica de transmisión	84
3.3.5.1 Obtención de partículas retrovirales	70	3.7 Ensayos de proliferación, muerte y supervivencia .	86
3.3.5.2 Obtención de partículas lentivirales.....	71	86
3.4 Análisis de la expresión génica.....	72	3.7.1 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	86
3.4.1 Aislamiento de ARN.....	72	3.7.2 Marcaje con anexina-V/ioduro de propidio	86
3.4.1.1 Obtención de ARN de líneas celulares	72	3.7.3 Cristal violeta	87
3.4.1.2 Obtención de ARN de islotes primarios.....	72	3.8 Otras técnicas.....	88
		3.8.1 Técnicas bioinformáticas.....	88
		3.8.1.1 Trabajo con secuencias de ADN	88
		3.8.1.2 Trabajo con imágenes.....	88
		3.8.1.2 Otros	88

3.8.2 Cuantificación.....	89	4.2.4 Papel de Bcl-2 en la autofagia inducida por estrés de RE	118
3.8.2.1 Blots.....	89	4.2.5 Papel de mTORC1 en autofagia y muerte o supervivencia celular tras estrés de RE agudo	119
3.8.2.2 Imágenes.....	89	4.2.6 La autofagia protege frente a la muerte mediada por estrés de RE	120
3.8.3 Estadística.....	89	4.2.7 Discusión.....	122
3.9 Materiales.....	90	4.3 Fracaso de la célula β pancreática mediado por la hiperactividad de mTORC1 y la incapacidad autofágica	125
3.9.1 Reactivos	90	4.3.1 Respuesta bifásica de la masa de célula β en el modelo β Tsc2 ^{-/-}	125
3.9.2 Inhibidores y otros agentes farmacológicos	90	4.3.2 La hiperactivación de mTORC1 conduce a un aumento de masa de célula β mediado por hipertrofia celular	127
3.9.3 Listado de plásmidos.....	92	4.3.2 La delección de Tsc2 en célula β induce resistencia a la insulina y confinamiento nuclear de FoxO1.....	128
3.9.4 Listado de anticuerpos.....	92	4.3.4 La delección de Tsc2 en célula β produce estrés de RE ..	130
4. Resultados y discusión	95	4.3.5 La hiperactivación de mTORC1 como causa de autofagia deficiente.....	134
4.1 El complejo TSC1-TSC2 como nexos integrador de la señalización energética y de factores de crecimiento ..	97	4.3.6. Hiperactivación de mTORC1 y mitofagia deficiente....	139
4.1.1 Generación de líneas de célula β fetales	97	4.3.7. La deficiencia de Tsc2 produce aumento de la masa mitocondrial y acumulación de proteínas mitocondriales oxidadas.....	143
4.1.2 Estimulación de la ruta TSC/mTORC1 por la vía PI3K/Akt	98	4.3.8 Discusión	145
4.1.3 Acción de la glucosa sobre ERK 1/2 y TSC2	101	5. Conclusiones	151
4.1.4 Modulación de la ruta mTORC1 por el estado energético de la célula	102	6. Agradecimientos	157
4.1.5 Interferencia de Tsc2 en célula β pancreática	103	7. Bibliografía	161
4.1.6 Efecto de la interferencia de TSC2 sobre la proliferación de célula β	106	8. Anexos.....	181
4.1.7 Discusión.....	108		
4.2 La autofagia como mecanismo protector ante estrés de retículo endoplasmático en célula β pancreática	112		
4.2.1 Autofagia basal aumentada en células β con secreción de insulina deficiente.....	112		
4.2.2 Presencia de agregados proteicos en células β con secreción de insulina deficiente.....	113		
4.2.3 Mayor sensibilidad a la muerte inducida por estrés de RE en célula β con secreción de insulina deficiente	116		

Abreviaturas

2dG	2-deoxiglucosa	IR	Receptor de insulina
4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>	IR_A	IR isoforma A
ADN	Ácido desoxiribonucleico	IR_B	IR isoforma B
ADN_c	ADN complementario	IRE1	Enzima con requerimiento de inositol-1
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranósido	IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
Akt	<i>AK strain transforming; v-akt murine thymoma viral homolog 1</i>	JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
AMP	Adenosín monofosfato	Kb	Kilobase
AMP_c	AMP-3',5' cíclico	MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP	MEF	Fibroblastos embrionarios murinos
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero	MEK	<i>Mitogen extracellular-signal regulated kinase</i>
ATF4	<i>Activating Transcription Factor 4</i>	MIN6	<i>Mouse insulinoma (clon 6)</i>
Atg	<i>Autophagy-related gene</i>	mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
ATP	Adenosín trifosfato	mTORC1/2	Complejo 1/2 de mTOR
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	PDK1	<i>Phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>	PERK	ARN quinasa PKR-like asociada a RE
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein (GRP78)</i>	PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
C/EBPβ	<i>CCAAT/enhancer-binding protein β</i>	GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
CCCP	Carbonilcianuro <i>m</i> -clorofenilhidrazona	GLUT	<i>Glucose transporte</i>
Cdk4	<i>Cyclin dependent kinase 4</i>	GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
CHOP	Proteína con homología C/EBP (Gadd153)	GTP	Guanosín trifosfato
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol	LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3</i> (nombre completo MAP1LC3)
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR interacting protein</i>	LKB1	<i>Liver kinase B1</i>
EiF2α	Factor iniciación de la traducción eucariota-2α	pb	Pares de bases
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
FBS	Suero bovino fetal	PDK1	<i>Phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
FoxO	<i>Forkhead box clase O</i>	Pdx1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox-1</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i> (dominio)	PKC	Proteína quinasa C
GSK3	Glucógeno sintasa kinasa 3	pH	Potencial de hidrógeno: logaritmo negativo en base-10 de la concentración molar del ión hidrógeno
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>	PH	<i>Pleckstrin homology</i> (dominio)
INS-1E	Línea de insulinoma de rata		
IP	Inmunoprecipitación		

PI(3)P	Fosfatidilinositol-3-monofosfato	shARN	<i>Short-hairpin</i> ARN
PIP₃	Fosfatidilinositol-4,5,6-trifosfato	SIRT	Sirtuina (deacetilasa NAD ⁺ dependiente)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	t.a.	Temperatura ambiente
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>	Tm	Temperatura de <i>melting</i>
RE	Retículo endoplasmático	TSC	Complejo de esclerosis tubular
Rheb	<i>Ras-homolg enriched in brain</i>	U.A.	Unidades arbitrarias
Rictor	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>	ULK	<i>Uncoordinated 51-like kinase</i>
RIP	<i>Rat insulin promoter</i>	UPR	<i>Unfolded protein response</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	WB	<i>Western-blot</i>
S6	Proteína ribosomal S6	XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>
S6K	Quinasa de la proteína ribosomal S6	$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
SH2	<i>Src homology 2</i> (dominio)		

Los acrónimos se encuentran siempre definidos la primera vez que son mencionados en el texto.

Esta lista recoge algunas de las abreviaturas que aparecen en múltiples ocasiones

1.

Introducción

1.1 Diabetes tipo 2 y papel de la célula β pancreática en la homeostasis metabólica

1.1.1 La diabetes en la actualidad

En el mundo occidental la disponibilidad continua de alimentos, muchos de ellos de alta densidad calórica, y la proliferación de tecnologías que fomentan el sedentarismo; están consiguiendo que la obesidad y sus comorbilidades sean la epidemia del siglo XXI. De entre las comorbilidades, la diabetes esta viviendo un espectacular aumento de prevalencia. Solamente la pasada década la estimación del número de diabéticos a nivel global pasó de los 171 millones en el año 2000, a los 285 millones en 2010. Se prevé que sean 439 millones en 2030, lo cual supondría un aumento de la prevalencia desde el 6,4% en 2010 al 7,7% en 2030 sobre el total de la población mundial (Shaw *et al.*, 2010). Según el reciente estudio sobre la diabetes en España (Estudio Di@bet.es) Soriguer *et al.*, 2012; la prevalencia es del 13,8%, aproximadamente la mitad de este número desconoce que padece la enfermedad.

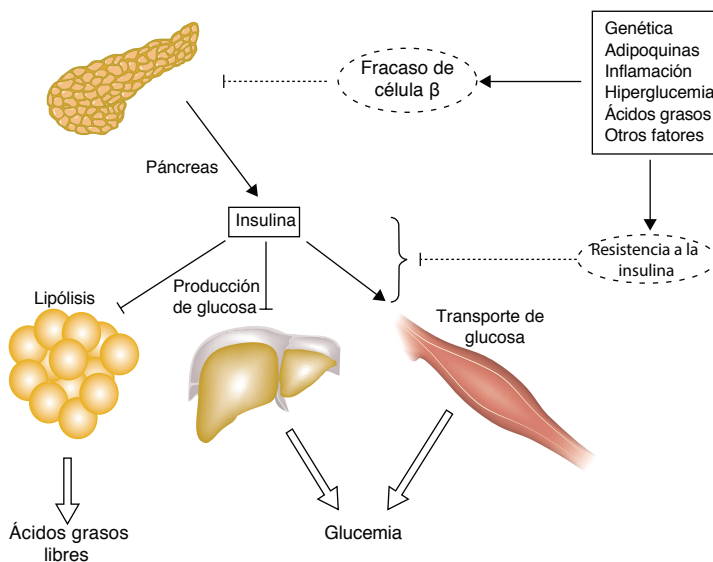
El aumento de prevalencia de la diabetes es un problema de salud pública de primer orden. La diabetes incrementa el riesgo de enfermedad cardiaca, infarto y complicaciones microvasculares como ceguera, fallo renal y neuropatía periférica. Las complicaciones causadas por la diabetes son una de las principales causas de consulta médica e ingreso hospitalario. El coste para la sanidad nacional de un paciente diabético es aproximadamente 4 veces mayor que el de un paciente no diabético, alrededor del 10% del gasto total en sanidad está destinado al tratamiento de esta enfermedad (American Diabetes Association, 1998). Además en muchos casos esta patología supone un importante hándicap a la hora de abordar otras comorbilidades, ya que la enfermedad es una contraindicación para muchos tratamientos, y sus repercusiones sobre los diferentes sistemas orgánicos son de gran importancia, complicando de esta manera el manejo de cualquier patología.

El aumento de la población urbana en los países en desarrollo, junto con el envejecimiento general de la población, son los principales eventos demográficos que afectaran a la prevalencia futura de la diabetes. La aparición de diabetes tipo 2 entre individuos cada vez más jóvenes, junto con el cambio de hábitos de vida en los países en desarrollo, han convertido a la obesidad y a la diabetes en importantes problemas que la humanidad debe de afrontar desde diferentes ámbitos. La educación y prevención es clave, aunque la modificación de hábitos que lleven a una menor ingesta calórica y a un aumento de la actividad física, resulta difícil de implementar en la población general, por lo que la intervención farmacológica puede ser el único recurso para algunos. Es necesario establecer nuevas estrategias preventivas y tratamientos, guiados siempre desde la investigación científica.

1.1.2 Fisiopatología de la diabetes tipo 2

La diabetes es una enfermedad caracterizada por un aumento de la glucemia, asociada a numerosas complicaciones, principalmente cardiovasculares, que reducen la calidad y la esperanza de vida. La principal diferencia entre diabetes tipo 1 y 2 se encuentra en la etiología. Mientras que la diabetes tipo 1 se da principalmente en la infancia, y es producida por una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas que resulta en una deficiencia absoluta de la insulina; la diabetes tipo 2 se caracteriza por un fallo en la acción de la insulina y/o su secreción, apareciendo normalmente en la población adulta.

La diabetes tipo 1 representa alrededor de un 5-10% de todas las diabetes. Aunque la diabetes tipo 2 es de carácter poligénico (> 90% de todas las diabetes), un 1-2% de las diabetes son de carácter monogénico: diabetes neonatales y las llamadas MODY (*maturity onset diabetes of the young*). Alrededor de 15 genes diferentes han sido identificados como responsables de las diabetes monogénicas (clasificación revisada en Murphy *et al.*, 2008). Prueba del papel clave de la célula β en la etiopatogénesis de la diabetes es el hecho de que todos estos genes están implicados en el desarrollo y/o función de la célula β pancreática.



La insulina es la hormona anabólica por excelencia, es la encargada de estimular la captación glucídica por parte de los tejidos periféricos, y a la vez impide que los lípidos del tejido adiposo sean liberados. Una falta de insulina, ya sea por una acción deficiente de la hormona (resistencia a la insulina), o por un defecto en la secreción por parte de las células β , lleva a múltiples desregulaciones metabólicas. Estas incluyen desde hiperglucemia por falta de captación de glucosa, a dislipidemia por la desregulación de la homeostasis lipídica. Si esta situación se crónica, puede desencadenarse el daño de múltiples órganos y la aparición de complicaciones diabéticas.

Figura 1.1. Esquema de los diferentes órganos implicados en la progresión a la diabetes. Figura adaptada de Stumvoll *et al.*, 2005.

En la diabetes tipo 2, el evento inicial que lleva al desarrollo de la enfermedad, es la resistencia a la insulina. En la diabetes asociada a obesidad, esta resistencia es fruto del exceso calórico, que acaba resultando tóxico para los tejidos. Son varios los tejidos que tienen un papel clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la diabetes (Figura 1.1). El tejido adiposo blanco, que fisiológicamente sirve como depósito de lípidos, puede saturarse y provocar una redistribución anormal de los lípidos en otros tejidos. Además, produce multitud de hormonas denominadas adipoquinas (leptina, resistina, adiponectina, IL-6, TNF α), cuya presencia o carencia juega un importante papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina (revisado en Muoio y Newgard, 2005). El músculo esquelético es el tejido que más glucosa consume del organismo, una menor captación de glucosa debido a la resistencia a la insulina en músculo, es uno de los factores que más contribuyen al desarrollo de la hiperglucemia (Stumvoll *et al.*, 2005).

El hígado es un órgano clave para el mantenimiento de la homeostasis glucídica. Tras la ingesta, la insulina secretada por las células β pancreáticas, llega por circulación portal al hígado, donde debe actuar suprimiendo la producción hepática de glucosa. En el caso de existir resistencia a la insulina en este órgano, la gluconeogénesis hepática estaría descontrolada, y contribuiría al desarrollo de hiperglucemia (Michael *et al.*, 2000).

Aunque la resistencia a la insulina es importante en el desarrollo de la diabetes tipo 2, no todos los individuos que presentan resistencia a la insulina acaban desarrollando la enfermedad. La fase de resistencia a la insulina, denominada pre-diabetes, puede alargarse durante años o incluso nunca evolucionar a diabetes. Esto es posible gracias a la compensación por parte del páncreas, que eleva los niveles de insulina para hacer frente a la falta de acción de la hormona en los tejidos. Tanto en modelos animales como humanos, el evento clave en el paso de pre-diabetes a diabetes manifiesta es el fracaso de la célula β (Figura 1.2).

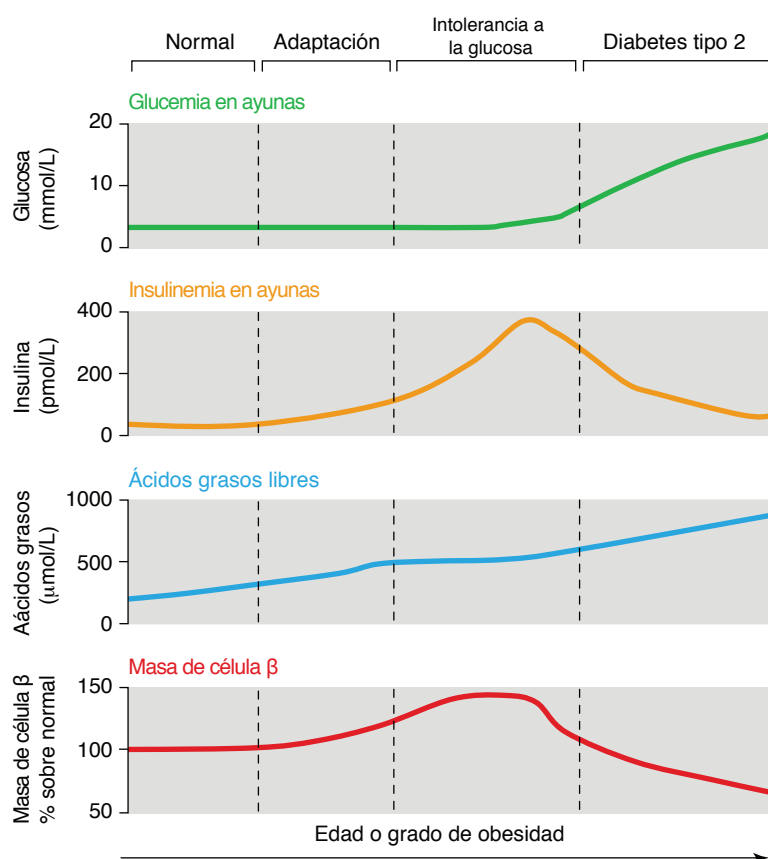


Figura 1.2. Comparación de la evolución de los niveles de glucosa en sangre, con la insulinemia, los ácidos grasos libres y la masa de célula β durante la progresión a la diabetes. El punto de inflexión lo representa el fracaso de la célula β , lo que conlleva una disminución de la insulina circulante y la manifestación de la diabetes. Figura adaptada de Lingohr *et al.*, 2002.

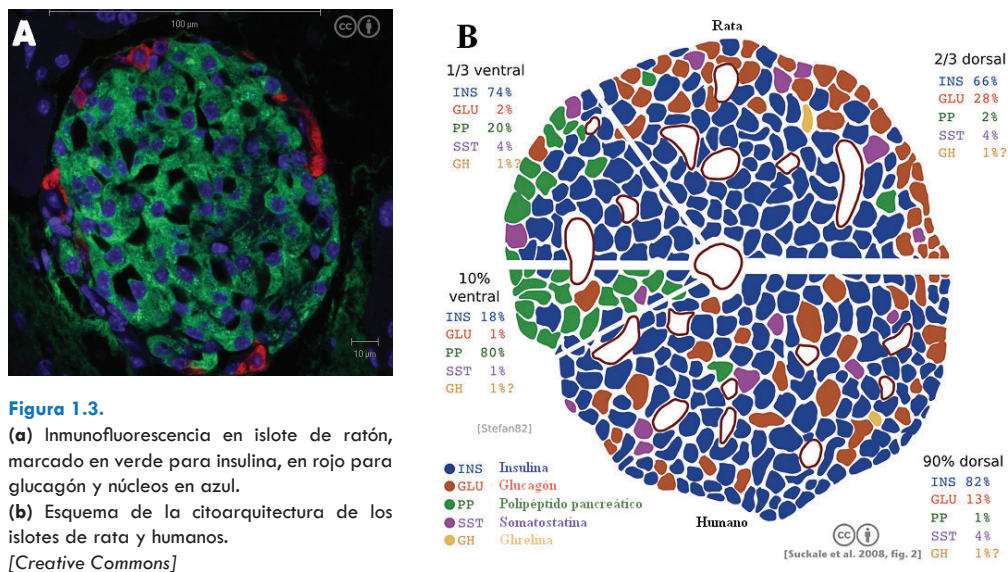
Esta naturaleza progresiva de la enfermedad, y su estrecha relación con la función de la célula β ha sido puesta de manifiesto en ensayos clínicos (UKPDS, 1998), u otros estudios prospectivos (Weyer *et al.*, 1999), así como en revisiones de la literatura (Kahn, 2001).

1.1.3 Papel de la célula β en la homeostasis metabólica

1.1.3.1 Estructura anatómica de los islotes de Langerhans

El páncreas es una glándula endocrina y exocrina. La parte exocrina está formada por los acinos serosos, cuya función es ayudar al sistema digestivo mediante la secreción de enzimas digestivas. La parte endocrina se encuentra en los islotes de Langerhans, descubiertos por Paul Langerhans en 1869 (Langerhans, 1869). Los islotes no representan más que el 1-2% del volumen del páncreas, encontrándose completamente embebidos en el páncreas exocrino. Mientras que el resto de órganos endocrinos del organismo forman estructuras compactas, los islotes de Langerhans se encuentran dispersos en una glándula exocrina. Las razones de esta organización “anatómicamente inusual” no quedan del todo claras, pero llevaron a proponer la existencia del eje islote-acinar (Williams y Goldfine, 1985), y pueden explicar la insuficiencia pancreática observada en muchos pacientes diabéticos (Lankisch *et al.*, 1982).

La citoarquitectura de los islotes es compleja y varía ampliamente entre diferentes especies (Brissova *et al.*, 2005) **Figura 1.3**. Los islotes contienen, al menos, cinco tipos de células secretoras de hormonas:



- Células α : producen glucagón (15-20%)
- Células β : producen insulina (65-85%)
- Células δ : producen somatostatina (3-10%)
- Células ϵ : producen ghrelina (<1%)
- Células PP: producen polipéptido pancreático (3-5%)

En roedores, los islotes tienen una composición muy uniforme y característica, con las células α y δ situadas en la periferia y células β en el núcleo. En humanos no se encuentra esta organización, y además los islotes presentan una gran variabilidad en su composición celular dependiendo de la zona del páncreas donde se encuentren, representando las células β entre el 25% y el 80% del total de células del islote.

1.1.3.2 Función de la célula β pancreática: secreción de insulina

Las células β pancreáticas son la principal fuente de la hormona insulina, esencial para mantener la homeostasis metabólica. La función más importante de estas células es la secreción de insulina en respuesta al estado nutricional del organismo. La secreción está además regulada por hormonas gastrointestinales denominadas incretinas (*i.e.* GLP-1, *glucagon-like peptide 1*; o el péptido insulínico dependiente de glucosa, conocido como GIP, *gastric inhibitory polypeptide*), además de estímulos neurales (revisado en Holst y Gromada, 2004).

Las células β , junto con los hepatocitos, presentan un transporte de glucosa independiente de insulina, gracias al transportador GLUT2 (*glucose transporter 2*). Una vez dentro de la célula, una isoforma de la hexoquinasa expresada en célula β e hígado, la hexoquinasa IV (también denominada glucoquinasa), cataliza la fosforilación de la glucosa a glucosa 6-fosfato. La alta K_m (constante de Michaelis-Menten) de GLUT2 y glucoquinasa para la glucosa, aseguran que la captación y metabolización de la glucosa sea proporcional a la concentración sanguínea, incluso a las concentraciones fisiológicas más altas, permitiendo que la célula β actúe como sensor de los niveles de glucosa (Newgard *et al.*, 1990). Aunque el papel clave de GLUT2 en islotes de roedores es bien conocido, existe controversia sobre su importancia relativa en islotes humanos, donde GLUT1 se expresa hasta 100 veces más que GLUT2 (De Vos *et al.*, 1995). Aún así, mutaciones en el gen que codifica para GLUT2 en humanos han sido recientemente identificadas como causa de diabetes neonatal, relacionadas con disfunción β pancreática (Sansbury *et al.*, 2012).

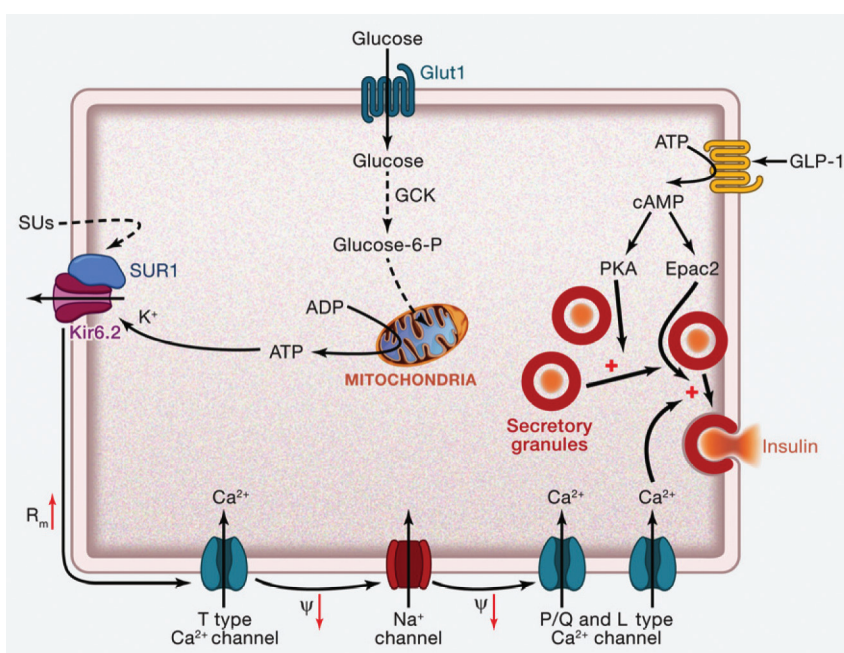


Figura 1.4 Secreción de insulina en célula β de humano. Esquema de Ashcroft y Rorsman, 2012.

La glucosa transportada al interior de la célula β es metabolizada, produciendo un incremento en el ratio ATP/AMP, lo cual produce el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (canales K_{ATP}), despolarización de la membrana celular, y apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Esto resulta en un aumento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, desencadenando la secreción de los gránulos de insulina (Figura 1.4 y revisado en Seino *et al.*, 2011). El papel de la mitocondria es clave tanto en el metabolismo que lleva al aumento de ATP, como en la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular que posibilitan la secreción de insulina de forma sostenida (Wiederkehr y Wollheim, 2012). Aunque la glucosa es el secretagogo por excelencia, otras moléculas también pueden modular el estado energético celular, estimulando la secreción de insulina. Un ejemplo muy estudiado es el caso del metabolismo de aminoácidos (Newsholme *et al.*, 2007).

1.1.3.3 Plasticidad de la masa de célula β

La masa de célula β se encuentra finamente regulada y puede ser adaptada en condiciones fisiológicas o patológicas que representen una mayor demanda sistémica de insulina. La masa de célula β resulta del balance entre fenómenos que producen su aumento: proliferación celular (hiperplasia), aumento de tamaño celular (hipertrofia), “aparición” de nuevas células β a partir de células ductales (neogénesis); y aquellos que la estarían disminuyendo (muerte celular, hipoplasia e hipotrofia).

En individuos normales, la masa de célula β aumenta durante la juventud debido a hiperplasia (Meier *et al.*, 2008; Köhler *et al.*, 2011), mayoritariamente por proliferación de células ya existentes en contraposición a neogénesis (Dor *et al.*, 2004). Estudios de acumulación de lipofuscina en célula β de humanos, junto a modelación matemática, han determinado que hasta el 97% de las células que componen la masa de célula β en humanos quedaron formadas antes de los 20 años de edad del individuo (Cnop *et al.*, 2010). El carácter postmitótico de la masa de célula β en adultos también ha sido puesto de relieve en otros estudios en humanos (Köhler *et al.*, 2011), así como en ratones (Teta *et al.*, 2005).

El papel clave de la hipertrofia celular en la dinámica de la masa de célula β a lo largo de la vida, fue descrito en ratas por (Montanya *et al.*, 2000). Su estudio demostró que tanto hipertrofia como hiperplasia son responsables del aumento de masa de célula β en animales jóvenes, siendo la hipertrofia la principal contribuidora del aumento en adultos (Figura 1.5). Estas observaciones permiten conciliar estudios que demuestran el aumento de masa de célula β en adultos (Butler *et al.*, 2003), con los ya descritos que hacen hincapié en la baja proliferación tras la juventud, poniendo de relieve la especial relevancia de la hipertrofia de célula β .

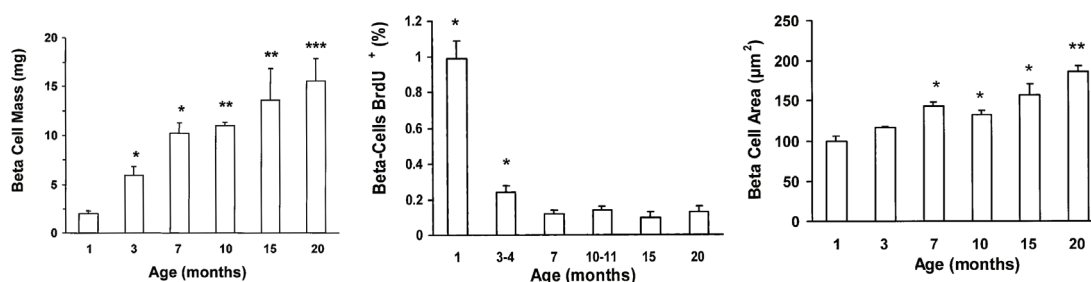


Figura 1.5 Papel clave de la hipertrofia de célula β , adaptado de Montanya *et al.*, 2000.

Se observan gráficas que relacionan la edad de ratas con (de izquierda a derecha): masa de célula β , proliferación y área celular.

Son diversos los estudios que demuestran la alta plasticidad de la masa de célula β en diversas condiciones. El embarazo supone un aumento de la demanda de insulina, resultando en aumento del número y volumen de células β entre otros cambios adaptativos (revisado en Sorenson y Brejle, 1997). La compensación ante situaciones patológicas, como la resistencia a la insulina sistémica observada en el modelo nulo heterocigoto para el receptor de insulina (IR) e IRS1 (*insulin receptor substrate 1*), es capaz de producir un aumento de hasta 15-20 veces la masa de célula β y secreción de insulina (Brüning *et al.*, 1998). Otros modelos clásicos de aumento compensatorio de masa de célula β incluyen los animales carentes de leptina

(*ob/ob*) Edvell y Lindström, 1995; o de su receptor (*db/db*) Chick y Like, 1970. Ambos son modelos de obesidad por hiperfagia que acaban desarrollando diabetes debido a pérdida de la masa de célula β .

Es importante mencionar a la apoptosis como mecanismo fisiológico para el mantenimiento de la masa de célula β . Pues si el fin de los mecanismos que llevan a una mayor masa de célula β , es el aumento de los niveles de insulina; una subsiguiente disminución de la demanda de la hormona debe de ir acompañada de reducción de la masa de célula β . En estos casos, una reducción deficiente de la masa de célula β podría llevar a hipoglucemia, potencialmente letal. Por lo que de forma fisiológica, siguiendo al aumento de masa de célula β observado durante el embarazo, la masa disminuye por muerte celular programada tras el parto (Scaglia *et al.*, 1995). De igual manera, la apoptosis de célula β participa de forma fisiológica en el remodelamiento del islote en neonatos (Scaglia *et al.*, 1997).

1.1.4 El fracaso de la célula β

El fallo de los mecanismos que llevan al aumento de la síntesis y secreción de insulina en condiciones de mayor carga metabólica, son los que propician la aparición de diabetes *per se* (Rhodes, 2005). El fracaso en la función de la célula β y su relación con la diabetes es un hecho bien documentado (Kahn, 1998), sin embargo la posibilidad de “reducción de la masa celular”, como hecho diferenciado o bien como el propio causante de la “reducción de función”, no ha sido seriamente considerado como agente etiológico de la diabetes tipo 2 hasta la pasada década. Esto fue en parte debido a la poca accesibilidad del tejido pancreático en humanos y la inexistencia de estudios longitudinales sobre masa de célula β . No obstante, la importancia de la relación de la función de la masa de célula β y la progresión hacia diabetes tipo 2 ha estado oscurecida durante muchos años detrás de la noción de “resistencia a la insulina” como agente fundamental en la patología.

Hoy en día el paradigma ha cambiado, y existe un amplio consenso sobre el papel clave que juega la reducción de función de célula β en la progresión a diabetes tipo 2 (Ashcroft y Rorsman, 2012). Esto ha sido posible gracias a la aparición de numerosas evidencias en modelos animales, además de estudios *post mortem* que muestran la pérdida de masa de célula β en humanos diabéticos (Butler *et al.*, 2003). Además se encontró que la secreción de insulina estimulada por glucosa es menor en islotes de pacientes diabéticos (Del Guerra *et al.*, 2005). Observaciones realizadas en pacientes pancreatectomizados (hasta el 50% de la masa pancreática), no se tradujeron en modificaciones significativas de la homeostasis glucídica (Menge *et al.*, 2008). Sin embargo, el mismo grupo ha llegado a establecer que la diabetes *per se* aparece cuando la masa de célula β queda reducida en aproximadamente en un 65% (Meier *et al.*, 2012).

Por otro lado, estudios recientes han identificado hasta 50 genes de susceptibilidad para el desarrollo de la diabetes tipo 2 (revisado en McCarthy, 2010). Al igual que pasa con los genes

responsables de las diabetes neonatales (100% relacionados con desarrollo o función de célula β), estos nuevos genes asociados con la patología también están en la práctica totalidad, relacionados con la célula β .

Si bien es cierto que la resistencia a la insulina tiene un papel importante en diabetes tipo 2, la célula β ha quedado reconocida como piedra angular en la evolución de la enfermedad. Aunque la misión de la célula β es la correcta secreción de insulina, ajustada siempre a la carga metabólica, esta tesis doctoral se centra no en la “función” de célula β sino en la masa; es decir en los mecanismos que regulan proliferación/tamaño celular, muerte o supervivencia de la célula β . Como es de suponer, la función es extremadamente dependiente de la masa de célula β . Si bien es cierto que puede existir una función deficiente de célula β de forma independiente de la masa, el debut de la diabetes es generalmente precedido por una disminución de masa de célula β .

Las vías de señalización que regulan el aumento de masa de célula β o que pueden contribuir también a su fracaso son recogidas en la sección 1.2. Los mecanismos moleculares específicos que participan en muerte/supervivencia de la célula β pancreática quedan discutidos en la sección 1.3.

1.2 Señalización celular

1.2.1 La insulina y su receptor

1.2.1.1 La insulina

La insulina es una hormona polipeptídica de 52 aminoácidos, descubierta en 1922 por Frederik G. Banting y colaboradores (Banting *et al.*, 1922). Se sintetiza como preproinsulina, una única cadena de 86 aminoácidos. Por procesamiento proteolítico se elimina el péptido señal amino-terminal, generando la proinsulina. Posteriormente, la escisión de un fragmento interior de la proinsulina (péptido-C), genera la insulina, con dos cadenas (α y β), unidas por dos puentes disulfuro, y un tercer puente intracatenario en la cadena α . (Figura 1.6).

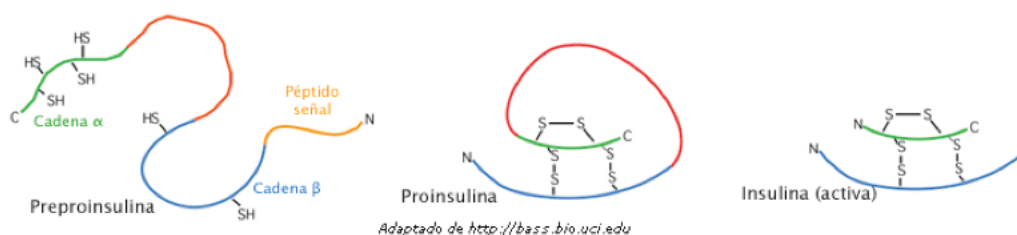


Figura 1.6. Esquema del procesamiento del precursor de la insulina.

1.2.1.2 El receptor de insulina y sus isoformas

El receptor de la insulina (IR) es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana, unidas por puentes disulfuro (Figura 1.7, a). De igual manera que las dos cadenas de su ligando, las del IR derivan de un mismo precursor transcrito, el pro-receptor que se ensambla tras una rotura proteolítica.

Tras la unión de la insulina al receptor, se produce un cambio conformacional que permite la unión de ATP y la autofosforilación de una serie de residuos de tirosina de la cadena β del IR (Kasuga *et al.*, 1982a; 1982c), lo cual permite la interacción del IR con sus sustratos intracelulares. En el IR también existen residuos de serina y treonina susceptibles de fosforilación y que regulan de forma negativa la actividad quinasa del IR (Kasuga *et al.*, 1982b). La estimulación crónica del receptor aumenta estas fosforilaciones, disminuyendo su actividad.

El gen humano del IR contiene 22 exones, pero por *splicing* alternativo del ARNm, el exón 11 se traduce en la isoforma B (IR_B), o aparece una forma sin exón 11 (IR_A). Las dos isoformas únicamente difieren en 12 aminoácidos, que se encuentran cerca del extremo C-terminal de la cadena α del IR_B (Seino y Bell, 1989) Figura 1.7, b. Aunque el IR presenta una estructura

común en todos los vertebrados, hasta con un 20% de invariabilidad, el *splicing* alternativo del exón 11 es una característica única de mamíferos (Hernández-Sánchez *et al.*, 2008).

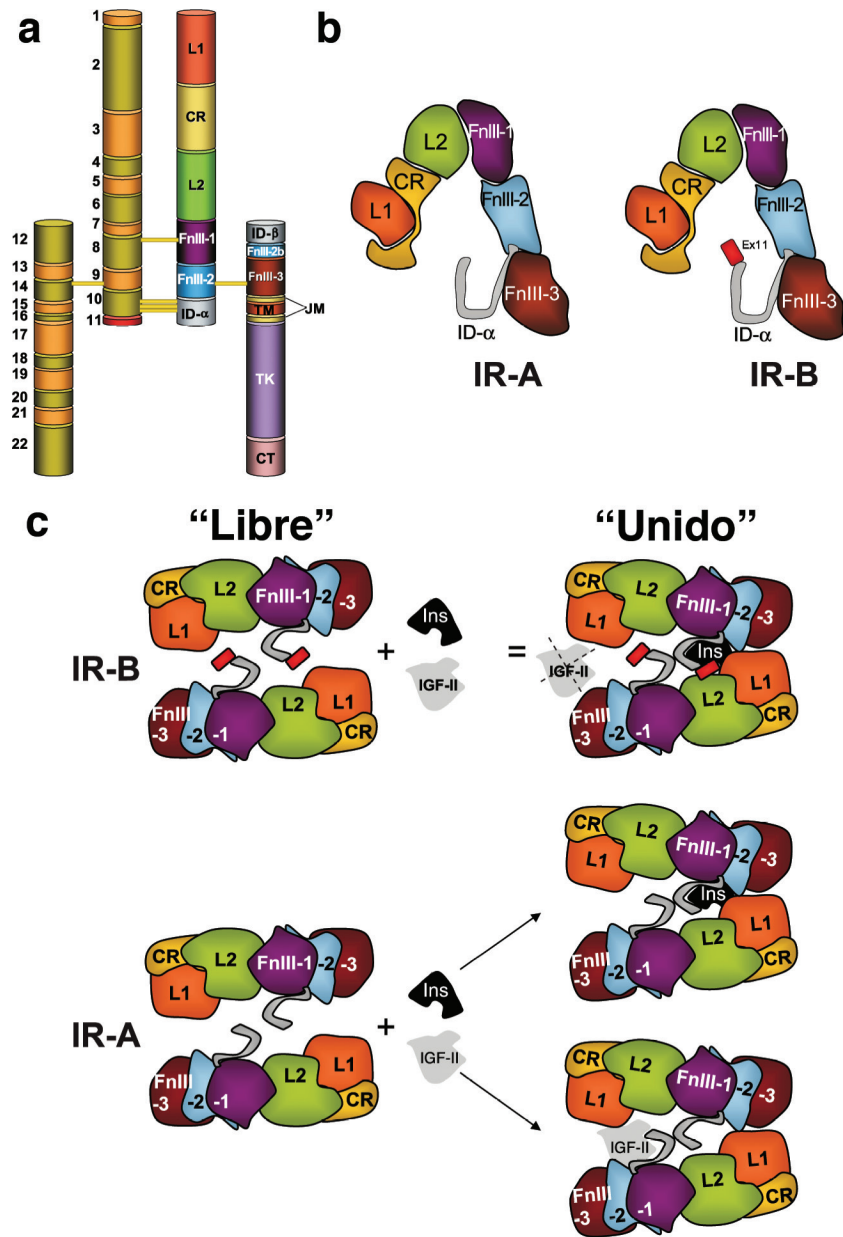


Figura 1.7. El IR y sus isoformas.
(a) Representación esquemática del IR. A la izquierda, exones: 1-11, cadenas α ; 12-22 cadenas β . A la derecha “módulos” predichos: L1, *Large domain 1*; CR, dominio rico en cisteína; L2, *large domain 2*; Fn, dominios “fibronectina tipo-III”; TM, dominio transmembrana; JM, *juxta membrane domain*; TK, dominio tirosina-quinasa; CT, dominio C-terminal.
(b) Representación de la cadena α del IR_A e IR_B. ID- α , dominio inserto, + exón 11 (IR_B); - exón 11 (IR_A).
(c) Vista en planta del IR, siguiendo el eje de simetría. Se muestra unión a insulina e IGF-II. Se representa el mayor impedimento en IR_B por el exón 11 (en rojo).
 Esquema adaptado de Belfiore *et al.*, 2009.

En la literatura existe gran controversia sobre el papel de las diferentes isoformas del IR. Se sabe que la distribución de las isoformas varía según el tejido (McClain, 1991), siendo el IR_A más característico de desarrollo fetal y relacionado con el cáncer (Denley *et al.*, 2003). Aún así IR_A es también expresado en tejidos adultos. No hay consenso sobre la afinidad relativa de las isoformas del IR por la insulina, diferentes trabajos indican una mayor afinidad del IR_A por la insulina (McClain, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1993; Denley *et al.*, 2004), otros indican que es idéntica (Whittaker *et al.*, 2002). Sin embargo no existen discrepancias sobre la mayor afinidad del IR_A versus IR_B por IGF-II (Figura 1.7, c), siendo mucho mayor que para IGF-I

(revisado en Belfiore *et al.*, 2009). La causa primera que lleva a la expresión de una u otra isoforma es desconocida, aunque estudios en distrofia muscular, patología relacionada con mayor expresión de IR_A y *splicing* aberrante de otros genes; han permitido identificar los elevados niveles de la ribonucleoproteína nuclear heterogénea H (hnRNP H), como responsable de la expresión preferencial de IR_A en miocitos (Paul *et al.*, 2006).

1.2.1.3 El receptor de insulina en célula β pancreática

El modelo animal nulo homocigoto para IR llega a término sin defectos aparentes, pero estos animales mueren a las 48-72 h por cetoacidosis severa (Accili *et al.*, 1996). Este estudio demostró como el IR no es vital para el desarrollo prenatal, pero es sumamente importante para la homeostasis metabólica durante la vida independiente.

Modelos *knock-out* del IR de forma específica de tejido han permitido una mejor comprensión de la acción tejido-específica de la insulina, y descubrimiento de nuevos elementos de su señalización (revisado en Kitamura *et al.*, 2003). El modelo *knock-out* para el IR de forma específica en célula β (β IRKO) presenta solamente una pequeña disminución de la masa de célula β de forma basal (Otani *et al.*, 2004). Sin embargo el IR es importante para el aumento compensatorio de la masa de célula β en respuesta a resistencia a la insulina a nivel sistémico. Esto quedo probado por el cruce del modelo *liver IR knock-out* (LIRKO, Michael *et al.*, 2000), el cual desarrolla resistencia a la insulina y aumento compensatorio de la masa de célula β , con el modelo β IRKO. El modelo resultante (β IRKO/LIRKO) desarrolló diabetes al quedar impedida la compensación de célula β (Okada *et al.*, 2007).

El receptor de IGF-I es importante en célula β para la correcta regulación de la secreción de insulina, pues el modelo β IGF1RKO mostró intolerancia a la glucosa pero no cambios en la masa de célula β (Kulkarni *et al.*, 2002). Tampoco es necesario el receptor de IGF-I para la compensación de la masa de célula β en animales alimentados con dieta grasa, mientras que el IR si es esencial (Okada *et al.*, 2007). Sin embargo, la resistencia total a insulina/IGF-I en célula β en el modelo doble *knock-out* de *IR e Igf1r* (β IRKO/ β IGF1RKO) resulta en hipoplasia de célula β y diabetes severa a las 3 semanas (Ueki *et al.*, 2006).

También existen datos en la literatura sobre el papel específico de las isoformas del IR en célula β . Parece ser que preferentemente las células β de islotes expresan IR_B (Muller *et al.*, 2007). Tanto en líneas de célula β murinas como en islotes pancreáticos humanos, se relaciona la hiperglucemia crónica con una disminución de la expresión de la isoforma IR_A en favor de IR_B (Hribal *et al.*, 2003). Por otro lado, fue descrito como la señalización a través de IR_A lleva a una mayor síntesis de insulina, mientras que el IR_B media una mayor transcripción de la glucoquinasa (Leibiger *et al.*, 2001). Por último, en islotes pancreáticos extraídos de animales de 6 meses del modelo LIRKO inducible, los cuales presentan resistencia a la insulina e hiperplasia pancreática compensatoria, hay una mayor expresión de IR_A (Escribano *et al.*, 2009). Estas observaciones parecen indicar que la expresión específica de IR_A en célula β podría jugar un importante papel en los mecanismos compensatorios frente a resistencia a insulina que llevan al aumento de masa de célula β por un lado y al aumento de síntesis y secreción de insulina por otro.

1.2.2 Señalización de la insulina

1.2.2.1 Sustratos del receptor de insulina

Hay numerosos sustratos conocidos del IR, los cuales también tienen un importante papel en la señalización a través del receptor de IGF-I (revisado en Taniguchi *et al.*, 2006). Entre ellos, los mejor caracterizados son los IRS (*insulin receptor substrate*), familia que cuenta con 6 miembros que presentan una alta homología. Los diferentes IRSs tienen diferente distribución tisular y función. IRS1 e IRS2 se encuentran ampliamente distribuidos, siendo IRS2 fundamental en célula β e hígado. El modelo *Irs2*^{-/-} presenta un fenotipo diabético causado principalmente por resistencia a la insulina hepática, y ausencia de compensación pancreática (Withers *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 2000). Mientras que animales *Irs1*^{-/-} presentan defectos de crecimiento por menor señalización de IGF-I, y resistencia a la insulina principalmente muscular. En este caso la resistencia es compensada por aumento de la masa de célula β , dando lugar a hiperinsulinemia, por lo que animales *Irs1*^{-/-} no llegan a desarrollar diabetes (Araki *et al.*, 1994; Tamemoto *et al.*, 1994).

Las proteínas IRS contienen múltiples residuos susceptibles de ser fosforilados. Los residuos de tirosina (21 residuos en IRS1 de los cuales se conservan 14 en IRS2) al fosforilarse sirven como puntos de anclaje para proteínas con dominios SH2 (*Src homology 2 domain*). Muchas de estas proteínas actúan como moléculas adaptadoras, tal como la subunidad reguladora de la PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa), o Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*). La fosforilación en tirosina de IR e IRS está contraregulada por tirosín-fosfatasas, las cuales se han encontrado reguladas positivamente en estados de resistencia a insulina. La tirosín-fosfatasa más estudiada es la PTP1B (proteína tirosina fosfatasa 1B), ratones *Ptp1b*^{-/-} presentan una mayor sensibilidad a la insulina, y son resistentes a la obesidad inducida por dieta grasa (Elchebly *et al.*, 1999).

Además de en tirosina, los IRS pueden fosforilarse en serina/treonina (unos 30 residuos) por diversas quinasas, entre las cuales se encuentra la quinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) Shah *et al.*, 2004. La fosforilación en serina/treonina, es causa de resistencia a la acción de insulina e IGF, además promueve la interacción de los IRS con la proteína 14-3-3, que acelera el programa proteolítico de estas proteínas. La fosforilación en estos residuos es un mecanismo de contraregulación de la señalización de la insulina, que se activa por un estímulo prolongado, además de servir de comunicación con otras vías de señalización que la regulan negativamente (TNF α , JNK, IKK β , etc.) Hotamisligil *et al.*, 1996.

1.2.2.2 Ruta PI3K/PDK1/Akt

PI3K funciona como un nodo crítico de la señalización de la insulina. PI3K está formada por una subunidad reguladora y otra catalítica, las cuales presentan múltiples isoformas. La interacción del dominio SH2 de la subunidad reguladora de PI3K con dominios de IRS fosforilados en tirosina produce la activación de la subunidad catalítica de PI3K (Myers *et al.*, 1992). PI3K clase I fosforila al fosfolípido de membrana PIP₂ (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) para

formar PIP₃ (fosfatidilinositol-4,5,6-trifosfato). El modelo animal con delección de PI3K clase Ia específicamente en célula β (cruce de β*Pik3r1*^{-/-} con en animal *Pik3r2*^{-/-}), presenta una masa de célula β normal a las 8 semanas, pero se encuentra reducida en animales de 32 semanas. Estos animales también presentan una menor función secretora, y mayor apoptosis de célula β (Kaneko *et al.*, 2010).

La acción de PI3K puede ser negativamente regulada por fosfatasa de PIP₃, PTEN (*phosphatase and tensin homolog*; 3'-fosfatasa de PIP₃) y SHIP2 (*SH2-containing PIP₃ phosphatase 2*; 5'-fosfatasa). Modelos animales carentes de estas proteínas presentan mayor sensibilidad a la insulina y resistencia a la obesidad inducida por dieta grasa (Sleeman *et al.*, 2005; Wijesekara *et al.*, 2005). El modelo β*Pten*^{-/-} presenta expansión de la masa de célula β, hiperinsulinemia e hipoglucemia, mejor tolerancia a la glucosa y resistencia a la destrucción de células β inducida por estreptozotocina (Stiles *et al.*, 2006).

PIP₃ actúa como segundo mensajero, y permite el anclaje en membrana plasmática y activación de proteínas con dominio PH (*pleckstrin homology*), como PDK1 (*phosphoinositide dependent protein kinase-1*). La activación de PDK1 por PIP₃ lleva a la fosforilación de Akt en Thr³⁰⁸ y de PKCζ en Thr⁴¹⁰. Para la completa activación de Akt es precisa la fosforilación de Ser⁴⁷³, que no es mediada por PDK1 sino por mTORC2 (Sarbasov *et al.*, 2005). El mecanismo que lleva a la fosforilación de Akt-Ser⁴⁷³ no está del todo claro, aunque mSIN1, componente crítico de mTORC2, posee un dominio PH que podría interactuar con PIP₃ en la membrana posibilitando la fosforilación de Akt (Yang *et al.*, 2006).

La función de esta ruta es crítica en célula β, el modelo *Pdk1*^{-/-} de forma específica en célula β desarrolla diabetes debido a una drástica reducción de la masa de célula β (Hashimoto *et al.*, 2006), de manera similar a lo observado en los modelos *Irs2*^{-/-} o el βIRKO/βIGF1RKO, tratados previamente.

Akt media muchas de las acciones de la insulina a nivel sistémico, esenciales para la homeostasis metabólica (transporte de glucosa mediado por GLUT4 en tejidos periféricos, síntesis de glucógeno, menor gluconeogénesis hepática, etc.). Akt es una serina/treonina quinasa que presenta 3 isoformas, con diferente distribución tisular. Akt3 se expresa preferentemente en tejido nervioso, mientras que Akt1 se expresa de forma pleiotrópica, y Akt2 está altamente expresado en tejidos clave para la función de la insulina. Solamente presentan un fenotipo caracterizado por alteraciones metabólicas los animales carentes de *Akt2*, aunque la masa de célula β es capaz de aumentar para compensar parcialmente la resistencia a la insulina sistémica en animales *Akt2*^{-/-} (Cho *et al.*, 2001a). También se han identificado mutaciones en humanos en el gen de *Akt2* que llevan a resistencia a la insulina severa (George *et al.*, 2004). Evidencias derivadas de las observaciones en modelos *Akt2*^{-/-} (Cho *et al.*, 2001a) y *Akt1*^{-/-} (Cho *et al.*, 2001b) llevan a pensar que las funciones de estos dos genes son redundantes en célula β y que pueden compensarse el uno al otro.

La expresión *in vivo* de una forma constitutivamente activa de Akt en célula β resultó en una masa de célula β hasta 6 veces mayor, acompañado de hiperinsulinemia (Bernal-Mizrachi *et al.*, 2001). En este modelo se observan hasta 4 veces más células β (hiperplasia), y de un

volumen doble (hipertrofia). Akt es capaz de aumentar la proliferación de célula β al regular los niveles de proteínas clave de ciclo celular en célula β , como ciclina D1, ciclina D2, p21 y aumentar la actividad de Cdk4 (*cyclin-dependent kinase 4*) Fatrai *et al.*, 2006. El cruce del animal transgénico expresando una forma de Akt constitutivamente activa en célula β , con modelos *S6k1*^{-/-} y/o *S6k2*^{-/-} demuestra que S6K media parte de los efectos de Akt sobre el aumento de masa de célula β , pero no todos, ya que el animal β *Akt-myr* ; *S6k1*^{-/-} ; *S6k2*^{-/-} aún presenta mayor masa de célula β respecto a los controles (Alliouachene *et al.*, 2008). La delección de Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), componente crítico de mTORC2 (ver sección 1.2.5.1), de forma específica en célula β , presenta menor fosforilación de Akt-Ser⁴⁷³ en islotes pancreáticos. Este efecto se traduce en una menor masa de célula β (Gu *et al.*, 2011).

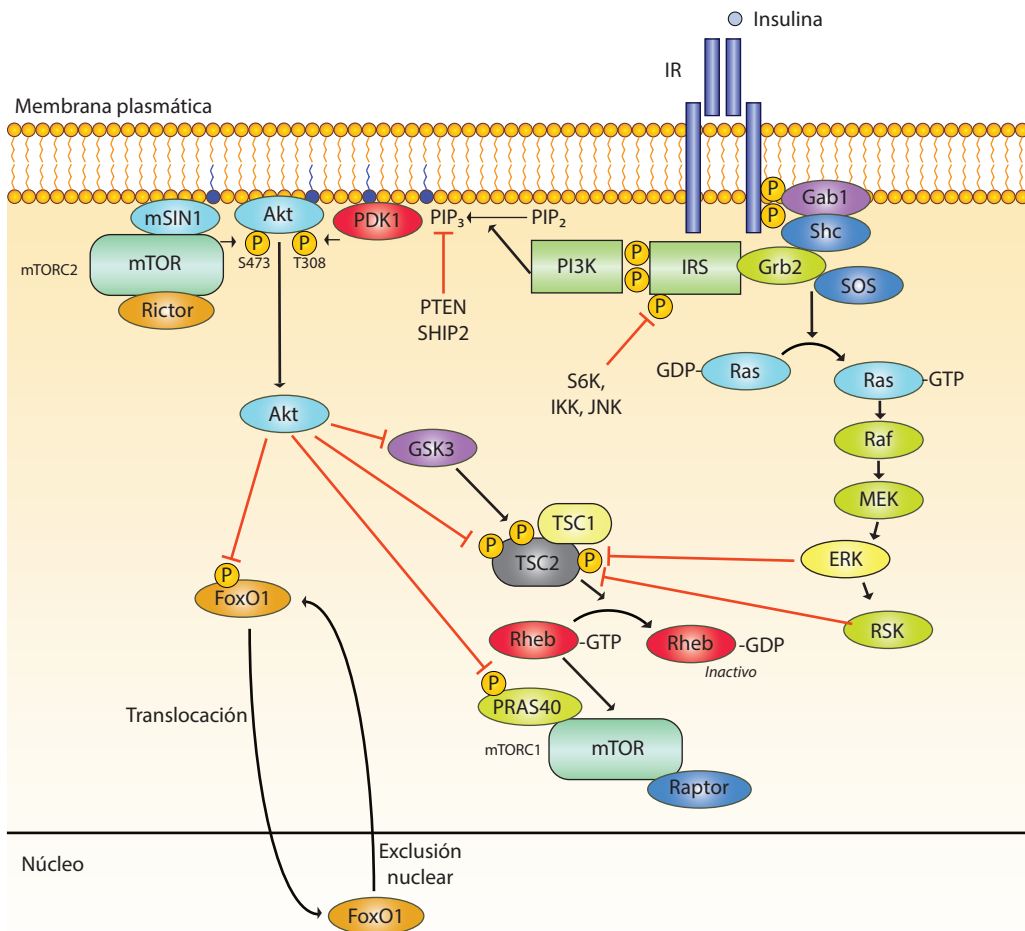


Figura 1.8. Esquema de la señalización de la insulina.

Se muestran los elementos introducidos en esta sección. Algunas de las proteínas no definidas hasta ahora son: Shc, SH2-domain containing protein; Gab2, Grb2-associated-binding protein; Grb2, Growth factor receptor-bound protein 2; Ras, Rat sarcoma protein; Raf, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; MEK, mitogen extracellular signal-regulated kinase; ERK, extracelular signal-regulated kinase.

Akt fosforila e inhibe a GSK3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 β), regulando la progresión del ciclo celular. GSK3 β además conecta con TSC2/mTORC1 mediante fosforilación inhibitoria de TSC2 (Inoki *et al.*, 2006). La señalización de insulina produciría activación de Akt, e inactivación de GSK3 β , con el consiguiente estímulo de la ruta TSC2/mTORC1. El tratamiento *ex vivo* de islotes humanos con inhibidores de GSK3 aumenta la proliferación celular de manera mTORC1 dependiente (Liu *et al.*, 2009a). La sobreexpresión de una forma

constitutivamente activa de GSK3 β en célula β lleva a hipoplasia celular, e intolerancia a la glucosa (Liu *et al.*, 2008). Mientras que se observan efectos inversos en el modelo β Gsk3 $\beta^{-/-}$ (Liu *et al.*, 2010). Ratones con pancreatectomía de hasta el 90% fueron tratados localmente con morfolino-oligonucleótidos antisentido frente a GSK3 β , promoviendo tanto regeneración acinar como de célula β pancreática (Figeac *et al.*, 2012).

Akt también tiene como dianas otras proteínas que serán tratadas más adelante, entre ellas, factores de transcripción de la familia *forkhead box* clase O (FoxO), o la proteína TSC2.

1.2.2.4 Ruta Ras-MAPK

La ruta Ras-MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) es activada por insulina tras la unión a dominios fosforilados en tirosina del IR e IRS de las proteínas con dominio SH2 (Shc y Gab1) a Grb2 y SOS. Esto causa la activación del dominio GTPasa de Ras, y la subsiguiente activación de Raf, que desencadena una cascada de señalización que resulta en la fosforilación de MEK1/2 y ERK1/2 (revisado en Pouyssegur *et al.*, 2002).

ERKs fosforilan múltiples proteínas, entre ellas TSC2 (Ma *et al.*, 2005), y la quinasa de la proteína ribosomal S6 p90 (RSK) Chen *et al.*, 1992. RSK a su vez también es capaz de fosforilar a TSC2 (Roux *et al.*, 2007). Estas acciones llevan a un aumento de la síntesis proteica general y la expresión de ciertos genes. Diversas evidencias indican que ERK1 y ERK2 son efectores de las acciones mediadas por insulina en crecimiento y diferenciación, pero no tanto para sus acciones metabólicas. Tampoco hay modelos que exploren la importancia de esta ruta en célula de manera específica en célula β . El efecto de la glucosa en esta ruta, de manera independiente del efecto de la insulina es discutido en la sección 1.2.3.

Por último mencionar como la estimulación de ERK no en célula β , sino en hígado, es capaz promover señales nerviosas, por medio de un eje hepato-neuro-pancreático que llevan a un aumento de la masa de célula β en condiciones de resistencia a la insulina (Imai *et al.*, 2008).

1.2.2.4 Factores de transcripción de la familia *forkhead box*

Miembros de esta familia como FoxO1, FoxO3a o FoxO4 son fosforilados por Akt (Nakae *et al.*, 2002), inhibiendo su acción al promover su exclusión nuclear. A nivel sistémico FoxO1 promueve la gluconeogénesis hepática o la adipogénesis, por lo que su inhibición mediada por insulina es esencial para el mediar el efecto anabólico de la hormona. Estos factores de transcripción también inhiben fuertemente la proliferación al regular positivamente la transcripción de p27^{kip1} (Medema *et al.*, 2000), inhibidor de la formación del complejo ciclina D/Cdk4, esencial para la proliferación de célula β (Rane *et al.*, 1999). FoxO1 juega un importante papel en célula β en proliferación y respuesta al estrés. En situaciones normales, la acción autocrina de la insulina producida por las células β mantiene a FoxO1 siempre en citoplasma. Sin embargo, FoxO1 localizado en núcleo inhibe la proliferación de célula β al suprimir la expresión de *Pdx1* (Kitamura *et al.*, 2002).

El modelo FoxO1 haploinsuficiente (*Foxo1*^{+/-}) es capaz de revertir parcialmente el fenotipo diabético observado en animales *Irs2*^{-/-} (Kitamura *et al.*, 2002), al igual que el del modelo

$\beta Pdk1^{-/-}$ (Hashimoto *et al.*, 2006). Estos estudios demostraron como FoxO1 suprime la transcripción de *Pdx1* dependiente de Foxa2, y elegantemente enseñaron como núcleos positivos para FoxO1 nunca lo son para Pdx1. *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homebox-1*) es un factor de transcripción clave para la identidad de célula β y su proliferación (McKinnon y Docherty, 2001). Pérdida parcial de la función de Pdx1 está relacionada con la aparición temprana de diabetes en humanos (Stoffers *et al.*, 1997), así como una menor expansión y mayor muerte de célula β en animales *Pdx1*^{+/-} (Fujimoto *et al.*, 2009; Sachdeva *et al.*, 2009).

Modelos animales mencionados hasta ahora, los cuales demuestran la importancia de la señalización de la insulina en célula β , quedan recogidos en la [Tabla 1.1](#).

Tabla 1.1 Señalización de la insulina en célula β, modelos animales			
<i>Modelo</i>	<i>Efecto en célula β</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Referencia</i>
$\beta IR^{-/-}$	↓ 25% masa de célula β ↓ Función secretora	Diabetes en el 25% de los animales	Otani <i>et al.</i> , 2004
$\beta IR^{-/-}$; LIRKO/HFD (<i>high-fat diet</i>)	Aumento compensatorio de masa de célula β impedido	Intolerancia a la glucosa severa Muerte temprana	Okada <i>et al.</i> , 2007
$\beta Igf1r^{-/-}$	↓ Función secretora	Intolerancia a la glucosa	Kulkarni <i>et al.</i> , 2002
$\beta Igf1r^{-/-}$; HFD	↑ Masa de célula β (compensatorio)	Resistencia a la insulina Intolerancia a la glucosa No desarrollan diabetes	Okada <i>et al.</i> , 2007
$\beta IR^{-/-}$; $\beta Igf1r^{-/-}$	Hipoplasia de célula β	Hipoinsulinemia, diabetes severa	Ueki <i>et al.</i> , 2006
<i>IR</i> ^{+/-} ; <i>Irs1</i> ^{+/-}	↑ Masa y función de célula β (compensatorio)	Hiperinsulinemia, resistencia severa a la insulina. 40% diabetes.	Brüning <i>et al.</i> , 1998
<i>Irs1</i> ^{-/-}	↑ Masa de célula β (compensatorio)	Defecto de crecimiento Resistencia muscular a la insulina	Araki <i>et al.</i> , 1994; Tamemoto <i>et al.</i> , 1994
<i>Irs2</i> ^{-/-}	Hipoplasia de célula β	Hipoinsulinemia, diabetes severa	Withers <i>et al.</i> , 1998; Kubota <i>et al.</i> , 2000
<i>Irs2</i> ^{-/-} ; <i>FoxO1</i> ^{+/-}	Recuperación parcial de la masa de célula β	Intolerancia a la glucosa No desarrollan diabetes	Kitamura <i>et al.</i> , 2002
$\beta Pik3r1^{-/-}$; $\beta Pik3r2^{-/-}$	↓ Función secretora ↓ Masa de célula β ↑ Apoptosis de célula β	Intolerancia a la glucosa	Kaneko <i>et al.</i> , 2010
$\beta Pten^{-/-}$	↑ Masa de célula β (Hipertrofia e hiperplasia)	Hipoglucemia Mayor tolerancia a la glucosa	Stiles <i>et al.</i> , 2006
$\beta Rictor^{-/-}$	↓ Función secretora ↓ Masa de célula β (hipoplasia)	Hiperglucemia Intolerancia a la glucosa	Gu <i>et al.</i> , 2011
$\beta Rictor^{-/-}$; $\beta Pten^{-/-}$	Ligera hipertrofia de célula β	Normal	Gu <i>et al.</i> , 2011
$\beta Pdk1^{-/-}$	Hipoplasia de célula β	Hipoinsulinemia, diabetes severa	Hashimoto <i>et al.</i> , 2006
$\beta Pdk1^{-/-}$; <i>Foxo1</i> ^{+/-}	Recuperación parcial de la masa de célula β	No desarrollan diabetes	Hashimoto <i>et al.</i> , 2006
$\beta Akt1\text{-}myr$	↑ Masa de célula β (Hipertrofia e hiperplasia)	Hiperinsulinemia, Tumores (insulinomas)	Bernal-Mizrachi <i>et al.</i> , 2001
$\beta Akt1\text{-}myr$; <i>S6k1</i> ^{-/-}	↑ Masa de célula β (Hipertrofia e hiperplasia). Menor que anterior	↓ Tumores	Alliouachene <i>et al.</i> , 2008
$\beta Akt1\text{-}myr$; <i>S6k1</i> ^{-/-} ; <i>S6k2</i> ^{-/-}	↑ Masa de célula β (Hipertrofia e hiperplasia) Menor que anterior	No desarrolla insulinomas No descritos otros efectos	Alliouachene <i>et al.</i> , 2008
$\beta Gsk3\beta\text{-}CA$	↓ Masa de célula β	Intolerancia a la glucosa	Liu <i>et al.</i> , 2008
$\beta Gsk3\beta^{-/-}$	↑ Masa de célula β	Resistencia a diabetes inducida por dieta grasa	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Pdx1</i> ^{+/-} ; HFD	Aumento de masa de célula β impedido	Hipoinsulinemia Diabetes severa	Sachdeva <i>et al.</i> , 2009

1.2.3 Modulación de la señalización por el estatus energético

1.2.3.1 Señalización de la glucosa en célula β

La glucosa en célula β es transportada de manera insulino-independiente, por lo que es posible el estudio de su propio efecto sobre la señalización. Es conocido que en célula β la glucosa es capaz de estimular la ruta de MEK-ERK (Frödin *et al.*, 1995; Briaud *et al.*, 2003), aunque no se conoce el mecanismo, parece ser dependiente de Ca^{2+} y AMPc. Un estudio previo de nuestro laboratorio demostró como la glucosa es capaz de activar a ERK de manera independiente de la insulina que pudiese secretarse en células β $IR^{-/-}$ (Guillen *et al.*, 2006). Otro estudio demostró que la señalización de glucosa *in vitro* a través de la ruta Ras-MAPK solo tiene consecuencias a nivel de proliferación celular, y no sobre la función secretora de la célula β (Khoo y Cobb, 1997).

Estudios en líneas celulares también demuestran como los niveles de glucosa modulan de manera crítica tanto la proliferación basal en células β como la estimulada por IGF-I o la hormona de crecimiento (Hügl *et al.*, 1998; Cousin *et al.*, 1999). Estudios recientes en modelos de diabetes inducida, muestran como la proliferación de célula β observada se puede relacionar directamente, y de manera positiva, con la glucemia (Pechhold *et al.*, 2009). Prueba del efecto positivo de la glucosa *per se* sobre la masa de célula β es el modelo animal haploinsuficiente de glucoquinasa, de forma específica en célula β . La glucoquinasa es esencial para el metabolismo de la glucosa, y animales haploinsuficientes no son capaces de aumentar la masa de célula β en respuesta a dieta grasa, desarrollando diabetes (Terauchi *et al.*, 2007). Los autores atribuyen parte de este efecto a una disminución de los niveles de IRS2, lo cual está en concordancia con otro estudio que reporta el efecto positivo de la glucosa sobre la expresión de IRS2 en líneas de célula β o islotes de rata (Lingohr *et al.*, 2006). La glucosa, aun demostrando ser un importante contribuyente al aumento de masa de célula β en estos estudios, no resulta suficiente en ausencia de señalización de la insulina/IGF-I. Como fue indicado anteriormente, el modelo β IRKO/ β IGFIRKO desarrolla diabetes severa con elevada hiperglucemia, sin presentar aumento de masa de célula β (Ueki *et al.*, 2006).

Los efectos potenciadores de GLP-1 sobre la masa de célula β son dependientes de glucosa (Buteau *et al.*, 1999). GLP-1 actúa a través de un segundo mensajero (AMPc), cuya síntesis mediada por la adenilato ciclasa es dependiente de ATP. GLP-1 es capaz de activar a mTORC1 por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} y AMPc (Kwon *et al.*, 2004). Esto apoya la idea de que glucosa y GLP-1 pueden actuar sinérgicamente, ya que el efecto de glucosa sobre Ras-MAPK/mTORC1 es también dependiente de AMPc y Ca^{2+} (Briaud *et al.*, 2003).

El propio metabolismo de la glucosa aumenta el ratio ATP/AMP, y por lo tanto incide sobre el sensor energético celular por excelencia, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK).

1.2.3.2 AMPK, importancia en célula β

La AMPK es un heterotrímero formado por 3 subunidades (α , β , γ). Para cada subunidad,

existen 2-3 isoformas diferentes, que provienen de diferentes genes, dando como resultado hasta 12 combinaciones diferentes (Hardie *et al.*, 2012). Aunque algunas isoformas son ubicuas, otras son específicas de corazón, hígado, u otros tejidos. En célula β , la isoforma catalítica predominante es AMPK α 1 (Da Silva Xavier *et al.*, 2000). AMPK actúa como un sensor energético, el cual es conservado en todas las células eucariotas. Se activa por incremento del ratio AMP/ATP, bien causado por estrés metabólico que interfiera con la producción de ATP (deprivación de nutrientes u oxígeno), o por un aumento del consumo de ATP. El

AMP produce una activación alostérica de AMPK, y permite que LKB1 (*liver kinase B1*) fosforele el residuo Thr¹⁷², aumentando alrededor de 100 veces la actividad de AMPK (Jenne *et al.*, 1998).

Multitud de proteínas son dianas de AMPK, que es uno de los nodos más importantes en la regulación del metabolismo de la célula, encargándose de inhibir los procesos biosintéticos que consumen ATP. Algunas de sus dianas son: 1) Regulando el metabolismo lipídico: ACC, HMG-CoA reductasa. 2) Sobre el metabolismo glucídico y transporte de glucosa: glucógeno sintasa, fosfofructoquinasa, AS160. 3) Síntesis de proteínas y autofagia al bloquear la

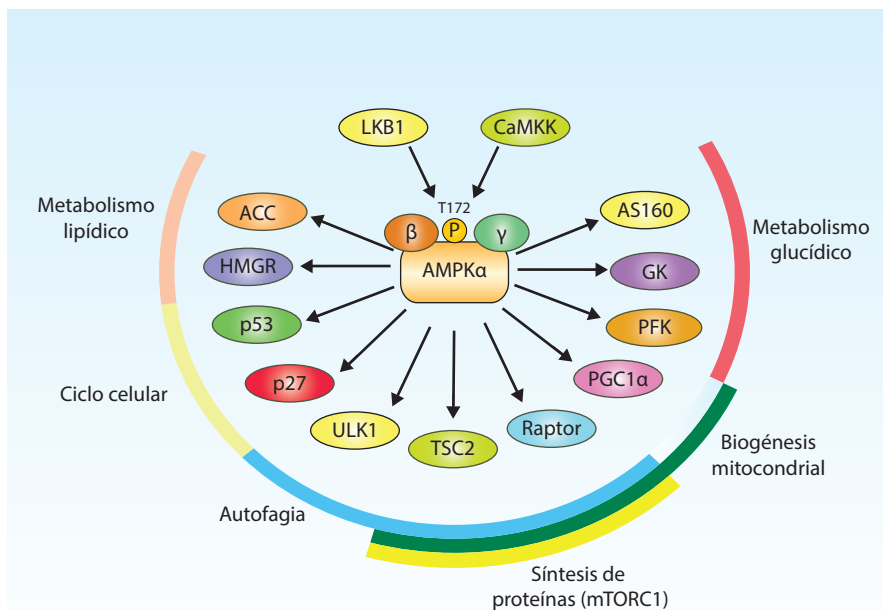


Figura 1.9 Regulación de diferentes procesos a través de AMPK.

AMPK es activada por un bajo ratio ATP/AMP, y fosforilada por LKB1. CaMKK (*Calmodulin-dependent protein kinase kinase*) también fosforila a AMPK en respuesta a elevado Ca²⁺ intracelular. AMPK regula positivamente transporte de glucosa a través de (AS160, *Akt substrate 160 kDa*) y glucólisis (PFK, fosfofructoquinasa), mientras que inhibe la síntesis de glucógeno (GS, glucógeno sintasa). Regula negativamente biogénesis mitocondrial y síntesis de proteínas a través de PGC1a (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1a*) y mTORC1. La autofagia es regulada positivamente a través de fosforilación directa de ULK1 e inhibición de mTORC1. La activación de AMPK produce parada de ciclo celular, siendo un modulador negativo de proliferación. AMPK inhibe la síntesis de esteroides (HMGGR, hidroximetilglutaril-CoA reductasa) y lípidos complejos, a la vez que promueve lipólisis y oxidación de ácidos grasos (ACC, acetil CoA-carboxilasa).

actividad de mTORC1: TSC2, Raptor, ULK1. AMPK inhibe el crecimiento y la proliferación, al inhibir la biosíntesis lipídica, glucídica y proteica (Figura 1.9). La relevancia de AMPK en diabetes tipo 2 queda patente al ser una diana farmacológica. La metformina, activador indirecto de la AMPK, es posiblemente el fármaco más extendido para el tratamiento de diabetes tipo 2, teniendo como efecto principal la inhibición de la gluconeogénesis hepática.

La importancia de la AMPK en la fisiología de la célula β pancreática ha sido extensivamente tratada en la literatura. Por un lado, juega un importante papel en la secreción de insulina, la activación artificial de AMPK bloquea la secreción de insulina estimulada por glucosa (Salt *et al.*, 1998; Leclerc *et al.*, 2004), al regular negativamente tanto la expresión de preproinsulina (Da Silva Xavier *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008b), así como la dinámica de vesículas de secreción (Tsuboi, 2003). Por otro lado, la activación prolongada de AMPK por AICAR o metformina, induce la apoptosis de célula β (Kefas *et al.*, 2003a; 2004), mediada por JNK y caspasa-3 (Kefas *et al.*, 2003b). Los efectos *in vivo* de la AMPK en célula β fueron interesantemente mostrados por Richards y colaboradores, usando como modelo ratones a los que se les indujo diabetes por estreptozotocina. Estos ratones fueron sometidos a trasplante con islotes pancreáticos que previamente habían sido infectados con adenovirus conteniendo una AMPK constitutivamente activa, un dominante negativo de la AMPK, o un gen irrelevante como

control. Los animales con islotes que expresaron la forma dominante negativa de AMPK, lograron un mejor control de la glucemia, todo lo contrario que aquellos que expresaban la forma activa de AMPK (Richards *et al.*, 2005).

Más recientemente, el modelo *knock-out* de *Lkb1* de forma específica en célula β muestra una tolerancia aumentada a la glucosa debido a mayor masa de célula β (hiperplasia e hipertrofia) además de mayor actividad secretora de insulina (Fu *et al.*, 2009; Granot *et al.*, 2009). Estos autores demostraron como la pérdida de LKB1 y la consiguiente menor acción de AMPK en célula β aumenta la actividad de mTORC1 e induce hipertrofia, reversible por tratamiento con rapamicina.

Sorprendentemente el modelo β AMPK-DKO (*Ampk α 1*^{-/-}; *β Ampk α 2*^{-/-}) no presenta una masa de célula β mayor (Sun *et al.*, 2010). Un efecto esperable sería una mayor activación de mTORC1 e hipertrofia, sin embargo los autores muestran hipotrofia, sin cambios en la ruta de mTORC1. Es posible que parte de los resultados no esperados con este modelo se deban a la doble delección de AMPK también encontrada en neuronas hipotalámicas, por el uso de *Cre* bajo el promotor RIP2 (*rat insulin promoter 2*), lo cual al aumentar el tono parasimpático, complica una correcta interpretación de los resultados.

1.2.4 El complejo TSC1-TSC2

1.2.4.1 Estructura y función

Los genes *TSC1* y *TSC2* fueron identificados en 1997 y 1993 como el *locus* genético que se encontraba mutado en la enfermedad conocida como complejo de esclerosis tubular (TSC) European TSC Consortium, 1993; van Slegtenhorst *et al.*, 1997. Esta enfermedad genética, de carácter autosómico dominante, se caracteriza por la formación de tumores benignos (tuberomas y hamartomas), que afectan principalmente al cerebro, riñones, piel, corazón y pulmones. Las manifestaciones clínicas incluyen desórdenes neurológicos (epilepsia, retraso mental), angiomiolipomas renales y pulmonares (revisado en Crino *et al.*, 2006).

El producto de estos genes son las proteínas TSC1 (140 kDa), y TSC2 (200 kDa), las cuales no comparten ninguna homología entre ellas, y muy poca con cualquier otra proteína. Aparentemente, el único dominio con actividad de estas dos proteínas, es una región C-terminal del TSC2 con actividad GAP (proteína activadora de GTPasa). TSC1 y TSC2 se asocian formando un complejo heterodimérico. TSC1 es requerido para estabilizar a TSC2 y prevenir su degradación mediada por ubiquitinación o su secuestro por unión a 14-3-3 (Li *et al.*, 2002; Shumway *et al.*, 2003). No se conoce otra función para TSC1 que la de estabilizar a TSC2, por lo que mutaciones en TSC1 afectan directamente a la actividad de TSC2 (Hodges *et al.*, 2001).

La función principal del complejo, es la de actuar como freno de la actividad de mTORC1. En condiciones en las que TSC2 se encuentra estabilizada por unión a TSC1, y por un estatus

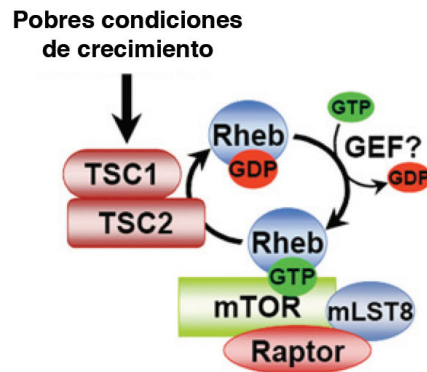
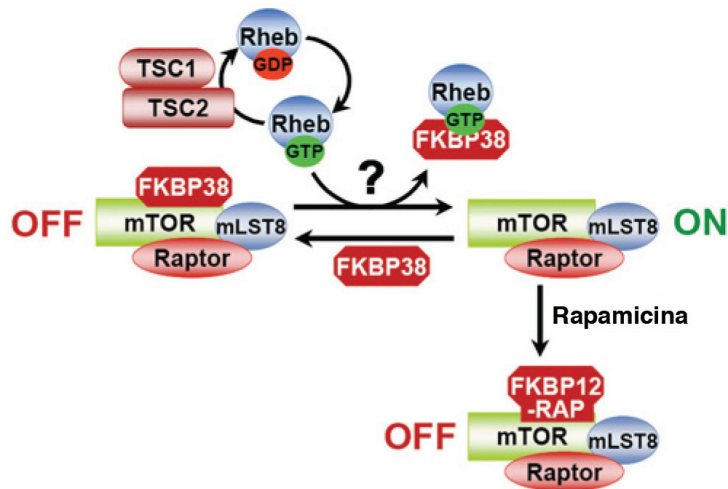


Figura 1.10.

El complejo TSC modula la actividad de mTORC1 a través de una proteína G de pequeño tamaño, Rheb, de la superfamilia de Ras. Rheb unido a GTP es un potente activador de mTORC1, el mecanismo de activación no está muy claro, pero se cree que la interacción de Rheb-GTP con FKBP38 libera a esta última del complejo mTORC1. Cuando FKBP38 se encuentra unido a mTOR, inhibe su actividad de una manera similar a la del complejo FKBP12-rapamicina. El complejo TSC1-TSC2, a través del dominio GAP de TSC2, con función activadora de GTPasa, promueve la actividad GTPasa intrínseca de Rheb, pasando de Rheb-GTP a Rheb-GDP, y por lo tanto inhabilitando la activación de mTORC1. Figura adaptada de Huang y Manning, 2008.



de fosforilación apropiado, la actividad GAP de TSC2 sobre Rheb (*Ras-homolog enriched in brain*) impide la activación de mTORC1 (Zhang *et al.*, 2003; Inoki *et al.*, 2003a) **Figura 1.10**. El factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) encargado de recargar a Rheb con GTP, fue identificado como la proteína dTCTP en *Drosophila* (Hsu *et al.*, 2007), aunque posteriores estudios cuestionan que TCTP (*translationally controlled tumor protein*) cumpla este mismo papel en mamíferos, por lo que la búsqueda del GEF de Rheb en mamíferos aún no ha sido concluida.

1.2.4.2 El complejo TSC1-TSC2 como nexo de integración de señales

Las proteínas TSC1 y TSC2 se encuentran moduladas por fosforilación (**Figura 1.11, a**), principalmente en TSC2, aunque TSC1 también puede ser fosforilado por IKK β (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase β*) Lee *et al.*, 2007a; Cdk1 (Astrinidis *et al.*, 2003) y GSK3 (Mak *et al.*, 2005). Además otras proteínas regulan la actividad del complejo mediante su asociación o disociación (**Figura 1.11, b**). El complejo TSC tiene máxima actividad en ausencia de factores de crecimiento, y estados de baja energía celular.

La señalización de la insulina, por la vía de PI3K/Akt, está conectada con el complejo mediante la fosforilación de Ser⁹³⁹ y Thr¹⁴⁶² en TSC2, mediada por Akt. Estas fosforilaciones inhiben la función GAP de TSC2, promoviendo la activación de mTORC1 (Inoki *et al.*,

2002; Manning *et al.*, 2002). De una manera similar, la activación de la ruta Ras-MAPK también conecta con mTORC1, mediante fosforilación de TSC2, y como se ha descrito anteriormente, en célula β esta ruta podría estar estimulada tanto por insulina como por glucosa de manera independiente. ERK 1/2, es capaz de fosforilar directamente a la Ser⁶⁶⁴ de TSC2, desestabilizando el complejo TSC1-TSC2 (Ma *et al.*, 2005; 2007). También se han descrito fosforilaciones en TSC2 mediadas por las RSKs (Roux *et al.*, 2004). En presencia de factores de crecimiento, TSC2 también puede ser fosforilado e inhibido por DAPK (*death-associated protein kinase*) Stevens *et al.*, 2009, o MK2 (*MAPK-activated protein kinase 2*) Li *et al.*, 2003.

Por otro lado, TSC2 es fosforilado en Thr¹²²⁷ y Ser¹³⁴⁵ por AMPK en condiciones de bajo estatus energético u otros tipos de estrés que activen a AMPK (Inoki *et al.*, 2003b). Esta

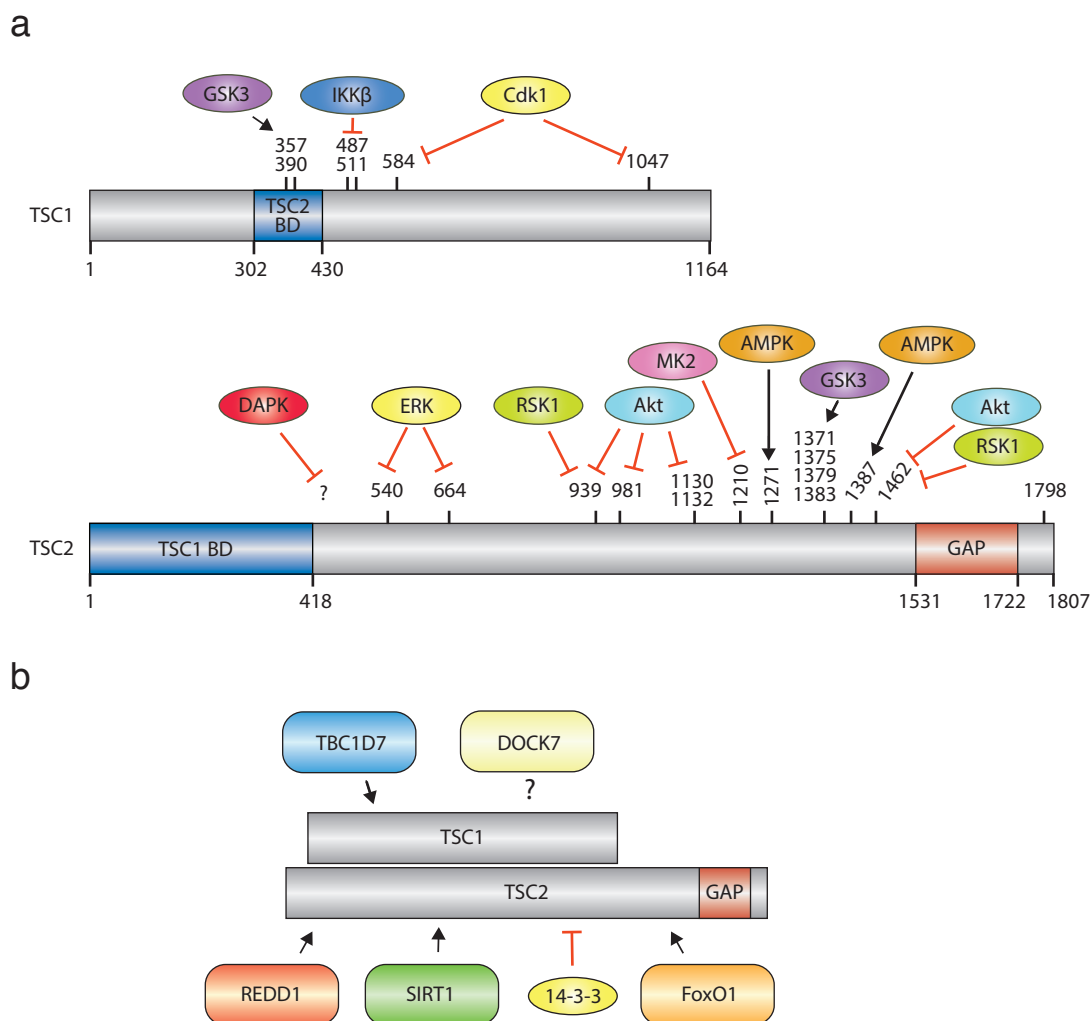


Figura 1.11 Regulación del complejo TSC1-TSC2.

(a) Esquema que muestra diferentes residuos de fosforilación de TSC1 y TSC2, así como las quinasas responsables. Las fosforilaciones que inhiben la función del complejo (líneas rojas), modulan positivamente la actividad de mTORC1. Ocurre de forma inversa para aquellas fosforilaciones que estabilizan el complejo (flechas negras).

(b) Diferentes proteínas que modulan la actividad del complejo a través de interacción. La interacción de DOCK7 (*dedicator of cytokinesis 7*) con TSC1 no tiene una función conocida (Nellist *et al.*, 2005). La proteína 14-3-3 interacciona con TSC2 tras fosforilación en ciertos residuos o interacción con otras proteínas, funcionando como regulador negativo de TSC2 (Li *et al.*, 2002; Shumway *et al.*, 2003).

fosforilación de TSC2, al contrario que las anteriores mencionadas, estabiliza la actividad GAP de TSC2 sobre Rheb, permitiendo la inhibición de mTORC1.

El estado redox celular es capaz de modular a mTORC1 (Sarbasov y Sabatini, 2005), y esta regulación parece ser dependiente de la proteína sensora ATM (*atalasia-telangiectasia mutated*), que modula la actividad de mTORC1 de manera dependiente de LKB1/AMPK y TSC2 (Alexander *et al.*, 2010), fibroblastos *Tsc2*^{-/-} no son capaces de inhibir la señalización de mTORC1 en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS).

La vía de señalización de Wnt también es capaz de regular a mTORC1 a través de TSC2. GSK3 β fosforila a TSC2 en múltiples residuos, y de manera sinérgica con AMPK, estabilizan la acción supresora de TSC2 sobre mTORC1. Sin embargo, la señalización de Wnt lleva a la inhibición de la acción de GSK3 β sobre TSC2, promoviendo la actividad de mTORC1 de manera independiente de cambios transcripcionales mediados por β -catenina (Inoki *et al.*, 2006). Por último, el complejo TSC1-TSC2 también puede integrar señales de hipoxia para inhibir a mTORC1. El complejo media la acción del gen inducible por hipoxia REDD1, el cual estabiliza la su función represora de mTORC1 (Brugarolas *et al.*, 2004).

No está del todo claro por qué las fosforilaciones descritas aumentan o disminuyen la actividad GAP de TSC2, aunque se cree que en parte puede ser por una modulación de su unión con TSC1, o directamente regulando negativa o positivamente su secuestro por unión a proteína 14-3-3, o su degradación mediada por ubiquitinización (Chong-Kopera *et al.*, 2006). Además el complejo TSC1-TSC2 puede estar modulado por interacción con otras proteínas. Recientemente se ha descrito un nuevo compañero del complejo TSC1-TSC2: TBC1D7 (*TBC domain family, member 7*), el cual estabiliza el complejo a través de su unión a TSC1. Aunque aún no queda claro su regulación concreta, parece que tiene un papel similar al de TSC1 y estabiliza el complejo reprimiendo la acción de mTORC1 a través de Rheb (Dibble *et al.*, 2012).

Tanto FoxO1 como TSC2 son proteínas fosforiladas por Akt, quinasa que reprime su acción. Pero además, tras la fosforilación por Akt, FoxO1 es excluido del núcleo y se localiza en citoplasma, donde capaz de interactuar con la región C-terminal de TSC2. Esta interacción desestabiliza el complejo TSC1-TSC2 e inhibe la actividad GAP de TSC2 frente a Rheb, promoviendo la forma Rheb-GTP y la activación de mTORC1 (Cao *et al.*, 2006). Además TSC2 puede asociarse a SIRT1 (sirtuina-1, deacetilasa dependiente de NAD⁺), modulando negativamente la actividad de mTORC1 en condiciones de estrés por deficiencia de aminoácidos (Ghosh *et al.*, 2010). Aunque Ghosh y colaboradores no encontraron evidencias de acetilación en TSC2, no se descarta que proteínas del complejo TSC1-TSC2 puedan estar reguladas por acetilaciones, algo que actualmente se encuentra bajo nuestra investigación. Otra posibilidad es que las sirtuinas puedan regular la interacción de TSC2 con factores de transcripción de la familia de FoxO, ya que los primeros son dianas bien caracterizadas de la actividad deacetilasa de sirtuinas (Brunet *et al.*, 2004; Nemoto *et al.*, 2004; Frescas *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010a).

1.2.5 mTORC1

1.2.5.1 Estructura de los complejos de mTOR

El *mammalian target of rapamycin* (mTOR) es una serina/treonina-quinasa que realiza su acción dentro de un complejo multiproteico (mTORC1 o mTORC2) **Figura 1.12**. Ambos contienen a mTOR como subunidad catalítica, aunque su regulación y acciones son diferentes. Ambos complejos tienen una proteína característica esencial para el ensamblaje de todo el complejo y sus interacciones con otras proteínas reguladoras. En el caso de mTORC1 es Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) Hara *et al.*, 2002; y para mTORC2 es Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) Sarbassov *et al.*, 2004. Otro componente característico de mTORC1 es el sustrato de Akt de 40 kDa rico en prolina (PRAS40) Sancak *et al.*, 2007; mientras que DEPTOR (*DEP domain-containing mTOR interacting protein*) Peterson *et al.*, 2009, está presente en ambos complejos; ambas proteínas son reguladoras negativas de mTOR. Como componente característico de mTORC2 cabe destacar mSIN1, posiblemente la proteína responsable de la activación de mTORC2 por PIP₃ y de su localización en membrana para la completa activación de Akt por fosforilación en Ser⁴⁷³ (Sarbassov *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006).

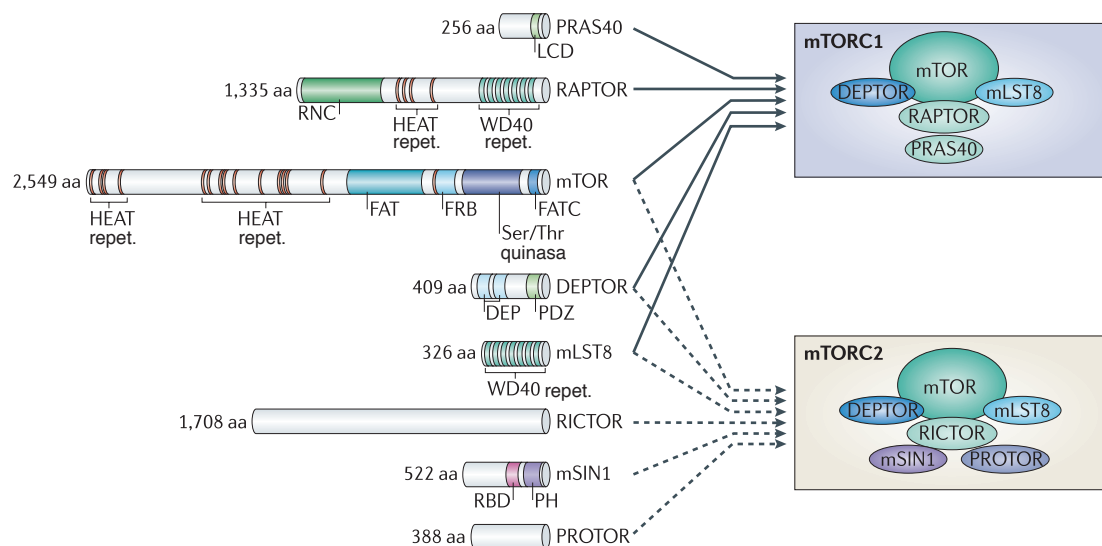


Figura 1.12. Los complejos de *mammalian target of rapamycin* 1 y 2 (mTORC1 y mTORC2) tienen algunos componentes compartidos mientras que otros son únicos de cada complejo. Ambos contienen la proteína letal en mamíferos SEC13-8 (mLST8), y la proteína de interacción con mTOR con dominio DEP (DEPTOR). Caracteriza a mTORC1 la presencia de la proteína reguladora asociada a mTOR (Raptor), y el sustrato de Akt rico en prolina de 40 kDa (PRAS40). Mientras que mTORC2 es caracterizado por la presencia de la proteína de mamíferos activada por estrés y de interacción con MAP quinasa (mSIN1), la proteína acompañante de mTOR insensible a rapamicina (Rictor) y la proteína observada con RICTOR (PROTOR). Esquema adaptado de Zoncu *et al.*, 2011.

Una de las características fundamentales que diferencian a los complejos de mTOR es su dispar sensibilidad al compuesto que, paradójicamente, les da nombre; la rapamicina. Mientras que mTORC1 es inhibible por rapamicina (mecanismo expuesto en la **Figura 1.10**), mTORC2 es rapamicina-insensible. Cabe puntualizar que en ciertas líneas celulares se ha observado inhibición de mTORC2 tras tratamiento prolongado con rapamicina (Sarbassov *et al.*, 2006).

Si bien la explicación que dan los autores es que el *pool* de mTOR queda secuestrado por el complejo rapamicina-FKBP12, inhabilitándolo para su acción en mTORC2.

mTORC2 es regulado por la unión de ligandos a receptores con dominios tirosina quinasa, como ha sido explicado previamente. Pero además se ha observado que la asociación del complejo TSC1-TSC2 a mTORC2 es necesaria para su completa actividad (Huang *et al.*, 2008). Aparte de los efectos anabólicos de la insulina mediados a través de la fosforilación de Akt, mTORC2 fosforila a PKC (Ikenoue *et al.*, 2008) regulando otras acciones anabólicas, progresión del ciclo celular y supervivencia. mTORC2 también participa en la organización del citoesqueleto de actina, regulando polaridad celular (Jacinto *et al.*, 2004).

1.2.5.2 Regulación de mTORC1

El complejo TSC1-TSC2, a través del dominio GAP de TSC2 y Rheb son los principales reguladores de la actividad de mTORC1, como queda recogido en la sección 1.2.4.1. Por lo tanto puede decirse ciertamente que mTORC2, a través de Akt-TSC2 regula positivamente a mTORC1.

La activación de mTORC1 por Rheb es compleja, y para que esta se produzca mTORC1 debe localizarse en la superficie de endosomas y lisosomas, donde reside Rheb. Para ello es necesaria la acción de Rag-GTPasas que en presencia de aminoácidos forman heterodímeros interaccionando directamente con Raptor, trasladando el complejo a la superficie de endomembranas (Sancak *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008a). Por lo tanto, para la activación de mTORC1 se requiere de la presencia de aminoácidos y de la activación de Rheb regulada por TSC2 (dependiente de estatus energético y factores de crecimiento).

Otra sorprendente reguladora de mTORC1 a través de Rheb es la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), enzima glucolítica que es capaz de formar un complejo con Rheb que inhibe la activación de mTORC1 (Lee *et al.*, 2009). Pero para complicar más aún el cuadro, Rheb no es el único regulador de mTORC1, sino que otras proteínas que forman el complejo pueden ser diana de diversas quinasas. La proteína inhibidora PRAS40 puede ser fosforilada directamente por Akt, lo cual se traduce en mayor actividad de mTORC1 (Sancak *et al.*, 2007). Por otro lado Raptor, es modulada por múltiples quinasas. AMPK media la fosforilación de Raptor en Ser⁷⁹², promoviendo la unión de 14-3-3 a Raptor y su disociación de mTORC1. Al ser Raptor esencial para el ensamblaje y la actividad de mTORC1, su fosforilación en Ser⁷⁹² tiene repercusiones negativas sobre la actividad del complejo. Estas observaciones fueron realizadas en fibroblastos *Tsc2*^{-/-}, donde mTORC1 seguía respondiendo al estrés energético (Gwinn *et al.*, 2008).

1.2.5.3 Dianas clásicas de mTORC1

El complejo mTORC1, dirige la síntesis proteica y permite un correcto acoplamiento del tamaño celular a la fase del ciclo celular. El complejo es el principal regulador de la síntesis de proteínas y de la biogénesis ribosomal. Estos procesos son regulados por fosforilaciones directamente dependientes de la actividad quinasa de mTOR, que fosforila e inactiva a 4E-BP1

(*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*), y activa por fosforilación a S6K. El estatus de fosforilación de estas dos proteínas, son indicadores de la actividad de mTORC1.

4E-BP1 es una proteína que se encuentra unida al factor iniciador de la traducción eIF4E, reprimiendo la síntesis proteica. La activación de mTORC1 produce la fosforilación de 4E-BP1 en múltiples residuos, liberándose eIF4E, que se une al complejo de iniciación de la traducción y permite la síntesis proteica (Hara, 1997). S6K (presente en dos isoformas, S6K1 y S6K2) es uno de los mayores efectores del crecimiento celular. S6K fosforila directamente a la proteína 40S ribosomal S6, activando la síntesis proteica y la biogénesis ribosomal. La fosforilación de S6 estabiliza y permite la traducción selectiva de ARNm de proteínas ribosomales, los cuales tienen una señal de oligopirimidina en el extremo 5' (5'-TOP) Montagne *et al.*, 1999. S6K activa, por fosforilación o interacción, a múltiples proteínas de la maquinaria de traducción de ARNm, afectando colectivamente tanto a iniciación como a elongación de la traducción proteica (revisado en Ma y Blenis, 2009). Dado que mTORC1 dirige la síntesis proteica, cabe esperar que una hiperactivación de la vía pueda llegar a colapsar la capacidad de plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático (RE) y producir estrés de RE. Esto se observa en fibroblastos *Tsc1*^{-/-}, *Tsc2*^{-/-} o en tumores de pacientes con complejo de esclerosis tubular (Ozcan *et al.*, 2008).

mTORC1 también juega un papel en algunas de las acciones anabólicas clásicas de la insulina sobre el tejido adiposo, tales como adipogénesis y síntesis lipídica. mTORC1 es un nexo que une la abundancia de nutrientes con el crecimiento y acumulación de reservas de energía. La acumulación nuclear de SREBP1 (*Sterol regulatory element-binding protein 1*), factor de traducción clave en lipogénesis, junto a la mayor expresión del factor adipogénico PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*), están moduladas positivamente por mTORC1 (Cho *et al.*, 2004; Porstmann *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

1.2.5.4 Retroalimentación negativa sobre la señalización de insulina

S6K, como efector de la actividad de mTORC1, media una retroalimentación negativa de la señalización de insulina al fosforilar a IRS1/2 en varios residuos de serina, provocando la desensibilización de la vía (Shah *et al.*, 2004). Consistente con estos hechos, animales *S6k1*^{-/-} son hipersensibles a la insulina, incluso tras dieta grasa, lo cual les protege contra el desarrollo de obesidad (Um *et al.*, 2004). Animales *db/db* o *wild-type* alimentados con dieta grasa presentan aumento de actividad S6K y resistencia a la insulina por fosforilación en IRS1-Ser¹¹⁰¹ en hígado (Tremblay *et al.*, 2007).

Otros grupos también demostraron *in vitro* que la hiperactivación de mTORC1 en fibroblastos *Tsc1*^{-/-} o *Tsc2*^{-/-} causa resistencia a la insulina de manera S6K/IRS dependiente, y reversible por rapamicina (Harrington *et al.*, 2004). Interesantemente, la fosforilación e inhibición de GSK3 no está impedida en condiciones de resistencia a la insulina por hiperactividad de S6K, y solo en estas condiciones GSK3 puede ser diana de la propia S6K1 (Zhang *et al.*, 2006a).

DEPTOR es una proteína inhibidora de la acción de mTOR, presente en los dos complejos. La propia actividad de mTORC1 y mTORC2 inhibe la expresión de DEPTOR (Peterson *et*

et al., 2009), estableciendo un bucle de retroalimentación positivo. Esta alimentación positiva es reforzada por S6K1, capaz de fosforilar directamente a DEPTOR, mediando su ubiquitinización y degradación proteasomal (Zhao *et al.*, 2011). Sin embargo, sobreexpresión de DEPTOR es capaz de mejorar la sensibilidad a la insulina al suprimir la actividad de S6K (Peterson *et al.*, 2009). El descubrimiento de esta proteína reguladora de los complejos de mTOR es reciente, y aún es desconocido su papel *in vivo*.

1.2.5.5 mTORC1 y autofagia

mTORC1 se encuentra implicado en el catabolismo proteico, al modular negativamente la autofagia. La rapamicina es un clásico inhibidor de mTORC1 e inductor de autofagia (Noda y Ohsumi, 1998; Ravikumar *et al.*, 2004).

En levaduras, en ausencia de actividad de TORC1, el complejo proteico formado por Atg1 junto a Atg13-Atg17 controlan la inducción de la autofagia (Kamada *et al.*, 2000). En mamíferos son dos las proteínas con homología Atg1: ULK1 y ULK2 (*uncoordinated 51-like kinase*), y aunque no presenta homología clara con Atg17, FIP200 (*FAK interacting protein 200 kDa*) parece realizar su papel. mTORC1 se asocia con el complejo ULK:Atg13:FIP200, a través de una interacción directa con ULK1. En presencia de señales que activan mTORC1, este fosforila a ULK1 y Atg13 inhibiendo la autofagia. Por el contrario, la ausencia de fosforilación por parte de mTORC1 es una señal para el inicio de la autofagia (Hosokawa *et al.*, 2009; Ganley *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011).

La inhibición de mTORC1 estimula autofagia, pero el catabolismo proteico mediado por la digestión lisosomal genera aminoácidos libres, los cuales son capaces de reactivar de nuevo la actividad de mTORC1. En estas condiciones mTORC1 es responsable del destino último de los autolisosomas, ya que a partir de estos, y de manera mTOR-dependiente se produce la regeneración del contenido lisosomal de la célula (Yu *et al.*, 2010). De estas observaciones se evidencia la importancia de mTORC1 no solo en iniciación de autofagia, sino también en su terminación.

1.2.5.6 mTORC1 y mitocondria

La regulación a nivel de mitocondria mediada por mTORC1 puede tener lugar a varios niveles. En la línea HEK293, mTORC1 aumenta la función oxidativa mitocondrial, mientras que el tratamiento con rapamicina disminuye el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), consumo de oxígeno y producción de ATP (Schieke *et al.*, 2006). El mecanismo responsable de estos efectos parece estar relacionado con la formación de un complejo ternario de mTORC1 con los factores de transcripción PGC1 α y ying-yang-1 (YY1) Cunningham *et al.*, 2007; lo cual lleva a un aumento de transcripción de proteínas clave para el metabolismo mitocondrial.

Sin embargo, en *Drosophila* se han realizado observaciones que contradicen lo encontrado en líneas celulares de mamífero. En condiciones de falta de nutrientes, mTORC1 se encuentra inactivado, pero se ve aumentada la traducción de mensajeros de proteínas de la cadena de

transporte electrónico mitocondrial a través de la activación de 4E-BP1 (Zid *et al.*, 2009), en un intento de mejorar la eficiencia de obtención de ATP.

Interesantemente, el modelo de hiperactivación de mTORC1 de manera específica en célula β *Tsc2*^{-/-} muestra una mayor expresión de genes mitocondriales, número de mitocondrias y contenido de ATP en animales jóvenes. Esto se traduce en una mayor secreción de insulina estimulada por glucosa (Koyanagi *et al.*, 2011). Por otro lado, no ha sido explorado el posible papel de mTORC1 en la autofagia selectiva de mitocondrias (mitofagia), aunque se hipotetiza que su inactivación en condiciones de bajo estatus energético, pueda llevar a la degradación de parte del contenido mitocondrial (Zoncu *et al.*, 2011). Aunque no hay datos sobre el papel de mTORC1 en mitofagia, recientemente se ha implicado a AMPK en su regulación a través de ULK1 (Egan *et al.*, 2011).

1.2.6 Importancia del complejo TSC1-TSC2/mTORC1 en célula β

1.2.6.1 Complejo TSC1-TSC2

Prueba del gran interés que despertó el papel del complejo TSC1-TSC2 en célula β fue la aparición independiente de 4 modelos animales tejido-específicos en poco más de un año. Existen dos modelos de ratón *knock-out* de TSC2 específico de célula β (β *Tsc2*^{-/-}). Shigeyama y colaboradores describen hiperactivación de mTORC1 y un aumento temprano de la masa de célula β por hipertrofia celular, acompañado de hiperinsulinemia e hipoglucemia, además de función secretora aumentada. También describen resistencia a la insulina en islotes debido a la hiperactivación de S6K. Sin embargo a partir de las 35 semanas, la masa de célula β regresa y los animales desarrollan diabetes severa. El tratamiento de animales β *Tsc2*^{-/-} con rapamicina impide el fracaso de la masa de célula β (Shigeyama *et al.*, 2008). Además este trabajo demuestra como el aumento de la señalización de mTORC1 es comúnmente encontrado en islotes de otros modelos de compensación de masa de célula β , tales como *db/db* o animales alimentados con dieta grasa.

Por otro lado, el modelo β *Tsc2*^{-/-} estudiado por el grupo de Bernal-Mizrachi tiene un fenotipo similar al anterior, pero los autores no describen secreción de insulina, ni una segunda fase de fracaso de la masa de célula β (Rachdi *et al.*, 2008). En paralelo, el grupo de Guan

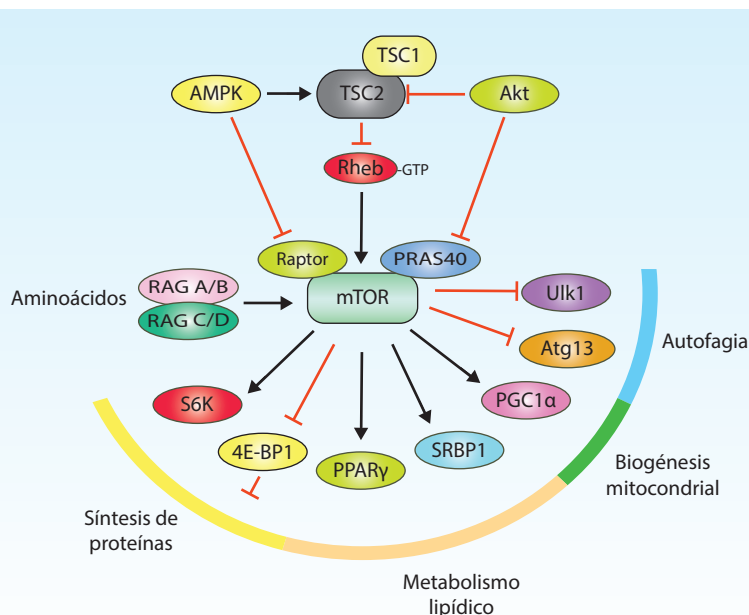


Figura 1.13 Regulación y dianas de mTORC1. mTORC1 es regulado por factores de crecimiento y estatus energético a través de Rheb, de forma dependiente del complejo TSC1-TSC2, AMPK y Akt entre otros. Además para ser activado por Rheb necesita localizarse en endomembranas, para ello es necesaria su traslocación mediada por RAG-GTPasas en presencia de aminoácidos. mTORC1 modula múltiples procesos, los efectores de sus acciones están indicados en el esquema.

generó el modelo $\beta Tsc1^{-/-}$, reafirmando la aparición de hipertrofia de célula β , hiperinsulinemia e hipogluemia, sin embargo este trabajo solo estudia animales jóvenes (Mori *et al.*, 2009b). Por último apareció un modelo transgénico que expresaba una forma constitutivamente activa de Rheb, de forma específica en célula β , y que de nuevo presentaba el fenotipo de los anteriores, pero de una forma más limitada (Hamada *et al.*, 2009). Todos estos estudios fueron descriptivos, y ninguno profundizó en posibles consecuencias de la hiperactivación de mTORC1 en procesos como estrés de RE o autofagia. Parte de los resultados de esta tesis se han obtenido mediante el uso del modelo $\beta Tsc2^{-/-}$ (Shigeyama *et al.*, 2008) en el laboratorio de Y. Kido (Kobe, Japón).

1.2.6.2 mTORC1 y efectos observados por tratamiento con rapamicina

La rapamicina es usada como inmunosupresor tras el trasplante de islotes según el Protocolo Edmonton (Shapiro *et al.*, 2000). Aunque este protocolo es el que mayor éxito ha tenido hasta la fecha, evitando en gran medida el rechazo del trasplante; hay dudas sobre la posible toxicidad de la rapamicina para los propios islotes, y como puede esto afectar a la progresiva disfunción β pancreática observada en los pacientes trasplantados (Desai *et al.*, 2003). La toxicidad de la rapamicina fue probada en ratones recipientes para trasplante de islote (Zhang *et al.*, 2006b). Además, los efectos deletéreos de la rapamicina sobre islotes aislados y líneas de célula β son bien conocidos (Bell *et al.*, 2003; Aronovitz *et al.*, 2008).

El tratamiento con rapamicina también fue causa de un aumento defectivo de masa de célula β durante el embarazo en ratones (Zahr *et al.*, 2007). Otro grupo trató de disminuir la resistencia sistémica causada por el *loop* S6K/IRS1 observada en obesidad, mediante el tratamiento con rapamicina de *Psammomys obesus* bajo dieta hipercalórica. Los resultados obtenidos fueron completamente opuestos a los esperados, ya que el aumento compensatorio de la masa de célula β bajo dieta grasa, que resulta en una insulinemia 10 veces mayor en animales no tratados, quedó completamente abolida en aquellos tratados con rapamicina, los cuales desarrollaron diabetes severa (Fraenkel *et al.*, 2008).

Otro estudio encontró como la actividad de mTORC1 en célula β es importante para la estabilización de la ciclina D2. El tratamiento de animales con rapamicina reduce la síntesis y estabilidad de ciclina D2, además de la actividad de Cdk4, moduladores esenciales de la proliferación β pancreática (Balcazar *et al.*, 2009).

1.2.6.3 Dianas de mTORC1

Dianas de mTORC1 como la S6K también han probado tener un importante papel de forma específica en célula β . El modelo $S6k1^{-/-}$ de forma global, presenta un fenotipo derivado de los efectos sobre célula β (Pende *et al.*, 2000). Los animales $S6k1^{-/-}$ presentan hipersensibilidad sistémica a la insulina, por la menor fosforilación de IRS mediada por S6K, pero son hipoin-sulinemicos al tener masa de célula β muy reducida debido principalmente a hipotrofia. Estos animales son intolerantes a la glucosa, con un fenotipo similar al causado por la malnutrición, que también produce una notable reducción de la masa de célula β e intolerancia a la glucosa (Swenne *et al.*, 1992).

Por el otro lado, la sobreexpresión en célula β de una forma de S6K constitutivamente activa ($\beta S6k^{CA}$) no lleva a un aumento neto de la masa de célula β , aunque se observa hipertrofia e hipoplasia celular. Aunque las células β de $\beta S6k^{CA}$ mostraron más reactividad frente Ki67, no son capaces de completar el ciclo celular y la hipoplasia es producida por una apoptosis aumentada. Los autores indican que la resistencia crónica a insulina en célula β , y la acumulación de los inhibidores de ciclo celular p21 y p27^{kip1} pueden ser los responsable de la mayor muerte observada en $\beta S6k^{CA}$ (Elghazi *et al.*, 2010).

Un modelo general *knock-in* de la proteína ribosomal S6, con los 5 residuos fosforilables sustituidos por alaninas, presentó hipotrofia específica de célula β , acompañado de hipoinsulinemia e intolerancia a la glucosa (Ruvinsky *et al.*, 2005). El hecho de que otros tipos celulares de estos animales muestren tamaños normales, indica la gran importancia de la proteína S6 en célula β pancreática.

Por último, Asahara y colaboradores demostraron como el modelo de obesidad *db/db*, previamente caracterizado por presentar aumento de actividad de mTORC1 en islotes, también presenta aumento de la biogénesis ribosomal en célula β . Encontraron como este hecho podría llevar al fracaso de la masa de célula β de manera mediada por estrés de RE (Asahara *et al.*, 2009).

Hasta el momento, las investigaciones se han centrado en el efecto positivo de mTORC1 sobre la masa de célula β , si bien existen algunas referencias que hablan de los efectos perniciosos derivados de la resistencia a insulina mediada por S6K. Otros aspectos de la hiperactivación de mTORC1, tales como estrés de RE o inhibición de autofagia no han sido convenientemente tratados.

La [Tabla 1.2](#) (siguiente página) recoge un listado de los modelos animales que inciden sobre la actividad mTORC1 o sus dianas, de manera específica en célula β .

Tabla 1.2 mTORC1 en célula β , modelos animales

Modelo	Efecto en célula β	Fenotipo	Referencia
$\beta Lkb1^{-/-}$	<p>↑ Masa de célula β (Hipertrofia e hiperplasia) ↑ Función secretora Dependiente de ↑mTORC1</p>	Hiperinsulinemia, hipoglucemia Mayor tolerancia a la glucosa	Fu <i>et al.</i> , 2009; Granot <i>et al.</i> , 2009
$\beta Tsc1^{-/-}$	<p>↑ Masa de célula β (hipertrofia) ↑ Función secretora</p>	Hiperinsulinemia, hipoglucemia Mayor tolerancia a la glucosa	Mori <i>et al.</i> , 2009b
$\beta Tsc2^{-/-}$ (I)	<p><35 semanas: ↑ Masa de célula β (hipertrofia) >35 semanas: ↓ Masa de célula β ↑ Función secretora ↑ Masa mitocondrial</p>	<35 semanas: hiperinsulinemia, hipoglucemia >35 semanas: hipoinsulinemia, diabetes	Shigeyama <i>et al.</i> , 2008; Koyanagi <i>et al.</i> , 2011
$\beta Tsc2^{-/-}$ (II)	<p>↑ Masa de célula β (hipertrofia e hiperplasia) Función secretora sin cambios</p>	Hiperinsulinemia, hipoglucemia Mayor tolerancia a la glucosa	Rachdi <i>et al.</i> , 2008
$\beta Rheb-CA$	<p>↑ Masa de célula β (hipertrofia) ↑ Función secretora</p>	Hiperinsulinemia, hipoglucemia Mayor tolerancia a la glucosa	Hamada <i>et al.</i> , 2009
$S6k1^{-/-}$	<p>↓ Masa de célula β (hipotrofia) ↓ Función secretora</p>	Hipersensible a la insulina Hipoinsulinemia Intolerancia a la glucosa	Pende <i>et al.</i> , 2000
$\beta S6k1-CA$	<p>↔ Masa de célula β ↑ Tamaño (hipertrofia) ↓ N° de células por ↑ Muerte celular ↑ Función secretora</p>	Hiperinsulinemia, hipoglucemia Mayor tolerancia a la glucosa	Elghazi <i>et al.</i> , 2010
rpS6 (no fosforilable)	↓ Masa de célula β (hipotrofia)	Hipoinsulinemia Intolerancia a la glucosa	Ruvinsky <i>et al.</i> , 2005

1.3

Eventos moleculares de importancia en muerte o supervivencia de célula β

1.3.1 Apoptosis

1.3.1.1 Introducción a la apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada caracterizada por diferentes cambios morfológicos los cuales incluyen reducción de volumen celular, condensación de la cromatina y destrucción de ADN. Esto lleva a fragmentación nuclear y celular formándose “cuerpos apoptóticos” eliminados por fagocitos. La apoptosis tiene una importancia fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, ya que elimina de manera ordenada células defectuosas y/o potencialmente peligrosas para el resto del organismo.

Generalmente los procesos apoptóticos han sido divididos en dos grupos: apoptosis extrínseca (o mediada por receptores de muerte), o intrínseca (independiente de receptores de muerte, dependiente de señales intracelulares provenientes de mitocondria, RE o núcleo), clasificación revisada en Galluzzi *et al.*, 2012.

Apoptosis extrínseca: mediada por receptores transmembrana que actúan tras la unión de sus ligandos (señales extracelulares). Ejemplos de estos receptores son FAS o el receptor de TNF α (factor de necrosis tumoral α). La unión de los ligandos a estos receptores de muerte induce la oligomerización del receptor, activación de la procaspasa 8, y posterior activación de la caspasa 3, lo cual, conduce a la ejecución del programa de muerte celular.

Apoptosis intrínseca: puede ser causada por multitud de condiciones de estrés intracelular (daño al ADN, estrés oxidativo, sobrecarga intracelular de Ca²⁺, estrés de RE, etc.). La señales pro- y anti-apoptóticas convergen a nivel de las membranas mitocondriales, las cuales se permeabilizan cuando predominan señales pro-apoptóticas. Esta ruta está regulada por proteínas de la familia de Bcl-2 (anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-x_L; o pro-apoptóticas como Bax, Bad, Bid, PUMA). Proteínas pro-apoptóticas pueden formar poros sobre la membrana mitocondrial externa, induciendo su permeabilización, lo cual conlleva la salida al citoplasma de citocromo *c* y otras proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembrana mitocondrial. La interacción de citocromo *c* con Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*) y la procaspasa 9 (apoptosoma), llevan a la activación de la procaspasa 3 y la ejecución de la muerte celular (revisado en Kroemer *et al.*, 2007). La apoptosis intrínseca también puede producirse de manera independiente de la mitocondria, una disrupción de la homeostasis de Ca²⁺ del RE, debido a estrés prolongado de RE, puede activar a calpainas, que proteolizan la procaspasa 12 e inducen la activación de las caspasas ejecutoras (Nakagawa y Yuan, 2000; Nakagawa *et al.*, 2000).

La apoptosis es ejecutada por la caspasa-3, -6 y -7. Las cuales proteolizan proteínas como PARP (Poli ADP-ribosa polimerasa), Bcl-2, diversas proteínas estructurales, y producen la activación de CAD (desoxiribonucleasa activada por caspasas), que lleva a degradación de ADN.

1.3.1.2 Apoptosis en célula β

La apoptosis como proceso responsable de la disminución de la masa de célula β en diabetes tipo 2, fue primeramente identificado en ratas obesas Zucker. En estos animales, la masa de célula β es incrementada dramáticamente para hacer frente a la resistencia a la insulina provocada por la obesidad. Pero al aumentar el peso de los animales y agudizarse la resistencia a la hormona, función y masa de célula β acaban decayendo. Esto no es debido a una falta de proliferación o neogénesis, sino a un aumento de la apoptosis, observada en secciones pancreáticas (Pick *et al.*, 1998). En humanos también se ha comprobó que el mecanismo que lleva a una pérdida de masa de célula β es la apoptosis. En un estudio a partir de muestras de autopsias, se comprobó que los pacientes obesos con intolerancia a la glucosa mostraban una pérdida de hasta el 40% de la masa de célula β , y de hasta el 60% en individuos que desarrollaron diabetes. No se encontraron diferencias en proliferación, que fue baja en todas las muestras; sin embargo, la apoptosis cuantificada por TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) resultó mayor en los pacientes diabéticos (Butler *et al.*, 2003).

La apoptosis es el mecanismo final encargado de la disminución de la masa de célula β , pero las causas que desencadenan apoptosis son múltiples. Es importante diferenciar la muerte de célula β por causas autoinmunes (diabetes tipo 1), del resto de diabetes. En diabetes tipo 1 la muerte de célula β es mediada por macrófagos activados que producen citoquinas y ligando de FAS, además de linfocitos T citotóxicos que producen la muerte de celular a través de contacto y liberación de gránulos citolíticos conteniendo perforina y granzima B. Diversas revisiones han comparado la muerte apoptótica de diabetes tipo 1 y tipo 2, las cuales comparan muy pocas similitudes (Cnop *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2009).

En esta sección se profundiza en mecanismos que puedan jugar un papel en la muerte o supervivencia de célula β y diabetes de origen no autoinmune.

1.3.2 Acumulación de proteínas defectuosas

1.3.2.1 Acumulación de amilina

Tanto las células β como δ producen amilina, secretada en vesículas (junto a la insulina o somatostatina respectivamente). La amilina humana presenta una sección altamente hidrófoba que produce la agregación de fibras amiloides. Existen varias evidencias que apuntan a un posible fallo de la célula β por esta causa. Por un lado, la amilina pancreática humana puede agregarse, de una manera análoga a la proteína β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer.

No obstante, numerosos estudios postulan una relación directa entre Alzheimer y diabetes (revisado en Sims-Robinson *et al.*, 2010).

En autopsias de pacientes diabéticos se observó que los páncreas presentaban acumulación de fibras amiloides (Cooper *et al.*, 1987). La amilina de roedores no produce fibras amiloides como las humanas, por lo que se descarta que este sea el único mecanismo que produce el fracaso de la masa de célula β . Sin embargo, ratas que expresan transgénicamente la amilina humana desarrollan una progresión a la diabetes similar a la que se produce en humanos, con una pérdida del 50% de masa de célula β a los 10 meses (Marveyenko y Butler, 2006). Aún así, existe controversia sobre el posible papel de la amilina, y probablemente su efecto pernicioso esté muy ligado al estrés de RE asociado al plegamiento de proteínas defectuoso (Huang *et al.*, 2007). No obstante, la amilina tiene como función fisiológica el contribuir al mantenimiento de la homeostasis glucídica, y por esta razón su uso está aprobado para tratamiento de diabéticos tipo 1 y 2.

1.3.2.2 Insulina

Una correcta síntesis y plegamiento de la insulina es esencial para el funcionamiento de la célula β pancreática. Una mutación puntual en un alelo del gen de la insulina puede producir defectos en la célula β que van más allá del simple efecto de la pérdida de un alelo. El modelo murino “Akita”, presenta una mutación en un alelo del gen *Ins2* que produce un cambio de cisteína a tirosina (C96Y), inhibiendo la formación de un puente disulfuro crítico. Aún así, la producción de insulina es compensada ya que los roedores presentan dos genes que codifican la insulina (*Ins1* e *Ins2*), e incluso pueden compensar la pérdida completa de los dos alelos de uno de los genes (Leroux *et al.*, 2001). Sin embargo, el ratón Akita sufre una progresiva pérdida de células β , que se correlaciona con el desarrollo de diabetes mellitus. Por lo que parece bastante probable que la expresión de *Ins2*^{C96Y} sea tóxica para la célula β , como ha sido probado en modelos celulares *in vitro* (Oyadomari *et al.*, 2002; Hartley *et al.*, 2010). Estos modelos demuestran como el estrés de RE crónico es el responsable de la muerte de célula β causada por insulina-C96Y. Otras mutaciones en el gen de la insulina han sido identificadas en humanos, algunas análogas a la mutación del ratón Akita (Støy *et al.*, 2007). Estas mutaciones causan diabetes neonatal permanente, enfermedad muy infrecuente de carácter autosómico dominante, la cual cursa con fallo de función y muerte de células β .

La proinsulina debe sufrir un plegamiento meticuloso en el RE, donde se forman tres puentes disulfuro. Luego se transporta al aparato de Golgi, y es empaquetada en gránulos de secreción, donde es transformada de proinsulina a insulina por escisión del péptido-C. La frecuente fluctuación de niveles de glucosa requiere un exquisito control del plegamiento de proinsulina en la célula β (Lipson *et al.*, 2006). Aparte de los drásticos efectos causados por mutaciones en el gen de la insulina, es posible que defectos en el procesamiento y/o secreción de la hormona puedan llevar a consecuencias perniciosas similares. La insulina puede agregarse de manera similar a como lo hace la amilina (Jansen *et al.*, 2005), agregados de insulina han sido encontrados en el modelo “Akita” (Oyadomari *et al.*, 2002).

En la progresión a la diabetes tipo 2, es frecuente encontrar alteraciones a nivel de secreción de insulina, previo a la disminución de masa por apoptosis y el debut de la diabetes. Estas alteraciones incluyen el procesamiento incompleto de la proinsulina, o secreción defectuosa tanto en humanos, como en roedores. Islotes obtenidos de donantes cadavéricos demuestran como aquellos que provienen de pacientes diabéticos tipo 2 o en progresión a la enfermedad, no son capaces de secretar insulina de manera correcta en comparación a los islotes de individuos sanos (Deng *et al.*, 2004). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la propia secreción deficiente de insulina, sea un agente contribuyente al muerte apoptótica de la célula β . Esta posibilidad es tratada en la sección 4.2 de esta tesis.

1.3.2.3 Agregados proteicos de origen diverso

Diferentes formas de estrés celular (estrés oxidativo, estrés de RE) pueden provocar un defecto de plegamiento de proteínas y la acumulación de agregados proteicos insolubles. Si esta acumulación supera la capacidad de eliminación de la célula, se forman unos cuerpos denominados agrosomas. La existencia de estos cuerpos en células β ha sido observada en condiciones de estrés crónico, y de forma asociada al desarrollo de diabetes tipo 2 (Kaniuk *et al.*, 2007).

Uno de los principales mecanismos para la degradación de proteínas intracelulares es el sistema de ubiquitina-proteasoma (Ding *et al.*, 2007b). Las proteínas son marcadas para su degradación mediante la conjugación con ubiquitina y dirigidas al proteasoma 26S. Tres enzimas son requeridas para unir ubiquitina a las proteínas: E1 (enzima activadora de ubiquitina), E2 (transportador de ubiquitina) y E3 (ubiquitina-proteína ligasa) la cual reconoce las proteínas sustrato y se encarga de la transferencia final de la ubiquitina a la proteína objetivo. Niveles de enzimas E3 se han visto altamente expresados en islotes pancreáticos (Hartley *et al.*, 2009).

Diferentes estudios han demostrado el importante papel de este sistema en célula β para el almacenamiento y secreción de insulina. La inhibición del proteasoma en islotes murinos produce una reducción de la biosíntesis y secreción de insulina (Kitiphongspattana *et al.*, 2005). El papel de este sistema también es importante en condiciones de estrés de RE para degradar proteínas mal plegadas o para la eliminación de amilina acumulada en islotes (Hull *et al.*, 2004). Aún así, los sustratos del proteasoma deben de ser desplegados antes de pasar por el estrecho poro del proteasoma, lo cual imposibilita la degradación de muchas proteínas oligoméricas o agregadas (Verhoef *et al.*, 2002), debiendo degradarse mediante autofagia (Ravikumar *et al.*, 2002). La inhibición del proteasoma es capaz de inducir autofagia, lo cual indica que ambos procesos pueden compensarse el uno al otro en ciertas circunstancias (Ding *et al.*, 2007b).

1.3.3 Estrés de retículo endoplasmático

1.3.3.1 Estrés de retículo endoplasmático y el “unfolded protein response”

El correcto plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático (RE) es esencial para el normal funcionamiento de la célula. Sin embargo, el entorno del RE es altamente sensible a perturbaciones. Cuando la demanda biosintética de proteínas excede la capacidad de plegamiento del RE, se da la condición denominada estrés de RE. El estrés de RE puede darse en condiciones fisiológicas, como sucede en célula β con la alta carga biosintética sufrida tras la estimulación postprandial de síntesis de insulina. Debido a esto, las células eucariotas cuentan con un mecanismo de adaptación, una vía de señalización del RE al núcleo denominada el *unfolded protein response* (UPR). Prueba del importante papel del UPR sobre el funcionamiento celular son resultados de estudios de expresión de genoma completo en *Saccharomyces cerevisiae*. Estos estudios revelaron que la expresión de más del 5% de todo su genoma está regulado por el UPR (Travers *et al.*, 2000).

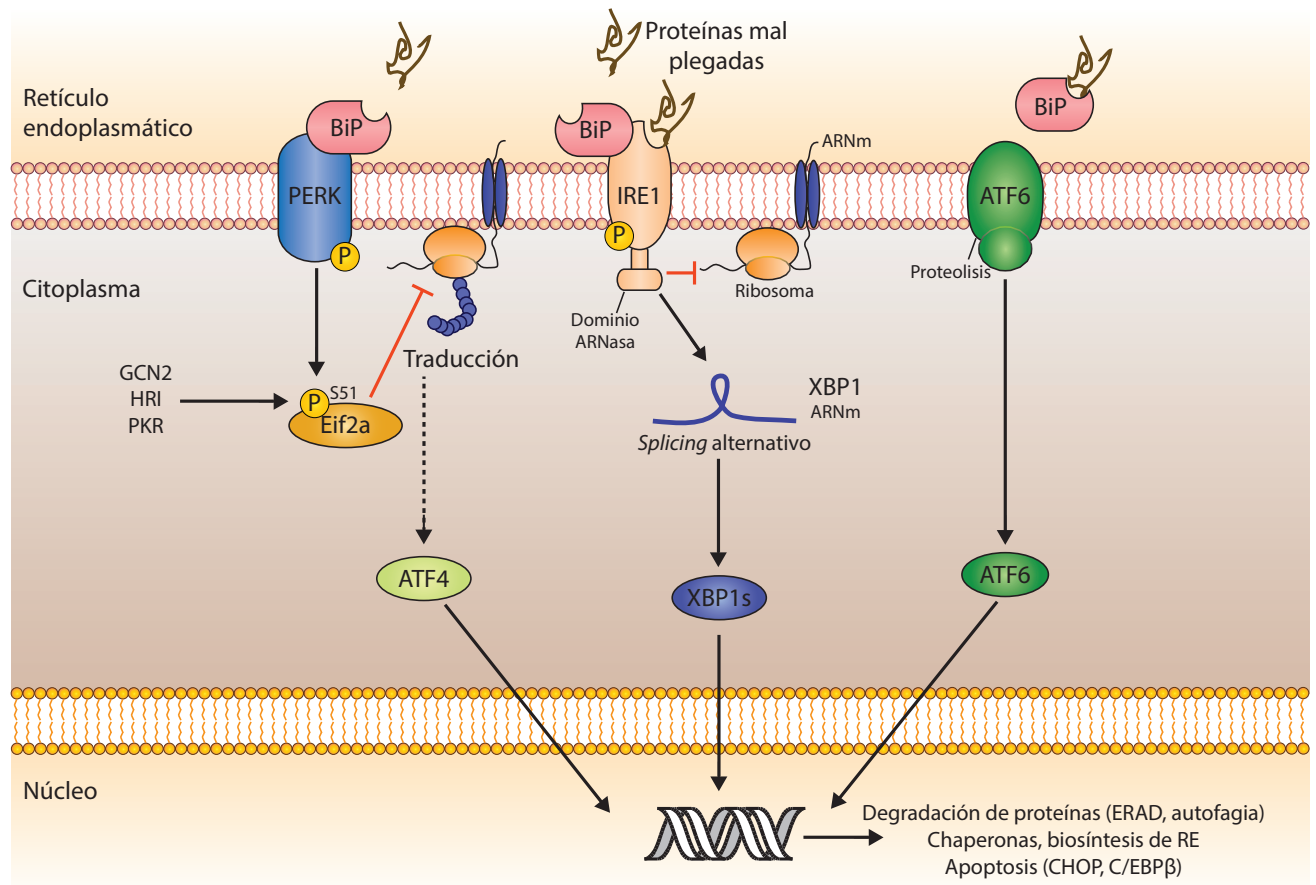


Figura 1.14. Esquema de la respuesta del UPR.

BiP detecta proteínas mal plegadas produciendo la activación de PERK/ATF6/IRE1. PERK se dimeriza y se autofosforila, activando a Eif2a, el cual atenúa la traducción de proteínas, y en estas condiciones ATF4 es capaz de expresarse. Además Eif2a puede activarse por GCN2 (*general control nonrepressed 2*), HRI (*heme-regulated eukaryotic initiation factor 2a kinase*), y PKR (*protein kinase R*). Por otro lado IRE1 interactúa con BiP, pero también es capaz de detectar proteínas mal plegadas. Tras su activación IRE1 degrada mensajeros, y puede producir el *splice* no convencional de *Xbp1*. ATF4, ATF6 y XBP1s son factores de transcripción que actúan en el núcleo activando un complejo programa de transcripción.

En mamíferos, la señalización del UPR es iniciada por tres proteínas transmembrana residentes en el RE. La ARN quinasa *PKR-like* asociada a RE (PERK), el factor activador de la transcripción 6 (ATF6) y la enzima con requerimiento de inositol 1 (IRE1). La presencia de proteínas mal plegadas puede ser reconocida por la proteína regulada por glucosa (GRP78), también denominada BiP (*binding immunoglobulin protein*). Las proteínas mal plegadas compiten con PERK/IRE1/ATF6 por su unión a BiP, cuando esto sucede BiP se libera y la señalización del UPR se activa (Ron y Walter, 2007).

En estas condiciones PERK se dimeriza y es activado por autofosforilación, actuando como quinasa del factor de iniciación de la traducción eucariota-2 α (Eif2 α) Harding *et al.*, 2000b. La fosforilación de Eif2 α en Ser⁵¹ es necesaria para la atenuación de la traducción en condiciones de estrés, y es mediada por diferentes quinasas, entre las que se encuentran la propia PERK (respuesta al estrés de RE), PRK (infección retroviral), GCN2 (baja disponibilidad de aminoacil-ARNt) o HRI (baja disponibilidad de grupo hemo para síntesis de hemoproteínas). A su vez Eif2 α produce el secuestro de Eif2 β y la parada de la traducción proteica general al inhibir la unión de Met-ARNt al ribosoma. En estas condiciones, el ARNm de ATF4 puede traducirse de manera selectiva (Harding *et al.*, 2000a), siendo ATF4 uno de los factores de transcripción, junto a ATF6 y XBP1s, que median la respuesta nuclear del UPR.

IRE es activado de manera similar a PERK, aunque su activación depende solo parcialmente de BiP, ya que es capaz de reconocer proteínas mal plegadas por sí misma (Gardner y Walter, 2011). IRE1 presenta un dominio con función ARNasa, el cual produce el "splicing" no convencional de *Xbp1* (*X-box binding protein 1*), generando el factor de transcripción XBP1s, además de degradar otros ARNm con el objetivo de disminuir la traducción proteica (Calfon *et al.*, 2002). Por su parte, cuando ATF6 no interacciona con BiP, sufre proteólisis del extremo N-terminal y es trasladado al núcleo, donde actúa como factor de transcripción. (Figura 1.13).

La respuesta que media el UPR intenta restaurar la capacidad de plegamiento de proteínas del RE. Estas respuestas se pueden resumir en: una disminución de las proteínas que entran al RE, menor traducción de ARNm, degradación de ARNm, aumento de síntesis de la maquinaria encargada del plegamiento (chaperonas, biosíntesis de RE), y degradación de proteínas (mediada por el complejo de degradación asociado a RE, sistema ubiquitina-proteasoma o autofagia).

1.3.3.2 Apoptosis inducida por estrés de RE, papel de las proteínas de la familia de Bcl-2

Las células que experimentan una señalización crónica del UPR acaban sufriendo activación de caspasas y apoptosis. Existen al menos 4 mecanismos implicados en este evento. El primero es la expresión, mediada por ATF4, ATF6 y XBP1s, de nuevos factores de transcripción como C/EBP β (*CCAAT/enhancer-binding protein β*) Chen *et al.*, 2004; o la proteína con homología C/EBP (CHOP) Oyadomari y Mori, 2004. Estos antagonizan la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o Bcl-x_L, y aumentan la transcripción de Bim (Puthalakath *et*

et al., 2007). El segundo es la activación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) mediada por el complejo IRE1:TRAF1:ASK1 (Urano *et al.*, 2000). JNK puede fosforilar a Bcl-2 asociado a RE, alterando la homeostasis de Ca^{2+} en el RE lo cual puede desencadenar la apoptosis (Bassik *et al.*, 2004), por otro lado JNK potencia la actividad proapoptótica de Bim y Bax también por fosforilación (Putchá *et al.*, 2003; Papadakis *et al.*, 2006). El tercer mecanismo es la activación de la caspasa-12 asociada a RE (Nakagawa *et al.*, 2000). Por último cabe hacer mención a la resistencia a la acción de la insulina inducida por estrés de RE, la cual es mediada por activación de IRE1-JNK y fosforilación en serina de IRS1/2 (Ozcan *et al.*, 2004). La propia resistencia a la insulina disminuye el efecto antiapoptótico de insulina/IGF y puede contribuir a la muerte mediada por estrés de RE.

Proteínas de la familia de Bcl-2 también pueden encontrarse en RE, modulando la homeostasis de Ca^{2+} y la actividad de ciertas proteínas. Las proteínas de la familia de Bcl-2 en RE conectan el orgánulo con procesos como autofagia y apoptosis (revisado en Szegezdi *et al.*, 2009). Los movimientos de Ca^{2+} entre RE, citosol y mitocondria son esenciales para la orquestación de numerosos procesos. Sin embargo, la liberación de Ca^{2+} del RE al citosol puede ser un evento importante para la iniciación de apoptosis, aunque esto depende de la amplitud de la señal. Por lo tanto, mecanismos que inducen una alta concentración de Ca^{2+} en RE en condiciones de reposo, pueden hacer a la célula más sensible a muerte apoptótica por liberación de Ca^{2+} inducida por estrés de RE. Bcl-2 y Bcl-x_L son capaces de reducir las concentraciones de Ca^{2+} en RE en reposo (Lam *et al.*, 1994), mientras que Bax y Bak aumentan su concentración (Scorrano *et al.*, 2003). Estos hechos concuerdan con la observación de que células deficientes de Bax y Bak son resistentes a la apoptosis inducida por estrés de RE (Wei *et al.*, 2001). No está del todo claro como estas proteínas pueden modular las concentraciones de Ca^{2+} , aunque han sido propuestos 3 mecanismos diferentes: 1) Regulación de la entrada de Ca^{2+} al RE a nivel de SERCA; 2) Regulación de la salida de Ca^{2+} al citosol por modulación de la actividad de IP₃R; 3) Formación de poros en el RE de manera análoga a al “poro apoptótico” en mitocondria (Szegezdi *et al.*, 2009). La presencia de Bax y Bak en RE es además necesaria para la activación completa de IRE1 (Hetz *et al.*, 2006).

1.3.3.3 Estrés de RE y UPR en célula β

La síntesis de insulina representa el 50% de toda la producción proteica en células β estimuladas (Schuit *et al.*, 1988). Una mayor ingesta calórica exige un mayor esfuerzo a la célula β , que debe incrementar la síntesis y secreción de insulina para mantener la homeostasis metabólica. Cuando esta necesidad se convierte en crónica, la biosíntesis proteica puede colapsar la capacidad del RE (Lipson *et al.*, 2006), provocando un plegamiento incorrecto de las proteínas y estrés de RE. Algunos autores consideran que la apoptosis desencadenada por estrés de RE crónico en célula β es lo que otros han denominado “muerte por agotamiento”. El estrés de RE como posible causa de apoptosis de células β está siendo extensivamente estudiado durante los últimos años (revisado en Fonseca *et al.*, 2009).

La respuesta del UPR, cuando es puntual es crucial para la generación de insulina de una manera proporcional a su necesidad (Lipson *et al.*, 2006). Ante una alta carga de trabajo

para el RE, la señalización del UPR procura recuperar la homeostasis del RE. PERK/Eif2a juegan un papel esencial atenuando la traducción proteica y poniendo en marcha un complejo programa génico para responder al estrés de RE. Su importancia en célula β se pone de manifiesto en modelos animales *Perk*^{-/-}, o en humanos con síndrome de Wolcott-Rallison, donde la falta de PERK funcional produce un fenotipo caracterizado por fracaso de la célula β y diabetes (Delépine *et al.*, 2000; Harding *et al.*, 2001). La fosforilación de Eif2a en Ser⁵¹ es importante para la homeostasis de la célula β , el modelo que expresa en heterocigosis y forma general, Eif2a con una sustitución de la serina crítica por alanina (S51A), desarrolla obesidad y diabetes cuando es sometido a dieta grasa ya que no es capaz de producir insulina de manera eficiente. Los autores proponen que la atenuación temporal de la traducción por el UPR es vital para la función del RE y la correcta biogénesis de gránulos de insulina (Scheuner *et al.*, 2005).

Por otro lado, una excesiva respuesta del UPR puede precipitar la apoptosis de la célula β . p58^{IPK} es una chaperona inducible por UPR, la cual juega un importante papel inhibiendo la señalización de PERK al mediar un *loop* de retroalimentación negativo. Animales p58^{IPK}^{-/-} desarrollan diabetes en semanas debido a la pérdida selectiva de células β por apoptosis (Ladiges *et al.*, 2005). Una señalización crónica del UPR bloquea la función de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, como son Bcl-2 o Bcl-x_L. Esto se postula en el ratón Akita, en el cual la delección de factores de transcripción asociados a estrés de RE como CHOP (Oyadomari *et al.*, 2002), o C/EBP β (Matsuda *et al.*, 2010), retrasan el desarrollo de diabetes mellitus. La propia sobreexpresión de C/EBP β en célula β induce diabetes por fracaso de célula β (Matsuda *et al.*, 2010; Shimizu *et al.*, 2012).

Es conocido que tanto la sensibilidad como la respuesta ante estrés de RE es mayor en célula β o hepatocitos en comparación con otros tipos celulares (Fonseca *et al.*, 2007). Es por esto que defectos genéticos en elementos que forman el complejo sistema del UPR suelen traducirse como desordenes metabólicos y diabetes. También por esto debe de tenerse precaución con compuestos que modulen la señalización del UPR a nivel global, por su posible efecto pernicioso en célula β e hígado. La obesidad y la sobrecarga lipídica también son causa de estrés de RE en hígado, musculo y tejido adiposo. El estrés de RE aumenta la resistencia a la insulina, y podría ser uno de los mecanismos que conecten la obesidad con el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Ozcan *et al.*, 2004). Otros estudios también han demostrado como ácidos grasos (preferentemente los insaturados) causan estrés de RE en célula β por disrupción de la homeostasis de Ca²⁺ (Karaskov *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2008).

Intentar corregir el defecto de plegamiento de proteínas que induce estrés de RE resulta interesante. El uso de moléculas que actúan como chaperonas químicas, ha demostrado ser efectivo para reducir la resistencia a la insulina periférica y conseguir una normalización de la glucemia (Ozcan *et al.*, 2006). Aparte, el tratamiento con análogos de GLP-1 es capaz de proteger a la masa de célula β frente a estrés de RE (Yusta *et al.*, 2006). Recientemente, hemos encontrado como el tratamiento *in vivo* con un inhibidor de la DPP4 (dipeptil-peptidasa 4, enzima encargada de la degradación de incretinas), incrementa los niveles de GLP-1 y disminuye C/EBP β en islotes, protegiendo a la masa de célula β del fracaso mediado por estrés de

RE (Shimizu *et al.*, 2012). Esto indica como las incretinas pueden jugar un importante papel en la homeostasis de célula β , también a nivel de la regulación de la respuesta del UPR.

1.3.4 Autofagia

1.3.4.1 Definición y función

La autofagia (término derivado de las raíces griegas *auto* – uno mismo, y *phagos* – comer), se define como la digestión de componentes intracelulares mediada por la maquinaria lisosomal. Es un proceso evolutivamente conservado que aparece en la práctica totalidad de organismos eucariotas (Levine y Klionsky, 2004). El descubrimiento de la autofagia fue derivado de la identificación de los lisosomas como entidades diferenciadas en 1955 por Christian de Duve (de Duve *et al.*, 1955), y posteriores observaciones ultraestructurales (Ashford y Porter, 1962; de Duve y Wattiaux, 1966). Aunque la autofagia es bien conocida desde la década de 1960, no empezó a caracterizarse molecularmente hasta el descubrimiento de las proteínas Atg (*autophagy-related gene*) en levaduras (Tsukada y Ohsumi, 1993) y revisado en Klionsky *et al.*, 2003. Se conocen muchos de los homólogos de las proteínas Atg de levaduras en mamíferos, aunque los mecanismos moleculares que dirigen la autofagia en eucariotas superiores aún no están plenamente caracterizados y quedan proteínas por identificar (Nakatogawa *et al.*, 2009). Al menos 7 de las proteínas Atg necesarias para la autofagia, también participan en procesos relacionados con el sistema ubiquitina-proteasoma (Hughes y Rusten, 2007).

La autofagia es un importante proceso homeostático para la célula. Se pueden enumerar al menos tres funciones fundamentales de la autofagia: 1) Degradación de componentes para su reciclaje y/u obtención de energía en condiciones de estrés energético o falta de determinados nutrientes. 2) Degradación de proteínas mal plegadas o agregadas que pueden ser perjudiciales para la célula, función realizada en conjunto con el proteasoma y degradación de proteínas asociada a RE. 3) Degradación de orgánulos dañados o control de su número. Podemos decir, por lo tanto, que la autofagia es un mecanismo de control de calidad citoplasmático, que además puede jugar un importante papel en condiciones de estrés.

El término “autofagia” engloba a varios procesos (Figura 1.15), en los que se incluyen macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia es el fenómeno más estudiado, se caracteriza por la formación de un compartimento de doble membrana, el autofagosoma, que engloba a material citoplasmático que finalmente se fusiona con lisosomas para formar el autolisosoma con actividad proteolítica. La microautofagia se refiere a la captación directa de componentes citosólicos por parte de lisosomas, mediante una invaginación de la membrana lisosomal (Mijaljica *et al.*, 2011). Por último, la autofagia mediada por chaperonas no requiere la formación de vesículas intermedias, sino que proteínas son incorporadas directamente a lisosomas de manera específica y dependiente de un complejo de translocación que produce el desplegado de las proteínas (Cuervo, 2010). Para simplificar, a partir de ahora se hará referencia a la macroautofagia con el término “autofagia”.

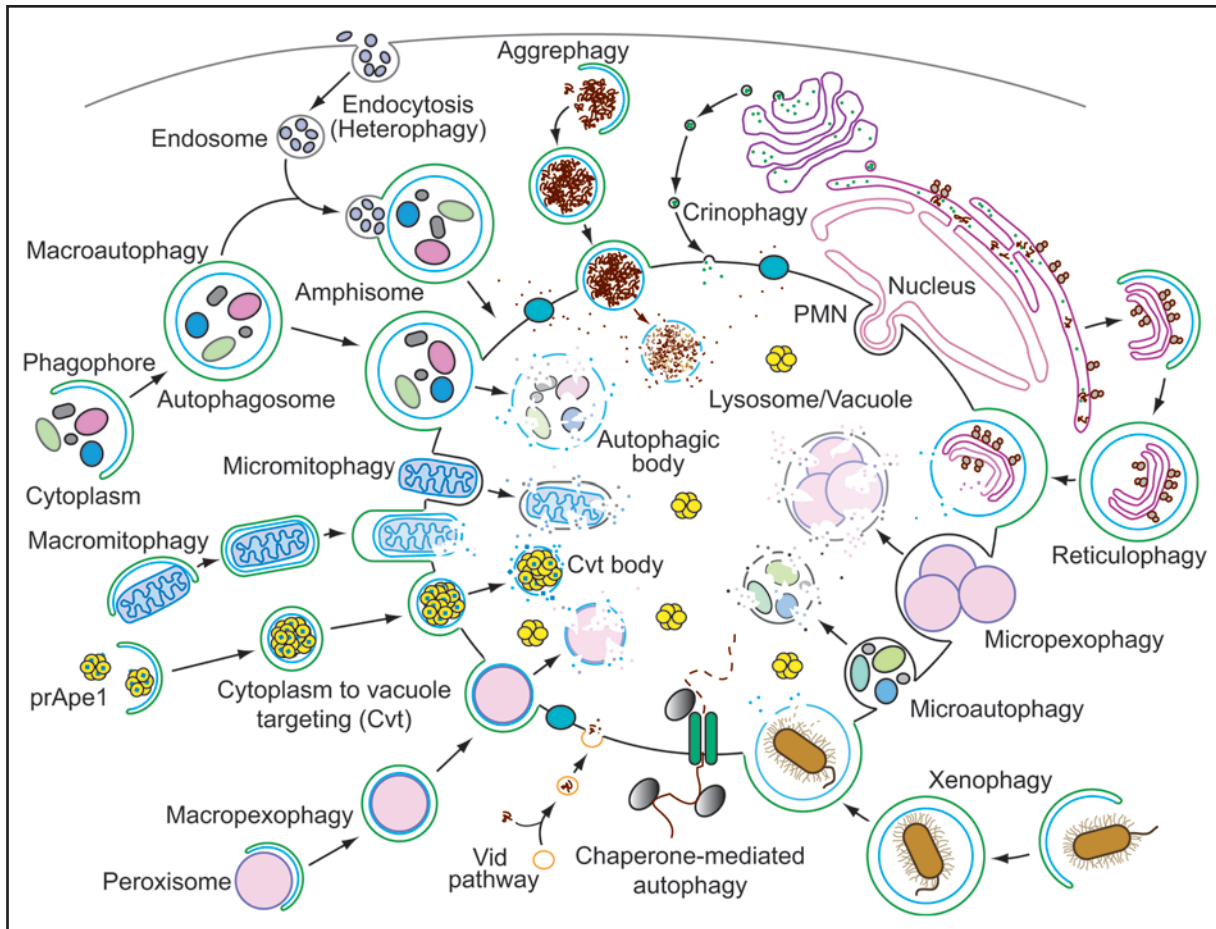


Figura 1.15. Esquema de los diferentes procesos en los que está envuelto el sistema lisosomal/vacuolar y que pueden englobarse dentro del término “autofagia”. Esquema de (Klionsky *et al.*, 2007).

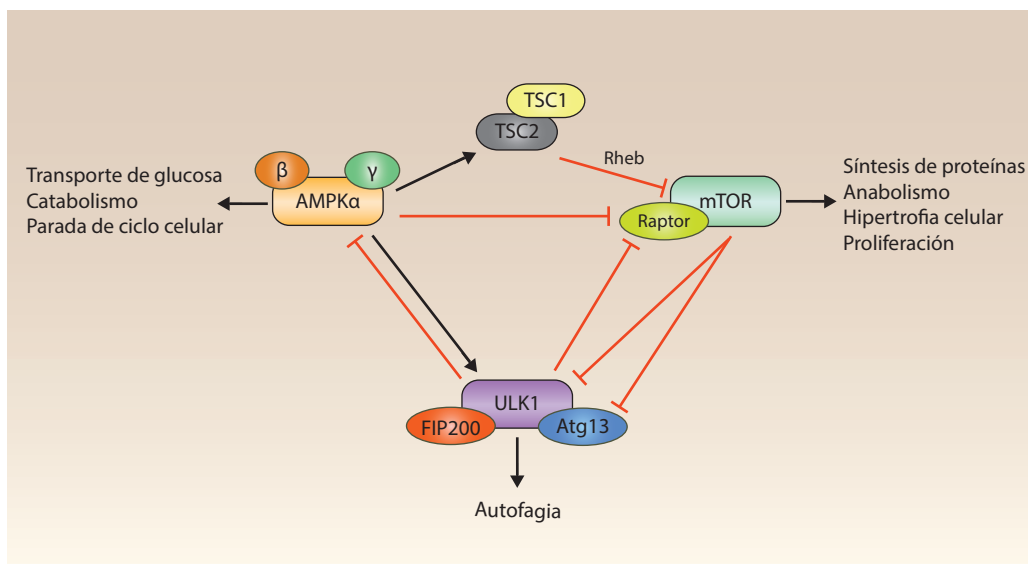
Aunque la inducción de autofagia puede preceder a muerte celular (apoptosis, necrosis), rara vez constituye un mecanismo “suicida”, y su presencia refleja intentos fallidos de adaptarse al estrés que desencadena muerte celular, por lo que su papel ha sido malinterpretado en ocasiones. Aún así, en algunas circunstancias la autofagia puede constituir una forma de muerte celular programada (no apoptótica). Aunque es posible inducirla de forma experimental, los ejemplos de su papel fisiológico son anecdóticos (Kroemer y Levine, 2008).

1.3.4.2 Regulación de autofagia

La autofagia ocurre de forma basal en células eucariotas, existiendo complejos mecanismos sensores y de traducción de señales para una mayor o menor inducción de autofagia. Factores de crecimiento, estado energético celular y la presencia o ausencia de varios tipos de estrés son algunos de los estímulos que pueden ser integrados por la maquinaria reguladora de la autofagia. Es de prever que por lo tanto son múltiples las vías de señalización las que controlan este proceso, siendo la regulación del sistema extremadamente compleja.

La presencia de factores de crecimiento y nutrientes produce la activación de mTORC1, el cual inhibe la autofagia al bloquear la acción del complejo Atg1:Atg13:Atg17 (en mamíferos ULK:Atg13:FIP200), según lo descrito en la sección 1.2.5.5. El complejo de ULK también puede ser modulado por AMPK (Figura 1.16). Cuando mTORC1 se encuentra activo

fosforila a ULK1 en Ser⁷⁵⁷ inhibiendo la interacción de AMPK con ULK1. Sin embargo, en condiciones de estrés energético, AMPK disminuye la actividad de mTORC1 (a través de TSC2 y Raptor), y consecuentemente disminuye la fosforilación de ULK1-Ser⁷⁵⁷ y AMPK puede activar a ULK1 por fosforilación en múltiples residuos (Egan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2011a).



Aunque mTORC1 es el regulador de autofagia más estudiado, existen otras vías de señalización que juegan un papel en la regulación de autofagia de manera independiente de mTORC1/AMPK. Entre ellas, destacar algunas que también son elementos comunes de la señalización de insulina/IGF como ERK2, FoxO1 y GSK3.

ERK2 es capaz de fosforilar al factor de transcripción EB (TFEB), siendo este un regulador maestro de la transcripción de genes relacionados con la formación del autofagosoma y la biogénesis de lisosomas. En presencia de nutrientes y factores de crecimiento, ERK2 se encuentra activo y reprime la acción de TFEB por fosforilación (Settembre *et al.*, 2011). Por lo que la inhibición de ERK2 también regula de forma directa la inducción de autofagia, aparte de regular mTORC1 a través de TSC2 (Roux *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005).

El papel de FoxO1 sobre la regulación de autofagia es controvertido, un estudio indica que FoxO1 en núcleo es capaz de inducir autofagia al regular la expresión de genes clave de la maquinaria autofágica, y que el mecanismo antiautofágico de la insulina es dependiente de la exclusión nuclear de FoxO1 (Liu *et al.*, 2009b). Por otro lado, otro estudio llega a conclusiones diametralmente opuestas, descartando el papel de FoxO1 en regulación de genes de autofagia. Zhao y colaboradores proponen que en condiciones de estrés FoxO1 se disocia de SIRT2 y se acetila, promoviendo su localización citoplasmática, donde puede interactuar con Atg7 con el fin de estimular autofagia (Zhao *et al.*, 2010a).

GSK3 es inhibida por fosforilación en Ser⁹ y Ser²¹. Múltiples vías de señalización pueden regular la inhibición de GSK3, entre ellas PI3K/Akt, Wnt, Ras-MAPK e incluso mTORC1/S6K. A su vez los efectos de GSK3 sobre la regulación de estas vías son extensos,

Figura 1.16 Ménage à trois entre mTORC1/ULK1/AMPK. mTORC1 regula negativamente autofagia a través del complejo de ULK1, por su parte AMPK induce autofagia interactuando directamente con ULK1 o bien mediante la inhibición de mTORC1. Por su parte ULK1 es capaz de mediar retroalimentación positiva inhibiendo mTORC1 (Lee *et al.*, 2007b; Jung *et al.*, 2011), y retroalimentación negativa al fosforilar e inhibir a AMPK (Löffler *et al.*, 2011).

pero recientemente se ha descrito que es capaz de modular autofagia de forma directa, al regular la acetilación de ULK1 mediada por TIP60 (*Tat-interactive 60 kDa protein*) Lin *et al.*, 2012. De esta forma, en ausencia de factores de crecimiento, GSK3 se activa y fosforila a TIP60, mediando esta última la acetilación y activación de ULK1 que induciría autofagia.

Son varios los componentes de la maquinaria autofágica que pueden estar regulados por acetilasas/deacetilasas. SIRT1 puede desacetilar Atg5, Atg7 y LC3 para estimular autofagia en condiciones de falta de nutrientes (Lee *et al.*, 2008). Por otro lado, la acetilación de Atg3 como requisito esencial para la conversión de Atg8 (LC3 en mamíferos) y maduración del autofagosoma ha sido recientemente identificada en levaduras (Yi *et al.*, 2012).

1.3.4.3 Componentes moleculares de la maquinaria autofágica

Se puede hablar de varias etapas para la consecución de la autofagia en las que participan diferentes proteínas y elementos reguladores: 1) Inducción; 2) Nucleación y formación de la vesícula inicial; 3) Elongación y empaquetamiento de cargo; 4) Recuperación de componentes; 5) Fusión con lisosoma; 6) Degradación del contenido intraluminal de la vesícula.

El complejo activo formado por Atg1 (ULK1/2), y regulado por mTORC1 y AMPK, es el encargado de inducción de la autofagia que lleva a la formación de la vesícula inicial, para ello la actividad quinasa de ULK es esencial (Chan *et al.*, 2009). Para el proceso inicial de reclutamiento de la membrana del autofagosoma y de sus componentes proteicos característicos es necesaria la participación del complejo de Beclina1 (homólogo de Atg6), hVps34 (*mammalian vacuolar protein sorting 34 homologue*, PI3K clase III) y hVps15. La unidad funcional del complejo es hVps34, que produce fosfatidil-inositol-3-monofosfato [PI(3)P] que pasa a formar parte de la membrana inicial del autofagosoma. Existen multitud de reguladores del complejo Beclina1:hVps34:hVps15, que interactúan principalmente con Beclina1 (revisado en Kang *et al.*, 2011a). Se han descrito hasta 13 proteínas que interactúan físicamente con el complejo. Algunos moduladores positivos del complejo, y por ende de la formación de autofosomas son Ambra1 (*autophagy/beclin-1 regulator 1*), Atg14L, PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) o UVRAG (*UV radiation resistance associated gene*). Por otro lado, entre los moduladores negativos se encuentran Bcl-2 y Bcl-x_L, los cuales interactúan con Beclina1 de forma específica en RE, inhibiendo la actividad del complejo (Patingre *et al.*, 2005). Tanto Bcl-2 como Bcl-x_L son factores antiapoptóticos y antiautofágicos. Una de las cuestiones menos conocidas es como los complejos de ULK:Atg13:FIP200 y Beclina1:hVps34:hVps15 interactúan para la regulación de la autofagia, aunque recientemente se ha identificado a ULK1 como quinasa de Ambra1, cuya fosforilación activaría el complejo Beclina1:hVps34:hVps15 (Di Bartolomeo *et al.*, 2010).

PI(3)P es un elemento esencial de la membrana naciente del autofagosoma (Axe *et al.*, 2008), aunque su papel concreto no es del todo conocido. El homólogo de Atg18 en mamíferos (WIPI1/2, *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides 1/2*) interactúa con PI(3)P, por lo que podría servir de anclaje para otras proteínas (Proikas-Cezanne *et al.*, 2004). El origen de la membrana que forma el autofagosoma es objeto de debate, ya desde 1966 (de

Duve y Wattiaux, 1966) hasta nuestros días (Tooze y Yoshimori, 2010). Se ha observado como la membrana del autofagosoma naciente puede provenir tanto de RE como membrana plasmática o membrana externa mitocondrial. Recientemente han sido identificadas pequeñas vesículas conteniendo Atg9, procedentes del aparato de Golgi, que tras su ensamblaje puedan dar lugar a la membrana inicial (Yamamoto *et al.*, 2012). Atg9 es la única proteína Atg transmembrana identificada hasta la fecha, y es además necesaria para la elongación de la membrana inicial. Atg9 funciona de manera dependiente de ULK1 y WIPI1/2, y es uno de los componentes recuperados del autofagosoma antes de su fusión con lisosomas (Young *et al.*, 2006).

La membrana inicial contiene PI(3)P y ciertas proteínas Atg, incluidas las de los complejos de Beclina1 y ULK1. Esto produce el reclutamiento de otras proteínas Atg como Atg8 (LC3, *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3*) y Atg12, ambas funcionan como proteínas “análogas a ubiquitina” y son conjugadas a otras mediante dos sistemas enzimáticos con características similares al utilizado para la conjugación de ubiquitina a proteínas (Figura 1.17) y revisado en Geng y Klionsky, 2008.

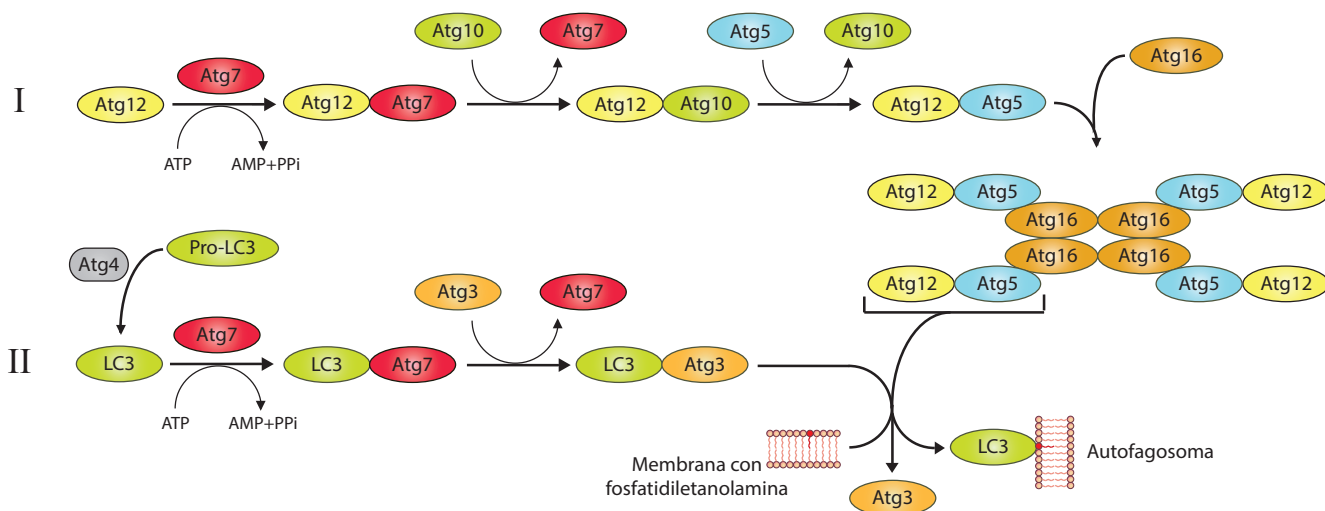


Figura 1.17 Sistemas ubiquitin-like de conjugación de proteínas Atg.

Existen dos sistemas (I y II), en (I) Atg12 funciona como proteína análoga a ubiquitina y es conjugada a Atg7 (E1-like) y posteriormente a Atg10 (E2-like). Atg12 queda conjugada a Atg5 sin la necesidad de una enzima con actividad E3 ligasa, y forma un complejo tetramérico junto con Atg16. En (II), LC3 es conjugado con Atg7 (E1-like) y Atg3 (E2-like). Finalmente es conjugado con fosfatidiletanolamina, para son necesarios Atg5-Atg12, los cuales presentan una actividad E3-like. LC3 (Atg8) conjugado con fosfatidiletanolamina es esencial para autofagia (denominado muchas veces LC3-II), y se encuentra en autofagosomas.

En mamíferos son muchos los homólogos de Atg8 incluyendo LC3A, LC3B, LC3C y proteínas de la familia de GABARAP (proteína asociada a receptor de ácido γ -aminobutírico tipo A), se cree que la familia de LC3 participa en la elongación del autofagosoma inicial y la familia de GABARAP en la maduración final. Los diferentes miembros de la familia de LC3 pueden variar en distribución tisular, siendo LC3B el más estudiado. La conversión de LC3 es probablemente el proceso más frecuentemente monitorizado para la evaluación experimental de autofagia. Usualmente, LC3-I (forma no lipidada) se encuentra en el citosol, y es localizada en autofagosomas cuando es conjugado con fosfatidiletanolamina para formar LC3-II. Este paso es esencial para la elongación y finalización del autofagosoma. Muchas proteínas

contienen regiones que interaccionan con LC3 (u otros homólogos de Atg8), y sirven como adaptadoras entre estructuras definidas, como proteínas ubiquitinadas u orgánulos dañados, para su interacción con la maquinaria autofágica. Algunas de las mejor caracterizadas son p62/SQSTM1 (secuestrosoma 1) y Bnip3l/NIX.

Tras la maduración del autofagosoma y la inclusión de su cargo, este es fusionado con lisosomas para formar autolisosomas. Este proceso debe de estar regulado con el fin de que la fusión no se produzca antes de tiempo. Los mecanismos moleculares que regulan la fase de fusión son bien conocidos en levaduras, y algunas evidencias indican que en mamíferos son muy similares. Los autofagosomas son generalmente formados en regiones periféricas, y conducidos a través de microtúbulos hacia el centro organizador de microtúbulos, donde generalmente se encuentran acumulados. Este movimiento es esencial para la formación final de autolisosomas (Jahreiss *et al.*, 2008).

1.3.4.2 Regulación de la autofagia por estrés de RE

La relación entre RE y autofagia se puso por primera vez de manifiesto mediante estudios llevados a cabo en levaduras (Bernales *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2006), desde un principio se apuntó al efecto protector de la autofagia frente al estrés de RE, lo cual fue también observado en fibroblastos murinos (Ogata *et al.*, 2006).

Autofagia y estrés de RE están conectados a múltiples niveles. Varios elementos son los que posibilitan la respuesta autofágica ante estrés de RE. La fosforilación de Eif2a mediada por PERK y la expresión de Atg12 es necesaria para la inducción de autofagia mediada por agregados de poli-glutamina (Kouroku *et al.*, 2007). Mientras que la activación de IRE1-JNK lo es para la autofagia inducida por agentes como tunicamicina y thapsigargina (Ogata *et al.*, 2006). Otros mecanismos también han sido demostrados, el estrés de RE causa resistencia a la acción de la insulina a través de JNK (Ozcan *et al.*, 2004), reduciendo la activación de la ruta PI3K/Akt/mTORC1, lo cual aumenta la autofagia (Qin *et al.*, 2010). Otro mecanismo regulador de la ruta Akt/mTORC1 dependiente de estrés de RE es la inducción del coactivador transcripcional p8 y de su diana TRB3 (*tribbles homolog 3*), observado tras estimulación de glioma humano con Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC). Esta acción es dependiente de la activación de Eif2a por THC, y la modulación negativa de Akt/mTORC1 por TRB3 (Du *et al.*, 2003; Salazar *et al.*, 2009).

Aunque bajo estrés de RE la traducción proteica es drásticamente reducida, algunos mensajeros como el de ATF4 son selectivamente traducidos. ATF4 a su vez actúa aumentando la expresión de LC3, componente esencial del autofagosoma (Milani *et al.*, 2009). Un aumento de Ca^{2+} intracelular procedente del RE dañado, también puede mediar un aumento de autofagia mediante la activación de CaMKK/AMPK e inhibición de mTORC1 (Høyer-Hansen *et al.*, 2007). Además la depleción de Ca^{2+} del retículo endoplasmático activa a la proteína quinasa C tipo theta (PKC θ), e induce autofagia. PKC θ solo es necesaria para la inducción de autofagia mediada por estrés de RE y no otros estímulos inductores de autofagia (Sakaki *et al.*, 2008).

Las consecuencias biológicas de la inducción de autofagia por estrés de RE parecen indicar que es una respuesta esencial para la recuperación de la homeostasis y la supervivencia. La respuesta ante estrés de RE está desencadenada por la presencia de proteínas mal plegadas, las cuales deben ser dispuestas convenientemente. Además la autofagia puede jugar un importante papel mediante la degradación del RE dañado (Bernales *et al.*, 2007). Sin embargo, el desenlace final de la autofagia inducida por estrés de RE también puede ser la muerte autofágica (revisado en Verfaillie *et al.*, 2010). La ejecución de muerte o supervivencia por autofagia puede depender de tipo celular, así como de la naturaleza e intensidad del estímulo inductor.

1.3.4.3 Autofagia selectiva de mitocondrias

La autofagia puede degradar orgánulos de manera selectiva con el fin de mantener un control de calidad y regular su número. Las mitocondrias tienen una vida media aproximada de 1-3 semanas, dependiendo del tejido (Menzies y Gold, 1971), por lo que debe haber mecanismos que regulen el remplazo mitocondrial. La degradación de mitocondrias está mediada por autofagia selectiva, denominada mitofagia. Aunque este proceso había sido observado, el comienzo de su caracterización molecular en mamíferos como un proceso selectivo es muy reciente. Los glóbulos rojos maduros carecen de mitocondrias, durante su maduración se observó como las mitocondrias son eliminadas de forma selectiva por mitofagia, de forma dependiente de NIX (*NIP3-like protein X*), también conocida como Bnip3l (Sandoval *et al.*, 2008). NIX presenta un dominio de interacción con LC3, lo que permite el englobamiento de mitocondrias marcadas con NIX en autofagosomas (Novak *et al.*, 2010).

Dado lo reciente de la caracterización de este proceso, se conocen pocas moléculas implicadas en mitofagia. Mitocondrias dañadas o que han perdido su potencial mitocondrial son capaces de interactuar con PINK1, la cual recluta a una ubiquitin-ligasa, Parkin, que media la ubiquitinización de proteínas mitocondriales (Vives-Bauza *et al.*, 2010). Para el reconocimiento de estas proteínas ubiquitinadas es necesario el papel de moléculas adaptadoras como p62/SQSTM1, la cual interactúa con LC3 (Geisler *et al.*, 2010). Mitocondrias “sanas”, son capaces de importar PINK1 y degradarlo por la proteasa PARL (*presenilin-associated rhomboid-like protein*), de una forma dependiente de $\Delta\Psi_m$, y de esta forma las mitocondrias activas inhiben su mitofagia (Jin *et al.*, 2010). NIX también contribuye a la autofagia de mitocondrias despolarizadas, además la estimulación experimental con agentes despolarizantes de mitocondrias produce la inhibición de mTORC1 (Ding *et al.*, 2010). AMPK y ULK1 también participan en mitofagia, MEF *Ulk1*^{-/-} o *Ampka1;Ampka2*^{-/-}, presentan una mayor masa mitocondrial. Muchas de sus mitocondrias tienen una morfología deforme (Egan *et al.*, 2011). En las primeras fases de la mitofagia, las mitocondrias colocalizan con estructuras conteniendo a ULK1 y Atg9 (Itakura *et al.*, 2012).

Las mitocondrias son orgánulos altamente dinámicos y su morfología se encuentra regulada por procesos de fisión y fusión mitocondrial. Para la autofagia de mitocondrias es preciso que estas sean fisionadas (Cho *et al.*, 2001a; Twig *et al.*, 2008). El mecanismo de fusión mitocondrial también puede permitir la recuperación de $\Delta\Psi_m$ a mitocondrias que previamente se encontraban despolarizadas, protegiendo de la apoptosis mediada por liberación de proteínas

mitocondriales al citosol. En célula β , el estrés causado por ácidos grasos o niveles altos de glucosa generan una deficiente fusión mitocondrial, y en esta situación manipulaciones que favorecen fusión son capaces de prevenir apoptosis de célula β (Molina *et al.*, 2009).

Aunque aún no existen demasiadas evidencias, se hipotetiza que la mitofagia puede ser importante para proteger a las células de mitocondrias dañadas que pueden sufrir permeabilización de membrana mitocondrial y desencadenar apoptosis (Green *et al.*, 2011). Por otro lado, el papel específico de mTORC1 sobre mitofagia es prácticamente desconocido.

1.3.4.4 Autofagia y célula β

Modelos animales con una autofagia deficiente en célula β han puesto de manifiesto la esencialidad de este proceso para un correcto funcionamiento de la masa de célula β y la homeostasis metabólica (Ebato *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2008). En ambos modelos, la delección selectiva de *Atg7* en célula β produce una disminución de la masa de célula β . El fenotipo diabético de estos animales se agrava cuando son enfrentados a una dieta hipercalórica (Ebato *et al.*, 2008), lo cual pone de manifiesto la relación entre progresión a diabetes tipo 2 y autofagia en célula β .

Otros estudios también demuestran el papel protector de la autofagia en célula β frente a la apoptosis inducida por oligomerización del polipéptido amiloide de islote (IAPP) Rivera *et al.*, 2010; al igual que frente a estímulos *in vitro* de alta glucosa (Han *et al.*, 2010), o de ácidos grasos insaturados (Choi *et al.*, 2009). El papel de la autofagia en célula β para el mantenimiento de un número apropiado de gránulos de secreción de insulina (proceso denominado crinofagia), fue observado hace más de 40 años en animales tratados con diazóxido, inhibidor de la secreción de insulina (Creutzfeldt *et al.*, 1969; Hellman *et al.*, 1974). Más recientemente también se ha observado en el modelo deficiente de secreción *Rab3a*^{-/-} (Marsh *et al.*, 2007). En este modelo, a pesar de presentar un defecto de secreción, la síntesis de insulina se mantiene constante, y hay un marcado aumento de la degradación autofágica de los gránulos de insulina. Esto sugiere que la autofagia puede jugar un papel protector en para la célula β cuando hay un fallo o desconexión entre las señales que llevan a la secreción de insulina y su síntesis.

Por otro lado, existen indicios de que la estimulación de autofagia en ciertas condiciones puede llegar a ser deletérea para célula β . En el caso de islotes sanos tratados con rapamicina, fue observado como la autofagia jugaba un papel negativo sobre la función secretora del islote, de manera directamente dependiente de la mayor inducción de autofagia (Tanemura *et al.*, 2012). Además, en ciertas condiciones se ha observado como la inhibición de autofagia puede proteger a célula β , este es el caso de animales *Pdx1*^{+/-}, cuyas masa de célula β es muy proclive a disminuir por apoptosis. La interferencia de *Pdx1* en MIN6 también causa una progresiva muerte celular, pero la inhibición de autofagia la retrasa (Fujimoto *et al.*, 2009).

1.3.5 Otras teorías sobre el fracaso de la célula β

1.3.5.1 Efecto gluco-lipotóxico

La glucotoxicidad puede definirse como el daño causado por exposición crónica a concentraciones suprafsiológicas de glucosa, que en islotes puede llevar a una disminución de función y apoptosis. Dependiendo de la especie estudiada, el efecto “glucotóxico” es diferente, mientras que islotes humanos o de *Psammomys obesus* (gerbo del desierto) son muy sensibles a concentraciones de glucosa por encima de 5.6 mM (Leibowitz *et al.*, 2001; Maedler *et al.*, 2001); islotes murinos son más resistentes o incluso están protegidos por concentraciones de glucosa más elevadas (Hoorens *et al.*, 1996). La glucosa en célula β puede ejercer su potencial efecto negativo a través de diferentes mecanismos (revisado en Robertson, 2004).

La mayoría de evidencias sobre el efecto tóxico de la glucosa sobre célula β son derivadas de experimentos *in vitro* con líneas celulares o *ex vivo* con islotes. Sin embargo, su importancia *in vivo* puede ponerse en entredicho, ya que fuera de toda duda, la hiperglucemia es causa directa del fracaso de la masa de célula β , y no al contrario. La posibilidad de que la propia hiperglucemia pudiese acelerar la muerte de las células β remanentes en animales diabéticos no ha sido tratada convenientemente, sin embargo hay evidencias que indican que podría ser todo lo contrario, como demuestran los resultados de animales tras inducción de diabetes por estreptozotocina. Estos animales presentan células β hiperproliferativas de manera dependiente de hiperglucemia (Pechhold *et al.*, 2009).

Respecto a la lipotoxicidad en célula β , evidencias *in vivo* indican que los lípidos pueden ser benignos en célula β , salvo en el caso de elevaciones dramáticas *in vitro* las cuales resultan razonablemente tóxicas. La elevación de ácidos grasos libres en ratas obesas Zucker es una señal que permite la adaptación de masa de célula β en condiciones de resistencia a la insulina (Nolan *et al.*, 2006). Sin embargo, los efectos tóxicos de los ácidos grasos aparecen en el contexto de hiperglicemia, causando lo que se conoce como “glucolipototoxicidad”. En esta situación, la elevada glucosa inhibe AMPK y ACC se encontraría activada, lo que se traduce en aumento de malonil-CoA, inhibición de la carnitina-palmitoil-transferasa e impedimento el metabolismo mitocondrial de ácidos grasos. En estas condiciones, en las que los mecanismos de detoxificación de ácidos grasos se encuentran disminuidos, y en las que además se generan lípidos complejos los cuales son tóxicos, se puede hablar de glucolipototoxicidad en célula β . De nuevo habría que considerar que la normoglucemia se mantiene hasta el “fracaso primario” de la célula β . Hay autores que hablan de un “fracaso secundario” causado por glucolipototoxicidad (revisado en Poitout y Robertson, 2002).

Varios autores coinciden en que parte del papel nocivo de glucosa y ácidos grasos puede estar causado por aumento de estrés de RE. Estudios *in vitro* demuestran como concentraciones altas de glucosa de manera crónica aumentan la de síntesis de proinsulina por parte del RE en un principio. Pero finalmente se produce estrés de RE y disminución de síntesis de proinsulina (Lipson *et al.*, 2006). Los efectos de ácidos grasos sobre el RE, de forma específica en célula β , se mencionan en la sección 1.3.3.3.

1.3.5.2 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

Las células β pancreáticas son muy sensibles a la muerte mediada por estrés oxidativo, esto es en parte debido a la baja expresión en célula β de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa (Lenzen *et al.*, 1996). Especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas en mayor medida en islotes de pacientes diabéticos en comparación con sujetos no diabéticos (Sakuraba *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2004).

Aunque la generación de ROS se produce en múltiples localizaciones, la fuente mayoritaria es la mitocondria. El flujo de electrones a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial genera pequeñas cantidades de anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), principalmente a través de los complejos I y III. A su vez pueden generarse otros radicales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el altamente reactivo radical hidroxilo ($HO\bullet$). Estas especies, si no son detoxificadas, ejercen su toxicidad a través de daño a nivel de ADN, lípidos y proteínas (revisado en Balaban *et al.*, 2005). Siendo la mitocondria la principal fuente de ROS, es de suponer que también es el compartimento más proclive a ser dañado por ROS, de lo que se deduce la importancia de su correcto reemplazo (ver sección 1.3.4.3: mitofagia).

La generación aguda de ROS en mitocondrias puede producir oxidación de fosfolípidos mitocondriales (principalmente cardiolipina), pérdida de potencial mitocondrial, y liberación de citocromo *c*. Este proceso es observado en islotes y líneas de célula β (Zhao *et al.*, 2010b). Además ROS son capaces de aumentar la expresión de la proteína desacoplante 2 (UCP2) Ehtay *et al.*, 2002; lo cual disipa el gradiente de protones que permite la síntesis de ATP, disminuyendo la función secretora célula β (Zhang *et al.*, 2001). El aumento de UCP2 es encontrado comúnmente en célula β durante progresión a la diabetes, y es otra explicación más a la progresiva pérdida de función de célula β (De Souza *et al.*, 2007).

El animal *Atg7^{-/-}* de forma específica en músculo o célula β demuestra como la autofagia defectiva se traduce en disfunción mitocondrial (Wu *et al.*, 2009), y en el caso de célula β causa un progresivo deterioro de la función de célula β y diabetes. En este trabajo se observa como las anormalidades mitocondriales ocurren desde edad temprana, cuando aún la patología no es evidente, lo cual pone en evidencia el papel primordial de la disfunción mitocondrial y su relación con autofagia defectuosa en el fracaso de la masa de célula β y progresión a diabetes tipo 2.

2.

Hipótesis y objetivos

La diabetes tipo 2 es una enfermedad metabólica de manifestación principalmente cardiovascular. Esta enfermedad está muy ligada a la obesidad, razón por la cual en los países desarrollados su prevalencia ha aumentado sin freno durante las últimas décadas, y las estimaciones prevén que siga creciendo. La enfermedad está caracterizada por un desarrollo lento, en el que el evento inicial es la resistencia a la insulina. Esta resistencia es compensada gracias a un aumento de la masa de célula β pancreáticas y de la insulina producida por estas. Sólo cuando las células β fracasan, se manifiesta la hiperglucemia y las complicaciones cardiovasculares por las que se caracteriza la diabetes. El fin de esta tesis es contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan tanto el aumento de la masa de célula β como las razones y procesos responsables de su fracaso.

1ª parte

La masa de célula β es el principal sensor del estado energético del organismo, mediante una fina regulación de la secreción de insulina permite alcanzar la homeostasis metabólica. Tanto glucosa como insulina son importantes factores que modulan la función de célula β (Withers *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 2000; Briaud *et al.*, 2003; Ueki *et al.*, 2006; Terauchi *et al.*, 2007). Estos factores pueden actuar de forma independiente, según fue demostrado en un trabajo previo del grupo (Guillen *et al.*, 2006).

Señales provenientes tanto de factores de crecimiento como de estatus energético son capaces de regular la actividad de mTORC1 a través de TSC2 (Inoki *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002; Inoki *et al.*, 2003a; 2003b). Siendo mTORC1 un importante regulador de la masa de célula β (Pende *et al.*, 2000; Rachdi *et al.*, 2008; Shigeyama *et al.*, 2008; Hamada *et al.*, 2009; Mori *et al.*, 2009b).

Objetivos

Utilizando líneas de célula β pancreática y la expresión de las diferentes isoformas del IR:

1. Estudiar como las señales provenientes de factores de crecimiento y estatus energético modulan la señalización mTORC1, profundizando en el papel integrador de TSC2 en célula β pancreática.
2. Estudio del papel diferencial de las isoformas del receptor de insulina (IR_A e IR_B), y como estas afectan a la señalización de mTORC1 y la proliferación de célula β pancreática.

2ª parte

En la progresión a diabetes tipo 2 hay una progresiva pérdida de función de la masa de célula β , causada por dos factores, la secreción de insulina defectuosa y la muerte apoptótica de la masa de célula β (Pick *et al.*, 1998; UKPDS, 1998; Kahn, 2001; Butler *et al.*, 2003). Además, la mayor demanda biosintética de insulina debido a la resistencia a insulina sistémica causa estrés de RE en célula β (Lipson *et al.*, 2006). La acumulación de proteínas mal plegadas en citoplasma es causa conocida de estrés de RE en célula β (Oyadomari *et al.*, 2002). Por lo tanto nos planteamos la posibilidad de que la propia secreción de insulina deficiente fuera causa de estrés de RE, pudiendo contribuir a la muerte acelerada de la célula β pancreática.

Objetivos

Utilizando líneas de célula β de origen fetal, con secreción de insulina deficiente, y líneas derivadas de insulinoma, como control:

3. Estudiar el estrés de RE y autofagia en condiciones de secreción de insulina deficiente por parte de las células β pancreáticas. Profundizar en el papel de mTORC1 como regulador crítico de autofagia y síntesis de proteínas, con el fin de resolver la siguiente cuestión: ¿Juega la autofagia un efecto protector sobre célula β en estas circunstancias?.

3ª parte

La hiperactivación de mTORC1 es usualmente encontrada en progresión a la diabetes tipo 2, de forma específica en célula β (Um *et al.*, 2004; Shigeyama *et al.*, 2008). Esta hiperactivación es esencial para un aumento de la masa de célula β en condiciones de resistencia a la insulina. Pero por otro lado, la hiperactividad crónica de mTORC1 es causa de estrés de RE (Ozcan *et al.*, 2008). Además la autofagia es un proceso directamente bajo control de mTORC1 (Noda y Ohsumi, 1998; Ravikumar *et al.*, 2004), por lo que cabe la posibilidad de que se encuentre regulada negativamente de forma crónica. Previamente se ha demostrado el papel protector de la autofagia frente a estrés de RE (Bartolomé *et al.*, 2012).

Objetivos

Trabajando con el modelo animal $\beta Tsc2^{-/-}$, además de con líneas celulares con hiperactivación de mTORC1 (MEF $Tsc2^{-/-}$, MIN6 $Tsc2$ -shRNA, INS-1E $Tsc2$ -shRNA):

4. Estudio de las consecuencias de la hiperactivación de mTORC1 por delección de TSC2 de forma específica en célula β ($\beta Tsc2^{-/-}$), centrándose en procesos como autofagia y estrés de RE.
5. Investigar la posible implicación de la hiperactivación crónica de mTORC1 en el fracaso de la masa de célula β .

3.

**Material y
métodos**

3.1 Animales

3.1.1 Trabajo con modelos animales

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron diferentes modelos animales. Con el fin de generar líneas de célula β pancreática sin receptor de insulina (IR) para trabajo *in vitro*, se usaron ratones C57Bl/6 con el exón 4 del IR flanqueado por secuencias *loxP* ($IR^{loxP/loxP}$), los cuales fueron creados por recombinación homóloga de la manera previamente descrita (Brüning *et al.*, 1998).

Por otro lado se trabajó *in vivo* con un modelo con delección de *Tsc2* específicamente en célula β ($\beta Tsc2^{-/-}$) Shigeyama *et al.*, 2008. Este modelo fue generado por el sistema Cre-lox, derivado del bacteriófago P1 (Sauer y Henderson, 1988), y que permite la circularización y escisión del genoma de la secuencia flanqueada por secuencias *loxP*, de manera tejido-específica al expresar la *Cre* recombinasa bajo promotores específicos (Gu *et al.*, 1994). El modelo $\beta Tsc2^{-/-}$ proviene del cruce de animales C57Bl/6J que expresaron *Cre* recombinasa bajo el promotor de la insulina (*Ins-Cre*) Herrera, 2000; y los generados por recombinación homóloga para introducir secuencias *loxP* flanqueando los exones 3-4 del gen *Tsc2* ($Tsc2^{loxP/loxP}$), según lo descrito previamente (Shigeyama *et al.*, 2008). Los animales $Tsc2^{loxP/loxP}$, no presentaron alteraciones en el metabolismo de la glucosa o función de célula β respecto a animales *wild-type*, por lo que fueron usados como control.

Solo ratones macho han sido usado para los estudios. Los animales fueron mantenidos en ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, con alimento y agua *ad libitum* desde el destete (3 semanas). Todo el trabajo se realizó según las normas del Comité de Experimentación Animal de Universidad Complutense de Madrid, o el Animal Ethics Committee of Kobe University Graduate School of Medicine (Kobe, Japón).

3.1.2 Cría y genotipaje de animales

3.1.2.1 Mantenimiento del modelo $\beta Tsc2^{-/-}$

El alelo *Ins-Cre* fue mantenido en heterocigosis (*Ins-Cre*^{+/−}) en hembras (*Ins-Cre*^{+/−}; $Tsc2^{loxP/loxP}$). Los alelos de *Tsc2* con exones 3-4 flanqueados con secuencias *loxP* fueron mantenidos siempre en homocigosis ($Tsc2^{loxP/loxP}$). Para la obtención del modelo $\beta Tsc2^{-/-}$ fueron cruzados machos ($Tsc2^{loxP/loxP}$) con hembras (*Ins-Cre*^{+/−}; $Tsc2^{loxP/loxP}$), obteniéndose un 50% de machos control $Tsc2^{loxP/loxP}$ y un 50% de machos $\beta Tsc2^{-/-}$ según las leyes mendelianas.

3.1.2.2 Obtención de ADN de cola de ratón

Las colas se incubaron en 300 µl de un tampón compuesto por [Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, SDS 0.5% (p/v), pH 7.4] y 20 mg/ml proteinasa K (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.), durante toda la noche a 55°C. Al día siguiente se extrajo el ADN con 300 µl de una mezcla de fenol, cloroformo e isoamilalcohol (25:24:1), y tras vórtex intenso seguido de centrifugación (4°C, 10 min, 15,000 × g), se recogió la fracción superior. El ADN fue precipitado por adición de 500 µl de etanol absoluto y centrifugación en dos pasos (5 min, 15,000 × g, 4°C). El precipitado se dejó secar durante 5 min, y siguiómente fue resuspendido en 300 µl de ddH₂O y calentado durante 3 min a 95°C.

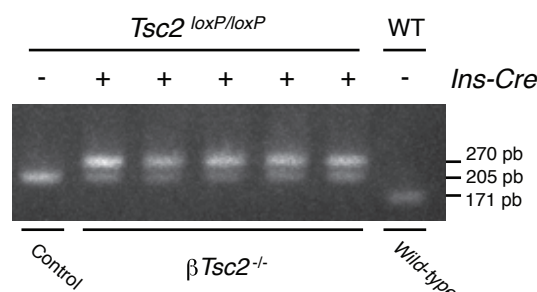
3.1.2.3 Genotipaje

El genotipaje de los animales fue realizado por PCR (ver sección 3.4.2.3) con 1 µl de la solución anterior (Figura 3.1). Los primers y condiciones de PCR quedan recogidos en la Tabla 3.1.

Gen	Secuencia	Producto	Condiciones (Tm y ciclos)
<i>Tsc2</i> (ex. 3-4)	S: 5'-GGTGTGGAAGCTGAGCAGAT-3'	WT: 171 pb	57°C, 35 ciclos
	AS: 5'-CAGCCTTGCTGTATCTATG-3'	<i>loxP</i> : 205 pb	
<i>Ins-Cre</i>	S: 5'-CCTGTTTTGCACGTTACCG-3'	270 pb	57°C, 35 ciclos
	AS: 5'-ATGCTTCTGTCCGTTTGCCG-3'		
<i>IR</i> (ex. 4)	S: 5'-CCTAAGGTCTGCCAAATC-3'	WT: 270 pb	57°C, 30 ciclos
	AS: 5'-TTAAAGCAATCCTCCTGCCTCAGCCT-3'	<i>loxP</i> : 304 pb	

Figura 3.1. Genotipaje del modelo β*Tsc2*^{-/-}.

Ejemplo de resultado del genotipaje de ratones control (*Tsc2*^{loxP/loxP}), β*Tsc2*^{-/-} y *wild-type*. La PCR de *Ins-Cre* (270 pb) y *Tsc2-loxP* (205 pb, positivo; 171 pb, negativo) se realizó siempre al mismo tiempo, utilizando los 4 primers correspondientes en la mezcla de reacción. De este modo el resultado de la PCR de *Tsc2-loxP* fue utilizado además como control interno del funcionamiento de la PCR, permitiendo descartar posibles falsos negativos en la PCR de *Ins-Cre*.



3.1.3 Aislamiento de islotes mediante canulación de colédoco

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y desinfectados con etanol 70% (v/v). Se abrió el abdomen mediante incisión en forma de "V" desde el abdomen inferior extendiéndose hacia las porciones laterales del diafragma, con objeto de exponer todos los órganos de la cavidad peritoneal. El animal fue exanguinado y se colocó bajo una lupa MS5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) de manera que la cabeza quedase más cerca del investigador y la cola apuntase hacia fuera. Se fijaron unas pinzas para bloquear la sección del duodeno donde desemboca el colédoco (ampolla de Vater), con el fin de impedir la salida de colagenasa al intestino. Utilizando una aguja de calibre 27-G, se perfundieron a través del colédoco alrededor a de 5-7 ml de HBSS (*Hanks's balanced salt solution*: NaCl

137 mM, KCl 5.4 mM, Na_2HPO_4 0.25 mM, KH_2PO_4 0.44 mM, CaCl_2 1.3 mM, MgSO_4 1 mM, NaHCO_3 4.2 mM, D-glucosa 1 g/l, rojo fenol 10 mg/l, pH 7.3) suplementado con colagenasa P (1.5 mg/ml) Roche, Basilea, Suiza. La inyección se practicó según se refleja en el esquema de la [Figura 3.2](#)

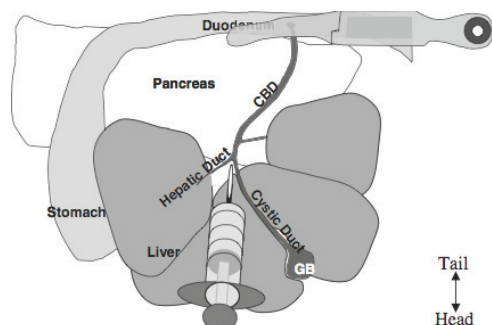


Figura 3.2. Inyección de la solución de colagenasa para aislamiento de islotes.

El colédoco fue canulado desde la unión en forma de "Y" del conducto cístico de la vesícula biliar, y el conducto hepático izquierdo. La solución fue inyectada muy lentamente desde esta posición para llegar a todo el páncreas. En caso de romperse el colédoco, o no llegar bien a la cola del páncreas, se inyectaron pequeñas gotas directamente en los lóbulos pancreáticos. Esquema de Carter *et al.*, 2009.

Una vez el páncreas se ha inflado completamente de cabeza a cola, se extrae separándolo completamente del intestino, la curvatura del estómago y finalmente del bazo. El páncreas inflado se sitúa en un tubo cónico de 50 ml (2-3 páncreas a la vez como máximo), y es digerido por agitación intensa en baño a 37°C durante 18-20 min (más agitación manual ocasional). Los tubos son situados en hielo y la solución fue diluida con HBSS frío para parar la acción de la colagenasa. El producto de digestión fue lavado 3 veces con HBSS y centrifugación para eliminar el sobrenadante (2 min, $290 \times g$, 4°C). Tras los lavados, el producto es pasado a través de un filtro de té que hace de tamiz, centrifugado de nuevo y suspendido en 10 ml de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.), que fue cubierto lentamente con 10 ml de HBSS, y centrifugado (20 min, $1,200 \times g$, 4°C). La densidad específica de los islotes hace que queden en la interfase entre la solución de Histopaque y HBSS, mientras que la mayor parte del páncreas exocrino queda sedimentado y se descarta. El sobrenadante es lavado 3 veces con HBSS suplementado con 2% NCS (*normal calf serum*) y centrifugación (2 min, $290 \times g$, 4°C). Los islotes en HBSS 2% NCS fueron pescados 2 veces de una placa de 60 mm con el fin de dejarlos lo más limpio posible de restos de páncreas exocrino, y depositados sobre hielo. El cultivo de islotes *ex vivo* se realizó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS (suero bovino fetal) y antibióticos.

3.1.4 Establecimiento una línea de célula β a partir de animales *IR^{loxP/loxP}*

Las líneas de célula β fetales fueron establecidas según el método previamente descrito por el grupo (Guillen *et al.*, 2006). Ratones *IR^{loxP/loxP}* gestantes (día 17) fueron sacrificados por dislocación cervical. De los fetos fue obtenido el tejido pancreático bajo lupa, y los páncreas troceados con tijeras y mantenidos en HBSS frío (100 μl por páncreas). Posteriormente fueron digeridos con colagenasa P (0.28 mg/páncreas) en un volumen final de 200 μl /páncreas, durante 10 min a 37°C. Tras la digestión fueron realizados 3 lavados de 5 min con HBSS para después pescar manualmente los islotes bajo lupa. Los islotes obtenidos se incubaron en RPMI 1640 suplementado con 20% FBS en placas *multiwell* de 6 pocillos. Fueron

mantenidos 72 h para dejar que los islotes se recuperasen del proceso de digestión y quedaran adheridos a las placas sobre una capa de fibroblastos.

Seguidamente, se procedió a la inmortalización por el método previamente descrito en otras líneas (Benito *et al.*, 1993). Para ello se llevó a cabo la infección con partículas virales codificando para el brazo largo del antígeno T (LTA_g) de SV40 (DeCaprio *et al.*, 1988) ver sección 3.3.5.1; obtenidas mediante transfección de células empaquetadoras Phoenix con el plásmido pBABE-puro-LTA_g (forma K1 mutante, E107K) Gjoerup *et al.*, 2000; amablemente cedido por el Dr. J. de Caprio (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, EE.UU.). Tras 72 h de infección, los islotes fueron cuidadosamente recogidos y replaqueados. Se procedió a la selección con puromicina 1 µg/ml durante 3 semanas, las células inmortalizadas fueron subclonadas para la obtención de células β (entre otras poblaciones del islote o fibroblastos y otras células contaminantes del cultivo primario) y ensayadas frente a marcadores de célula β (insulina, IAPP) **Figura 3.3.**

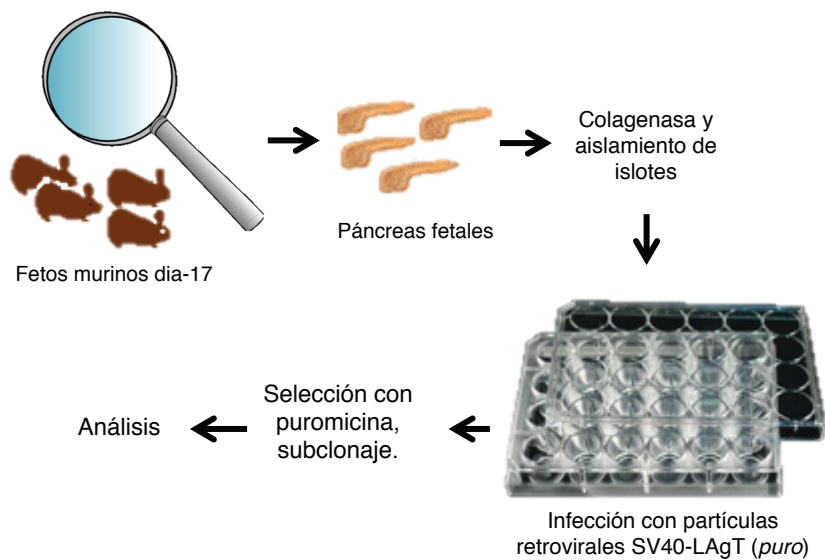


Figura 3.3. Esquema que ilustra el procedimiento de obtención de células β fetales. El uso de la forma K1 mutante del LTA_g (E107K) fue importante a la hora de generar las líneas celulares, ya que la forma salvaje es capaz de estimular de manera basal la ruta PI3K-Akt (Yu y Alwine, 2008).

3.2 Cultivos celulares

3.2.1 Líneas celulares y medios de cultivo

Todos los medios de cultivo y suplementos fueron obtenidos de Life Technologies, salvo excepciones indicadas. Todos los medios fueron suplementados con antibióticos: penicilina G (12 $\mu\text{g/ml}$), estreptomina (10 $\mu\text{g/ml}$), anfotericina B (0.25 $\mu\text{g/ml}$) y MycoZap (Lonza, Basilea, Suiza).

Las células β fetales fueron cultivadas en DMEM glucosa 1 g/l suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% y HEPES 20 mM (pH 7.4). Se usaron dos líneas celulares provenientes de insulinomas. INS-1E, originadas en rata, fueron proporcionadas por P. Maechler (Université de Genève, Ginebra, Suiza) Merglen *et al.*, 2004; y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS 10%, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 50 μM , glutamina 2 mM y HEPES 10 mM. Por otro lado, se usó la línea MIN6 originaria de insulinoma murino (Miyazaki *et al.*, 1990), cultivada en DMEM (4.5 g/l), suplementado con FBS 15% y 2-mercaptoetanol 50 μM . El cultivo de islotes primarios para experimentos *ex vivo* fue realizado en RPMI 1640 suplementado con FBS 10%.

Aparte de líneas derivadas de célula β fueron usadas las líneas Phoenix y HEK293T para producción de partículas virales, y fibroblastos embrionarios murinos (MEF), todas ellas cultivadas en DMEM (4.5 g/l) suplementado con FBS 10%. Los MEF *Tsc1*^{-/-} y *Tsc2*^{-/-} así como sus controles fueron generosamente proporcionados por D. Kwiatkowski (Harvard Medical School, Boston, EE.UU.).

3.2.2 Condiciones de cultivo, mantenimiento y experimentación

3.2.2.1 Condiciones de cultivo

Las células fueron cultivadas en placas de poliestireno tratado para cultivo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE.UU.) y mantenidas en incubadora a 37°C en una atmósfera controlada con alta humedad y CO₂ al 5%. Las células fueron subcultivadas tras lavado con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, pH 7.4) e incubación con una solución de tripsina 0.25% y EDTA 0,02% en PBS. La tripsina permite levantar a las células adherentes de la placa al digerir proteínas que mantienen a las células unidas entre si y a la placa, la digestión es parada mediante adición de medio completo con suero. El subcultivo se realizó una o dos veces a la semana dependiendo de la línea celular.

3.2.2.2 Congelación, criopreservación y descongelación de líneas celulares

Para congelar una línea celular las células fueron tripsinizadas y una vez parada la reacción se centrifugaron (3 min, $110 \times g$), para ser resuspendidas en FBS suplementado con dimetilsulfóxido 10% (v/v), e introducidas en criotubos debidamente etiquetados (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.). El proceso de congelación fue llevado a cabo enfriando desde t.a. hasta -80°C a un ritmo de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Para ello los criotubos se colocaron sobre un soporte de polietileno bañado por isopropanol (Mr. Frosty, Thermo Scientific) que fue introducido en un congelador a -80°C . Las células así congeladas pudieron mantenerse a -80°C durante meses. Para periodos más largos los criotubos fueron llevados a un tanque de nitrógeno líquido (-190°C).

La descongelación fue realizada de forma rápida, pasando los viales directamente de -80°C o nitrógeno líquido a un baño a 37°C , con agitación manual. Una vez descongeladas, las células fueron sembradas en placas de cultivo con medio completo.

3.2.2.3 Condiciones de experimentación

Por lo general, las células fueron sembradas el día anterior al comienzo del experimento. Las deprivaciones de suero y glucosa previas a estímulos con insulina y glucosa, fueron realizadas durante 3 h en medio sin glucosa y sin suero con BSA 0.1% (p/v), en estos experimentos los inhibidores fueron añadidos 30 min antes del estímulo con insulina. Los estímulos con agentes que producen estrés de RE e inhibidores/inductores de autofagia fueron realizados en medio completo, salvo indicación.

3.2.2.4 *Mycoplasma*

La contaminación de cultivos celulares con micoplasmas sigue siendo uno de los mayores problemas encontrados en investigación biológica. Esta contaminación puede producir grandes cambios en los cultivos que infecta y muchas veces no es detectable a simple vista (Russell *et al.*, 1975). Por ello, todas las líneas fueron ensayadas para presencia de micoplasma tras su descongelación, y de forma rutinaria 1-2 veces al mes, mediante dos técnicas diferentes.

Por un lado se realizó un ensayo citoquímico, las diferentes líneas celulares en marcha fueron sembradas en placas de 12 pocillos y 2 días más tarde lavadas con una solución de DAPI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4',6'-diamidino-2-fenilindol) en metanol e incubadas con esta misma solución 15 min a 37°C . Seguidamente fueron lavadas una vez con metanol y cubiertas con PBS para la observación directa en un microscopio invertido de fluorescencia. DAPI se une selectivamente al ADN, dando lugar a núcleos altamente marcados y citoplasma no detectable. Los complejos DAPI-ADN tienen absorbancia máxima a 340 nm (excitación con luz UV) y emisión máxima a 488 nm (azul). En el caso de contaminación con micoplasma se observarían focos de fluorescencia característica en el citoplasma y a veces en espacios intercelulares (Figura 3.4).

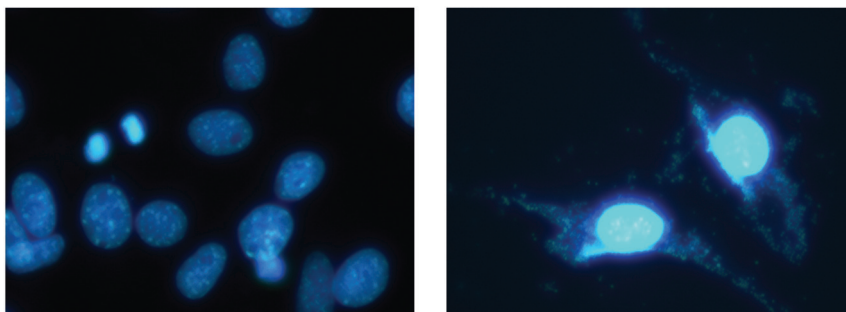


Figura 3.4. Uso de DAPI para detección de micoplasma

Se muestran células limpias (izquierda) en las cuales son solo observables los núcleos, y células contaminadas (derecha) con gran cantidad de focos fluorescentes en citoplasma.

Por otro lado, el sobrenadante de células cultivadas al menos 48 horas fue recogido y analizado por PCR para comprobar la presencia de una secuencia específica de *Mycoplasma sp.*

(S: 5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'; AS: 5'-CGGATAACGCTTGCGACCTATG-3')

3.2.4 Transfección transitoria de células en cultivo

3.2.4.1 Transfección de ARNi

Se utilizaron 3 ARNi (ARN de interferencia) diferentes frente a *Tsc2* murino (Bionova Científica, Madrid). Después de probar con cada uno, una combinación de los 3 oligonucleótidos a partes iguales resultó ser más efectiva en la interferencia de *Tsc2*. Como ARNi control se utilizó un “scrambled”, el cual no es capaz de silenciar la expresión de ningún gen. El ARNi fue introducido mediante electroporación con el Nucleofector II, y la Nucleofector Solution T (Lonza). Se contaron 2×10^6 células para cada transfección individual, se centrifugaron y fueron resuspendidas en 100 μ l de Nucleofector Solution T, junto con 2 μ g de ARNi, pasándose a la cubeta de transfección, donde se realizó según el programa X-001 del Nucleofector II. Tras la transfección, se añadieron 500 μ l de medio completo atemperado, y el volumen se sembró para los experimentos correspondientes: alrededor de 1.6×10^5 células para *western-blot*, y 8×10^4 para citometría de flujo y experimentos de proliferación. Se comprobó la interferencia a las 24 y 48 horas. Este método fue utilizado sólo en la primera parte de la tesis, en adelante se realizó interferencia mediada por shRNA (sección 3.3.5.2).

3.2.4.2 Transfección de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se transfectó por lipofección con Lipofectamina 2000 (Life Technologies) siguiendo métodos estándar. Las células fueron sembradas para obtener alrededor de un 50% de confluencia al día siguiente, para placas de 60 mm se usaron 8 μ g de ADN plasmídico y 20 μ l de Lipofectamina 2000 (Life Technologies), diluidos en Opti-MEM (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. La solución fue aplicada gota a gota sobre las células (en medio sin antibióticos), y se mantuvo durante 15 h. Al día siguiente el medio se reemplazó por medio fresco con antibióticos, y se dejaron 24 h para la expresión del vector.

3.2.4 Delección *in vitro* del *IR* por expresión de *Cre* recombinasa

Las líneas de célula β fetales generadas contienen secuencias *loxP* flanqueando el exón 4 del receptor de insulina. Mediante el sistema Cre-Lox es posible escindir del genoma una región flanqueada por secuencias *loxP* (Figura 3.5).

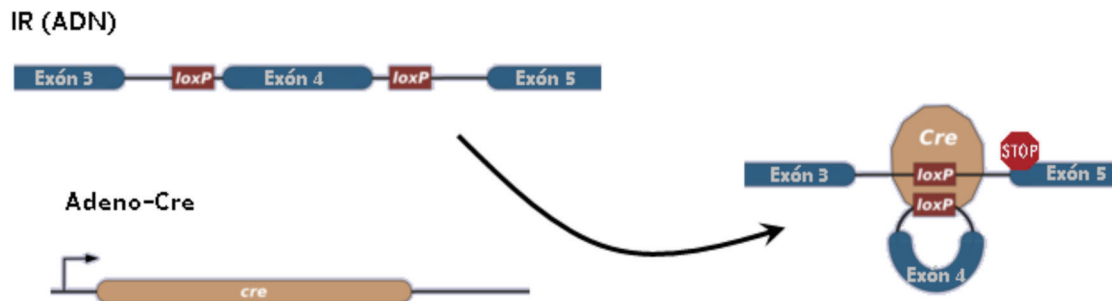


Figura 3.5. La secuencia *loxP* de 34 pb existe naturalmente en el genoma del bacteriófago P1. Consiste en una secuencia asimétrica de 8 pb entre dos secuencias palindrómicas de 13 pb. Esquema de la eliminación del exón 4 del *IR* por el sistema Cre-Lox.

La Cre recombinasa es una proteína tetramérica del bacteriófago P1. Reconoce las secuencias *loxP*, y circulariza la región entre ellas mediante recombinación, eliminando dicha región del genoma. En el caso del *IR^{loxP}*, al escindir el exón 4, en el mensajero queda un codón de parada que detiene la traducción del IR, perdiendo completamente su función. Las células β *IR^{loxP/loxP}* en subconfluencia se infectaron con adenovirus que codifican *Cre* recombinasa. Tras una hora, el sobrenadante con adenovirus fue reemplazado por medio de cultivo, y se aislaron colonias individuales, comprobándose la recombinación por PCR. Las células fueron subclonadas dos veces y se volvieron a infectar con adenovirus para asegurarse de que la escisión fue completa. De esta manera quedó establecida la línea celular *IR^{-/-}*.

3.2.5 Generación de líneas celulares por infección retroviral o lentiviral

Uno de los objetivos por los que resultaba de interés conseguir la línea *IR^{-/-}*, fue la posibilidad del estudio diferencial de las dos isoformas del receptor (*IR_A* e *IR_B*), pues abrió la posibilidad de reconstituir la expresión de una única isoforma generando dos nuevas líneas a partir de las *IR^{-/-}*. Las dos nuevas líneas establecidas se denominaron Rec A y Rec B.

A partir de dos construcciones que conferían resistencia a higromicina, y que codificaban cada uno para una u otra isoforma del receptor de insulina humano (secuencias proporcionadas por C.R. Kahn, Joslin Diabetes Center, Boston, EE.UU.), se obtuvieron partículas retrovirales (ver sección 3.3.5.1).

Las infecciones retrovirales se realizaron con aproximadamente 1 ml de sobrenadante viral enriquecido con polibreno 8 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich) por placa de 60 mm durante 1 hora, completado hasta 5 ml con medio completo sin antibióticos durante las siguientes 72 h. Tras los 3 días de infección, se procedió a la selección con antibiótico durante 3 semanas y subclonaje, que fue realizado por el método de la dilución límite. Las infecciones lentivirales se

realizaron con 50-500 μ l de sobrenadante lentiviral (ver sección 3.3.5.2), en medio completo con 8 μ g/ml de polibreno, durante 15 horas. Procediendo con la selección 24 horas después. La [Tabla 3.2](#) recoge un listado de diferentes líneas estables generadas.

Tabla 3.2. Líneas celulares estables generadas				
<i>Nombre</i>	<i>Inserto</i>	<i>Vector origen</i>	<i>Método</i>	<i>Selección</i>
<i>IR^{+/+}</i> (Célula β fetal)	LAGT	pBABE-LAGT-puro	Retrovirus	Puomicina (1 μ g/ml)
Rec A (Célula β fetal)	IR isoforma A	pBABE-IRA-hygro	Retrovirus	Higromicina (200 μ g/ml)
Rec B (Célula β fetal)	IR isoforma B	pBABE-IRA-hygro	Retrovirus	Higromicina (200 μ g/ml)
MIN6-Tsc2-shARN	Tsc2-shARN	pLKO.1-Tsc2-neo	Lentivirus	Geneticina (750 μ g/ml)
MIN6-Scrambled-shARN	Scr-shARN	pLKO.1-Scr-neo	Lentivirus	Geneticina (750 μ g/ml)
INS-1E-Tsc2-shARN	Tsc2-shARN	pLKO.1-Tsc2-neo	Lentivirus	Geneticina (250 μ g/ml)
INS-1E-Scrambled-shARN	Scr-shARN	pLKO.1-Scr-neo	Lentivirus	Geneticina (250 μ g/ml)
MIN6-Raptor-myc	Raptor	pBABE-Raptor-hygro	Retrovirus	Higromicina (200 μ g/ml)
MEF-Ire1 α -shARN	Ire1 α -shARN	pLKO.1-Ire1 α -puro	Lentivirus	Puomicina (1 μ g/ml)
MEF-Scrambled-shARN	Scr-shARN	pLKO.1-Scr-puro	Lentivirus	Puomicina (1 μ g/ml)
INS-1E-EGFP-LC3B	EGFP-LC3B	pEGFP-LC3B	Lipofección	Geneticina (250 μ g/ml)

3.3 Técnicas de ADN recombinante

3.3.1 Cultivo de bacterias

Para la producción de ADN plasmídico recombinante se utilizaron cultivos de *E.coli* de diferentes cepas (XL1/2-Blue, DH5 α , etc.). Todos los plásmidos amplificados fueron de alto número de copias.

3.3.1.1 Cultivo en placa de agar-LB

Las bacterias fueron crecidas en placas Petri con agar bacteriológico 1.5% (p/v) en medio LB, *Luria Bertoni*: NaCl (10 g/l), triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l). El medio fue autoclavado, y enfriado hasta 55°C para la adición de antibióticos: ampicilina (100 μ g/ml) o kanamicina (50 μ g/ml). Entre 20-25 ml fueron vertidos por placa Petri, sobre la cual, una vez solidificado el medio, se sembraron las bacterias por estrías con un asa de Kolle. Se dejaron crecer no más de 15 h, con el fin de evitar la aparición de colonias satélite en las placas de agar con ampicilina. Se trabajó en condiciones asépticas, en la proximidad de un mechero Bunsen, utilizado para esterilizar el asa de Kolle.

3.3.1.2 Cultivo en LB líquido

Todas las inoculaciones para amplificación de plásmidos provinieron de colonias únicas seleccionadas de placas de agar con antibiótico. Se inocularon primeramente en un volumen de 2-3 ml de LB con antibiótico (*miniprep*), crecidas en incubador a 37°C en tubos de polipropileno no cerrados herméticamente para permitir el intercambio de gases, con agitación vigorosa (~250 rpm) hasta saturación del cultivo (10-15 h). La *miniprep* fue pasada directamente a un volumen de 100-200 ml de LB con antibiótico (*maxiprep*), y cultivado en agitación durante 15 h. De esta manera se obtuvo una masa de bacterias aproximada de 0.3 g/100 ml.

3.3.1.2 Congelación (*glycerol-stock*)

Medio LB conteniendo *E.coli* expresando construcciones de interés fueron mantenidas indefinidamente tras mezclar 500 μ l de medio LB con 500 μ l de una solución estéril de glicerol 50% (v/v). Los *glycerol-stock* fueron crioconservados a -80°C. Para recuperar las construcciones se raspó la superficie del *glycerol-stock* con un asa de Kolle (sin llegar a descongelarlo para ello), y se sembró en placas de agar.

3.3.2 Purificación de plásmidos y transformación de bacterias

Los plásmidos fueron purificados de cultivos bacterianos por el método de la lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Para ello se utilizó el Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante y usando las soluciones incluidas o preparadas en nuestro laboratorio, las cuales quedan recogidas en la **Tabla 3.3**. Los plásmidos fueron resuspendidos en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). La ARNasa A de origen pancreático (Roche) fue preparada a una concentración de 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), NaCl 15 mM, calentada a 100°C durante 15 min (con el fin de inactivar cualquier ADNasa contaminante), enfriada lentamente a t.a., alicuotada y conservada a -20°C.

Tabla 3.3 Tampones para purificación de plásmidos

Nombre	Composición
Tampón de resuspensión (P1)	Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, 100 µg/ml ARNasa A, pH 8.0
Tampón de lisis (P2)	NaOH 200 mM, SDS 1% (p/v)
Tampón de neutralización (P3)	Acetato potásico 3 M, pH 5.5
Tampón de equilibrado (QBT)	NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, isopropanol 15% (v/v), 0.15% Triton X-100 (v/v), pH 7.0
Tampón de lavado (QC)	NaCl 1 M, MOPS 50 mM, isopropanol 15% (v/v), pH 7.0
Tampón de elución (QF)	NaCl 1.25 M, MOPS 50 mM, isopropanol 15% (v/v), pH 8.5

3.3.3.1 Regeneración de las columnas para purificación de plásmidos

Las columnas comerciales con resina de intercambio aniónico (QIAGEN-tip), fueron reutilizadas indefinidamente siguiendo un método previamente descrito (Siddappa *et al.*, 2007). Brevemente, las columnas fueron lavadas con HCl 1 M y conservadas con la solución de lavado hasta su uso. Antes de ser usadas fueron lavadas extensivamente con ddH₂O y equilibradas con tampón QBT. Este método permite la completa fragmentación y elución de cualquier ADN unido a la resina, y posteriormente la regeneración de la resina para su nuevo uso.

3.3.3.2 Transformación de bacterias

Se transformaron *E. coli* cepa XL1-Blue o XL2-Blue ultracompetentes (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.). 25-50 µl de bacterias enriquecidas con 2-mercaptoetanol 25 mM fueron transformadas con 1 µl de ADN (0.1-50 ng), mediante un pulso de calor a 42°C, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron en una placa de LB-agar con antibiótico, y fueron extendidas por toda la placa con un asa de Drigalski.

3.3.4 Clonaje y trabajo con enzimas de restricción

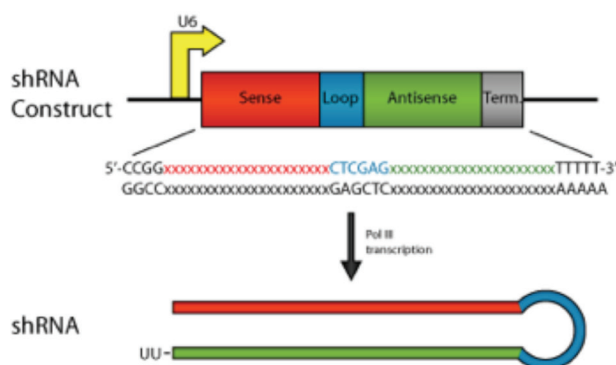
3.3.4.1 Diseño y anillamiento de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados con el fin de que fueran compatibles con el sistema

pLKO.1 (The RNAi Consortium) Moffat *et al.*, 2006; según lo descrito en la [Figura 3.6](#). Las secuencias de ARNi fueron diseñadas con el fin de interferir la expresión de determinados genes de *Mus musculus* (y en ocasiones de *Rattus norvegicus*).

Sentido: 5'-CCGG—ARNi (S)—CTCGAG—ARNi (AS)—TTTTG-3'
 Antisentido: 5' AATTCAAAA—ARNi (AS)—CTCGAG—ARNi (S)-3'

Figura 3.6 Oligonucleótidos para clonaje en pLKO.1.
 Se diseñaron con el fin de obtener extremos “pegajosos” compatibles con los dejados por las enzimas *AgeI* y *EcoRI*. (Esquema de Addgene).



Para el anillamiento de los oligonucleótidos se resuspendieron los oligonucleótidos sentido (S) y antisentido (AS), a concentración final de 2 μ M cada uno en tampón de ligación (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, ditiotretiol 1 mM, pH 7.9), en un volumen final de 50 μ l. La solución se incubó a 95°C durante 4 min, para después colocarla flotando en un baño de agua hirviendo, el cual se dejó enfriar lentamente hasta t.a. El proceso de enfriamiento tardó varias horas, pero fue importante para que los oligonucleótidos quedaran anillados. La lista de oligonucleótidos utilizados queda recogida en la [Tabla 3.4](#).

Tabla 3.4 Oligonucleótidos clonados en el vector pLKO.1

Gen	Secuencia
Atg5	5'-CCGGcctgaaatggcattatccaCTCGAGttggataatgccattcagggTTTTG-3',
	5'-AATTCAAAAccctgaaatggcattatccaCTCGAGttggataatgccattcaggg-3'
Atg7	5'-CCGGcgcagctctgaactcaataataCTCGAGtattattgagttcagagctggTTTTG-3',
	5'-AATTCAAAAaccagctctgaactcaataataCTCGAGtattattgagttcagagctgg-3'
Tsc2	5'-CCGGccccgatatgtgttctcaaCTCGAGttggagaacacatatcgggTTTTG-3',
	5'-AATTCAAAAaccgatatgtgttctcaaCTCGAGttggagaacacatatcggg-3'
Ire1a (Ern1)	5'-CCGGgctcgtgaattgatagagaaaCTCGAGtttctctcaattcacgagctTTTTG-3',
	5'-AATTCAAAAgctcgtgaattgatagagaaaCTCGAGtttctctcaattcacgagc-3'
Raptor	5'-CCGGgccagactctgtgaatgtaatCTCGAGattacattcacagactcgggcTTTTG-3',
	5'-AATTCAAAAgccagactctgtgaatgtaatCTCGAGattacattcacagactcgggc-3'
Scrambled	5'-CCGGcctaaggftaagtcgacctcgCTCGAGcgagggcgacttaacctaggTTTTG-3',
	5'-AATTCAAAAcctaaggftaagtcgacctcgCTCGAGcgagggcgacttaacctagg-3'

Secuencias sentido y antisentido para cada uno de los genes diana, se muestra en minúscula la secuencia específica que codifica para el shARN de interés.

3.3.4.2 Digestión con enzimas

Enzimas de restricción fueron usadas de manera rutinaria para comprobar la correcta identidad de plásmidos amplificados u obtenidos de diversas fuentes. Las enzimas de restricción utilizadas fueron obtenidas de Roche (*EcoRI*, *PstI*, *ScaI*, *XhoI*); Fermentas, Vilna, Lituania (*MluI*, *BamHI*); New England Biolabs, Ipswich, EE.UU. (*AgeI*) y Promega, Fitchburg, EE.UU. (*NotI*).

Al no usar el vector pLKO.1-TRC-*puro* (usado de rutina por el RNAi Consortium y la mayoría de investigadores), para obtener las construcciones en los vectores usados (pLKO.1-*neo* o pLKO.1-*hygro*) fueron diseñadas estrategias de clonaje y *screening* alternativas que son derivadas de la estándar (Addgene, Cambridge, EE.UU.). El vector pLKO.1 fue digerido en dos pasos con *AgeI* y *EcoRI*, siendo purificadas bandas de geles de agarosa. Se realizó un tercer corte “de seguridad”, con *MluI*, al existir un punto de corte entre la región que va de *AgeI* a *EcoRI*, siendo esta región no lo suficientemente grande como para ser descartados los fragmentos lineales no digeridos con la segunda enzima. Este tercer corte redujo el número de colonias con plásmido religado, lo cual facilitó la tarea de encontrar colonias con el inserto esperado.

3.3.4.3 Purificación de bandas de geles de agarosa

Bandas de geles de agarosa al 0.8% con plásmidos linearizados fueron cortadas en un transiluminador UV (alta longitud de onda) y digeridas usando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El ADN fue eluido usando 30 μl de ddH₂O (pH ajustado a 8.0 con NaOH).

3.3.4.4 Ligación y cribado de colonias positivas

2 μl de la solución de oligonucleótidos anillados y 20 ng de plásmido linearizado fueron ligados mediante T4 ligasa con el Rapid DNA Ligation Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de ligación se llevó a cabo durante 4 h a 16°C mantenidos en termociclador. 1 μl de la mezcla final fue usado para transformar bacterias.

Se seleccionaron hasta 10 colonias positivas por construcción, las cuales se amplificaron en *miniprep*, y se guardó un *glycerol-stock* de cada una. Para el cribado a gran escala (hasta 48 colonias simultáneamente) se usó un método sencillo, rápido y de bajo coste (sin necesidad del uso de columnas para purificar plásmidos). Las bacterias obtenidas por *miniprep* se sometieron a lisis alcalina con 100 μl de cada uno de los tampones siguientes (resuspensión, lisis y neutralización), mezclados uno a uno cuidadosamente. La solución fue centrifugada (15 min, 15,000 $\times g$, 4°C) y pasada a un nuevo eppendorf con 900 μl de etanol absoluto, centrifugada de nuevo (15 min, 15,000 $\times g$, 4°C), y el precipitado obtenido lavado con etanol 70% (v/v) y centrifugado (2 min, 15,000 $\times g$, 4°C). El precipitado fue dejado secar 5 min y se resuspendió en 50 μl de ddH₂O. 1 μl de la solución resultante fue incubado con 0,3 μl de *BamHI* y 0,3 μl de *MluI* y el correspondiente tampón (Fermentas) durante 15 min a 37°C. *BamHI* lineariza el plásmido y *MluI* solo corta los plásmidos religados sin el inserto (Figura 3.7).

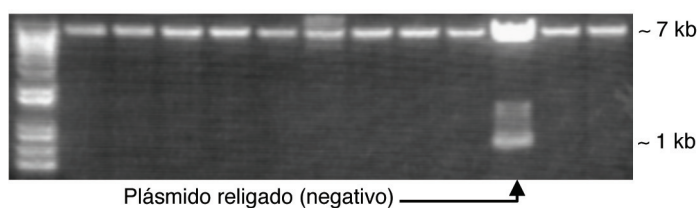


Figura 3.7 Cribado de colonias expresando pLKO.1 con insertos.

De ADN aislado de las diferentes colonias solo se observa una que presenta la secuencia de restricción reconocida por *MluI*, indicativo de que se ha religado y no ha incorporado el inserto.

3.3.4.5 Secuenciación

Los plásmidos obtenidos de diversas fuentes fueron secuenciados rutinariamente para comprobar su integridad y la presencia de mutaciones puntuales específicas (caso de *Rheb-Q64L*). Los plásmidos pLKO.1 con insertos fueron secuenciados para comprobar que habían introducido la secuencia de forma correcta.

Para secuenciación se utilizaron 6 µl/reacción (100 ng ADN/µl) y 2 µl/reacción de *primer* a 5 pmol/µl, en un secuenciador ABI Prism 3730 (Life Technologies). Los *primers* para secuenciación utilizados están recogidos en la [Tabla 3.5](#).

Tabla 3.5 Primers usados para secuenciación	
Primer	Secuencia
LKO.1 5'	5'-GACTATCATATGCTTACCGT-3'
BABE 5'	5'-CTTTATCCAGCCCTCAC-3'
CMV	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

3.3.5 Producción de partículas virales

3.3.5.1 Obtención de partículas retrovirales

Para obtener partículas retrovirales se utilizaron las células empaquetadoras Phoenix (Swift *et al.*, 2001). La línea Phoenix deriva de la HEK293T, expresando establemente los genes de la estructura retroviral en dos construcciones diferentes, *gag-pol* por un lado y *env* por otro, con el fin de minimizar riesgos de recombinación que diesen lugar a retrovirus replicantes competentes. Estas células se usaron junto a construcciones en el vector de expresión pBABE, el cual contiene elementos críticos para su función como vector retroviral (al igual que los contienen los plásmidos para obtener lentivirus, como pLKO.1). Estos son dos *long terminal repeats* (LTR), elementos implicados en la integración de la secuencia viral en el genoma diana; y una secuencia *Psi*, responsable del empaquetamiento del ARN viral en la cápside. Mediante los sistemas retrovirales (incluidos lentivirus), conseguimos integrar en el genoma diana únicamente nuestros genes de interés (gen clonado en vector y gen que confiere resistencia a antibióticos en mamíferos).

Siguiendo las recomendaciones del grupo que generó la línea Phoenix (Dr. Nolan, Stanford University, Stanford, EE.UU.) Las células Phoenix fueron pasadas por higromicina (300 µg/ml) durante una semana, para mejorar la expresión de *gag, env y pol*. Aproximadamente 5×10^6 células fueron sembradas por placa de 100 mm (con medio completo enriquecido con glutamina 2 mM), y transfectadas con las construcciones en pBABE por lipofección según lo previamente descrito. Al día siguiente se cambió el medio por DMEM FBS 10%, glutamina 2 mM, y se recogió el sobrenadante con partículas virales a las 24 h y 48 h siguientes, pasándolo por filtros de 0.45 µm para eliminar cualquier célula que hubiese podido quedar suspendida. Las partículas virales fueron usadas al momento para un mejor rendimiento, o bien conservados a -80°C.

3.3.5.2 Obtención de partículas lentivirales

Las partículas lentivirales fueron producidas según el protocolo del RNAi Consortium y Addgene (Moffat *et al.*, 2006). Para el trabajo con lentivirus se tomaron las medidas de seguridad pertinentes: uso de guantes y ropa de protección en todo momento, los residuos fueron descontaminados con lejía al 10% (v/v) y desechados de forma segura. Además se utilizó un sistema de producción de lentivirus de segunda generación, mucho más seguro que métodos originales. Este sistema requirió la expresión transitoria de tres plásmidos, además de contar con una secuencia LTR 3' auto-inactivable en el vector pLKO.1 (Zufferey *et al.*, 1998), lo cual incrementó notablemente la bioseguridad del trabajo con lentivirus, haciendo que la posibilidad de generación de virus replicantes competentes fuera virtualmente imposible.

Los lentivirus se produjeron usando células HEK293T. Fueron sembradas aproximadamente 7×10^5 células por placa de 60 mm. Al día siguiente se transfectaron por lipofección usando los siguientes vectores y cantidades: 1 μ g de pLKO.1-shARN, 750 ng de psPAX2 (codifica para las proteínas funcionales del virus) y 250 ng pMD2.G (codifica para las proteínas de la envoltura). Tras 15 h se cambió el medio por uno fresco, y se recogió el sobrenadante con partículas virales a las 24 h y 48 h siguientes, pasándolo por filtros de 0.45 μ m para eliminar cualquier célula que hubiese podido quedar suspendida. Los lentivirus fueron conservados a -80°C .

3.4 Análisis de la expresión génica

3.4.1 Aislamiento de ARN

3.4.1.1 Obtención de ARN de líneas celulares

Se siguió el método de Chomczynski y Sacchi el cual consiste en la extracción de ARN con una mezcla de tiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las células fueron lavadas una vez con PBS frío, y en una campana extractora de gases, y sobre hielo, se añadió Trizol (Life Technologies) 170 μl por placa de 60 mm, con el fin de conseguir la lisis celular y solubilizar el ARN. Las muestras se homogenizaron y se pasaron a eppendorf, a los que se añadieron 35 μl de cloroformo. Se agitaron las muestras con la ayuda de un agitador mecánico, y se dejaron reposar 15 min en hielo, para seguidamente centrifugarlos (15 min, 15,000 $\times g$, 4°C). Se obtienen dos fases, la inferior orgánica que contiene las proteínas y el ADN, y la superior acuosa con el ARN, que se pasa a un nuevo eppendorf. El volumen que se ha separado con el ARN solubilizado se mezcla con un volumen igual de isopropanol, agitando por inversión, y mantenido a -20°C durante más de una hora para precipitación de los ácidos nucleicos. Por centrifugación (15 min, 15,000 $\times g$, 4°C) se obtiene un precipitado blanco. El sobrenadante se elimina por vacío, y el precipitado se lava con 1 ml de etanol al 70% (v/v), para volver a centrifugar y resuspender el precipitado de ARN en 20 μl de ddH₂O-dietilpirocarbonato 0,1% (v/v).

3.4.1.2 Obtención de ARN de islotes primarios

Se obtuvo ARN de cada animal por separado (2-3 por modelo y edad). A partir de unos 100 islotes, se obtuvo ARN con el RNeasy kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, y fue finalmente resuspendido en 20 μl de ddH₂O.

3.4.2 RT-PCR

3.4.2.1 Valoración de ácidos nucleicos

El contenido de ácidos nucleicos se valora por una lectura espectrofotométrica doble a 260 y 280 nm en cubeta de cuarzo. A 260 nm los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción, mientras que a 280 nm presentan un máximo los aminoácidos aromáticos de proteínas. El ratio A_{260}/A_{280} da una idea del grado de contaminación de las muestras con proteínas, y en condiciones óptimas debe situarse entre 1.8 y 2. Para valorar el contenido de los ácidos nucleicos, hay que tener en cuenta que cada unidad de densidad óptica a 260 nm se corresponde

a 20 µg/ml de oligonucleótidos, 40 µg/ml para ARN de cadena sencilla y a 50 µg/ml para ADN.

3.4.2.2 Síntesis de ADNc por retrotranscripción

Para eliminar posibles contaminaciones con ADN, se incubaron 2-3 µg de ARN de cada línea celular con 10 U de ADNasa I (Roche) en un tampón de incubación (Tris-HCl 40 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.9) y 20 U de inhibidor de ARNasas, RNasin (Promega). Las muestras se incubaron 30 min a 37°C, y posteriormente la ADNasa se inactivó por 5 min a 95°C.

Para la síntesis del ADNc, la solución resultante de la reacción anterior fue sometida a transcripción inversa con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), utilizando *primers* aleatorios y retrotranscriptasa según las instrucciones del fabricante. La solución se incubó dos horas a 37°C, y posteriormente se inactivó la enzima calentando a 95°C durante 5 min.

3.4.2.3 PCR y electroforesis en geles de agarosa

La PCR fue realizada a partir de ADN extraído de cola de ratón o bien de ADNc. Se usaron por lo general reactivos de Biotools, Madrid; salvo excepciones indicadas. Para la reacción se utilizó un 1 µl de ADN en un volumen final de 25 µl compuesto de tampón de reacción [Tris-HCl 75 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, pH 9.0], *primers* 0.2 µM (cada uno), dNTPs 0.2 mM (cada uno) y 1 U de ADN polimerasa.

Para la PCR se usó un termociclador Veriti 96-well (Life Technologies). Y las siguientes condiciones.

94°C 5 min	}	30-35 ciclos
94°C 30 s		
(<i>T_m</i>)°C 30s		
72°C 1 min		
72°C 7 min		
4°C final		

Para el paso de hibridación se usó la *T_m* (temperatura de *melting*) teórica de los *primers* -5°C (ajustada por la concentración de sales, usando Primer-BLAST). Los *primers* utilizados en PCR con ADNc como molde quedan recogidos en la [Tabla 3.6](#). Cuando fue posible se diseñaron *primers* tales que uno de la pareja hibridase con uniones exón-exón (específicos de ARNm maduros). Salvo excepciones indicadas, los *primers* son específicos para *Mus musculus*.

El producto de la PCR se completo con un tampón de carga, concentración final [Tris-HCl, 1.7 mM, azul de bromofenol 0.005% (p/v), xileno cianol 0.005% (p/v), glicerol 10% (v/v), EDTA 10 mM, pH 7.6], y fue resuelto mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5-3% (p/v) en TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0), suplementado con GelRed (Biotium, Hayward, EE.UU.) tras la disolución de la agarosa. La

electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE. Como marcadores para electroforesis de ADN se utilizaron los siguientes: para PCR, Phi-X174/*Hae*III (Promega) o el PCR low ladder set (Sigma-Aldrich); para plásmidos o fragmentos grandes, Lambda/*Hind*III (Promega) o 1 Kb Plus Ladder (Life Technologies). El resultado fue visualizado mediante un transiluminador UV, y las imágenes captadas con una cámara CCD (*charged coupled device*), ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).

Tabla 3.6 Primers usados en PCR (ADNc)

Gen	Secuencia	Amplicón	Condiciones (<i>T_m</i> y ciclos)
<i>Atg5</i>	S: 5'-ATGCGGTTGAGGCTCACTTA-3' AS: 5'-GCCAAAACCTGGTCAAATCTGTC-3'	145 pb	55°C, 35 ciclos
<i>Atg7</i>	S: 5'-TTCAGTGCTTTGACATGAGTGC-3' AS: 5'-CACCTGACTTTATGGCTTCCC-3'	160 pb	55°C, 35 ciclos
<i>Gapdh</i> (ratón/rata)	S: 5'-CATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3' AS: 5'-CATCGAAGGTGGAAGAGTTGG-3'	110 pb	55°C, 30 ciclos
<i>lapp</i>	S: 5'-CCTCATCCTCTCTGTGGCAC-3' AS: 5'-CACGTTGGTTGGTGGGAG-3'	175 pb	55°C, 35 ciclos
<i>Ins2</i>	S: 5'-TTGTCAAGCAGCACCTTTG-3' AS: 5'-GGTCTGAAGGTACCTGCTC-3'	165 pb	55°C, 30 ciclos
<i>IR ex 11</i> (ratón)	S: 5'-ATCAGAGTGAGTATGACGACTCGG-3' AS: 5'-TCTGACTTGTTGGGCACAATGGTA-3'	IRB: 258 pb IRA: 222 pb	57°C, 35 ciclos
<i>IR ex 11</i> (humano)	S: 5'-ACCAGAGTGAGTATGAGGATTCGG-3' AS: 5'-TCCGGACTCGTGGGCACGCTGGTC-3'	IRB: 258 pb IRA: 222 pb	57°C, 35 ciclos
<i>Irel a (Ern1)</i>	S: 5'-CAGGGCCACGTCCTGCCATG-3' AS: 5'-TTCCAAAACCTCCGGGGCCG-3'	87 pb	55°C, 35 ciclos
<i>Xbp1</i>	S (ratón): 5'-ACACGCTTGGGAATGGACAC-3'	<i>Unspliced:</i>	56°C, 35 ciclos
	S (rata): 5'-ACACGCTTGGGGATGGATGC-3'	171 pb	
	AS (ratón/rata): 5'-CCATGGGAAGATGTTCTGGG-3'	<i>Spliced:</i> 145 pb	

3.4.3 PCR cuantitativa

El contenido de ADNc obtenido a partir del ARN de islotes fue evaluado en un ABI Prism 7900 (Life Technologies), con *primers* específicos recogidos en la [Tabla 3.7](#), y SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies). La abundancia relativa de los ARNm fue calculada tomando el ARNm de ciclofilina A como control invariante. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

Tabla 3.7 Primers usados para PCR cuantitativa

Gen	Secuencia
<i>Chop</i>	S: 5'-CCACCACCTGAAAGCAGAA-3' AS: 5'-AGGTGAAAGGCAGGGACTCA-3'
<i>Cebpb</i>	S: 5'-ACCGGGTTTCGGGACTTGA-3' AS: 5'-GTTGCGTAGTCCCGTGTCCA-3'
<i>Bip</i>	S: 5'-TGGAGTCCCCAGATTGAAG-3' AS: 5'-CCTGACCCACCTTTTCTCA-3'
<i>Ciclofilina A</i>	S: 5'-CAGACGCCACTGTCGCTTT-3' AS: 5'-TGTCTTGGAACTTTGTCTGCAA-3'

3.5 Análisis de la expresión de proteínas

3.5.1 Extractos proteicos

3.5.1.1 Obtención de extractos proteicos

Las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, colocadas sobre hielo y raspadas con 50-500 μl de tampón de lisis según el formato y densidad celular [Nonidet-P40 1% (v/v), Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NaCl 150 mM, NaF 20 mM, pH 7.5] y añadidos extemporáneamente PMSF 1 mM, aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y leupeptina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El lisado se pasó a eppendorfs y tras 5-10 min en hielo y un ligero agitado fueron centrifugados (15 min, 15,000 $\times g$, 4°C). Se recogió el sobrenadante con el lisado proteico, y se descartaron los restos celulares del pellet.

Para obtener extractos proteicos de la fracción insoluble, el pellet fue lavado con PBS, resuspendido en tampón de lisis y sonicado hasta completa disolución.

Los islotes usados para *western-blot* fueron lavados 3 veces con PBS y centrifugados (2 min, 290 $\times g$, 4°C), lisados en el tampón de lisis ya descrito, y sometidos a 3 pulsos de 10 segundos en un baño sonicador con hielo. Los extractos centrifugados (15 min, 15,000 $\times g$, 4°C) y el sobrenadante pasado a nuevos eppendorfs.

3.5.1.2 Valoración de proteínas

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). Este ensayo se basa en la observación del cambio de absorbancia (de 465 nm a 595 nm) que se produce cuando se añaden proteínas a una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250. Las interacciones hidrofóbicas e iónicas producidas por aminoácidos básicos (principalmente arginina) estabilizan la forma aniónica del reactivo indicador, causando un cambio de color visible. Como control, se prepara una curva de calibrado de 0-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a partir de una solución estándar de BSA de 2 mg/ml (Bio-Rad). Para el ensayo se cuantifica la absorbancia de una mezcla de 1 μl de la muestra a analizar en 1 ml de la solución de Bradford (Bio-Rad) diluida en ddH₂O (1:5), y cuantificada su absorción en espectrofotómetro a 595 nm.

3.5.1.3 Defosforilación con fosfatasa- λ

100 μg de proteína fueron mezclados en tampón de fosfatasa- λ [Tris-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, ditiotriol 5 mM, BRIJ 35 0.01% (p/v), 2 mM MnCl₂, pH 7.5] con 400 U de fosfatasa- λ (Sigma-Aldrich), e incubado 1 h a 30 °C.

3.5.2 Western-blot

3.5.2.1 Preparación de muestras para electroforesis

Se igualó la concentración de las muestras a 0.5-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína, preparando un volumen determinado y diluyendo con tampón de lisis, además se completan con tampón de Laemli concentrado (Laemmli, 1970) para una concentración final [Tris-HCl 100 mM, glicerol 5% (v/v), SDS 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 1% (v/v), azul de bromofenol 0,004% (p/v), pH 6.8]. Las muestras son desnaturalizadas (5 min, 95°C) y cargados 10-50 μg por muestra en geles de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Junto a las muestras, se usó un estándar de marcador del peso molecular Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad)

3.5.2.2 Electroforesis en geles de SDS-PAGE

El fraccionamiento del componente proteico de los extractos celulares, se realizó por electroforesis en geles discontinuos de SDS-PAGE, según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), empleando un equipo de electroforesis Miniprotean II o TetraSystem (Bio-Rad).

Se prepararon geles con dos zonas de diferente concentración de poliacrilamida: 5% para el gel superior concentrante y 6-15% para el gel inferior separador, a partir de una solución al 30% que contiene acrilamida y bis-acrilamida en proporción 29:1 (Bio-Rad). El primero, que contiene los pocillos de depósito de muestras, sirve para concentrar y alinear las muestras; el segundo, para separar las proteínas según su peso molecular. La concentración de poliacrilamida final en el gel utilizada varió en función del peso molecular de las proteína a analizar. Los geles contienen además de poliacrilamida, SDS que confiere a las proteínas una carga negativa uniforme, Tris-HCl pH 8.8 para el gel separador; pH 6.8 para el concentrante, persulfato amónico y TEMED que catalizan la polimerización del gel. Las proporciones de los diferentes componentes varían según el tipo de gel.

Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó el siguiente tampón: Tris-base 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0.1% (p/v) pH 8.3, con una fuente Powerpac HC de Bio-Rad, a un voltaje constante de 100 v para el gel concentrante y de 110-150 v para el gel separador, durante 1.5-2 horas.

3.5.2.3 Transferencia a membranas de PVDF

Una vez finalizada la separación de proteínas, estas fueron transferidas de los geles de SDS-PAGE a membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno) Immobilon-P 0.45 μm (Merck Millipore, Billerica, EE.UU.). Previo a la transferencia se activaron las membranas altamente hidrofóbicas de PVDF por un breve paso por metanol, y se dejaron en tampón de transferencia.

El gel se colocó pegado a la membrana de PVDF y el conjunto entre 2 capas de papel Whatman, colocado todo el sistema entre almohadillas y una carcasa, de tal forma que las proteínas migraran hacia el polo positivo. El tampón de transferencia usado fue 25 mM Tris, 192 mM glicina, metanol 20% (v/v). La electrotransferencia fue llevada a cabo con el Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), con un voltaje constante de 100 v, y una resistencia inicial de 350 mA, durante una hora y en frío.

3.5.2.4 Bloqueo e incubación con anticuerpos

Finalizada la transferencia, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos a proteínas. Para ello, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave, en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) más Tween-20 0,05% (v/v), TTBS; suplementado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada en unos casos o BSA 3% (p/v), dependiendo del anticuerpo de interés. Generalmente cuando fueron usados anticuerpos fosfo-específicos, las membranas se bloquearon con BSA, ya que la leche en polvo contiene grandes cantidades de fosfo-proteínas como la caseína.

Posteriormente se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario diluido en TTBS hasta el día siguiente, en una cámara fría a 4°C, con agitación suave. Algunos anticuerpos fueron incubados en solución de bloqueo para reducir el fondo. La lista con todos los anticuerpos utilizados y sus diluciones se encuentra en la sección 3.9.4.

Al día siguiente, la membrana se lavó 3-5 veces con TTBS durante una hora en agitación fuerte, tras la cual se incubó con una solución en TTBS de anticuerpo secundario frente a la fracción constante de la especie correspondiente en la que se hubiese generado el anticuerpo primario. La incubación con el anticuerpo secundario fue de 1 h a t.a. en agitación suave. Finalmente se volvió a lavar con TTBS otras 3-5 veces durante aproximadamente una hora, en agitación fuerte.

3.5.2.5 Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia

Para detectar los anticuerpos secundarios, conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), las membranas se incubaron con reactivos de quimioluminiscencia, los cuales se basan en la oxidación del luminol en presencia de H₂O₂ y un catalizador, a 3-aminofalato, el cual decae a su estado fundamental emitiendo luz visible (432 nm). Como reactivos se usaron ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), o bien Western Lighting ECL Plus (Perkin Elmer, Waltham, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Para fijar la señal, se utilizaron las placas de autorradiografía Hyperfilm-ECL (GE Healthcare) y un aparato revelador CURIX 60 (Agfa, Mortsel, Bélgica). Los films fueron posteriormente digitalizados con un escáner.

Alternativamente se usaron sistemas de detección de quimioluminiscencia por cámara CCD, los cuales permitieron la digitalización directa de los resultados. Se usó un LAS300 mini (Fujifilm, Tokio, Japón) y el reactivo ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare), o bien un ChemiDoc XRS+ y el reactivo Immun-Star WesternC (Bio-Rad).

3.5.2.6 Borrado de membranas de PVDF

Para poder ver bandas que podrían solaparse, o en el caso de las proteínas totales tras haber revelado con anticuerpos fosfoespecíficos, se precisó borrar la membrana, con lo que se elimina el anticuerpo primario y secundario unido a esta, y quedan libres para una nueva hibridación. Para ello las membranas de PVDF se incubaron con un tampón de borrado (Tris-HCl 62.5 mM, SDS 0.5% y 2-mercaptoetanol 100 mM, pH 6.8) durante 20 min a 55°C. Posteriormente se lavaron varias veces en TTBS antes de ser incubadas con un nuevo anticuerpo.

3.5.3 Inmunoprecipitación

De los extractos proteicos de cultivos celulares, obtenidos de la manera antes descrita, se realizaron inmunoprecipitaciones. Partiendo de una cantidad de proteína uniforme para todas las muestras de un mismo experimento (de 300 µg a 1 mg de proteína), en un volumen final de 600-800 µl ajustado con tampón de lisis, se añadió el anticuerpo de interés para inmunoprecipitar (1-2 µg de anticuerpo por 1 mg de proteína), y se mantuvo toda la noche en rotación a 4°C.

Al día siguiente, para quedarse con toda la proteína que se ha unido al anticuerpo, se añadió el extracto proteico 20-30 µl de una mezcla de proteína A o proteína G-agarosa (Roche) con tampón de lisis (1:1, previamente lavada varias veces con el tampón) y se incubaron 2 h a 4°C. La proteína A/G se une a las IgG por la fracción constante, al estar la proteína A o G conjugada con bolas de agarosa, sedimentan rápidamente y se pueden separar del resto del sobrenadante, que contiene las proteínas que no han sido reconocidas por el anticuerpo usado en la inmunoprecipitación.

La fase sedimentada (con las bolas de agarosa) se lavo varias veces con 500 µl de tampón de lisis, dejando en un último paso a las bolas lo más secas posibles, y se añadió tampón de Laemli. Las muestras ya preparadas se hierven 5 min a 95°C para eliminar las uniones entre proteínas, y se cargan en geles de SDS-PAGE para su detección por *western-blot*. Adicionalmente, se utilizó un método alternativo de inmunoprecipitación, mediado por partículas magnéticas tapizadas con proteína A o G (Dynabeads, Life Technologies), y el uso de un imán DynaMag 2 (Life technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.4 Fraccionamiento celular y aislamiento de orgánulos

3.5.4.1 Aislamiento de retículo endoplasmático

El procedimiento fue llevado a cabo siguiendo una metodología ya descrita (Bozidis *et al.*, 2001). Brevemente, aproximadamente 10 placas (100-mm) por condición fueron sembradas. Las células fueron tripsinizadas, lavadas con PBS y resuspendidas en 10 ml de tampon MTE

(D-manitol 270 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, PMSF 1 mM, pH 7.4), y lisadas por una sonicación suave. Se obtuvo un pellet de restos celulares por centrifugación (10 min, $1,400 \times g$, 4°C) y otro pellet conteniendo mitocondrias (10 min, $15,000 \times g$, 4°C). El sobrenadante fue recogido y colocado en la parte superior de un gradiente de densidad de sacarosa (2.0:1.5:1.3 M). Los tubos de ultracentrifuga fueron completados con tampón MTE para evitar su colapso, y fueron sometidos a ultracentrifugación (70 min, $152,000 \times g$). La interfase entre las soluciones de sacarosa 1.5 M y 1.3 M, conteniendo la fracción de RE, fue recogida y diluida con tampón MTE. De nuevo se sometió a ultracentrifugación (22 min, $40,000 \times g$), siendo los pellets conteniendo la fracción de RE resuspendidos en buffer de lisis y sonicados. 10-20 μg de proteína de RE fueron utilizados por punto para *western-blot*.

3.5.4.1 Aislamiento de mitocondrias para detección de proteínas oxidadas

Para la detección de proteínas oxidadas en mitocondrias, se utilizaron alrededor de 2×10^7 células por punto. Las células fueron tripsinizadas, centrifugadas (3 min, $110 \times g$, 4°C) y lavadas con PBS. Para la purificación de mitocondrias se utilizó el Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante, pero adaptadas al procedimiento subsiguiente. Para ello todos los tampones fueron suplementados con 2-mercaptoetanol 1% (v/v) para evitar la oxidación de proteínas tras la lisis celular, y para reducir al máximo la contaminación con peroxisomas y lisosomas, el pellet de mitocondrias se obtuvo centrifugando (15 min, $3,000 \times g$, 4°C), en vez de $12,000 \times g$ (obteniendo un menor rendimiento pero mucha menor contaminación de otros orgánulos).

Una vez obtenido y lavado el pellet mitocondrial, fue resuspendido en 30 μl de tampón de lisis TBS-CHAPS [CHAPS 2% (p/v), Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, 2-mercaptoetanol 1% (v/v), pH 7.5]. Se utilizaron 5 μl para la cuantificación de proteínas, y el resto para derivación de proteínas o *western-blot* directo.

Para la derivación de proteínas, aproximadamente 10 μg de proteína mitocondrial en un volumen de hasta 10 μl fueron derivadas usando el kit OxyBlot para detección de proteínas oxidadas (Merck Millipore). Esta técnica se basa en la detección de grupos carbonilo introducidos en las cadenas laterales de proteínas cuando estas se encuentran sometidas a estrés oxidativo. Los grupos carbonilos sufren una reacción de condensación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP-hidrazina), y el uso de un anticuerpo específico frente a DNP permite la cuantificación por *western-blot* de las proteínas oxidadas.

3.6 Técnicas de imagen

3.6.1 Inmunofluorescencia de células en cultivo

Las células se sembraron sobre cristales circulares de 1 cm de diámetro. Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y fijadas inmediatamente con una solución de paraformaldehído al 4% (p/v), durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con PBS, y se incubaron 5 min a temperatura ambiente con Tritón X-100 0.2% (v/v) en PBS, con el fin de permeabilizar las células y permitir el marcaje de antígenos intracelulares. Tras este tratamiento, se lavan y se incuban 15 min a temperatura ambiente con una solución de NH_4Cl 50 mM, con esto se consigue amortiguar la autofluorescencia endógena que presentan las células. Tras un nuevo lavado, se bloquean los sitios de unión inespecíficos con una incubación en una solución de bloqueo de BSA 1% (p/v), 0,2% Tritón X-100 (v/v) en PBT [PBS suplementado con Tween-20 0.05% (p/v)] durante 45 min a temperatura ambiente (en ocasiones enriquecido con 2% de suero de cabra). La incubación con anticuerpos primarios (uno solo o una mezcla de dos anticuerpos para doble marcaje), se realizó durante 1.5 h a t.a. en cámara húmeda.

Tras lavado con PBT, se incuba con anticuerpo secundario 45 min (dos veces en el caso de doble marcaje). Tras un último lavado con PBT, las preparaciones se montaron sobre un portaobjetos con un líquido de montaje SlowFade Gold (Life Technologies) conteniendo DAPI para la visualización de núcleos. Las muestras fueron observadas generalmente al día siguiente, ya que el índice de refracción del líquido de montaje tuvo que madurar y quedó estable a las 24 horas.

3.6.2 Inmunohistoquímica de secciones pancreáticas

3.6.2.1 Fijación de páncreas y obtención de cortes

Los animales fueron sacrificados como es descrito en la sección 3.1.3, y sometidos a perfusión intracardiaca con paraformaldehído 4% (p/v) en PBS. Los páncreas fueron sacados de una pieza, lavados en PBS, y colocados en solución de Bouin [ácido pícrico 1% (p/v), formaldehído 10% (v/v), ácido acético 5% (v/v)] donde fueron dejados en ligera agitación toda la noche. Al día siguiente los páncreas fueron extensivamente lavados en PBS y dejados en formaldehído 10% (v/v) para su envío a una empresa externa que se encargó de la inclusión del tejido en bloques de parafina.

La solución saturada de ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol) debe conservarse convenientemente en un lugar fresco y seco. Soluciones que han quedado deshidratadas con menos de 30% de H_2O son altamente explosivas y sensibles a golpes.

Los bloques de parafina, previamente enfriados, fueron procesados con un micrótopo obteniéndose cortes de 5 μm que fueron depositados en la superficie de un baño de agua a 55°C para su extensión completa, y seguidamente colocados en portaobjetos. Se obtuvieron alrededor de 8-10 cortes por cada región del bloque. Para acceder a la siguiente región se desbastó el bloque mediante cortes de 20 μm (total aproximado de 200 μm entre secciones). En total se obtuvieron cortes de 4-5 regiones por páncreas, lo cual posibilitó la aproximación estereológica para el cálculo de masa de célula β .

3.6.2.2 Desparafinización e hidratación de cortes

Para desparafinizar, los portaobjetos con cortes de páncreas fueron pasados por xilol (2 incubaciones de 10 min), y seguidamente por etanol absoluto (2 incubaciones de 2 min) y una serie de etanoles de concentración decreciente 90, 80, 70% (v/v), 1 min por cada solución. Seguidamente los portaobjetos fueron lavados extensivamente con agua corriente. Posteriormente se realizaron círculos alrededor del tejido con un rotulador hidrófobo (*pap-pen*), antes de proseguir con el inmunomarcaje.

3.6.2.3 Inmunofluorescencia para área de célula β

Las secciones fueron colocadas en cámara húmeda y bloqueadas con BSA 3% (p/v) en TTBS a t.a. durante 1 h. Posteriormente se incubaron con anticuerpos anti-insulina (1:2000, Dako, Glostrup, Dinamarca) y anti-glucagón (1:500, Dako), a 4°C toda la noche. Al día siguiente las secciones fueron lavadas 3 veces con TTBS e incubadas con anticuerpos secundarios a t.a. durante 1 h (FITC-anti conejo 1:200, para glucagón; Cy3-anti cobaya 1:200, para insulina, Jackson ImmunoResearch, West Grove, EE.UU.). Las secciones fueron lavadas de nuevo en TTBS y observadas en el periodo de una semana. Para la toma de imágenes se usaron duplicados de 4-5 regiones diferentes de páncreas de cada animal. Fueron obtenidas imágenes de todo el páncreas mediante el uso de un microscopio de fluorescencia semi-automático Biozero BZ-8000 (Keyence, Osaka, Japón), el cual permitió la obtención de hasta 30 imágenes (50 \times 37 μm) de una sección pancreática y la posterior recomposición con el software BZ-Analyzer (Keyence). La cuantificación del área de célula β está descrita en la sección 3.8.2.2.

3.6.2.3 Inmunohistoquímica en secciones de páncreas

Tras el lavado de las secciones en agua, se procedió al desenmascaramiento antigénico. Este proceso es importante, ya que la extensa fijación con aldehídos produce gran cantidad de puentes metileno a lo largo de la estructura de la proteína, lo cual puede ocultar epítopos reconocidos por los anticuerpos. El desenmascaramiento de las secciones pancreáticas fue realizado siempre, salvo para la inmunofluorescencia con insulina-glucagón. Para desenmascarar, las preparaciones se hirvieron durante 20 min en una solución de citrato sódico 10 mM, pH 6.0. Para ello se usó un microondas a potencia baja tras arrancar el primer hervor. Seguidamente las preparaciones se dejaron enfriar lentamente a t.a. durante 30 min, y fueron lavadas 3 veces con ddH₂O.

Las secciones se incubaron 10 min con una solución de H_2O_2 3% (v/v) con el fin de bloquear las peroxidasas endógenas, posteriormente lavadas 2 veces con ddH₂O e incubadas en solución de bloqueo [2% BSA (p/v), suero de cabra 1% en PBS] a t.a. durante 1 h y en cámara húmeda. Seguidamente se reemplazó la solución de bloqueo por anticuerpo primario diluido en bloqueo, y las preparaciones fueron incubadas toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron 3 veces en PBS y tras el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, y nuevos lavados se procedió al desarrollo de la imagen mediante el uso de 3,3'-diaminobenzidina y un cromógeno (Dako), siguiendo las instrucciones del fabricante. La 3,3'-diaminobenzidina forma un precipitado marrón local al oxidarse en presencia de H_2O_2 y peroxidasa. La reacción es parada a los 2-5 min bajo el microscopio, introduciendo las preparaciones en ddH₂O. Previo a la observación las secciones con contrateñidas con una solución de hematoxilina, y lavadas con ddH₂O.

3.6.3 Inmunofluorescencia con islotes aislados

3.6.3.1 Fijación y preparación de islotes

La fijación y preparación de islotes aislados para observación en microscopio confocal fue puesta a punto siguiendo las recomendaciones de A.B. Roper (Universidad Miguel Hernández, Elche), y el método ya descrito (Tudurí *et al.*, 2008).

Una vez finalizado el tratamiento *ex vivo*, los islotes fueron lavados 2 veces con PBS frío y centrifugados (2 min, 290 × g, 4°C). Este método requirió muchos cambios de solución, todos ellos realizados por centrifugación (2 min, 290 × g) y aspiración de sobrenadante, tras la fijación el proceso tuvo lugar a t.a. Los islotes fueron fijados con solución de Bouin (5 min, t.a.) y lavados varias veces con PBS. Seguidamente se pasaron por soluciones de etanol de concentración creciente, 30, 50, 70% (v/v), y lavados con PBS. La permeabilización fue realizada con Triton X-100 0.5% (v/v) en PBS, durante 15 min, lavados con PBS y bloqueados en BSA 5% (p/v), Tritón X-100 0.1% (v/v) en PBS durante 1 h.

3.6.3.2 Incubación con anticuerpo y montaje

Todo el procedimiento de incubación y montaje fue realizado bajo lupa. Para la incubación con anticuerpos, se preparó una placa lisa de polipropileno en la cual se hicieron círculos con un rotulador hidrófobo, con espacio para 20-30 µl. Los islotes en solución de bloqueo fueron depositados en una placa, de la cual 10-15 islotes fueron pescados y colocados en los círculos preparados. La solución fue retirada y reemplazada por una nueva solución de bloqueo con los anticuerpos de interés (1:50-1:500) ver sección 3.9.4; e incubados toda la noche a 4°C.

Al día siguiente los islotes fueron lavados 3 veces con PBS, retirando las soluciones cuidadosamente. La incubación con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos (1:200) se realizó a t.a. durante 1 h en la misma placa. Tras lo cual los islotes volvieron a lavarse 3 veces con PBS y se montaron (Figura 3.8).



Figura 3.8 Montaje de islotes.

Los islotes se depositaron en cubreobjetos (grosor no. 1), dentro de cámaras adhesivas fabricadas con la ayuda de un taladro perforador de papel, como las mostradas en la figura. Se retiró el PBS restante y fue reemplazado por líquido de montaje (SlowFade Gold con DAPI, Life Technologies). Las preparaciones fueron observadas a las 24 h.

3.6.3.2 Marcaje selectivo de mitocondrias con alto $\Delta\Psi_m$

Para el marcaje de mitocondrias en islotes, tras el aislamiento los islotes fueron dejados en RPMI FBS 10% durante toda la noche. Al día siguiente, los islotes se recogieron en eppendofés y se incubaron en medio sin suero con Mitotracker Orange CMTMRos 500 nM (Life Technologies), en incubador a 37°C durante 30 min con la tapa abierta. Tras este tiempo se lavaron los islotes 2 veces con PBS y se prosiguió con la fijación.

Mitotracker Orange CMTMRos es solamente incorporado por mitocondrias respirando activamente, y es capaz de quedar irreversiblemente unido a proteínas (Figura 3.9), por lo que no se pierde tras la fijación con aldehídos.

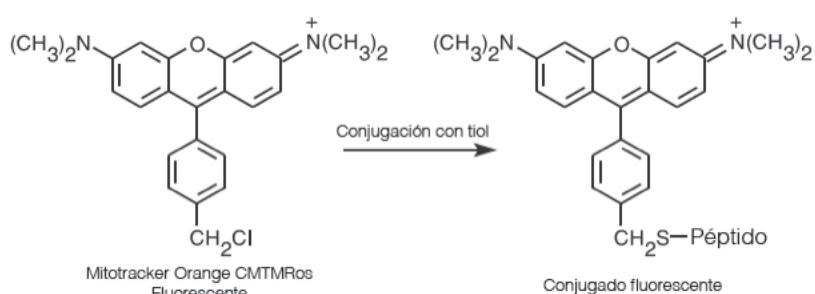


Figura 3.9 Conjugación irreversible de Mitotracker a proteínas mitocondriales.

Mitotracker CMTMRos (un derivado de la tetrametil-rosamina), al contrario que otras sondas fluorescentes selectivas de mitocondria, no se pierde tras la fijación con aldehídos, por lo que es compatible con marcaje con anticuerpos.

3.6.4 Microscopio invertido

Se utilizó un microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Tokio, Japón) acoplado a una cámara y a lámpara de mercurio. Permitió la captura de imágenes en contraste de fases y de inmunofluorescencia de células en cultivo. Las imágenes fueron obtenidas con el software Nis-Elements F (Nikon).

Todas las imágenes de secciones de páncreas, y las imágenes de contraste de fase de islotes aislados para el cálculo de diámetro de islote fueron obtenidas mediante un microscopio invertido Biozero BZ-8000 (Keyence) y el software BZ-Analyzer. El microscopio cuenta con una lámpara de mercurio y diferentes filtros de emisión usados con los fluoróforos indicados entre paréntesis, 360/40 nm (DAPI), 470/40 nm (FITC, EGFP) y 540/25 (Cy3).

3.6.5 Microscopio confocal

Se utilizó un microscopio confocal Axio Observer.Z1 con el módulo de escaneo LSM 700 (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se dispuso de 4 láseres de estado sólido (Diodo 405 nm, 5 mW; diodo 488 nm, 10 mW; diodo 555 nm, 10 mW; diodo 639, 5 mW), utilizados por lo general a $\leq 2\%$ de transmisión. La lista de fluoróforos utilizados en microscopía confocal queda recogida en la [Tabla 3.8](#).

Nombre	Ex. max (nm)	Em. max (nm)	Láser usado (nm)
DAPI	345	455	405
FITC	495	519	488
Cy3	550	570	555
MTR Orange	554	576	555
Alexa Fluor 647	652	668	639

Para obtener imágenes de islotes completos, se usó un objetivo 40× Zeiss Plan-Apochromat oil (apertura numérica 1.3), y para imágenes a detalle de células dentro del islote se usó el objetivo 63× Zeiss Plan-Apochromat oil (apertura numérica 1.4). Con este último objetivo, en ocasiones se tuvo que recurrir a $> 2\%$ de transmisión de láser. Ambos objetivos fueron siempre utilizados con aceite de inmersión.

DAPI siempre fue visualizado en un canal aparte con el láser de 405 nm y un filtro de paso bajo (SP 550 nm), ningún otro fluoróforo utilizado es excitado a 405 nm. Para los marcajes más complejos se utilizaron los siguientes filtros de emisión.

- FITC/EGFP Láser 488 nm: BP 420-528 nm
- MTR Orange/Cy3: Láser 555 nm: BP 576-640 nm
- Alexa Fluor 647: Láser 639 nm: LP 640 nm

* SP: filtro de paso bajo, BP: filtro de paso de banda, LP: filtro de paso largo.

Todas las imágenes fueron obtenidas en formato de 1024×1024 píxeles, a una velocidad de 0,5-5 $\mu\text{s}/\text{pixel}$ (dependiendo del experimento). El *pinhole* del microscopio que permite la toma de imágenes confocales fue de un tamaño de aproximadamente 1 *airy unit*, o algo mayor dependiendo del experimento. Las imágenes a lo largo del eje *z* (*z-stacks*) fueron recogidas en espacios de 2.5 μm (objetivo 40×), y de 1 μm (objetivo 63×). Para la operación del microscopio y la obtención de imágenes se utilizó el software ZEN2011 (Zeiss).

3.6.6 Microscopía electrónica de transmisión

Pellets de células tripsinizadas fueron pasados a eppendorfs, lavados con PBS y fijados en paraformaldehído 4% (p/v), Electron Microscopy Sciences; glutaraldehído grado I 2,5% (v/v) Sigma-Aldrich; en tampón de fosfato sódico 0.1 M (pH 7.3), durante 3 horas. Se lavaron con PBS 3 veces y se dejaron hasta el día siguiente a 4°C. Todo el procedimiento fue llevado

a cabo en campana extractora de gases, utilizando eppendorfs y aspirando cuidadosamente cada solución para dejar el pellet celular sedimentado (sin centrifugación).

Al día siguiente las muestras fueron post-fijadas con una mezcla de OsO_4 1% (p/v) Electron Microscopy Sciences; $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_5]$ 1% (p/v) durante 1 h, y deshidratadas en una batería de etanoles (30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%), 15 min por cada una y embebidas en resina epoxi (Epon812, TAAB, Aldermaston, Reino Unido) pasándose por mezclas etanol:resina (3:1, 1 h; 1:1, 1h; 1:3, 2h; resina pura). La resina pura se cambia a las 24 horas y los eppendorfs se dejan abiertos en estufa a 60°C durante 3 días. Una vez polimeriza la resina, las muestras fueron llevadas al Centro de Microscopía Electrónica de la UCM. Secciones ultrafinas (60-70 nm) fueron obtenidas con un ultramicrotomo (Ultracut E, Leica), teñidas con citrato de plomo y examinadas mediante un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010, JEOL, Tokio, Japón).

El tetróxido de osmio (OsO_4) es volátil y extremadamente tóxico, incluso a concentraciones bajas. Se une altamente a fosfolípidos y proteínas, por lo que todos los residuos generados son neutralizados con leche en polvo.

3.7

Ensayos de proliferación, muerte y supervivencia

3.7.1 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Una vez realizado el tratamiento deseado en cultivo, se levantaron las células con tripsina, y tras parar la reacción con medio con suero, se centrifugaron las células (5 min, $110 \times g$, 4°C) dos veces tras lavarlas con PBS. El pellet celular se resuspendió en 300 μl de PBS frío más 700 μl de etanol absoluto a -20°C , en estas condiciones se agitaron las muestras y se dejaron en hielo durante 1 min, y las células fueron lavadas 2 veces más con PBS frío. Se resuspendieron finalmente en 500 μl de PBS atemperado, y así fueron incubadas durante 30 min a 37°C con ARNasa (preparada según lo descrito en sección 3.3.2). El último paso fue añadir 25 μl de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) 0.1% (p/v) en PBS.

Se valoró el contenido celular de ADN por incorporación de yoduro de propidio, (emisión fluorescente entre 562-588 nm), pudiendo diferenciarse células apoptóticas ($<2n$), células en fase G_0/G_1 , y células en proliferación (fase S/G_2-M , $>2n$). Para ello se utilizó un citómetro FACScalibur y el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

3.7.2 Marcaje con anexina-V/yoduro de propidio

Tras finalizar el ensayo *in vitro*, se recogieron células del sobrenadante y las pegadas a los platos previa tripsinización. Los pellets fueron lavados con PBS y aproximadamente 1.5×10^5 células fueron centrifugadas y resuspendidas en 100 μl de buffer de unión a anexina-V (HEPES 10 mM, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4), e incubadas con 5 μl de anexina-V-FITC y 5 μl de solución de yoduro de propidio (Immunostep, Salamanca). Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se añadieron 400 μl de tampón de unión a anexina, y las muestras fueron llevadas a un citómetro para el análisis doble de anexina-V/yoduro de propidio.

La pérdida de asimetría en los fosfolípidos de la membrana plasmática es un signo característico de la apoptosis, dando lugar a la externalización de fosfatidilserina (PS), como señal para el reconocimiento por parte de macrófagos de las células apoptóticas (Fadok *et al.*, 1992). Esto permite el uso de anexina-V, una proteína anticoagulante que se une a PS en la superficie de las células, para la detección de apoptosis temprana (Koopman *et al.*, 1994). La combinación de anexina-V-FITC e yoduro de propidio permite diferenciar entre células apoptóticas tempranas (sólo anexina-V positivas) y células apoptóticas tardías/células necróticas (anexina-V e yoduro de propidio positivas).

3.7.3 Cristal violeta

Se sembraron las células en placas de 12 pocillos a una densidad de 5000 células/cm². Tras el tratamiento deseado, las células fueron lavadas con PBS y teñidas con cristal violeta 0,2% (p/v) en 2% etanol (v/v) durante 10 min. Seguidamente las placas fueron lavadas varias veces con ddH₂O y se dejaron secar. Para cuantificar la cantidad de colorante fijado se añadió 1 ml de SDS 1% (p/v) por pocillo y se midió la absorbancia de cada uno de los puntos a 560 nm. Se utilizó un lector de placas FluoStar Omega (Bmg Labtech, Ortenberg, Alemania).

3.8 Otras técnicas

3.8.1 Técnicas bioinformáticas

3.8.1.1 Trabajo con secuencias de ADN

- **BLAST** (National Institutes of Health, Bethesda, EE.UU.) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)
Diseño de *primers* y comparación de secuencias con las bases de datos del NIH.
- **LabLife** (<http://www.lablife.org>)
Trabajo con enzimas de restricción, predicción de puntos de corte dentro de una secuencia.
- **4peaks** (Mekentosj, Aalsmeer, Holanda)
Software gratuito usado para trabajo con archivos .ab1 de secuenciadores ABI. El programa permite visualización de electroferogramas de secuenciador y la corrección manual de secuencias.
- **Pairwise Sequence Alignment**; EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>)
Alineamiento de secuencias de ADN y aminoácidos.

3.8.1.2 Trabajo con imágenes

- **ZEN2011** (Zeiss)
Software utilizado para la operación del microscopio confocal LSM 700 y toma de imágenes, pero además usado en los posteriores ajustes y análisis de las imágenes.
- **Adobe Photoshop CS3** (Adobe, San Jose, EE.UU.)
Ajustes de imágenes.
- **ImageJ** (National Institutes of Health)
Software gratuito usado para análisis de imágenes (área), y densitometría de *blots*.
- **Amira** (Visage Imaging, Berlin, Alemania)
Generación de modelos tridimensionales a partir de *z-stacks* y medición de volumen.
- **BZ-Analyzer** (Keyence)
Recomposición de secciones de páncreas a partir de múltiples imágenes.

3.8.1.2 Otros

- **BD Spectrum Viewer** (Becton Dickinson) (http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/)
Aplicación *online* que permite consultar espectros de emisión y absorción de diferentes fluoróforos, además de simular experimentos de marcaje múltiples.
- **Cell Quest Pro** (Becton Dickinson)
Operación de citómetro y análisis de resultados.
- **Gatelogic** (Inivai, Mentone, Australia)
Generación de histogramas y *dot-plots* a partir de los resultados de citometría
- **GraphPad** (<http://www.graphpad.com/quickcalcs>)
Aplicación *online* usada para cálculos estadísticos.
- **Papers** (Mekentosj)
Organización de documentos científicos y gestión de referencias.

3.8.2 Cuantificación

3.8.2.1 Blots

Los *blots* fueron cuantificados usando la herramienta “Analyze\Gels” de ImageJ (Figura 3.10). Fueron seleccionadas regiones rectangulares de mismo área para todos los puntos del *blot*, y se obtuvieron representaciones de la densidad de señal a lo largo de la región seleccionada. Se dibujó una línea base y se obtuvo el área bajo la curva, indicativa de la señal relativa de cada punto. Los resultados fueron siempre normalizados con la señal del control invariable (β -actina, *Gapdh*, etc.).

3.8.2.2 Imágenes

Para el análisis de masa de célula β se utilizó el programa ImageJ. Las imágenes de secciones reconstruidas de páncreas frente a insulina fueron procesadas mediante la función “Image\Color\Stack to RGB”, con el fin de separar los tres canales (rojo, verde y azul) de la imagen. Mediante la función “Image\Adjust\Threshold” se seleccionó automáticamente todo el área positivo para insulina (en rojo por marcaje con Cy3) y el dato de área relativo fue obtenido con la función “Analyze\Measure”. El área de célula β fue representado frente al total del páncreas, las imágenes de contraste de fases, obtenidas en paralelo a las de inmunofluorescencia, fueron usadas para calcular el área total por el mismo método. La selección automática fue corregida manualmente para eliminar defectos, o áreas de tejido graso.

Para la cuantificación de áreas en imágenes de contraste de fases, o tamaño de autofagosomas en imágenes de microscopía electrónica, se utilizó ImageJ y la herramienta “Freehand selection”. Las áreas en imágenes de microscopía confocal fueron determinadas con el software ZEN2011. Para la determinación del diámetro medio (d) a partir del área (A) se utilizó la fórmula $d = 2(A/\pi)^{1/2}$. El volumen celular fue obtenido a partir de *z-stacks* con el software Amira.

3.8.3 Estadística

Las pruebas estadísticas entre valores medios fueron determinadas mediante el test t de Student para comparación de dos muestras independientes (*prueba-t despareada*, usada en la práctica totalidad de análisis realizados en esta tesis). Análisis simple de la varianza mediante ANOVA de una vía, fue utilizado para comparaciones múltiples. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para $P < 0.05$.

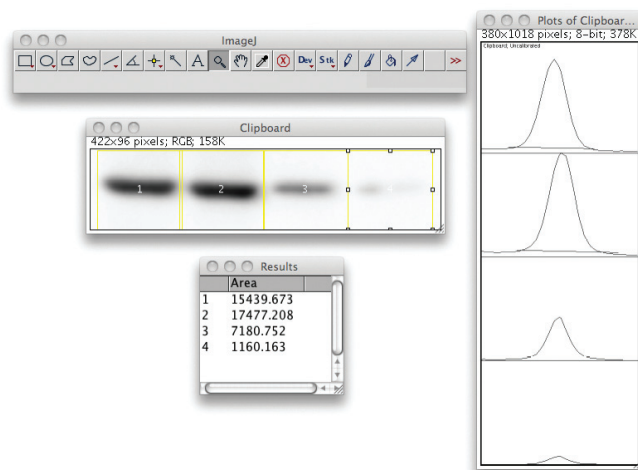


Figura 3.10 Ejemplo de uso de la función Analyze/Gels de ImageJ

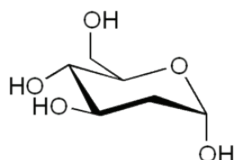
3.9 Materiales

3.9.1 Reactivos

Reactivos comunes de laboratorio fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales.

- **Merck Millipore:** Triton X-100 y Tween-20.
- **Panreac** (Castellar del Vallés): ácido acético, etanol, glicerol, glicina, HCl, isopropanol, metanol y NaCl.
- **Pronadisa** (Torrejón de Ardoz): agar bacteriológico, agarosa, extracto de levadura y triptona.
- **Roche:** aprotinina, leupeptina y PMSF.
- **Santa Cruz** (Santa Cruz, EE.UU.): genética e higromicina.
- **Sigma-Aldrich:** anfotericina B, ampicilina, CHAPS, DAPI, ditiotriol, DMSO, EDTA, EGTA, estreptomycin, HEPES, kanamicina, 2-mercaptoetanol, MOPS, NaF, paraformaldehído, penicilina G, puromicina, SDS y Tris base (Trizma).

3.9.2 Inhibidores y otros agentes farmacológicos usados



2-deoxiglucosa (2dG) Sigma-Aldrich

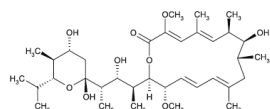
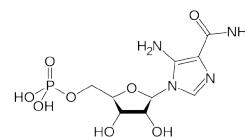
Análogo no metabolizable de la glucosa que puede ser transportado al interior de las células. Inhibe indirectamente la glucólisis y la producción de ATP. Causa estrés de RE al inhibir la glucosilación de proteínas en RE.

Soluble: agua, 1M. Concentración efectiva: 1-5 mM

AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranosido (Sigma-Aldrich)

Es un intermedio de la generación de inosina monofosfato. Farmacológicamente usado como análogo de AMP que una vez fosforilado es capaz de activar a AMPK.

Soluble: agua, 50 mg/ml. Concentración efectiva: 1-5 mM



Bafilomicina A₁ (Sigma-Aldrich)

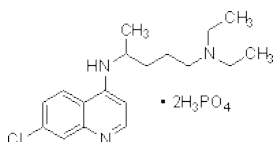
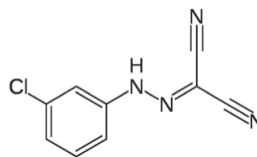
Macrólido producto de *Streptomyces griseus*. Funciona como un inhibidor altamente específico de la H⁺/ATPasa vacuolar, inhibiendo la acidificación de lisosomas y su fusión con autofagosomas. Por lo tanto inhibe la autofagia efectiva.

Soluble: DMSO, 0.1 mg/ml. Concentración efectiva: 1-20 nM

CCCC (Carbonilcianuro *m*-clorofenilhidrazona) Wako Chemicals, Osaka, Japón

Inhibidor químico de la fosforilación oxidativa, impide el funcionamiento de la ATP sintasa al funcionar como ionóforo en la membrana mitocondrial, produciendo el colapso del $\Delta\psi_m$. Es comunmente usado como inductor de mitofagia.

Soluble: DMSO, 100 mM. Concentración efectiva: 5-30 μ M



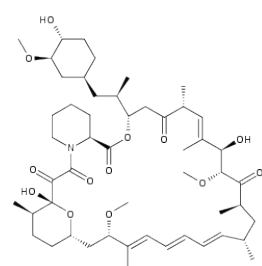
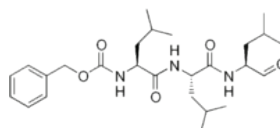
Cloroquina, difosfato (N'-(7-cloroquinolil-4-il)-N,N-dietil-pentano-1,4-diamina) Sigma-Aldrich.

Compuesto lisosomotropo que aumenta el pH lisosomal, llevando a inhibición de la fusión autofagosoma-lisosoma. Compuesto relacionado estructuralmente con la quinina, alcaloide obtenido de corteza de *Cinchona* sp.

Soluble: agua, 50 mg/ml. Concentración efectiva: 10-25 μ M

MG132 - Z-Leu-Leu-Leu-CHO (Enzo Life Sciences, Farmingdale, EE.UU.)
Compuesto peptidomimético que funciona como inhibidor específico del proteasoma 26S.

Soluble: DMSO, 25 mg/ml. Concentración efectiva: 1-10 μ M



Rapamicina (Merck-Millipore)

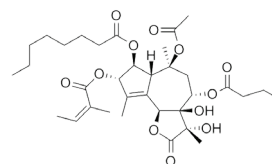
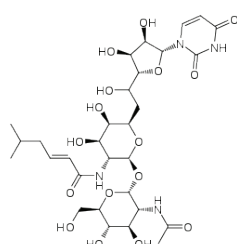
Macrólido producto de *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina actúa al unirse a FKBP12, y el complejo es capaz de asociarse a mTORC1, inhibiéndolo. Sin embargo a las dosis utilizadas frecuentemente, solo es capaz de inhibir a mTORC1, y no a mTORC2.

Soluble: DMSO, 50 mg/ml. Concentración efectiva: 20-40 nM

Thapsigargina (Sigma-Aldrich)

Lactona sesquiterpénica extraída de una planta (*Thapsia garganica*). Inhibe la Ca^{2+} /ATPasa de RE, rompiendo su homeostasis de Ca^{2+} y generando estrés de RE.

Soluble: DMSO, > 1 mM. Concentración efectiva: 10-1000 nM



Tunicamicina (Sigma)

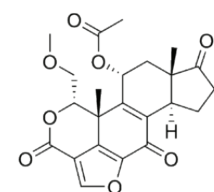
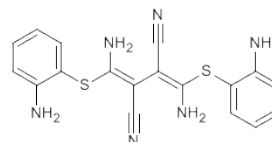
Antibiótico análogo de nucleósidos, producido por diversas bacterias como *Streptomyces clavuligerus* o *Streptomyces lysosuperficus*. En mamíferos es capaz de inhibir la N-acetilglucosamina fosfotransferasa, enzima clave para la síntesis de N-glicoproteínas. Utilizada comúnmente para producir estrés de RE de forma experimental.

Soluble: DMSO, > 10 mg/ml. Concentración efectiva: 1-5 μ g/ml

U0126 (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofeniltio)butadieno (Merck-Millipore).

Inhibidor altamente selectivo de MEK1 y MEK2

Soluble: DMSO, 100 mM. Concentración efectiva: 5 μ M



Wortmanina (Sigma-Aldrich)

Furanoesteroide metabolito del hongo *Talaromyces wortmanii*. La wortmanina es un inhibidor covalente específico de las fosfatidilinositol 3-kinasas (PI3K), especialmente de PI3K clase Ia.

Soluble: DMSO, > 1 mM. Concentración efectiva: 40 nM

La cloroquina es comúnmente usada como antimalárico. Está estructuralmente relacionada con la quinina, alcaloide obtenido de la corteza de *Cinchona* sp. El nombre de este género deriva del hecho de que en 1638, la Condesa de Chinchón (esposa del Virrey de Perú), consciente de sus propiedades antipalúdicas, fue artífice del inicio de su exportación a Europa. Carlos Linneo quiso honrar a la condesa nombrando de esta manera al género *Cinchona*.



Moáis en "Rapa Nui" [Creative Commons]

La rapamicina fue descubierta por primera vez en una muestra de suelo de la Isla de Pascua (Chile), conocida como "Rapa Nui" por los nativos. Este lugar da nombre de manera indirecta a mTOR (*mammalian target of rapamycin*).



Thapsia garganica [Franz Bauer]

3.9.3 Listado de plásmidos

Tabla 3.9. Líneas celulares estables generadas

Nombre	Ab. bacteria	Ab. Mamífero	Origen	Ref.
pBABE IRA	Ampicilina	Higromicina	C.R. Kahn ⁽¹⁾	–
pBABE IRB	Ampicilina	Higromicina		
pBABE LAgT-K1	Ampicilina	Puromicina	J. de Caprio ⁽²⁾	Gjoerup <i>et al.</i> , 2000
pBABE myc-Raptor	Ampicilina	Higromicina	Addgene #18116	Gwinn <i>et al.</i> , 2008
pEGFP-LC3B	Kanamicina	Geneticina	Addgene #11546	Jackson <i>et al.</i> , 2005
pFLAG Rheb-WT	Ampicilina	–	Cheol O. Joe ⁽³⁾	Suk <i>et al.</i> , 2011
pFLAG Rheb-Q64L	Ampicilina	–		
pLKO.1 hygro	Ampicilina	Higromicina	Addgene #24150	Bob Weingber Lab
pLKO.1 neo	Ampicilina	Geneticina	Addgene #13425	Sheila Stewart Lab
pMD2.G	Ampicilina	–	Addgene #12259	Didier Trono Lab
psPAX	Ampicilina	–	Addgene #12260	Didier Trono Lab

(1) Joslin Diabetes Center, Boston, EE.UU. Las secuencias proporcionadas de IRA/IRB fueron clonadas en pBABE

(2) Dana-Farber Cancer Institute, Boston, EE.UU.

(3) Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seúl, Corea del Sur.

3.9.4 Listado de anticuerpos

Tabla 3.10. Listado de anticuerpos primarios

Anticuerpo	Casa comercial (Ref)	Origen	Dilución	Uso
4E-BP1	Cell Signaling (#9452)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-4E-BP1 (Ser ⁶⁵)	Cell Signaling (#9451)	IgG Rabbit	1:1000	WB
ACC	Cell Signaling (#3662)	IgG Rabbit	1:1000	WB
ACC (Ser ⁷⁹)	Cell Signaling (#3661)	IgG Rabbit	1:1000	WB
Antígeno T (H-1)	Santa Cruz 25326	mAb IgG ₁ Mouse	1:1000	WB
Akt	Cell Signaling (#9272)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-Akt (Ser ⁴⁷⁴)	Cell Signaling (#9271)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-Akt (Thr ³⁰⁸)	Cell Signaling (#9275)	IgG Rabbit	1:1000	WB
AMPK α	Cell Signaling (#2352)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-AMPK (Thr ¹⁷²)	Cell Signaling (#2531)	IgG Rabbit	1:1000	WB
ATF4	Santa Cruz (sc-200)	IgG Rabbit	1:200	WB
β -actina (AC-74)	Sigma-Aldrich (A5316)	mAb IgG ₁ Mouse	1:5000	WB
Bax	Santa Cruz (sc-526)	IgG Rabbit	1:500	WB
Bcl-2	Cell Signaling (#2876)	IgG Rabbit	1:1000	WB
Bcl-x (44)	Becton Dickinson (610746)	mAb IgG ₁ Mouse	1:1000	WB
Beclina-1	Santa Cruz (sc-11427)	IgG Rabbit	1:500	WB, IP
BiP (C50B12)	Cell Signaling (#3177)	mAb IgG Rabbit	1:1000	WB
Calnexina (C8.26)	Merck-Millipore (MAB3126)	mAb IgG ₁ Mouse	1:1000	WB
Caspasa-3 activa	Cell Signaling (#9661)	IgG Rabbit	1:1000	WB
C/EBP β	Santa Cruz (sc-150)	IgG Rabbit	1:500	WB

Anticuerpo	Casa comercial (Ref)	Origen	Dilución	Uso
CHOP (B-3)	Santa Cruz (sc-7351)	mAb IgG ₁ Mouse	1:1000, 1:100	WB, IF
cMyc (9E10)	Santa Cruz (sc-40)	mAb IgG ₁ Mouse	1:500	WB, IP
Cox4 (3E11)	Cell Signaling (#4850)	mAb IgG Rabbit	1:200	IHQ, IF
Eif2a	Cell Signaling (#9722)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-Eif2a (Ser ⁵¹) (119A11)	Cell Signaling (#3597)	mAb IgG Rabbit	1:1000, 1:100	WB, IHQ
P-Eif2ak3 (Thr ⁹⁸¹)	Santa Cruz (sc-32577)	IgG Rabbit	1:500	WB
ERK 1/2	Cell Signaling (#9102)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-ERK 1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	Cell Signaling (#9101)	IgG Rabbit	1:1000	WB
FLAG (M2)	Sigma-Aldrich (F1804)	mAb IgG ₁ Mouse	1:1000	WB, IP
FoxO1 (C29H4)	Cell Signaling (#2880)	mAb IgG Rabbit	1:100	IF
P-FoxO1 (Thr ²⁴)	Cell Signaling (#9464)	IgG Rabbit	1:1000	WB
Glucagón	Dako (A0565)	IgG Rabbit	1:500	IF
HA (12CA5)	Roche (11583816001)	mAb IgG ₁ Mouse	1:1000	WB
Hsp60	Enzo Life Sci (SPA-807)	mAb IgG ₁ Mouse	1:5000	WB
Insulina	Dako (A0564)	IgG Guinea pig	1:1000-2000	IF
IR (Cadena β)	Santa Cruz (sc-711)	IgG Rabbit	1:1000	WB, IP
IRS1	Merck-Millipore (06-248)	IgG Rabbit	1:2000	WB
P-IRS1 (Ser ³⁰⁷)	Cell Signaling (#2381)	Rabbit IgG	1:1000	WB
P-IRE1a (Ser ⁷²⁴)	Novus Biologicals (NB100-2323)	IgG Rabbit	1:1000	WB
JNK 1/2	Santa Cruz (sc-571)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-JNK 1/2	Cell Signaling (#9251)	IgG Rabbit	1:1000	WB
LC3B	Cell Signaling (#4108)	IgG Rabbit	1:1000, 1:200	WB, IF
mTOR	Cell Signaling (#2972)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-mTOR (Ser ²⁴⁴⁸)	Life Technologies (441125)	IgG Rabbit	1:1000	WB
Nitrotirosina	Merck-Millipore (06-284)	IgG Rabbit	1:1000, 1:200	WB, IHQ
p53	Santa Cruz (sc-6243)	IgG Rabbit	1:500	WB
p62/SQSTM1	Progen (GP62)	IgG Guinea pig	1:2500, 1:200	WB, IF
Pdx-1	Merck-Millipore (07-696)	IgG Rabbit	1:100	IF
S6 (5G10)	Cell Signaling (#2217)	mAb IgG Rabbit	1:1000	WB
P-S6 (Ser ^{235/236})	Cell Signaling (#2211)	IgG Rabbit	1:1000	WB
S6K	Cell Signaling (#9202)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-S6K (Thr ³⁸⁹)	Cell Signaling (#9205)	IgG Rabbit	1:1000	WB
Raptor	Cell Signaling (#4978)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-Raptor (Ser ⁷⁹²)	Cell Signaling (#2083)	IgG Rabbit	1:1000	WB
Tom20 (F-10)	Santa Cruz (sc-17764)	mAb IgG _{2a} Mouse	1:50	IF
TSC1	Bethyl (BL1601)	IgG Rabbit	1:1000	WB, IP
TSC2	Cell Signaling (#3612)	IgG Rabbit	1:1000	WB, IP
P-TSC2 (Ser ⁶⁶⁴) #1	(Regalo de P.Pandolfi)	IgG Rabbit	1:500	WB
P-TSC2 (Ser ⁶⁶⁴) #2	Bio Legend (635901)	IgG Rabbit	1:200	ICQ

Anticuerpo	Casa comercial (Ref)	Origen	Dilución	Uso
P-TSC2 (Ser ⁹³⁹)	Cell Signaling (#3615)	IgG Rabbit	1:1000	WB
P-TSC2 (Thr ¹⁴⁶²) (5B12)	Cell Signaling (#3617)	mAb IgG Rabbit	1:1000	WB
Ubiquitina (FK2-H)*	Enzo Life Sci (BML-PW0150)	mAb IgG ₁ Mouse	1:1000	WB, IF
Ubiquitina (P4D1)	Cell Signaling (#3936)	mAb IgG ₁ Mouse	1:1000	WB
VDAC	Cell Signaling (#4866)	IgG Rabbit	1:200	IHQ

mAb (monoclonal, detallado clon en el nombre del anticuerpo). WB, *western-blot*; IF, inmunofluorescencia; ICQ, inmunocitoquímica; IHQ, inmunohistoquímica; IP, inmunoprecipitación. (*) Conjugado con peroxidasa

Tabla 3.11. Listado de anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Casa comercial	Conjugado	Dilución	Uso
Sheep anti-rabbit	GE Healthcare (NA931V)	HRP	1:5000	WB
Sheep anti-mouse	GE Healthcare (NA934V)	HRP	1:5000	WB
Rabbit anti-guinea pig	Abcam (ab-6771)	HRP	1:5000	WB
Donkey anti-mouse	Life Technologies (A21203)	Alexa Fluor 594	1:200	IF
Donkey anti-rabbit	Life Technologies (A2120)	Alexa Fluor 594	1:200	IF
Goat anti-rabbit	Jackson (111225008)	Cy2	1:200	IF
Goat anti-mouse	Jackson (115226072)	Cy2	1:200	IF
Donkey anti-rabbit	Jackson (711095152)	FITC	1:200	IF
Donkey anti-mouse	Jackson (715165150)	Cy3	1:200	IF
Donkey anti-mouse	Jackson (715095150)	FITC	1:200	IF
Donkey anti-guinea pig	Jackson (706165148)	Cy3	1:200	WB
Donkey anti-guinea pig	Jackson (706605148)	Alexa Fluor 647	1:5000	WB

4.

Resultados y discusión

4.1

El complejo TSC1-TSC2 como nexo integrador de la señalización energética y de factores de crecimiento

4.1.1 Generación de líneas de célula β fetales

Se generaron líneas celulares a partir de islotes pancreáticos aislados de fetos de ratón (día 17 de gestación). Fueron usados ratones con el exón 4 del receptor de la insulina (IR) flanqueado por secuencias *loxP*, para posteriormente deleccionar *in vitro* el IR con dos objetivos: 1) el estudio de la señalización de la glucosa, de manera independiente a la señalización de insulina y 2) posibilitar la reconstitución específica de las isoformas del IR, para su estudio diferencial.

Tras someter a los islotes a infección retroviral y selección con antibiótico para la obtención de líneas inmortales que expresaran antígeno T de SV40, se obtuvieron diferentes subclones los cuales fueron ensayados para la expresión de marcadores de célula β (*Ins2* e *Iapp*), además se comprobó la expresión de insulina por inmunofluorescencia (Figura 4.1).

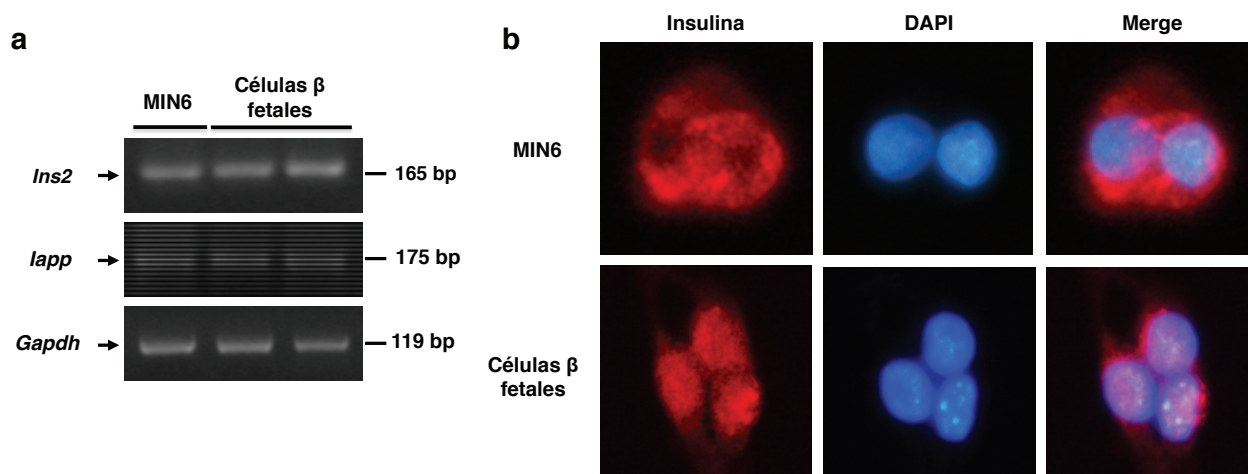


Figura 4.1. Caracterización de la línea de célula β proveniente de islotes fetales.

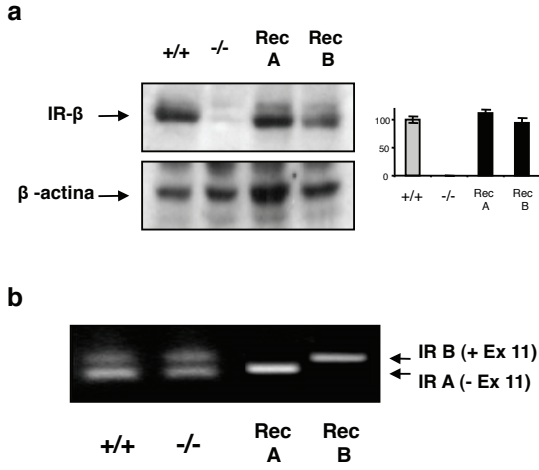
El IR fue deleccionado *in vitro* mediante la expresión, mediada por adenovirus, de *Cre* recombinasa, quedando establecida la línea *IR*^{-/-}. A partir de la línea *IR*^{-/-} se establecieron líneas con la expresión reconstituida de la isoforma A o B del IR (denominadas en adelante Rec A y Rec B). De esta manera quedaron establecidas las cuatro líneas celulares (*IR*^{+/+}, *IR*^{-/-}, Rec A y Rec B), utilizadas en la primera parte de esta tesis.

(a) RT-PCR demostrando la expresión de ARNm de *Ins2*, *Iapp* y *Gapdh* en células β fetales y MIN6 (control positivo).

(b) Inmunofluorescencia frente a insulina (rojo), los núcleos fueron visualizados por tinción con DAPI (azul).

La expresión del IR de las diferentes líneas fue caracterizada por *western-blot* (Figura 4.2, a). Las isoformas del IR se diferencian únicamente por la expresión de un exón adicional en

IR_β (exón 11) Seino y Bell, 1989; siendo ambas isoformas reconocidas de manera similar por anticuerpos. La expresión diferencial de las dos isoformas del IR fue comprobada por RT-PCR (Figura 4.2, b)



La presencia de las proteínas TSC1 y TSC2 en las líneas celulares, así como su asociación física, fue demostrada por inmunoprecipitación y *western-blot* (Figura 4.3, a). TSC1-TSC2 funcionan como regulador negativo de mTORC1 y de la síntesis proteica. Para comprobar si el estado energético de la célula modulaba los niveles de las proteínas TSC1 o TSC2, se privó a las células de suero y glucosa, y se las comparó con células control en crecimiento exponencial, no observándose cambios entre ambas condiciones (Figura 4.3, b).

Figura 4.2. Expresión del receptor de insulina en las diferentes líneas celulares. (a) *Western-blot* frente a la cadena β del IR. Presente en todas las líneas menos en la IR^{-/-}. A la derecha se representan los resultados de la cuantificación densitométrica (IR-β corregido por β actina) de los resultados de 5 experimentos independientes. (b) Análisis por RT-PCR de la expresión a nivel de ARNm, del exón 11 del IR. La líneas IR^{+/+} e IR^{-/-} expresan el ARNm de las dos isoformas del IR (IR_A, sin exón 11; IR_β, con exón 11). Pero en el caso de la línea IR^{-/-}, el IR no se traduce correctamente. Las líneas Rec A y Rec B solo expresan selectivamente una de las isoformas.

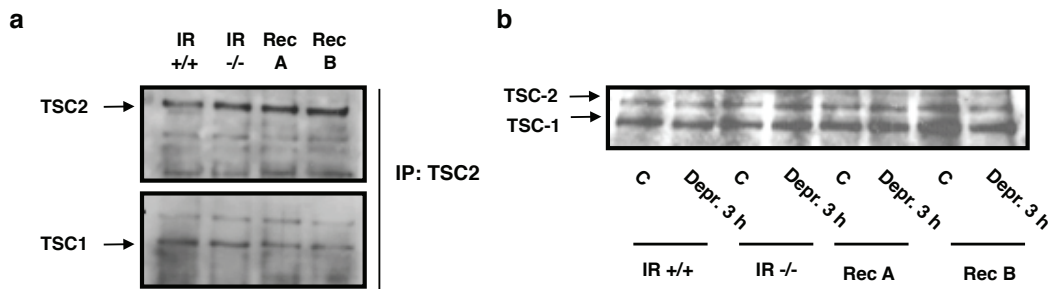


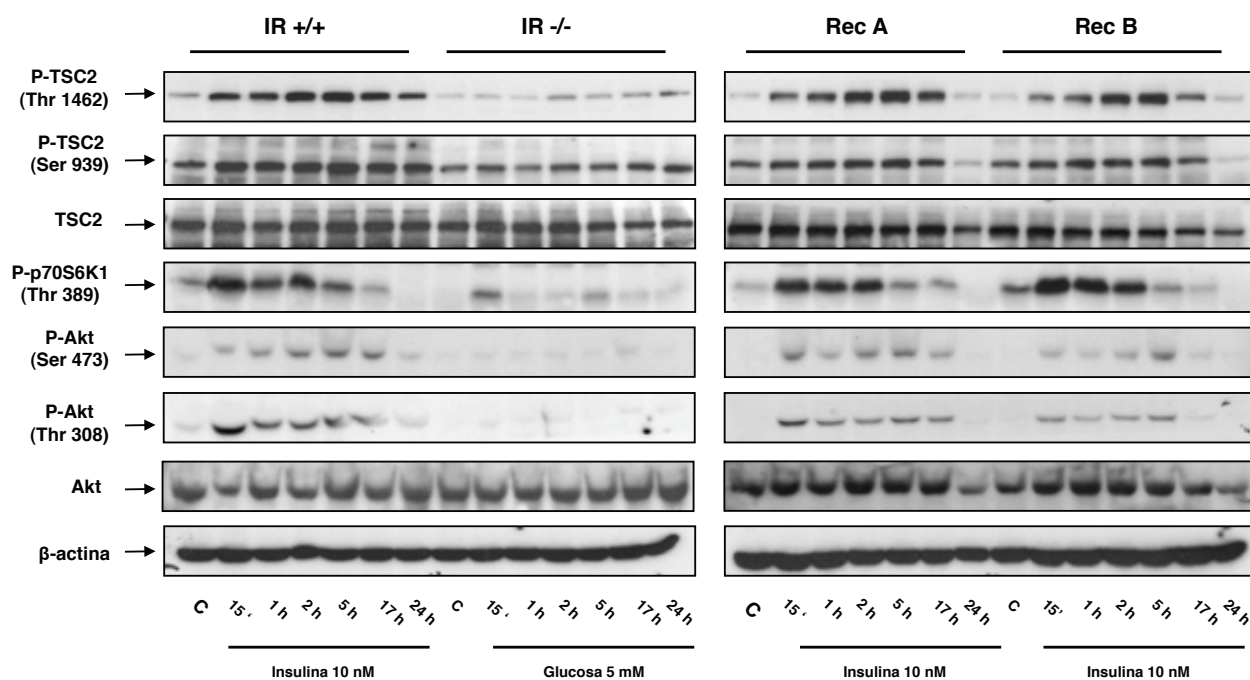
Figura 4.3. El complejo TSC1-TSC2 en célula β. (a) Asociación entre TSC1 y TSC2, por IP de TSC2, y *western-blot* frente a TSC1. (b) Niveles de TSC1 y TSC2 en condiciones basales, y tras deprivación de suero y glucosa durante 6 h.

4.1.2 Estimulación de la ruta TSC/mTORC1 por la vía PI3K/Akt

Para examinar el efecto de la insulina sobre el complejo TSC1-TSC2, y la actividad mTORC1, se sometió a las líneas celulares a un tratamiento con insulina 10 nM, a diferentes tiempos. La estimulación con insulina llevó a la activación de la ruta PI3K, y la fosforilación dependiente de PDK1 de Akt en Thr³⁰⁸. De manera paralela, la insulina activa a mTORC2, y se produce la completa activación de Akt por fosforilación en Ser⁴⁷³ (Sarbasov *et al.*, 2005). Ambas fosforilaciones aparecieron paralelas en las líneas con IR (IR^{+/+}, Rec A y Rec B), aunque comparando las líneas Rec A y Rec B, la fosforilación de Akt en Rec A fue más duradera en el tiempo. La estimulación con glucosa 5 mM en las células β IR^{-/-} no activó la ruta PI3K, ni mTORC2 (Figura 4.4).

Akt fosforila directamente a TSC2 en Thr¹⁴⁶² y Ser⁹³⁹ (Inoki *et al.*, 2002). Tras la estimulación con insulina, la fosforilación de estos residuos fue paralela a la activación de Akt. La fosforilación de TSC2 no se pierde hasta después de 15 h, a la vez que la de Akt. La glucosa no estimuló la fosforilación de estos residuos de TSC2.

La actividad de mTORC1, resultante de la fosforilación de TSC2 y de la inactivación del complejo TSC, se comprobó por la fosforilación de S6K1 en Thr³⁸⁹. En todas las líneas tratadas con insulina hubo estimulación de S6K, con un máximo a los 15 min, y mantenida hasta las 15 h. En la línea *IR*^{-/-}, la glucosa también fue capaz de estimular a S6K (Figura 4.4).



Para comprobar que estas acciones eran selectivas de la vía de PI3K, se repitió el experimento de estimulación con insulina, con el uso de inhibidores, y a un tiempo fijo de 5 min. La estimulación con glucosa de las células *IR*^{-/-} fue de 15 min.

Las fosforilaciones de TSC2 en Thr¹⁴⁶² y Ser⁹³⁹ resultaron específicas de la ruta PI3K/Akt. La adición de U0126, inhibidor específico de MEK 1/2, no modificó la fosforilación de TSC2 en los residuos mencionados. Sin embargo, la wortmanina, un inhibidor específico e irreversible de la subunidad catalítica p110 de PI3K, inhibió la activación de Akt (ausencia de fosforilación tanto en Thr³⁰⁸ como en Ser⁴⁷³) y por ende, la fosforilación de TSC2 en los residuos que dependen de esta vía. La estimulación con glucosa en la línea *IR*^{-/-}, de nuevo no produjo fosforilación de Akt o TSC2 en Thr¹⁴⁶²/Ser⁹³⁹ (Figura 4.5).

A nivel de la fosforilación de Akt, hubo diferencias significativas entre las líneas Rec A y Rec B. Mientras que la fosforilación de Akt-Ser⁴⁷³, mediada por insulina a través del IR_B, se inhibió completamente con wortmanina 40 nM, esta fosforilación no fue completamente abolida por el mismo inhibidor en la línea que expresa IR_A. La fosforilación de Akt se

Figura 4.4. Curva de tiempo de la fosforilación de TSC2.

Células en crecimiento exponencial fueron privadas durante 3 h de suero y de glucosa, y subsiguientemente estimuladas con insulina 10 nM o bien glucosa 5 mM. Se realizó una curva de tiempo entre 0-24 h. Los extractos proteicos fueron recogidos y sometidos a SDS-PAGE. Los resultados se obtuvieron por *western-blot* mediante el uso de anticuerpos específicos.

siguió correlacionando con la de TSC2. Estos resultados contradicen lo que estaba descrito anteriormente respecto a las isoformas del IR (Leibiger *et al.*, 2001). La insulina estimuló tanto la señalización por la vía PI3K/Akt, como de la ruta de MEK/ERK, ya que se observa fosforilación de ERK 1/2, que solo es inhibida por U0126. Ambas vías son estimuladas en líneas que expresan tanto IR_A como IR_B.

Tanto la activación de S6K como la inactivación de 4E-BP1, ambas por fosforilación mediada por mTORC1, fueron inducidas por la estimulación con insulina en las líneas con IR, o por glucosa en las células IR^{-/-}. La inhibición de MEK 1/2 con U0126 no redujo en gran medida la activación de S6K, pero si se vio significativamente disminuida por el bloqueo de la ruta de PI3K con wortmanina. Al igual que pasa con Akt-Ser⁴⁷³, la disminución de la fosforilación de S6K-Thr³⁸⁹ por la adición de inhibidores, no es completa en la línea Rec A pero si en la Rec B (Figura 4.5).

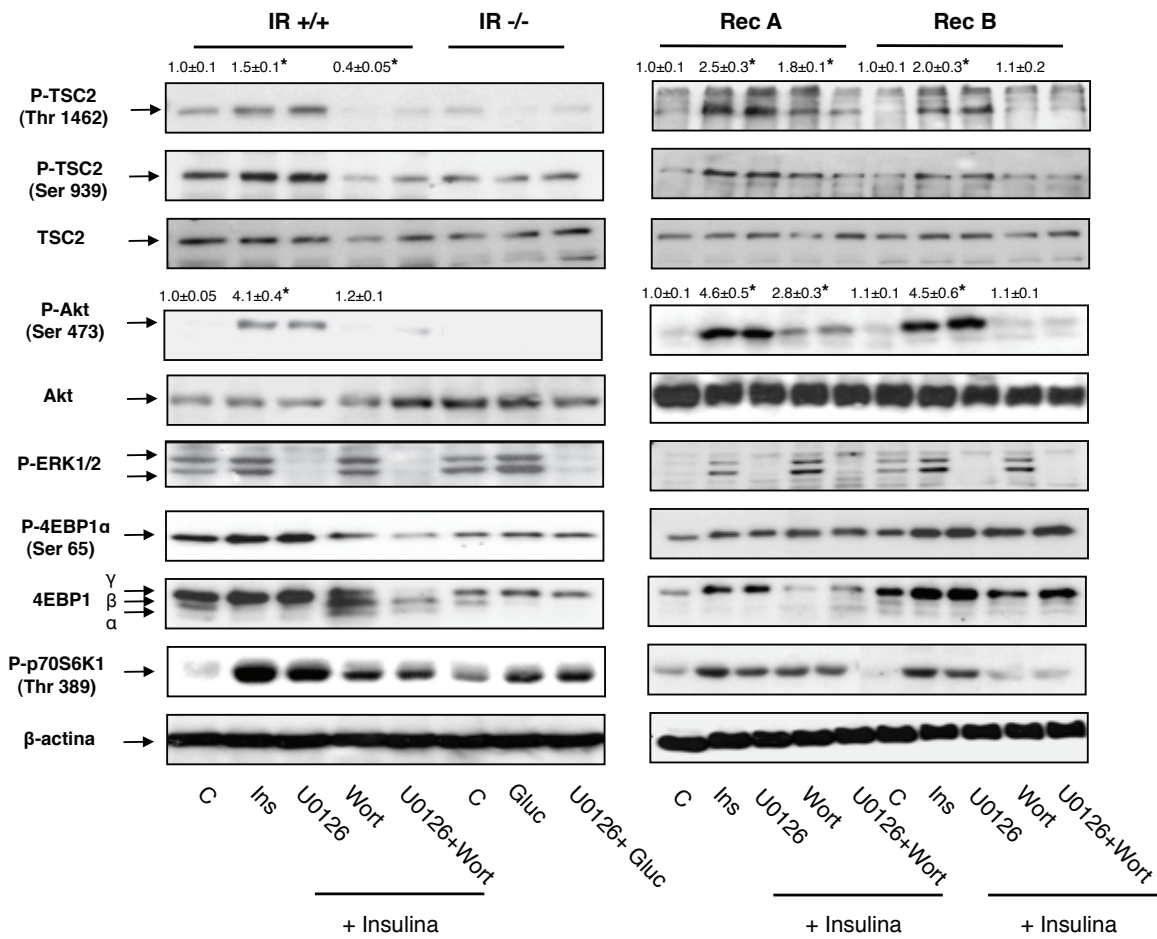


Figura 4.5. Insulina y glucosa sobre la ruta PI3K/TSC/mTORC1.

Células en crecimiento exponencial fueron deprivadas durante 3 h de suero y de glucosa. Los inhibidores fueron añadidos 30 min antes de las estimulaciones, que fueron de 5 min para la insulina 10 nM (en IR^{+/+}, Rec A y Rec B), y de 15 min para la glucosa 5 mM (en IR^{-/-}). Los extractos proteicos se sometieron a western-blot y fueron incubados con anticuerpos específicos. (Wort: wortmanina 40 nM; U0126 5 μM). Los blots son representativos de al menos tres experimentos independientes. La cuantificación de los puntos más representativos (control, Insulina, Insulina más wortmanina) es mostrada, los datos reflejan la media ± s.d. *, P < 0.05 comparado al punto control.

4.1.3 Acción de la glucosa sobre ERK 1/2 y TSC2

En un trabajo anterior, nuestro grupo había comprobado como la glucosa es capaz de estimular a ERK 1/2 y S6K en célula β de manera independiente de la insulina (Guillen *et al.*, 2006). Se quiso demostrar que la activación por glucosa de la ruta mTORC1/S6K se produce a través de dos vías que confluyen en el complejo TSC1-TSC2: la inhibición de la AMPK, y otra dependiente directamente de ERK.

Para comprobar la acción específica de la glucosa sobre la fosforilación de TSC2 en célula β pancreática, se propusieron varios abordajes. El primero fue el análisis por *western-blot*, de la fosforilación del residuo TSC2 Ser⁶⁶⁴ en células *IR*^{-/-} en respuesta a glucosa. Para ello se utilizó un anticuerpo fosfoespecífico, generado en el laboratorio de Pier Paolo Pandolfi (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA), y cortesía del mismo (Ma *et al.*, 2007). El anticuerpo fue generado por inmunización con un péptido que contenía la secuencia humana para la región próxima al residuo Ser⁶⁶⁴, pero dada la alta conservación de esta región entre diferentes especies, su uso en ratón parecía viable (Figura 4.6, a). Los resultados demostraron que la glucosa es capaz de estimular la fosforilación de TSC2-Ser⁶⁶⁴ en la línea *IR*^{-/-}, y que un inhibidor de MEK 1/2, como U0126, inhibe dicha fosforilación (Figura 4.6, b).

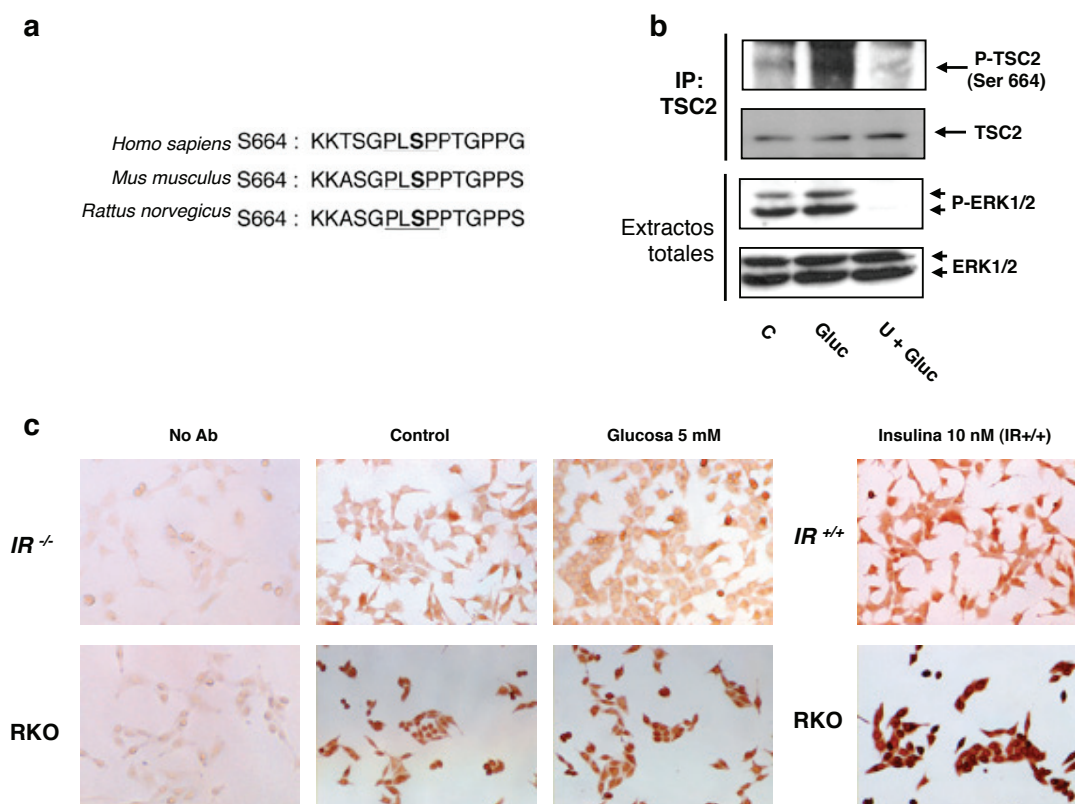


Figura 4.6. Fosforilación de TSC2-Ser⁶⁶⁴.

(a) Conservación de la región próxima a TSC2-Ser⁶⁶⁴ en ratón, rata y humano.

(b) Células deprivadas 3 h de suero y glucosa fueron estimuladas con glucosa 5 mM, durante 5 min. El inhibidor U0126 5 μ M se añadió 30 min antes del estímulo. Con los extractos proteicos se realizó una IP frente a TSC2, y WB frente a TSC2-Ser⁶⁶⁴. Se muestran *blots* representativo.

(c) Células creciendo en cultivo fueron deprivadas 3 h de suero y glucosa, y se les estimuló durante 15 min con glucosa 5 mM (Células *IR*^{-/-}, RKO) o insulina 10 nM (Células *IR*^{+/+}, RKO). Las células fueron sometidas a inmunocitoquímica con un anticuerpo que reconoce el residuo TSC2-Ser⁶⁶⁴ fosforilado.

El siguiente abordaje, fue el uso de otro anticuerpo fosfoespecífico para TSC2-Ser⁶⁶⁴ de humano, pero que solo reconoce el residuo fosforilado en la conformación nativa de la proteína, por lo que su uso para *western-blot* resultaba inviable. Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica sobre células β pancreáticas en cultivo. Como control se llevó en paralelo la línea RKO, derivada de carcinoma colorrectal humano. La glucosa fue capaz de estimular la fosforilación de TSC2-Ser⁶⁶⁴, aunque la estimulación de la vía ERK-TSC2 fue más clara tras la adición de insulina. Esto mismo se observó aún con más intensidad en las células RKO (Figura 4.6, c).

4.1.4 Modulación de la ruta mTORC1 por el estado energético de la célula

AMPK es el sensor energético celular, es una quinasa activada por un aumento en el ratio AMP/ATP. Observaciones previas en células HEK293 demostraron que la activación de AMPK por un bajo estado energético, producía una inhibición de mTORC1 mediada por TSC2 (Inoki *et al.*, 2003b). AMPK es además capaz de fosforilar Raptor, proteína que forma parte del complejo mTORC1, y cuya fosforilación produce la inactivación del complejo (Gwinn *et al.*, 2008). Estas observaciones aún no habían sido reproducidas en célula β pancreática, donde AMPK tiene un papel clave en el control de la secreción de insulina, proliferación y supervivencia.

Los datos obtenidos demostraron como la privación de glucosa es capaz de activar AMPK en célula β pancreática. Esta activación fue mayor aún al tratar con 2dG (2-deoxiglucosa), un análogo no metabolizable de la glucosa que impide la glucólisis y aumenta el ratio AMP/ATP intracelular, lo cual activa fuertemente a AMPK. Los resultados se repitieron estimulando con AICAR, un análogo sintético de AMP que también estimula AMPK. La activación de AMPK se tradujo en una mayor fosforilación de Raptor-Ser⁷⁹², y en la pérdida de la señalización de mTORC1/S6K, que fue total con 2DG o AICAR (Figura 4.7, a).

Comparando las cuatro líneas celulares, destaca la baja activación de la AMPK por 2dG en la línea *IR*^{-/-}, comparado con las líneas con receptor de insulina (*IR*^{+/+}, Rec A y Rec B). Como era de esperar, la adición de 2dG se tradujo en la inhibición de la vía mTORC1/S6K en todas las líneas estudiadas. La estimulación con glucosa tuvo un efecto contrario, inhibiendo a AMPK y activando mTORC1/S6K. La insulina es capaz de activar esta vía más aún, incluso en presencia de un alto estatus energético (Figura 4.7, b).

El estrés energético es capaz de modular positivamente la fosforilación de TSC2. Sin embargo, y al contrario que las fosforilaciones en Thr¹⁴⁶² y Ser⁹³⁹ mediadas por Akt (Inoki *et al.*, 2002), AMPK es capaz de fosforilar a TSC2 en Thr¹²²⁷ y Ser¹³⁴⁵ (Inoki *et al.*, 2003b). Al no existir anticuerpos fosfoespecíficos para estos residuos observamos el cambio de movilidad producido por la activación de AMPK, mediante tratamiento con 2dG. Esta disminución de movilidad es debida a fosforilación de TSC2, ya que el tratamiento de las muestras con fosfatasa λ lo revirtió (Figura 4.7, c).

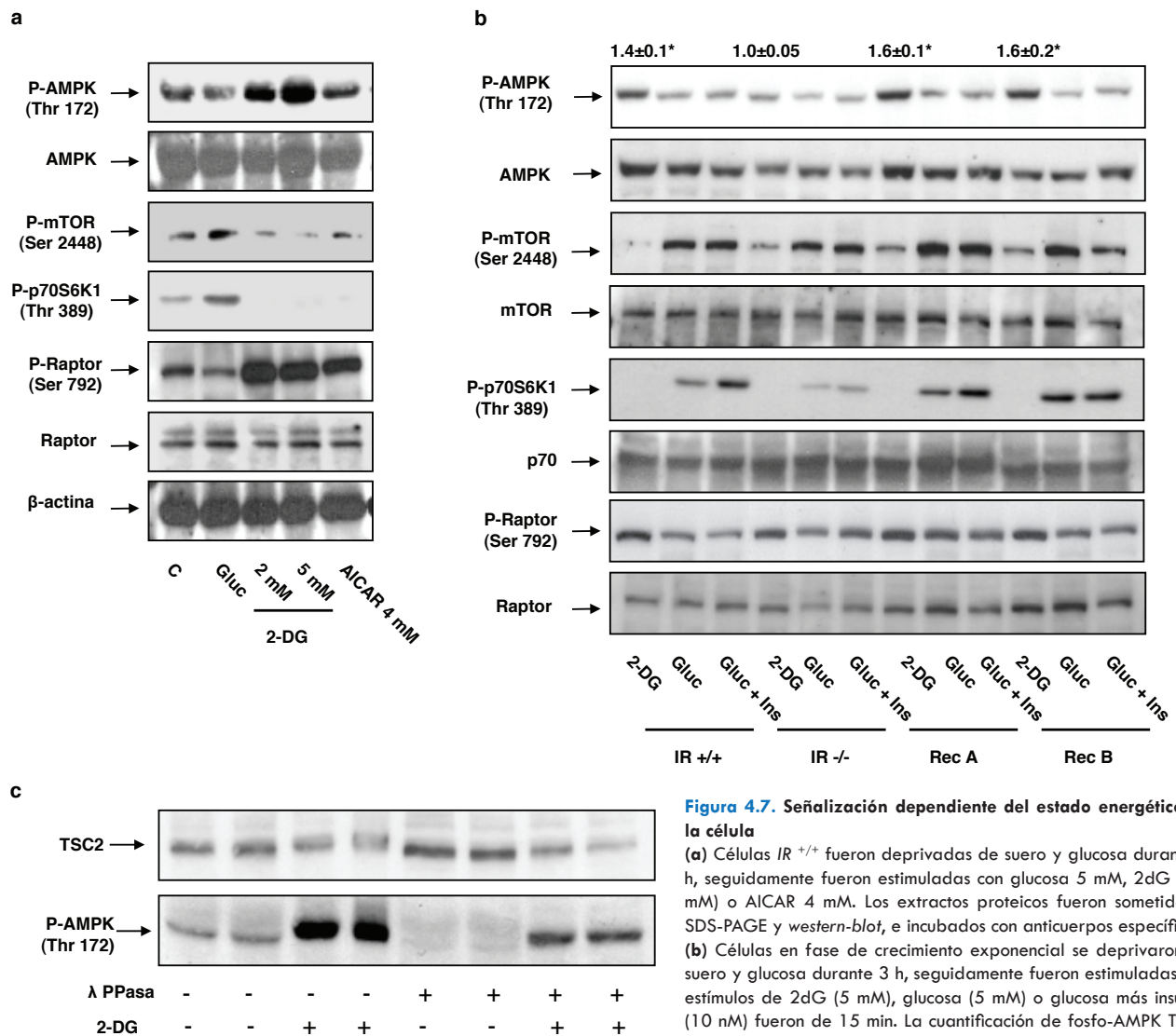


Figura 4.7. Señalización dependiente del estado energético de la célula

(a) Células *IR*^{+/+} fueron privadas de suero y glucosa durante 3 h, seguidamente fueron estimuladas con glucosa 5 mM, 2dG (2-5 mM) o AICAR 4 mM. Los extractos proteicos fueron sometidos a SDS-PAGE y *western-blot*, e incubados con anticuerpos específicos. (b) Células en fase de crecimiento exponencial se privaron de suero y glucosa durante 3 h, seguidamente fueron estimuladas. Los estímulos de 2dG (5 mM), glucosa (5 mM) o glucosa más insulina (10 nM) fueron de 15 min. La cuantificación de fosfo-AMPK Thr¹⁷² en las diferentes líneas celulares se encuentra indicada. Los datos se presentan como medias \pm s.d. *, $P < 0.05$, comparado al resultado de *IR*^{-/-}. Los *blots* son representativos de tres experimentos independientes. (c) Células *IR*^{+/+} creciendo exponencialmente fueron estimuladas o no con 5 mM 2dG por 15 min, extractos proteicos fueron recogidos y una parte tratados con fosfatasa- λ . Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE e incubadas con anticuerpos específicos.

4.1.5 Interferencia de *Tsc2* en célula β pancreática

Para comprobar la importancia de TSC2, tanto en regulación de la señalización, como en su papel en la proliferación de célula β pancreática, nos propusimos interferir su expresión. Para ello se transfectó la línea *IR*^{+/+} con diferentes ARNi frente a *Tsc2*. Utilizando la misma cantidad de ARNi en todos los casos, se probaron 3 ARNi diferentes, o una combinación de los 3, siendo esta última la más efectiva. Mediante *western-blot* frente a TSC2 se cuantificaron niveles de interferencia. Se obtuvo una disminución de TSC2 superior al 70%. La interferencia fue igual de efectiva tras 24 y 48 h de transfección, todos los experimentos subsiguientes comenzaron 24 h después de la transfección.

En la línea *IR*^{+/+} transfectada con diferentes ARNi, se observó un aumento de la actividad basal de mTORC1 cuantificada por fosforilación en mTOR-Ser²⁴⁴⁸ o S6K-Thr³⁸⁹. Dicho aumento de la señalización fue proporcional a la delección de la proteína TSC2. La interferencia de *Tsc2* no tuvo efectos sobre los niveles de la proteína TSC1, con la que forma complejo (Figura 4.8).

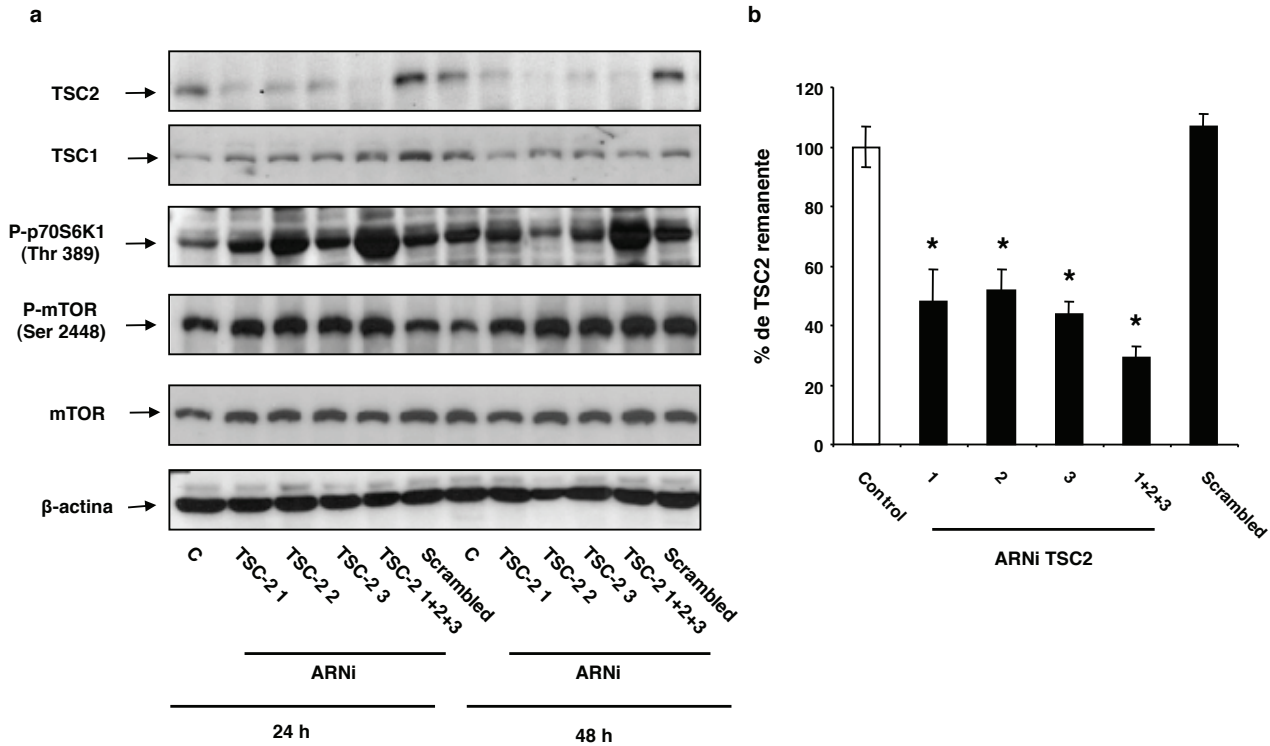


Figura 4.8. Interferencia de la expresión de Tsc2 con diferentes ARNi

(a) Las células fueron transfectadas de un único ARNi frente a *Tsc2*, o una combinación de esos (*Tsc2-1*, *Tsc2-2* y *Tsc2-3*), y posteriormente sembradas. Un ARNi *scrambled* fue usado como control. Tras 24 o 48 h se recogieron los extractos proteicos y se analizaron por western-blot.

(b) Análisis densitométrico de tres experimentos independientes sobre el nivel de interferencia alcanzado sobre la expresión de la proteína TSC2. Los datos son medias ± s.d. *, *P* < 0.05 comparado al control (ARNi *scrambled*).

El siguiente paso fue interferir la expresión de *Tsc2* en las cuatro líneas celulares, y ver la respuesta de estas a la estimulación con insulina o glucosa, y como diferentes inhibidores farmacológicos interferían en su señalización en estas circunstancias. Se alcanzó un grado similar de interferencia en las cuatro líneas estudiadas (Figura 4.9, b). La interferencia de *Tsc2* causó un aumento de la señalización de mTORC1, lo cual se reflejó en un aumento de la fosforilación de S6K en condiciones basales (Figura 4.9, a). Aunque inesperadamente la hiperactividad basal hizo que la fosforilación de S6K fuera más susceptible de ser inhibida con el uso de agentes farmacológicos (wortmanina, U0126, rapamicina).

A este nivel, la interferencia de *Tsc2* produjo resistencia a la insulina en célula β, posiblemente mediado por los mecanismos de retroalimentación negativa que existen para frenar una sobreactivación de mTORC1 (Um *et al.*, 2004). Tal y como se ve reflejado en los paneles (Figura 4.9, a), o en la cuantificación del nivel de estimulación de Akt Ser⁴⁷³ (Figura 4.9, d), la estimulación con insulina no consiguió elevar la fosforilación de Akt en la línea *IR*^{+/+}, ni en la línea que expresa *IR_B* (Rec B) cuando la expresión de *Tsc2* está interferida. Sorprendentemente, la expresión específica del *IR_A* en la línea Rec A, es capaz de salvar el efecto de la interferencia de *Tsc2*, y la estimulación de Akt sigue produciéndose tras la adición de insulina (Figura 4.9, a, d).

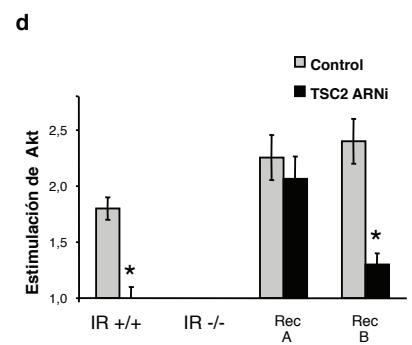
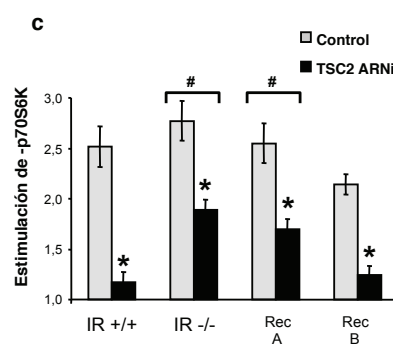
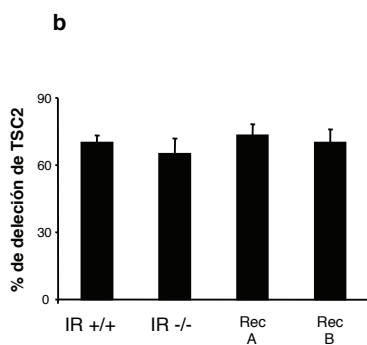
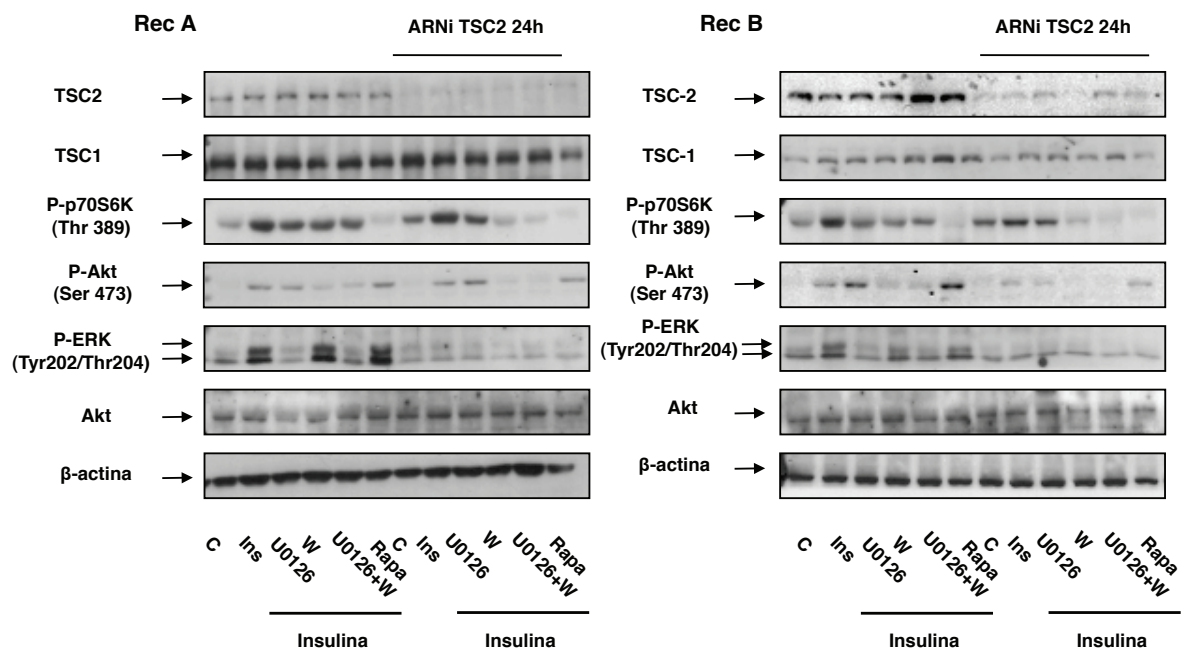
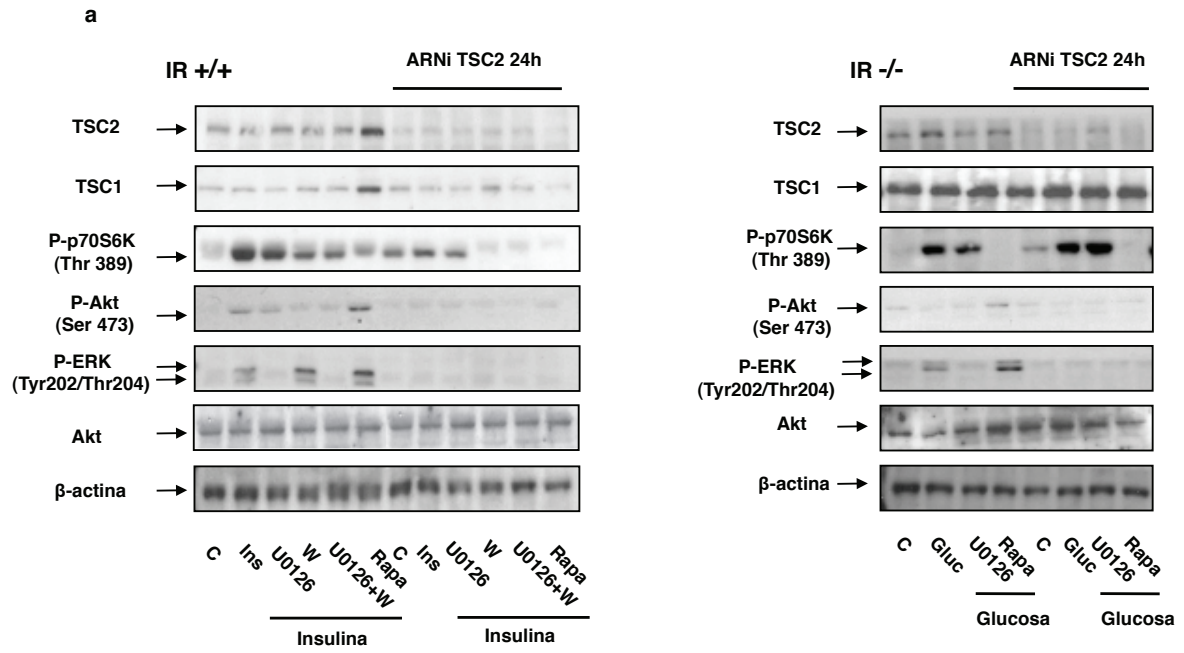
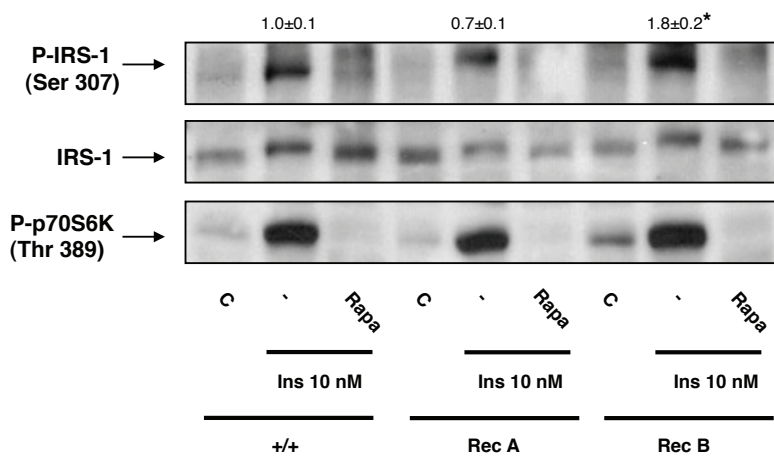


Figura 4.9. (página anterior) **Interferencia de TSC2 y su efecto en la señalización de insulina y glucosa en las cuatro líneas celulares.**
(a) 24 h tras la transfección con ARNi frente a *Tsc2*, las células fueron estimuladas con insulina 10 nM (*IR*^{+/+}, Rec A y Rec B) durante 5 min, o glucosa 5 mM durante 15 min (*IR*^{-/-}, panel superior derecho). Los inhibidores específicos (wortmanina 40 nM, U0126 5 μM o rapamicina 40 nM) fueron añadidos 30 min antes de la estimulación. Se recogieron los extractos proteicos y los resultados se obtuvieron mediante *western-blot* e incubación con anticuerpos específicos. Los *blots* son representativos de cuatro experimentos independientes.
(b) Representación de los niveles de interferencia de TSC2 alcanzados, mediante análisis densitométrico.
(c) Nivel de estimulación (incremento de señal por densitometría) de la fosforilación de S6K Thr³⁸⁹ tras la adición de insulina. *, *P* < 0.05 comparado con cada control, #, *P* < 0.05 comparando las diferencias en el ratio de estimulación entre células control/interferencia de *Tsc2*, respecto a la línea *IR*^{+/+}.
(d) Nivel de estimulación (incremento de señal por densitometría) de la fosforilación de Akt Ser⁴⁷³ tras la adición de insulina. Los datos son medias ± s.d. *, *P* < 0.05 comparado con cada control.

Por otro lado, la interferencia de *Tsc2* también se tradujo en una menor estimulación de S6K por insulina, ya que los niveles basales se encuentran aumentados y la pérdida de *Tsc2* supone hacer a la ruta mTORC1/S6K independiente, en buena parte, de factores de crecimiento. Aún así, la estimulación con insulina en la línea Rec A siguió siendo capaz de aumentar la fosforilación de S6K Thr³⁸⁹, aunque esta estimulación solo se recuperó parcialmente, y no en su totalidad como resultó con Akt. De igual forma, la glucosa en la línea *IR*^{-/-} fue capaz de ejercer una estimulación de S6K de manera independiente a *Tsc2*, aunque de nuevo ésta fue bastante menor que en las condiciones control (Figura 4.9, a, c). Por último encontramos que la estimulación de ERK 1/2 quedó completamente abolida tras interferir *Tsc2*, algo que aún no había sido descrito en ningún tipo celular. Curiosamente la presencia de *Tsc2* parece ser necesaria para que ERK 1/2 sea estimulado, pues ni siquiera el tratamiento con rapamicina consiguió recuperar la estimulación mediada por insulina. En este caso, ni siquiera la expresión de *IR_A* fue capaz de recuperar la estimulación de ERK 1/2 (Figura 4.9, a).



Para profundizar en las diferencias entre la expresión de *IR_A* o *IR_B* y la resistencia a la insulina, se estimularon células 15 min con insulina 10 nM, y se observó una modulación diferente de la fosforilación de IRS1-Ser³⁰⁷. Esta fosforilación es mediada por S6K (Um *et al.*, 2004), y fue regulada positivamente en la línea Rec B en comparación con las líneas Rec A o *IR*^{+/+}, y revertida con rapamicina (Figura 4.10).

Figura 4.10. Fosforilación en IRS-1 Ser³⁰⁷ es diferentemente activada dependiendo de la isoforma del IR. Células fueron deprivadas de suero y glucosa durante 3 h, y estimuladas con insulina 10 nM, 15 min. La rapamicina 40 nM fue añadida 30 min antes de la estimulación. Los *blots* son representativos de 3 experimentos independientes. Los datos son medias ± s.d. **P* < 0.05 comparado con la línea *IR*^{+/+}.

4.1.6 Efecto de la interferencia de TSC2 sobre la proliferación de célula β

Para evaluar el ritmo proliferativo y el papel jugado por mTORC1 en célula β, se plantearon diferentes ensayos complementarios. Mediante conteo de células, fue descrito el diferente ritmo proliferativo de las 4 líneas celulares, en presencia o ausencia de rapamicina. La línea

reconstituida con IR_A (Rec A) muestra un ritmo proliferativo mayor que la reconstituida con IR_B (Rec B), siendo esta última muy similar a la $IR^{+/+}$. La línea sin receptor de insulina $IR^{-/-}$ muestra el ritmo proliferativo más bajo. En todas las líneas, la adición de rapamicina disminuye la proliferación celular (Figura 4.11, a-b).

A la hora de estudiar el efecto de la interferencia de *Tsc2*, se analizó el ciclo celular por citometría de flujo, y el número de células indirectamente por tinción con cristal violeta (Figura 4.11, c-d). En todas las líneas celulares transfectadas con ARNi frente a *Tsc2* aumentó la proliferación, observado por ambas técnicas. Los histogramas de citometría no mostraron apoptosis en ninguna condición estudiada. Por último, la rapamicina revertió el incremento proliferativo observado tras interferir *Tsc2*, lo cual indica que el efecto es mediado por la hiperactivación de mTORC1.

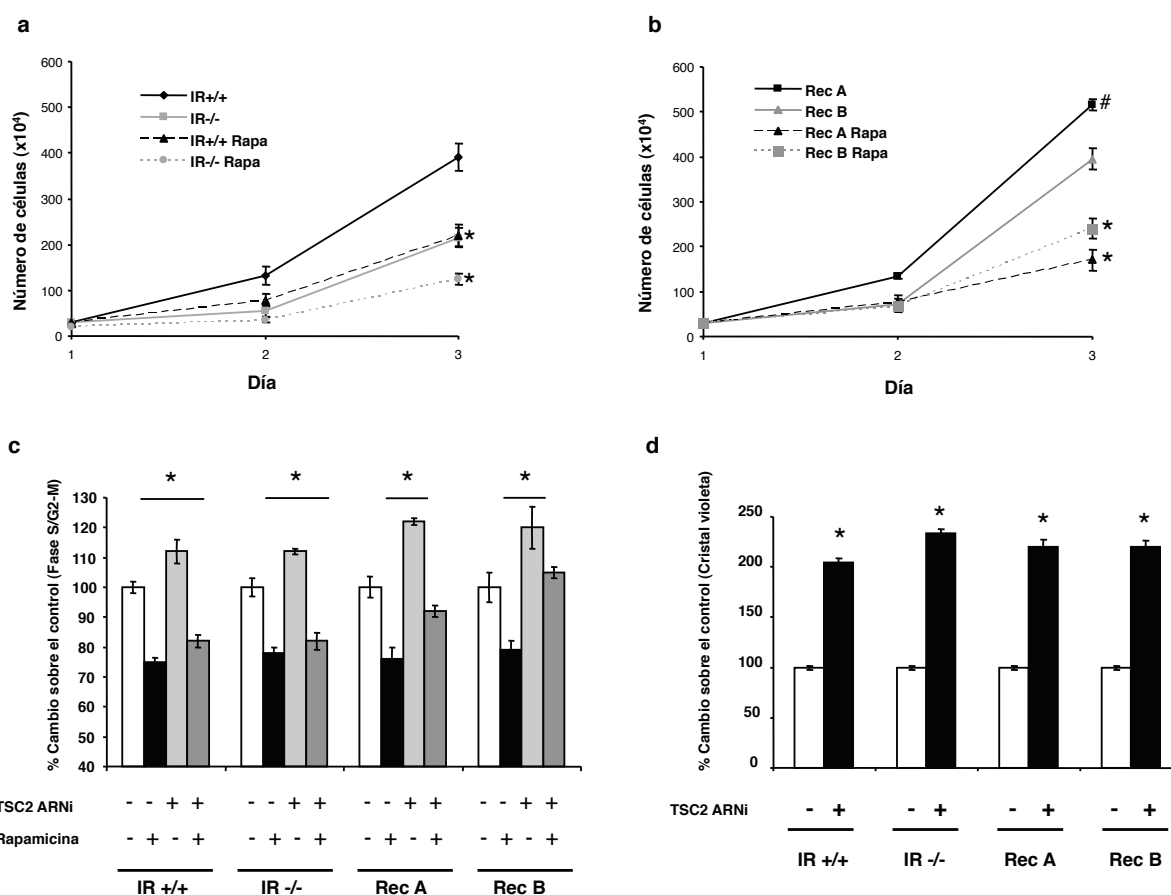


Figura 4.11. Efecto de la inhibición o la hiperactivación de mTORC1 sobre la proliferación de célula β .

(a) Células $IR^{+/+}$ e $IR^{-/-}$ fueron contadas y sembradas a la misma densidad, y crecidas en medio con 10% FBS, en presencia o ausencia de rapamicina 40 nM. Las células fueron contadas a las 24 y 48 h.

(b) Mismo experimento pero para células Rec A y Rec B. Los resultados reflejan las medias \pm s.d. (n=3). *, $P < 0.05$ comparado a los controles, #, $P < 0.05$ comparado con la línea Rec B.

(c) Células a las que se interfirió la expresión de *Tsc2* y células control fueron crecidas en medio con 10% FBS durante 24 h, en presencia o ausencia de rapamicina 40 nM. El contenido celular de ADN fue cuantificado por citometría de flujo, de la manera descrita en *material y métodos*. Las barras muestran la cantidad de células proliferativas (en fase S/G₂-M) respecto a los controles.

(d) Células a las que se interfirió la expresión de *Tsc2* y células control fueron sembradas a la misma densidad. Tras 24 y 48 h se cuantificó la tinción por cristal violeta. Las diferencias de absorbancia respecto a los controles están reflejadas en las barras, expresando medias \pm s.d. (n=3). *, $P < 0.05$ comparado con los controles.

4.1.7 Discusión

Modelos animales han puesto de manifiesto el papel del complejo TSC1-TSC2 como represor de la actividad de mTORC1 y su importancia en el control de la masa de célula β pancreática. Animales con delección de *Tsc1* o *Tsc2* de forma específica en célula β muestran aumento de masa de célula β , hiperinsulinemia e hipoglucemia (Rachdi *et al.*, 2008; Shigeyama *et al.*, 2008; Mori *et al.*, 2009b). De forma similar, el modelo que sobreexpresa Rheb en célula β , pierde la regulación mediada por TSC2 y como consecuencia muestra una masa de célula β aumentada (Hamada *et al.*, 2009). El papel de mTORC1 sobre la masa de célula β en humanos también queda patente; la progresiva pérdida de función de célula β fue observada en pacientes recipiente de trasplante de islotes y posteriormente tratados con rapamicina como inmunosupresor (Desai *et al.*, 2003; Zahr *et al.*, 2007).

En un trabajo previo se demostró como insulina y glucosa, de forma independiente, son capaces de inducir proliferación en célula β de origen fetal (Guillen *et al.*, 2006). Y aquí se ha tratado el mecanismo de la integración de ambas señales para la regulación de mTORC1 y proliferación celular. Nuestro trabajo se basó en observaciones sobre líneas celulares β pancreáticas, con una diferente expresión del IR. Las células β *IR*^{-/-}, son una herramienta que permitió estudiar la señalización de la glucosa de manera independiente a la de insulina. Por otro lado, para el estudio de la señalización de la insulina, contamos con tres líneas celulares: *IR*^{+/+}, y las líneas celulares derivadas de *IR*^{-/-}, con la expresión reconstituida de la isoforma A o B del IR (Rec A y Rec B).

La estimulación con insulina media la fosforilación de TSC2 de manera dependiente de PI3K/Akt, llevando a una menor actividad GAP de TSC2 frente a Rheb, lo cual se traduce en mayor actividad de mTORC1 (Inoki *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002; Inoki *et al.*, 2003a). La fosforilación de TSC2 llevó a su vez a un aumento de la fosforilación en las dianas de mTORC1 S6K y 4E-BP1. Además, se encontró que la insulina fue capaz de estimular las vías PI3K/Akt y Ras-MAPK tanto en células expresando *IR*_A como *IR*_B. Estos resultados descartan suposiciones previas que argumentaban sobre la acción de *IR*_A e *IR*_B a través de diferentes vías (Leibiger *et al.*, 2001; Uhles *et al.*, 2007). Aún así, se encontraron diferencias entre las líneas Rec A y Rec B, al inducir la insulina una fosforilación más prolongada de dianas de la señalización de la insulina en células que expresaron *IR*_A, y además la fosforilación de Akt o TSC2 no fue completamente bloqueada por wortmanina en la línea Rec A.

Las diferencias observadas entre la señalización a través de *IR*_A e *IR*_B, indican, no vías de señalización independientes, sino una diferente potencia. El trabajo de Leibiger y colaboradores analizaba la señalización diferencial de las 2 isoformas del IR en célula β , concluyendo que la estimulación de *IR*_A mediaba la transcripción del gen de la insulina, y el de *IR*_B la transcripción del gen de la glucoquinasa (Leibiger *et al.*, 2001). Según este trabajo, *IR*_A señala a través de PI3K de clase Ia y S6K, mientras que *IR*_B ejerce su acción a través de PI3K de clase II y Akt. Estos resultados se contradicen con los aquí mostrados, ya que tanto *IR*_A como *IR*_B son capaces de señalar a través de PI3K/Akt/TSC/mTORC1/S6K, además de a través de la ruta Ras-MAPK. Sin embargo, es posible que las diferencias observadas entre ambas

isoformas puedan deberse a una señalización preferente a través de diferentes isoformas de PI3K.

Esta descrito que la PI3K de clase Ia presenta una CI_{50} de 1-10 nM para la wortmanina, mientras que la CI_{50} de la PI3K de clase II, para el mismo compuesto es al menos 5 veces mayor; 50 nM para la PI3K-C2 β , y 500 nM para PI3K-C2 α . Por otro lado, la CI_{50} de las PI3K para LY294002, otro inhibidor usado en muchos estudios, es en PI3K clase Ia 6.5 μ M, PI3K-C2 α 7.3 μ M y para PI3K-C2 β 23.1 μ M (Fruman *et al.*, 1998). Más importante aún, y algo tenido en cuenta en muy pocos trabajos, es que los inhibidores de PI3K son capaces de inhibir la actividad quinasa de mTOR, cuya CI_{50} para wortmanina es de 200 nM, y para LY294002 de 3 μ M (Brunn *et al.*, 1996) **Tabla 4.1**. Por lo que todos los resultados obtenidos con LY294002, e incluso wortmanina a altas dosis, son en muchos casos cuestionables. Al inhibirse la actividad quinasa de mTOR tanto mTORC1 como a mTORC2 se ven afectados. Por esta razón, nosotros no hemos usado LY294002, y wortmanina sólo a bajas dosis (40 nM) para inhibir específicamente a las PI3K de clase I. Para la inhibición específica de mTORC1 usamos rapamicina 40 nM.

Tabla 4.1. CI_{50} de PI3K/mTOR para wortmanina y LY.

	CI_{50} wortmanina	CI_{50} LY294002
PI3K Clase Ia	1-10 nM ¹	6.5 μ M ¹
PI3K Clase II	PI3K-C2 α : 50 nM ¹ PI3K-C2 β : 500 nM ¹	PI3K-C2 α : 7.3 μ M ¹ PI3K-C2 β : 23.1 μ M ¹
mTOR	200 nM ²	3 μ M ²

¹Fruman *et al.*, 1998. ²Brunn *et al.*, 1996.

Los resultados en la literatura sobre la señalización de IR_A e IR_B, hablan de una señalización de IR_A vía PI3K-Ia/S6K, e IR_B vía PI3K-II/Akt, pero no tienen en cuenta el efecto inhibitorio de LY294002 sobre mTORC1 y mTORC2, este último descrito como responsable de la fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ (Sarbasov *et al.*, 2005). Nosotros proponemos un modelo en el que ambas isoformas del IR están señalizando a través de PI3K de clase I y II, pero posiblemente con diferente afinidad por una u otra.

La glucosa es un factor de proliferación esencial en célula β (Guillen *et al.*, 2006; Assmann *et al.*, 2009). Hay trabajos que presentan como la glucosa es capaz de estimular la ruta PI3K/Akt debido al efecto autocrino de la insulina en célula β (Dickson *et al.*, 2001). Aquí se muestra, usando células β IR^{-/-}, como la glucosa activa la ruta de Ras-MAPK y no la PI3K/Akt, ni tampoco estimula la fosforilación de TSC2 en residuos dependientes de Akt. Además la señalización a través de ERK 1/2 estimulada por glucosa es capaz de activar a mTORC1/S6K. Esto es posible mediante la modulación directa de TSC2 por fosforilación en Ser⁶⁶⁴, la cual es también activada por insulina en líneas IR^{+/+}. La fosforilación en TSC2-Ser⁶⁶⁴ ha sido identificada como marcador de la activación de mTORC1, mediada por ERK 1/2 en esclerosis tubular y cáncer (Ma *et al.*, 2007).

La glucosa también puede regular la actividad de mTORC1 a través de la modulación de los

niveles de ATP y la inhibición de AMPK, quinasa que tiene un importante papel en célula β y puede inhibir tanto secreción de insulina como proliferación y supervivencia (Salt *et al.*, 1998; Kefas *et al.*, 2003b; Richards *et al.*, 2005). Su activación implica inactivación de mTORC1: por un lado, AMPK estabiliza el complejo TSC1-TSC2 por fosforilación (Inoki *et al.*, 2003b), lo cual conduce a inhibición de mTORC1; por otro lado puede fosforilar a Raptor, inhibiendo directamente a mTORC1 (Gwinn *et al.*, 2008). Aquí se demuestra como la glucosa reduce la fosforilación de AMPK y Raptor, mientras que un antagonista, 2-deoxiglucosa es capaz de inducir la fosforilación de AMPK, TSC2 y Raptor en célula β , contribuyendo a la disminución de señalización de mTORC1/S6K en condiciones de bajo estatus energético. Además, la activación de AMPK fue menos sensible a la deprivación energética en la línea $IR^{-/-}$ en comparación con el resto de líneas que expresaron IR. Esto se correlaciona con observaciones previas de transporte de glucosa mediado por GLUT-2/IR en líneas de célula β fetales (Escribano *et al.*, 2009), o hepatocitos neonatales (Nevado *et al.*, 2008). AMPK respondió de forma más aguda a la deprivación energética en las líneas con mayor transporte de glucosa. El mayor transporte de glucosa se dio en las líneas expresando IR_A , y el menor en líneas $IR^{-/-}$, también se encontró una correlación positiva del mayor transporte de glucosa con los datos de proliferación aquí mostrados.

La interferencia de *Tsc2* produce un aumento de la actividad de S6K y resistencia a insulina en las líneas $IR^{+/+}$ y Rec B a nivel de Akt, debido a la fosforilación en serina de IRSs. Este mecanismo ha sido previamente demostrado en diferentes líneas celulares no procedentes de islotes (Harrington *et al.*, 2004; Manning, 2004; Shah *et al.*, 2004), y posteriormente en célula β con el modelo $\beta S6k^{CA}$ (Elghazi *et al.*, 2010). Esto también puede explicar como la estimulación crónica con glucosa produce la degradación proteasomal de IRS-2 en células β (Briaud *et al.*, 2005). La fosforilación en serina de IRS por hiperactivación de mTORC1 es directamente dependiente de S6K (Um *et al.*, 2004), y es regulada positivamente en obesidad (Hotamisligil *et al.*, 1996). Esto llevó a proponer la inhibición de mTORC1 como posible tratamiento para la reducción global de resistencia a la insulina en obesidad, pero sin embargo el tratamiento con rapamicina resultó tóxico para las células β , impidiendo el aumento compensatorio de la masa de célula β , agravando el fenotipo obeso y contribuyendo al desarrollo de diabetes (Fraenkel *et al.*, 2008).

Además describimos un efecto novel de resistencia sobre la señalización de Ras-MAPK a nivel de ERK1/2 en respuesta a insulina o glucosa, y mediado por la interferencia de *Tsc2*. Este efecto es consistente con observaciones que describen el efecto inverso, hiperactivación de ERK tras inhibición de mTOR en líneas celulares o en preparaciones de tumores de animales tratados *in vivo* (Carracedo *et al.*, 2008). Aún así, la inhibición de mTORC1 con rapamicina tras interferencia de *Tsc2* no revirtió el efecto observado sobre ERK 1/2, sugiriendo la existencia de algún mecanismo de retroalimentación independiente de mTORC1. En la línea $IR^{-/-}$ la glucosa no estimuló ERK tras interferencia de *Tsc2* pero si fue capaz de estimular mTORC1, posiblemente a través de AMPK/Raptor.

Sorprendentemente, la línea que expresa IR_A fue capaz de superar la resistencia a la insulina causada por la interferencia de *Tsc2* y se observó estimulación de Akt por insulina. Los datos

obtenidos demuestran como la inhibición de la señalización de la insulina a nivel de IRS puede estar diferentemente modulada en líneas expresando IR_A o IR_B . La fosforilación de IRS-1 Ser³⁰⁷ está considerada marcador de resistencia a la insulina (Um *et al.*, 2004), y en las líneas estudiadas fue de menor intensidad en Rec A frente a Rec B en respuesta a insulina. Esto puede explicar las diferencias encontradas en estas líneas tras la interferencia de *Tsc2*.

En los animales con delección de *Tsc1* o *Tsc2* se muestra siempre hipertrofia celular (Rachdi *et al.*, 2008; Shigeyama *et al.*, 2008; Mori *et al.*, 2009b), pero solo el modelo $\beta Tsc2^{-/-}$ estudiado por Rachdi y colaboradores muestra hiperplasia. En nuestras líneas de célula β observamos un aumento de la proliferación en todas las líneas tras interferencia de *Tsc2*. Este incremento fue dependiente de mTORC1, ya que su inhibición con rapamicina bloqueó el efecto observado sobre la proliferación. De forma basal la proliferación es mayor en la línea que expresa IR_A frente a IR_B , y más baja en la línea $IR^{-/-}$ frente a $IR^{+/+}$. Curiosamente el tratamiento con rapamicina reduce hasta 4 veces la proliferación en la línea Rec A y solo 2 veces en la línea Rec B, indicando dependencia de mTORC1 en la hiperproliferación observada en las líneas expresando IR_A . Estos resultados apoyan las diferencias de señalización previamente discutidas, así como las observaciones de mayor expresión de IR_A *in vivo* en islotes hiperplásicos del modelo LIRKO inducible (*liver-specific IR knock-out*). Este animal presenta resistencia a la insulina primaria en hígado y desarrolla hiperplasia pancreática compensatoria (Escribano *et al.*, 2009).

En conclusión, aquí se demuestra la relevancia del complejo TSC1-TSC2 en la integración de la señalización independiente de glucosa e insulina (Figura 4.12). Este complejo participa en la coordinación de señales tanto energéticas como de factores de crecimiento, y regula la síntesis de proteínas a través de mTORC1. La ruta está descrita como crítica para el mantenimiento de la masa de célula β , jugando un importante papel en la compensación por parte del páncreas en estados de resistencia a la insulina. En este punto, la expresión relativa de IR_A versus IR_B en célula β puede jugar un papel clave en la regulación de proliferación de célula β . Un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares detrás de la plasticidad de la masa de célula β serán necesarios para comprender el papel de la célula β en progresión a la diabetes tipo 2.

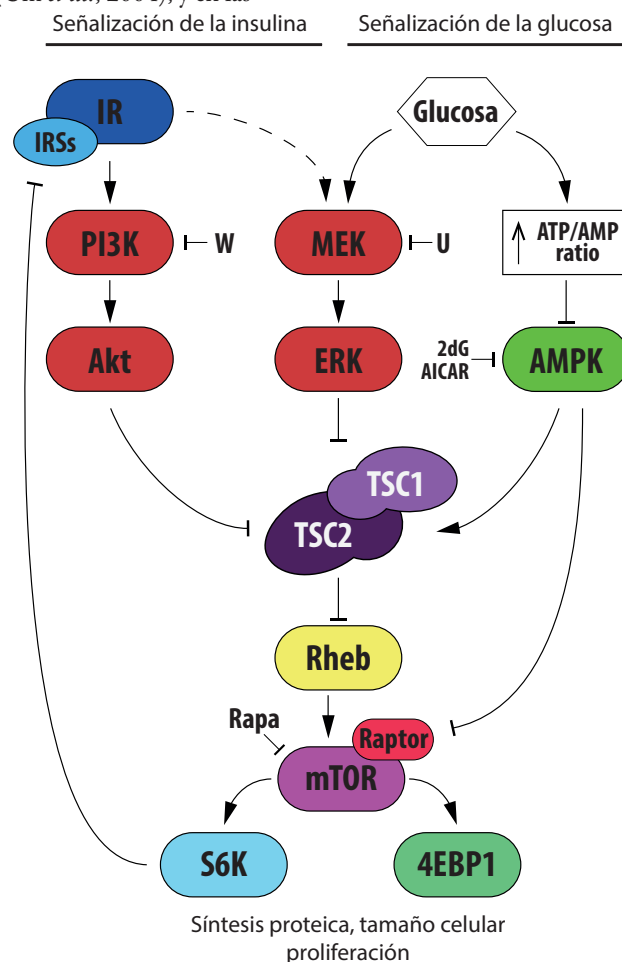


Figura 4.12. Esquema simplificado de la señalización de insulina y la glucosa en célula β . Vías que actúan sobre el complejo TSC1-TSC2, y la regulación de mTORC1.

4.2

La autofagia como mecanismo protector ante estrés de retículo endoplasmático en célula β pancreática

4.2.1 Autofagia basal aumentada en células β con secreción de insulina deficiente

Para explorar el papel de la autofagia en célula β bajo un estado de secreción de insulina deficiente, se usaron líneas celulares generadas a partir de islotes pancreáticos aislados de fetos de ratón (día 17 de gestación). Los islotes fetales han sido previamente caracterizados como deficientes en secreción de insulina debido a la inmadurez de la maquinaria requerida para su secreción (Masaki *et al.*, 1987; Hughes, 1994; Tu y Tuch, 1996), aunque nosotros y otros hemos probado que células β aisladas de islotes fetales, aun incapaces de secretar insulina, expresan la hormona y otros marcadores de célula β como IAPP (Figura 4.1) Guillen *et al.*, 2006.

La síntesis y la secreción de insulina son dos procesos independientes. Previamente fue demostrado que un defecto en la secreción de insulina produce un incremento de la actividad autofágica en célula β pancreática. Dicha observación fue realizada por primera vez en animales tratados con agentes que inhiben la secreción de insulina (Creutzfeldt *et al.*, 1969; Hellman *et al.*, 1974). Un aumento de autofagia en célula β también es observado el modelo animal *Rab3a*^{-/-}, el cual muestra secreción de insulina deficiente (Marsh *et al.*, 2007), o células β de humano expuestas a ácidos grasos (Lupi *et al.*, 2002). Nosotros encontramos que la autofagia basal estaba aumentada en las células β procedentes de islotes fetales, en comparación con las que provienen de insulinomas de animales adultos (MIN6 e INS-1E). Los niveles de LC3B-II se encontraron aumentados en las células β fetales, y el bloqueo del flujo autofágico con cloroquina (agente lisosomotropo que aumenta el pH lisosomal e inhibe la fusión autofagosoma-lisosoma y la degradación proteica) incrementó más aún los niveles de LC3B, probando que la las diferencias basales observadas no son debidas a una degradación ineficiente de LC3B en los autofagosomas de las células β fetales (Figura 4.13, a). Ensayos de inmunofluorescencia mostraron claramente mayor punteado de LC3B en célula β fetal. El tratamiento con rapamicina, como control positivo, incremento el punteado en todas las líneas estudiadas (Figura 4.13, b y d). Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión revelan un alto contenido de vacuolas autofágicas en células β fetales (Figura 4.13, c: 1-5, y e), las cuales son bastante más escasas en células de insulinoma MIN6 (Figura 4.13, c: 6, y e). Estas vacuolas autofágicas fueron reconocidas como estructuras con doble membrana con contenido que abarcó desde citoplasma granulado, orgánulos degenerados, retículo endoplasmático y agregados proteicos. La presencia de anisomas por la fusión de autofagosomas con vacuolas digestivas también fue observado (Figura 4.13, c: 4-5). No se

encontraron diferencias significativas en el diámetro medio de las vacuolas autofágicas de células β fetales y MIN6 (Figura 4.13, e).

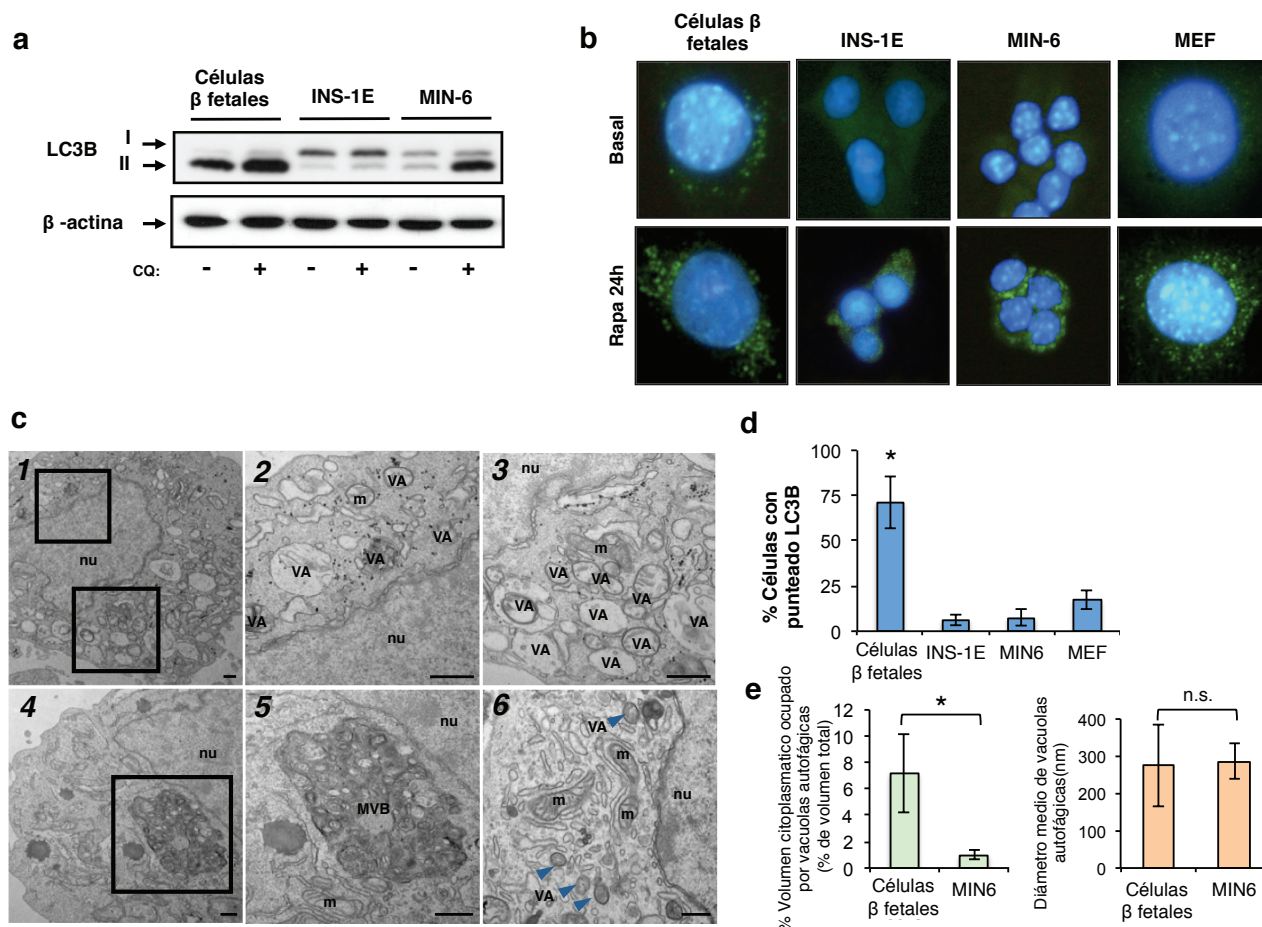


Figura 4.13. Los niveles de autofagia basal están aumentados en célula β con secreción de insulina deficiente.

(a) Western-blot frente a LC3B en condiciones basales o tras 24 h de tratamiento con cloroquina (CQ; 10 μ M). La forma LC3B-II (indicadora de autofagia activa) es conjugada con fosfatidiletanolamina, y dado que es más hidrófoba, presenta mayor movilidad electroforética.

(b) Inmunofluorescencia frente a LC3B (verde) en condiciones basales, o tras tratamiento con rapamicina (40 nM, 24 h). La aparición de señal focalizada es indicativa de presencia de LC3 en autofagosomas (autofagia activa). En ausencia de autofagia, LC3B se encuentra disperso en el citoplasma. Núcleos (azul) visualizados por tinción con DAPI.

(c) Imágenes de microscopía electrónica de células β fetales (1-5), y MIN6 (6). Secciones de (1) están ampliadas en (2-3), sección de (4) se encuentra ampliada en (5). Las barras representan 500 nm. Las vacuolas autofágicas presentes en MIN6 están indicadas con flechas azules. VA, vacuola autofágica; nu, núcleo; m, mitocondria; MVB, cuerpo multivacuolar.

(d) Barras representando la proporción de células con punteado positivo para LC3B en condiciones basales del experimento mostrado en (b), expresado como media \pm s.d. (n = 3), *, $P < 0.001$ comparado con cada una de las líneas celulares restantes.

(e) Cuantificación del volumen citoplasmático ocupado por autofagosomas (izquierda) y el diámetro medio de los autofagosomas (derecha), *, $P < 0.001$.

4.2.2 Presencia de agregados proteicos en células β con secreción de insulina deficiente

La presencia de agregados conjugados con poli-ubiquitina fue demostrada mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo FK2, el cual reconoce proteínas ubiquitinadas pero no ubiquitina libre (Fujimuro y Yokosawa, 2005). Se observó punteado positivo para FK2 en células β fetales, pero no en células control (MIN6 e INS-1E) Figura 4.14, a. La autofagia

juega un importante papel en el aclaramiento de los agregados proteicos (Szeto *et al.*, 2006), encontramos que LC3B colocalizaba con la señal de FK2, además el tratamiento con rapamicina incrementó aún más la señal de LC3B y disminuyó la de FK2. Este efecto no fue observado tras tratar a las células con rapamicina en presencia de un inhibidor de autofagia como la cloroquina (Figura 4.14, b; Figura 4.15, a). Las diferentes líneas también fueron comparadas por *immunoblot*, encontrándose un patrón de proteínas ubiquitinadas mayor en célula β fetal tanto en fracción soluble como en insoluble (Figura 4.14, c). Imágenes de microscopía electrónica claramente muestran la presencia de agregados proteicos en las células β de origen fetal, algunas veces observados dentro de autofagosomas, además de dilatación de RE, signo característico de estrés de RE (Figura 4.14, d; Figura 4.15, b). Por otro lado, el estímulo con agentes que causan estrés de RE de manera aguda, también es capaz de inducir autofagia en células β provenientes de insulinoma (INS-1E) Figura 4.16.

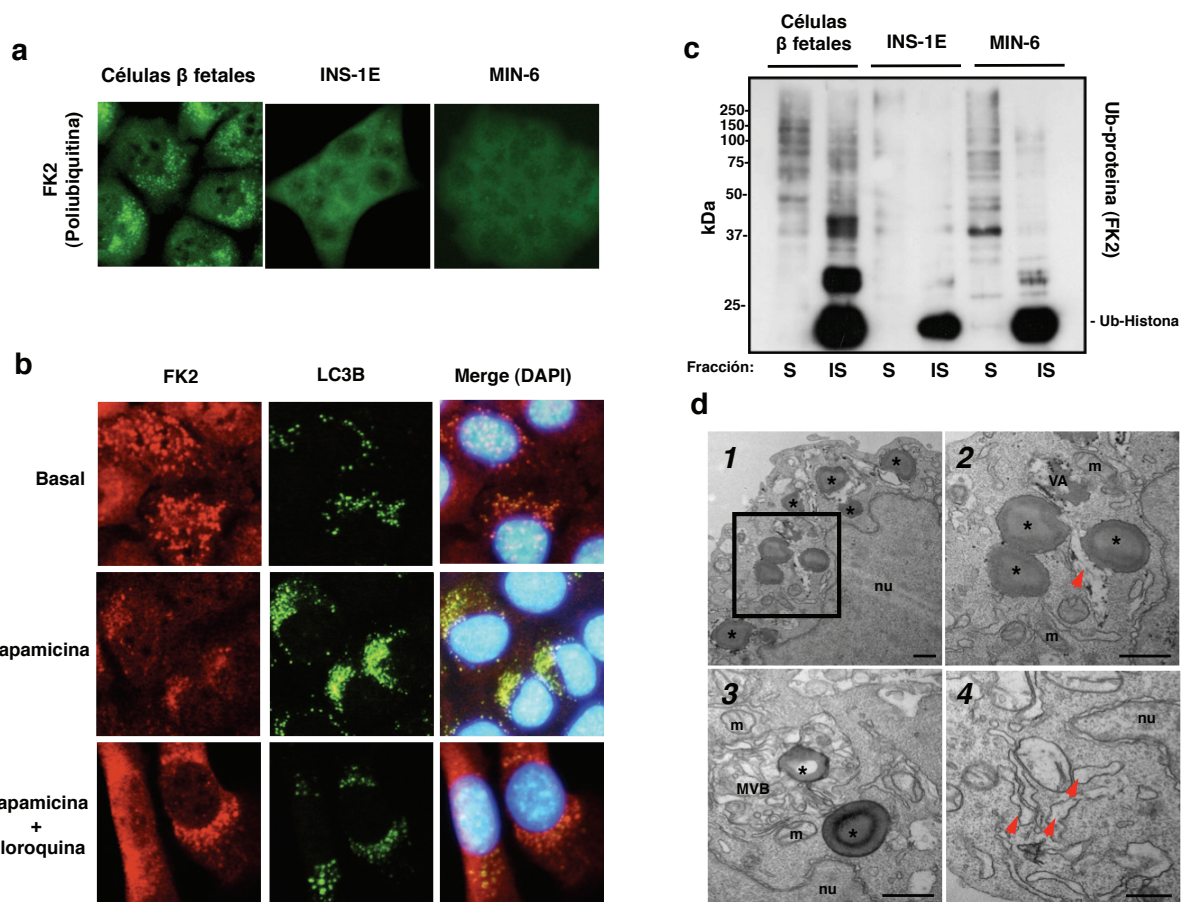


Figura 4.14. Presencia de agregados proteicos en célula β fetal.

(a) Inmunofluorescencia en condiciones basales frente a FK2 (proteínas poli-ubiquitinadas; verde).

(b) Células fueron estimuladas durante 24h con rapamicina (40 nM) o rapamicina y cloroquina (25 μ M). Tras su fijación y permeabilización fueron incubadas con anticuerpos frente a LC3B (verde) y poli-ubiquitina (rojo). Los núcleos son visualizados en azul por la incubación con DAPI.

(c) *Western-blot* con el anticuerpo FK2, en extractos proteicos soluble (S) e insoluble (IS).

(d) Imágenes de microscopía electrónica de células β fetales, agregados proteicos están señalados con (*), RE dilatado es mostrado con flechas rojas, sección de (1) se encuentra ampliada en (2). Barra representa 500 nm. (nu, núcleo; m, mitocondria, MVB, cuerpo multivacuolar, VA, vacuola autofágica).

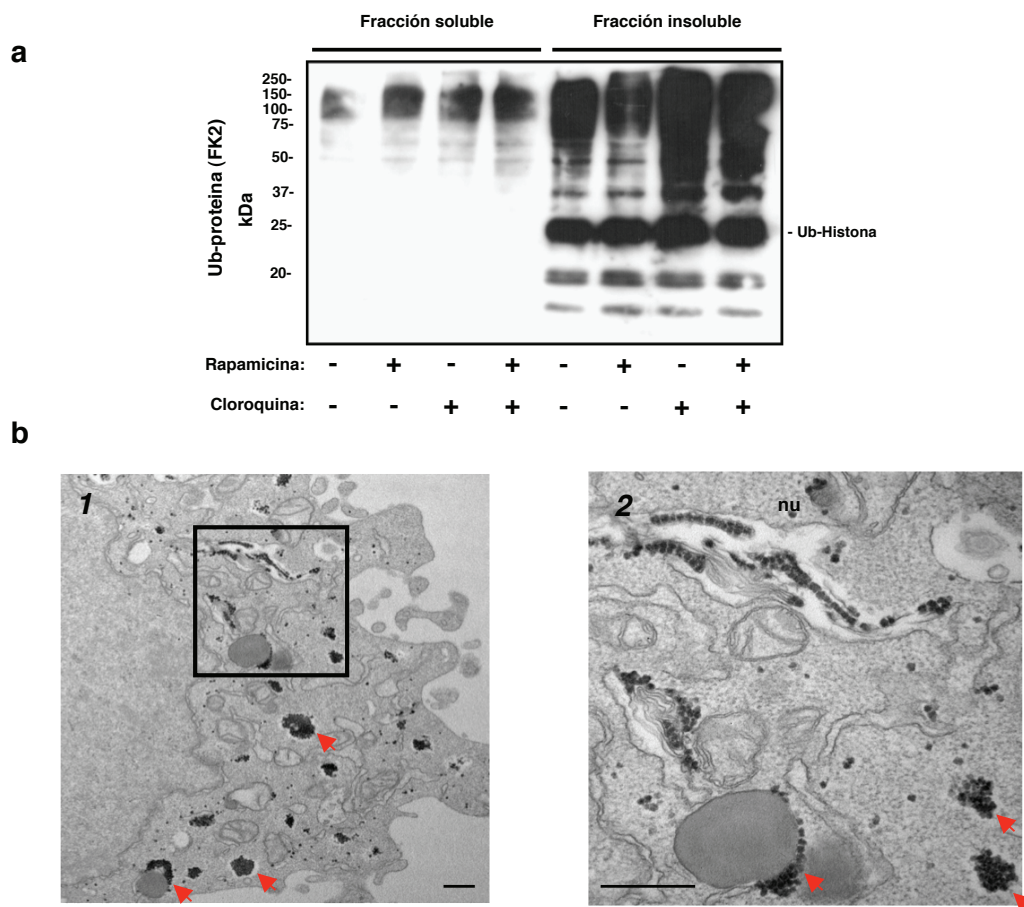


Figura 4.15. Agregados proteicos en célula β fetal.

(a) *Western-blot* con el anticuerpo FK2 frente a extracto proteico soluble e insoluble del experimento mostrado en la (Figura 4.14, b).

(b) Imágenes de microscopía electrónica mostrando la formación de agregados proteicos (flechas rojas) en célula β fetal.

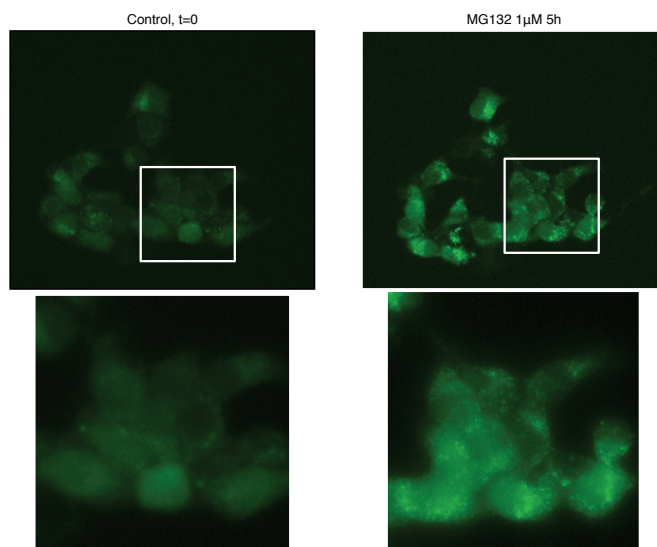


Figura 4.16. Inducción de autofagia por estrés de RE agudo en célula β .

Células INS-1E expresando establemente la proteína de fusión fluorescente LC3B-EGFP, fueron sometidas a tratamiento con MG132 1 μ M. Se tomaron imágenes antes y después de 5 h de tratamiento.

4.2.3 Mayor sensibilidad a la muerte inducida por estrés de RE en célula β con secreción de insulina deficiente

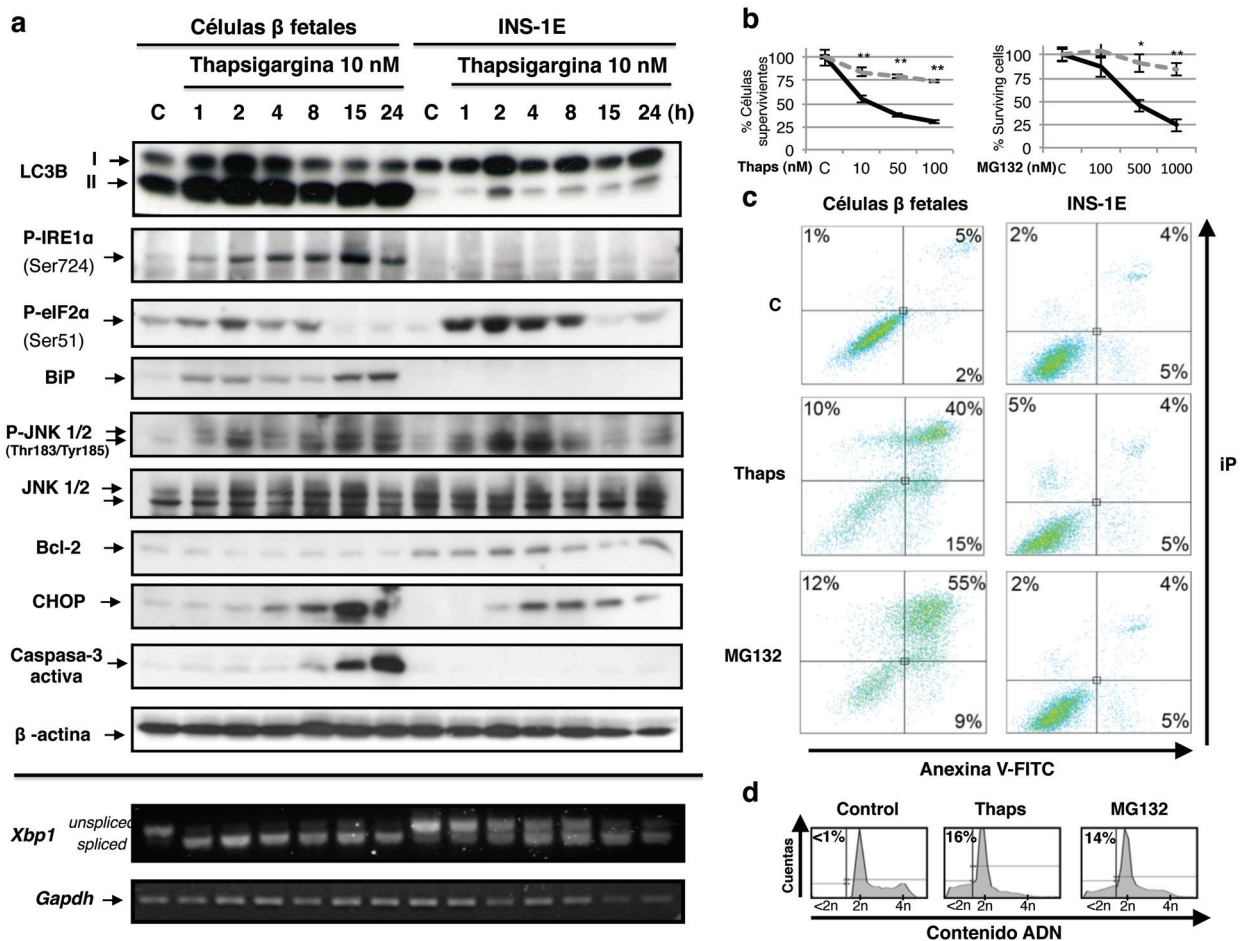


Figura 4.17. Respuesta diferencial del UPR y diferente sensibilidad a la muerte celular mediada por estrés de RE agudo.

(a) *Immunoblots* representativos de células β fetales e INS-1E estimuladas con thapsigargina (10 nM) durante los tiempos indicados (parte superior del panel). Abajo, imágenes de geles de agarosa mostrando el ADN complementario (ADNc) amplificado por RT-PCR. Formas *unspliced* (171 pb) y *spliced* (145 pb) de *Xbp1* son mostradas.

(b) Dosis-respuesta durante 15 h de thapsigargina (izquierda) y MG132 (derecha), para células β fetales (línea continua) e INS-1E (discontinua). Se muestran resultados de supervivencia por ensayo de cristal violeta, expresado como media \pm s.d. ($n = 3$), *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

(c) Células β fetales o INS-1E fueron dejadas sin tratar (control), o tratadas 24 h con thapsigargina 10 nM (thaps) o MG132 100 nM. La tinción de anexina-V-FITC/ioduro de propidio fue analizada por citometría de flujo. *Dot-plots* representativos son mostrados.

(d) Células β fetales del experimento mostrado en (b) fueron fijadas y el contenido de ADN fue medido mediante tinción con ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Los porcentajes de células hipodiploides de histogramas representativos son mostrados.

Al enfrentar a las células con agentes químicos que causan estrés de RE de forma aguda, como thapsigargina (inhibe Ca^{2+} -ATPasa del RE), o MG132 (inhibidor de proteasoma), las células β fetales mostraron mucha mayor sensibilidad a la muerte inducida por estos agentes (Figura 4.17). La estimulación con dosis bajas de thapsigargina (10 nM), aún es capaz de causar estrés de RE irresoluble y muerte en las células β fetales. Análisis del UPR (*unfolded protein response*) muestra fosforilación de Eif2 α -Ser⁵¹ como respuesta al estrés de RE inducido por thapsigargina. Sin embargo, las células β fetales muestran fosforilación basal y no son capaces de incrementar la fosforilación de la misma manera que se observa en la línea INS-1E. Por otro lado, la fosforilación de IRE1 α Ser⁷²⁴ solo fue observada en las células β fetales, al igual

que el *splicing* de *Xbp1*, el cual es mucho mayor en célula β fetal y se encuentra retrasado en las células INS-1E. Aunque la fosforilación de JNK1/2 se encuentra aumentada en ambas líneas tras estimulación con thapsigargina, una inducción más sostenida se observa en célula β fetal, probablemente como resultado de la mayor actividad de IRE1 α . BiP/GRP78, chaperona del RE y marcador clásico de estrés de RE fue inducido solamente en célula β fetal. La reducción de expresión de Bcl-2, aumento de CHOP y caspasa-3 activa también fueron observados en célula β fetal (Figura 4.17, a). Ensayos de supervivencia por tinción con cristal violeta revelaron la mayor sensibilidad a menores dosis de thapsigargina y MG132 en células β fetales (Figura 4.17, b). La muerte apoptótica mediada por thapsigargina y MG132 a bajas dosis también fue confirmada mediante ensayos de anexina-V/ioduro de propidio (Figura 4.17, c), y la presencia de un pico de ADN hipodiploide en análisis de ADN realizado por citometría de flujo (Figura 4.17, d).

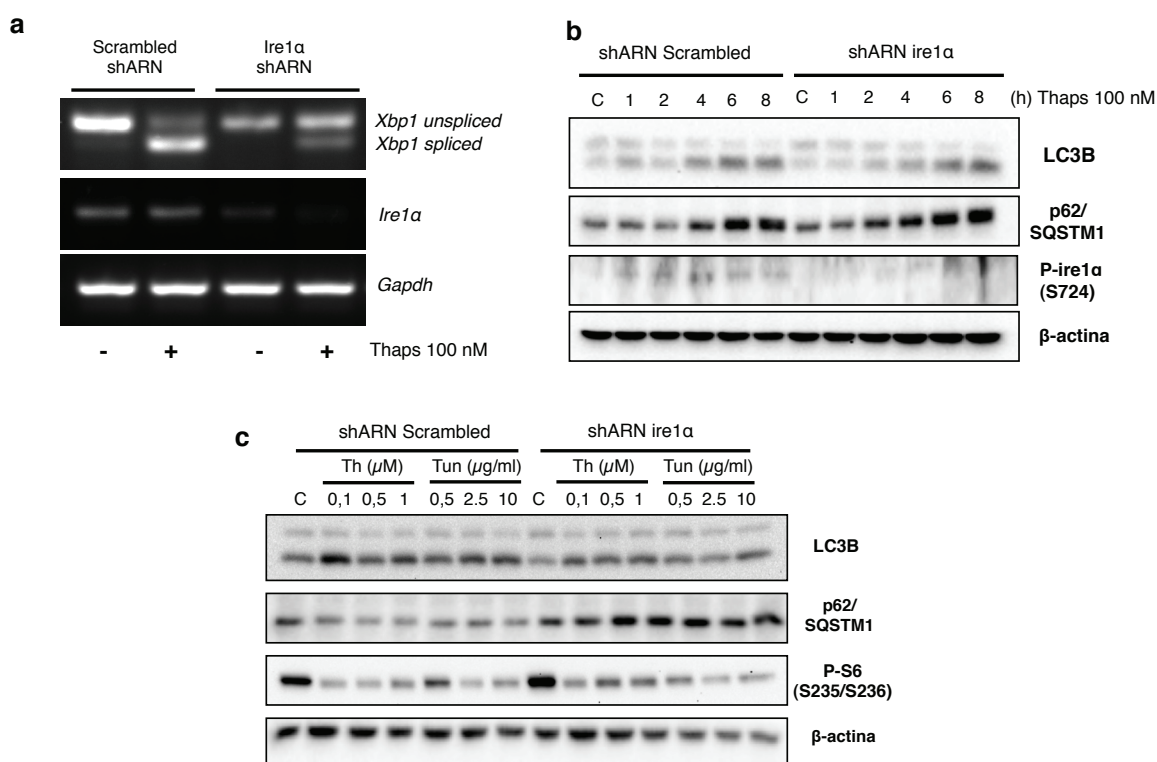


Figura 4.18. Papel de IRE1 α en autofagia inducida por estrés de RE agudo.

Debido a la gran disparidad en la actividad de IRE1 α entre células β fetales y provenientes de insulinooma, se quiso profundizar en el papel de IRE1 α /XBP1 en la autofagia inducida por estrés de RE, ya que los datos existentes en la literatura son contradictorios (Ogata *et al.*, 2006; Tadmimir *et al.*, 2008; Hetz *et al.*, 2009). Para ello se generó una línea de fibroblastos embrionarios murinos (MEF), la cual expresase establemente shARN para interferir la expresión de IRE1 α . El *splicing* de *Xbp1* es menor en la línea IRE1 α -shARN en respuesta a thapsigargina (Figura 4.18, a). Esta línea presenta una conversión de LC3B retrasada, y mayor acumulación de p62/SQSTM1 en respuesta a thapsigargina (Figura 4.18, b) al igual que a tunicamicina (Figura 4.18, c). Estos resultados parecen indicar que IRE1 α /XBP1 juegan un papel activo en la autofagia inducida por estrés de RE, y apoyan lo observado en célula β .

(a) MEF expresando establemente una secuencia de shRNA que no interfiere la expresión de ningún gen *Scrambled*-shARN, o interfiriendo la expresión de *Ire1 α* fueron estimuladas con thapsigargina 100 nM durante 30 min. Las imágenes muestran el ADNc amplificado por RT-PCR.

(b) MEF fueron estimulados con thapsigargina 100 nM durante los tiempos indicados, se muestran *blots* representativos.

(c) MEF fueron estimulados con thapsigargina (Th) o tunicamicina (Tun) a las dosis indicadas durante 3 h. Se muestran *blots* representativos.

4.2.4 Papel de Bcl-2 en la autofagia inducida por estrés de RE

El nivel de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 se encontró altamente disminuido en las células β de origen fetal en comparación con las derivadas de insulinooma (INS-1E), tanto en condiciones basales, como tras la estimulación de estrés de RE mediada por thapsigargina (Figura 4.19, a). Bcl-2 tiene función antiapoptótica y antiautofágica, inhibiendo la autofagia mediante interacción con Beclina1 en el RE (Pattingre *et al.*, 2005). Ensayos de inmunoprecipitación demostraron la mayor labilidad de la interacción entre Bcl-2 y Beclina1 en célula β fetal tras estimulación con thapsigargina, lo cual apoya las observaciones de mayor inducción de autofagia mediada por estrés de RE en estas células (Figura 4.19, b). Además, el fraccionamiento de RE y citosol reveló menores niveles de Bcl-2 en RE en célula β fetal (Figura 4.19, c). Por otro lado, miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2 como Bax y Bak son capaces de modular positivamente la actividad de IRE1 α a través de interacción directa en RE (Hetz *et al.*, 2006). Niveles incrementados de Bax fueron encontrados en célula β fetal en comparación con la línea INS-1E, tanto en condiciones basales como tras estímulo con thapsigargina (Figura 4.19, a). Los niveles de Bax también se encontraron elevados en la fracción de RE (Figura 4.19, d), este resultado podría explicar la mayor fosforilación de IRE1 α en respuesta a estrés de RE y su actividad ARNasa de *Xbp1* como ha sido mostrado en la Figura 4.17.

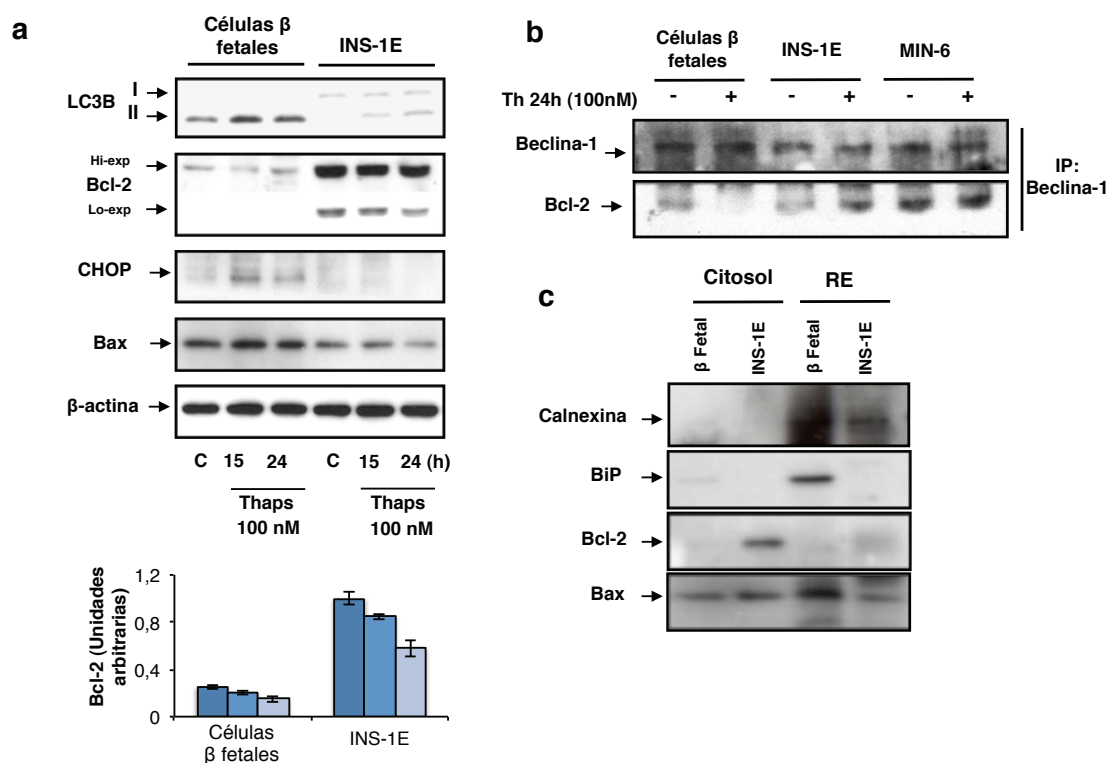


Figura 4.19. Papel de Bcl-2 en la autofagia estimulada por estrés de RE.

(a) Células β fetales o INS-1E fueron estimuladas con thapsigargina 100 nM durante 15 o 24 h. Se muestran blots representativos, con alta y baja exposición para Bcl-2, además de cuantificación en la gráfica inferior. Las diferencias entre células β fetales e INS-1E fueron significativas para todos los puntos de tiempo. $P < 0.01$.

(b) Extractos proteicos fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-Beclina1, WB frente a Beclina1 y Bcl-2.

(c) Extractos proteicos totales o fracción enriquecida en retículo endoplasmático (RE), fue obtenida según lo explicado en *material y métodos*, y sometidos a western-blot. Calnexina fue usada como marcador de la fracción del RE.

4.2.5 Papel de mTORC1 en autofagia y muerte o supervivencia celular tras estrés de RE agudo

La rapamicina es un inhibidor específico de mTORC1 y potente inductor de autofagia (Noda y Ohsumi, 1998; Ravikumar *et al.*, 2004). Para investigar el papel de mTORC1 en células β bajo estrés de RE, células β fetales fueron sometidas a pre-tratamiento con rapamicina (40 nM), y subsiguientemente estimuladas con bajas dosis de thapsigargina (10 nM). La rapamicina revirtió parcialmente el efecto observado sobre la viabilidad celular (Figura 4.20, a-c). La inducción de autofagia, cuantificada como lipidación de LC3B, estuvo inversamente relacionada con la actividad de mTORC1 tomada como fosforilación de S6K-Thr³⁸⁹ (Figura 4.20, a). El tratamiento con rapamicina fue capaz de reducir los niveles basales de CHOP y BiP observados en estas células. Además, el pre-tratamiento con rapamicina previo a la estimulación aguda de estrés de RE, potenció la recuperación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o Bcl-x_L, junto con una reducción de la activación de la caspasa-3. Análisis del marcaje de anexina-V/ioduro de propidio por citometría de flujo también reveló el efecto protector de la rapamicina, revirtiendo casi completamente el marcaje con anexina-V tras tratamiento por 15 h con bajas dosis de thapsigargina o MG132 (Figura 4.20, d). Aún así, tratamiento por más de 24 h con rapamicina resulta tóxico para las células β , y no protege frente a la muerte inducida por estrés de RE (datos no mostrados).

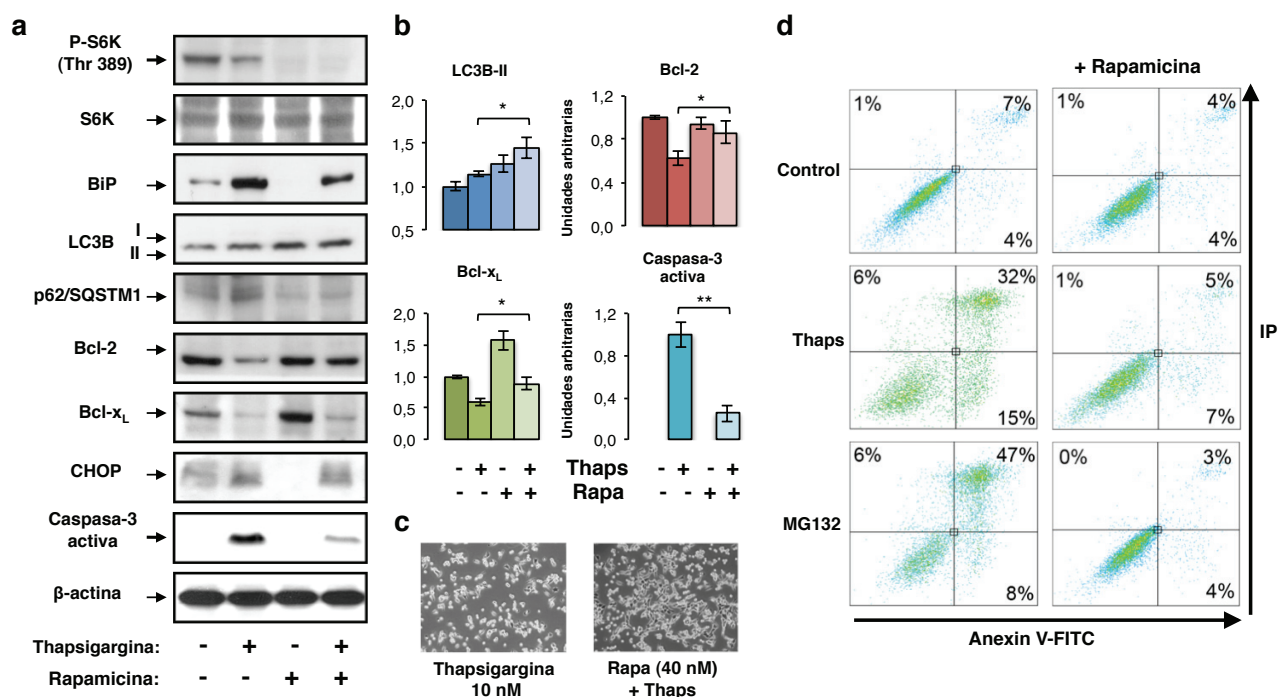


Figura 4.20. El bloqueo de mTORC1 con rapamicina protege frente a la muerte inducida por estrés de RE.

(a) *Immunoblots* representativos de células tratadas o no con rapamicina 40 nM 24 h, el tratamiento con thapsigargina 10 nM fue llevado a cabo durante las últimas 24 h.

(b) Cuantificaciones de los *blots* mostrados en (a), diferencias frente a los puntos de rapamicina y thapsigargina y rapamicina son estadísticamente significativas, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

(c) imágenes del experimento mostrado en (a).

(d) Del mismo experimento, *dot-plots* representativos mostrando la tinción con anexina-V-FITC/ioduro de propidio, analizado por citometría de flujo.

Para implicar de mayor manera a mTORC1 en el desenlace que observamos tras estrés de RE agudo, se tomó una aproximación opuesta a la anterior. Para incrementar la actividad de mTORC1 se expresó una forma constitutivamente activa de Rheb (Q64L) o Rheb-*wild type* como control. Rheb-GTP es capaz de unirse a mTORC1 y activarlo. Por otro lado, TSC2 presenta actividad activadora de GTPasa (GAP) hacia Rheb, actuando así como un freno

de mTORC1. La expresión transitoria de FLAG-*Rheb-Q64L* disminuyó la lipidación de LC3B, e incrementó los niveles de BiP y de caspasa-3 activa tras estimulación con thapsigargina (Figura 4.21, a). De manera similar, la interferencia de *Tsc2* mediada por shARN hizo a las células más sensibles a la muerte mediada por estrés de RE, incrementando BiP y caspasa-3 activa, y disminuyendo Bcl-2 tras estimulación con thapsigargina (Figura 4.21, b). El aumento de actividad de mTORC1 es mostrado como incremento de la fosforilación de la proteína ribosomal S6.

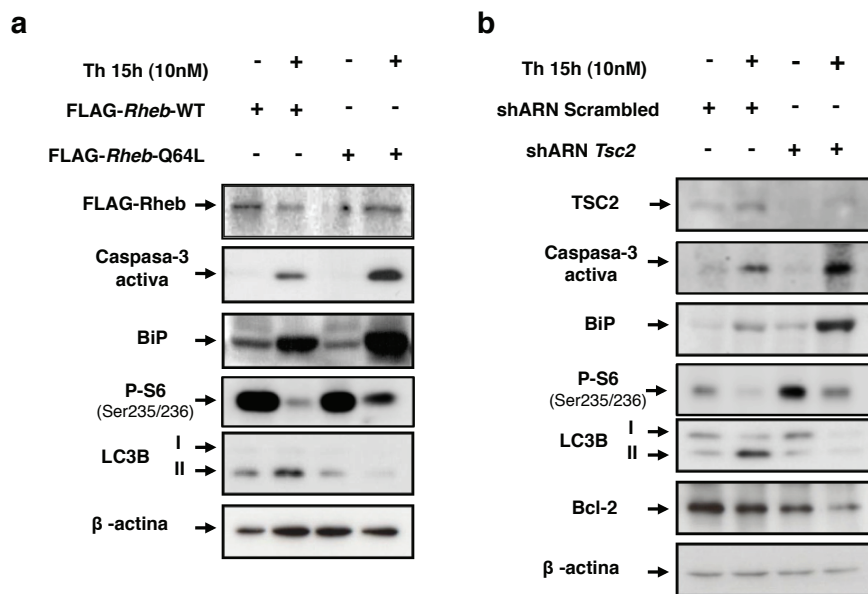


Figura 4.21. La regulación positiva de mTORC1 aumenta la muerte mediada por estrés de RE en células β fetales.

(a) Células β fetales fueron transfectadas transitoriamente con un vector de expresión de Rheb "salvaje" (*Rheb*-WT) o constitutivamente activo (*Rheb*-Q64L) ambos FLAG-tagged, y sometidos a thapsigargina 10 nM durante 15 h.

(b) 24 h después de la infección con lentivirus codificando shARN scrambled o frente a *Tsc2*, las células fueron dejadas sin tratar como control, o tratadas con 10 nM thapsigargina durante 15 h.

4.2.6 La autofagia protege frente a la muerte mediada por estrés de RE

Tras pretratar a las células con cloroquina, para inhibir la respuesta autofágica, células β fetales fueron estimuladas con diferentes dosis de thapsigargina. La inhibición de la autofagia incrementó los niveles de BiP y la expresión de CHOP. Tras estimulación con thapsigargina, los niveles de CHOP y BiP fueron incrementados más aún, además se observó una disminución de Bcl-2 y aumento de caspasa-3 activa (Figura 4.22, a). Como los autofagosomas no pueden ser procesados en presencia de cloroquina, LC3B-II se acumula en la membrana de los autofagosomas, por lo que el incremento de LC3B-II no debe de ser tomado como mayor autofagia efectiva, sino como mayor flujo de autofagosomas que no pueden ser procesados. Análisis de supervivencia por cristal violeta y del marcaje de células por anexina-V/ioduro de propidio también mostraron los efectos deletéreos de los inhibidores de autofagia cloroquina y bafilomicina A₁ tras estimulación aguda de estrés de RE (Figura 4.22, b y c). De una manera similar, la interferencia mediada por shARN lentiviral de *Atg5* o *Atg7*, hipersensibilizó a las células frente al efecto de la thapsigargina sobre la muerte celular, visto como un aumento de la caspasa-3 activa y expresión de BiP (Figura 4.22, d).

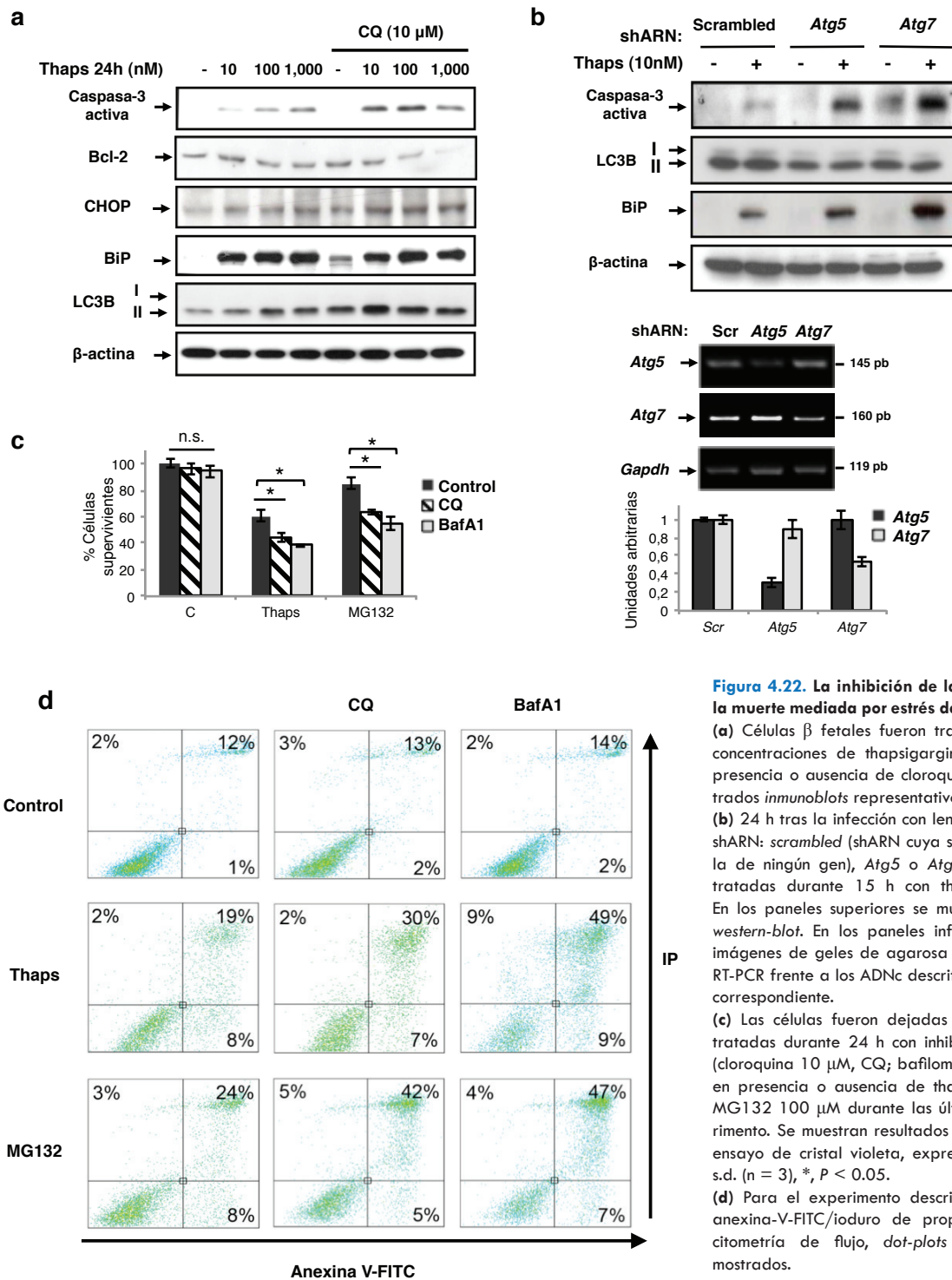


Figura 4.22. La inhibición de la autofagia aumenta la muerte mediada por estrés de RE en célula β fetal. (a) Células β fetales fueron tratadas con diferentes concentraciones de thapsigargina durante 15 h, en presencia o ausencia de cloroquina 10 μ M. Son mostrados *immunoblots* representativos del experimento. (b) 24 h tras la infección con lentivirus codificantes de shARN: *scrambled* (shARN cuya secuencia no interfiere la de ningún gen), *Atg5* o *Atg7*. Las células fueron tratadas durante 15 h con thapsigargina 10 nM. En los paneles superiores se muestran resultados de *western-blot*. En los paneles inferiores aparecen las imágenes de geles de agarosa con los resultados de RT-PCR frente a los ADNc descritos, y la cuantificación correspondiente. (c) Las células fueron dejadas sin tratar (control) o tratadas durante 24 h con inhibidores de autofagia (cloroquina 10 μ M, CQ; bafilomicina A₁ 2 nM, BafA₁) en presencia o ausencia de thapsigargina 10 nM o MG132 100 μ M durante las últimas 15 h del experimento. Se muestran resultados de supervivencia por ensayo de cristal violeta, expresado como media \pm s.d. (n = 3), *, P < 0.05. (d) Para el experimento descrito en (c), tinción con anexina-V-FITC/ioduro de propidio, analizada por citometría de flujo, *dot-plots* representativos son mostrados.

4.2.7 Discusión

Este trabajo se basó en observaciones sobre líneas de célula β pancreática. Para ello dispusimos de una línea con secreción de insulina deficiente debido a la inmadurez de sus mecanismos de secreción dado su origen fetal (Masaki *et al.*, 1987; Hughes, 1994; Tu y Tuch, 1996). Encontramos mayor autofagia de forma basal en las líneas de origen fetal, como respuesta a la acumulación de agregados proteicos. Agregados proteicos y su aclaramiento autofágico han sido previamente observados en islotes de ratas Zucker diabéticas (Kaniuk *et al.*, 2007). Curiosamente los islotes de estos animales mostraron una secreción de insulina deficiente (Sturis *et al.*, 1994; Pick *et al.*, 1998). De manera similar, animales tratados con diazóxido, inhibidor de la secreción de insulina (Creutzfeldt *et al.*, 1969; Bommer *et al.*, 1976), o con secreción de insulina deficiente por deficiencia *Rab3a*^{-/-} (Marsh *et al.*, 2007), mostraron autofagia aumentada en islotes.

Un mantenimiento adecuado de la masa y función de célula β es esencial para frenar la progresión a diabetes tipo 2. La apoptosis de célula β es un factor crítico contribuyente a la aparición de la enfermedad (Pick *et al.*, 1998; Butler *et al.*, 2003). Una sobrecarga crónica del RE por mayor demanda biosintética de insulina puede desencadenar estrés de RE y la respuesta prolongada del UPR causando apoptosis de célula β (Oyadomari *et al.*, 2002; Lipson *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2009). Aquí describimos la mayor sensibilidad frente a estrés de RE agudo en células β con secreción de insulina deficiente, las cuales muestran de manera basal fosforilación de Eif2a al igual que expresión de BiP y CHOP, todos ellos marcadores de estrés de RE. Tras estimulación con dosis bajas de agentes que causan estrés de RE, las células β fetales rápidamente sufrieron activación de IRE1 α y *splicing* de *Xbp1*, con inducción masiva de BiP y CHOP, siendo la alta expresión de esta última molécula la posible razón de la muerte apoptótica (Oyadomari *et al.*, 2002).

Las diferencias en IRE1 α /XBPs entre las diferentes líneas podrían explicar la mayor inducción de autofagia en líneas con secreción de insulina deficiente. Nuestros resultados indican que la activación de esta ruta parece tener un papel positivo en la autofagia estimulada por el estrés de RE, otros apoyan como IRE1 α estimula autofagia de manera independiente de su dominio ARNasa L, y por lo tanto de XBP1 (Ogata *et al.*, 2006). Por otro lado la deficiencia de XBP1 en sistema nervioso central induce autofagia (Hetz *et al.*, 2009), aunque no queda claro que XBPs juegue directamente un efecto inhibitorio sobre autofagia, como llega a insinuarse en el trabajo de Hetz y colaboradores. No obstante, parece que la forma *unspliced* de XBP1 podría traducirse y jugar un papel antiautofágico mediante interacción con proteínas en citoplasma (C. Hetz, comunicación personal, datos no publicados).

Se observaron grandes diferencias a nivel de expresión de Bcl-2 entre líneas provenientes de insulinoma y células β fetales. En las líneas fetales Bcl-2 se expresa muy reducidamente, además de que su interacción con Beclina-1 es más lábil, posiblemente contribuyendo a la apoptosis y autofagia basal tan aumentada en estas células. Aparte de ser un clásico efector antiapoptótico en la mitocondria, Bcl-2 puede encontrarse en RE, donde ejerce función antiautofágica interaccionando con Beclina1 (Patingre *et al.*, 2005). Recientemente también

se ha descrito que Bcl-2 mitocondrial puede inhibir la autofagia inducida por Ambra1 (Strappazon *et al.*, 2011).

Otros estudios *in vivo* han demostrado el papel esencial de la autofagia en célula β para el reciclaje basal de orgánulos y proteínas, lo cual permite mantener función y masa de célula β (Ebato *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2008). Estos modelos β Atg7^{-/-} muestran células β con defectos ultraestructurales debido a autofagia deficiente, lo cual se traduce en pérdida de función y masa por apoptosis, llevando a desarrollo de diabetes. Una expresión disminuida de proteínas de UPR y estrés de RE aumentado también fue recientemente encontrado en animales β Atg7^{-/-} (Quan *et al.*, 2012a). Estos autores también demuestran como la apoptosis está aumentada en islotes de animales β Atg7^{-/-} tras tratamiento *ex vivo* con thapsigargina (Quan *et al.*, 2012b). Otros trabajos también describen el efecto positivo de juega la autofagia en célula β bajo estrés como la exposición a ácidos grasos o hiperglucemia (Choi *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2010). La oligomerización del polipéptido amiloide de islote de origen humano (hIAPP) es capaz de alterar la autofagia basal de célula β , siendo el aumento de autofagia mediado por rapamicina capaz de reducir la apoptosis mediada por hIAPP (Rivera *et al.*, 2010). Por otro lado, otros autores describen un posible papel de la autofagia contribuyendo a la muerte de célula β en ciertas condiciones, como bajo deficiencia de *Pdx1* (Fujimoto *et al.*, 2009). Recientemente también ha sido descrito que la estimulación de autofagia mediada por rapamicina en islotes pancreáticos sanos, es capaz de perjudicar su función y supervivencia (Tanemura *et al.*, 2012), probablemente indicando que una hiperestimulación de la autofagia en células β sanas puede tener efectos negativos.

Más allá del hecho de que las células β con secreción de insulina deficiente muestran mayor nivel de autofagia, nuestro objetivo fue investigar el papel que esta podría estar jugando en la muerte o supervivencia de la célula β . mTORC1 es un regulador negativo de autofagia cuando factores de crecimiento y nutrientes están presentes (Noda y Ohsumi, 1998; Ravikumar *et al.*, 2004). La inhibición de mTORC1 mediada por rapamicina fue capaz de incrementar la eliminación de agregados proteicos en las células β fetales. Se encontró que el aumento de autofagia era el mecanismo responsable de este hecho. Es más, el tratamiento con rapamicina confirió resistencia a la muerte mediada por agentes que causan estrés de RE, mientras que un aumento de actividad de mTORC1 sensibilizo a la muerte. Aún así, la modulación de la autofagia en célula β con rapamicina o análogos debe de ser tomado con precaución, ya que la actividad de mTORC1 es clave en el aumento de la masa de célula β (Shigeyama *et al.*, 2008; Bartolomé *et al.*, 2010), siendo el tratamiento crónico con rapamicina negativo para la masa y función de célula β (Zahr *et al.*, 2007; Fraenkel *et al.*, 2008). Otros trabajos también sugieren el papel positivo de la autofagia en la apoptosis inducida por palmitato en la línea INS-1E. La respuesta autofágica inducida por palmitato es parcialmente reducida por tratamiento con la chaperona química 4-PBA (ácido 4-fenil butírico), lo cual puede indicar que el palmitato induce autofagia al causar estrés de RE. Un aumento de la sensibilidad al estrés de RE también fue demostrado en fibroblastos embrionarios murinos (MEF) *Tsc1*^{-/-} o *Tsc2*^{-/-}, los cuales presentan hiperactivación de mTORC1 (Qin *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011b). La autofagia disminuida en MEF deficientes en *Tsc1* o *Tsc2* ha sido descrita como una de las causas de su mayor sensibilidad a muerte por estrés energético (Ng *et al.*, 2011).

Finalmente, demostramos que tanto la inhibición química de la autofagia, o la interferencia de *Atg5/Atg7* incrementó la muerte en célula β fetal tras el tratamiento con agentes que causan estrés de RE. La respuesta autofágica frente a estrés de RE fue primeramente encontrada como un mecanismo protector (Bernales *et al.*, 2006; Ogata *et al.*, 2006) en levaduras y fibroblastos, también jugando un papel protector en otros modelos de enfermedad (Hetz y Glimcher, 2009; Milani *et al.*, 2009; Fouillet *et al.*, 2012). Sin embargo, la implicación de la autofagia en la supervivencia tras estrés de RE no es siempre clara a través de la literatura.

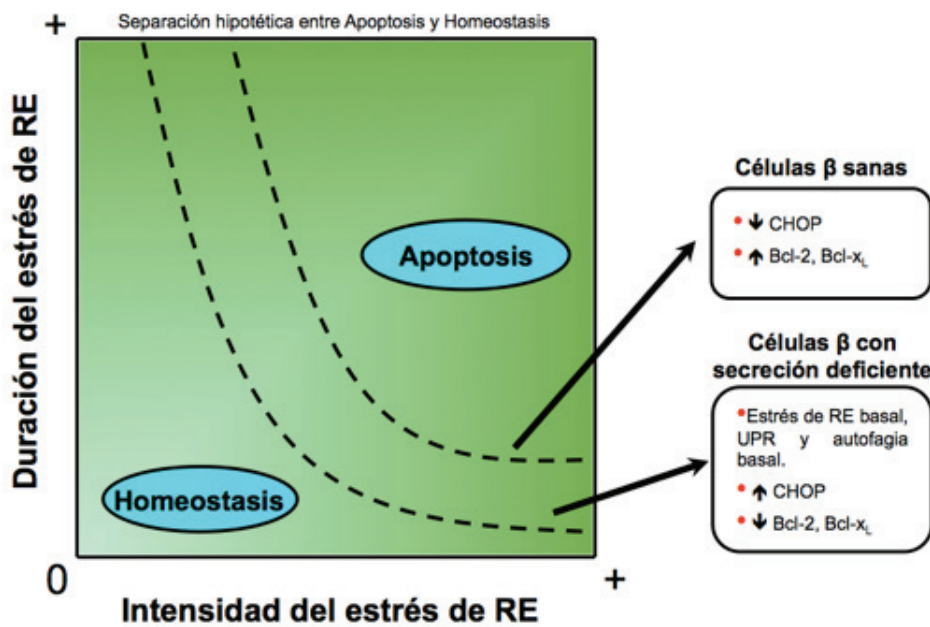


Figura 4.23. Diagrama hipotético en el que se indica un margen de separación diferente, para células β con secreción de insulina normal o deficiente, en el destino celular final (homeostasis o apoptosis) tras estrés de RE y activación del UPR.

Durante la progresión hacia la diabetes tipo 2, las células β pueden tener un comportamiento anómalo. Defectos en la secreción han sido observados, esto junto con observaciones en paralelo de agregación proteica y estrés de RE, podrían estar llevando a la muerte de la célula β (Kaniuk *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2009). Algunos de estas proteínas formando agregados han sido identificadas, y ejemplos son el polipéptido amiloide de islotes (Huang *et al.*, 2007; Gurlo *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2010) o la propia (pro)insulina (Oyadomari *et al.*, 2002; Jansen *et al.*, 2005). Mutaciones encontradas en el gen humano de la insulina, similares a las responsable del fenotipo del ratón “Akita” (Oyadomari *et al.*, 2002), son observadas en pacientes con diabetes neonatal permanente, enfermedad que causa estrés de RE y pérdida masiva de células β (Støy *et al.*, 2007). Proponemos que defectos en la secreción de insulina pueden estar acelerando la pérdida de células β al incrementar la sensibilidad a estrés de RE (Figura 4.23), y en este escenario, encontramos que la autofagia juega un papel protector. La modulación de la autofagia en estos casos, podría ser una estrategia a considerar.

El resultado puede depender de la línea celular estudiada (Bernales *et al.*, 2006; Ogata *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007a; Ullman *et al.*, 2008; Milani *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010), y probablemente de los compuestos y dosis utilizados para producir estrés de RE. En este estudio se han utilizado las menores dosis de thapsigargina y MG132 capaces de inducir señalización del UPR y muerte celular en menos de 24 horas, otros estudios llegan a usar dosis 10-100 veces mayores de estos compuestos.

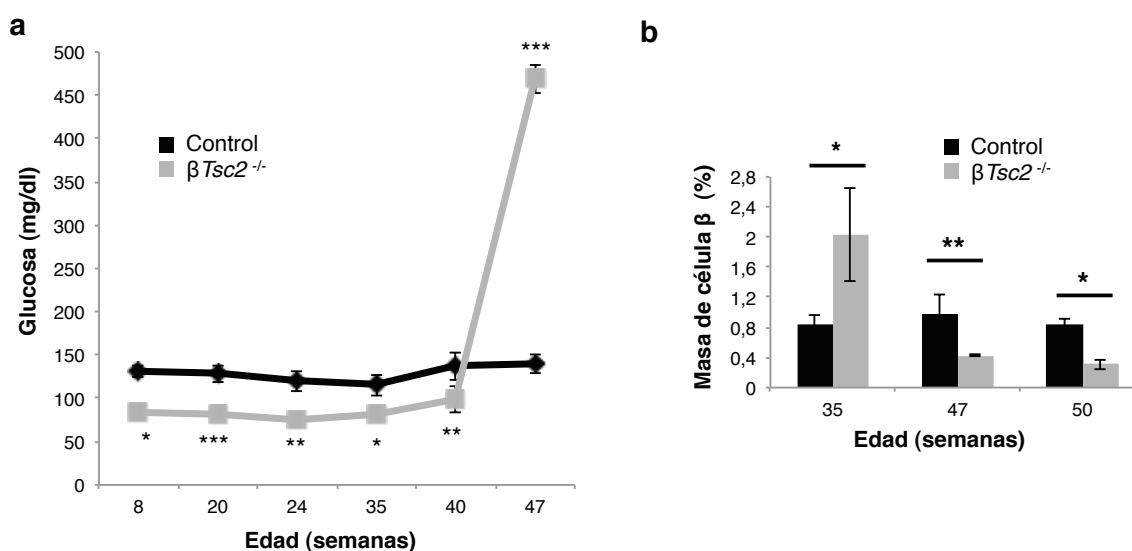
4.3

Fracaso de la célula β pancreática mediado por la hiperactividad de mTORC1 y la incapacidad autofágica

4.3.1 Respuesta bifásica de la masa de célula β en el modelo $\beta Tsc2^{-/-}$

La sobrecarga de nutrientes es considerada como una de las principales causas que pueden llevar al desarrollo de resistencia a la acción de la insulina y diabetes tipo 2. La sobrecarga de nutrientes causa hiperactivación de mTORC1, este hecho es comúnmente encontrado durante la evolución de la enfermedad (Um *et al.*, 2004; Tremblay *et al.*, 2005).

Para estudiar el papel de mTORC1 en la progresión a la diabetes tipo 2, de manera específica en célula β pancreática, se generó un modelo animal *knock-out* de *Tsc2* en célula β , mediante el cruce de ratones que expresaban *Cre* recombinasa bajo el promotor la insulina (*Ins-Cre*) Herrera, 2000; y otros que contenían secuencias *loxP* flanqueando los exones 3-4 de *Tsc2* (*Tsc2^{flax/flax}*), obteniéndose el ratón *knock-out* para *Tsc2* de manera específica en célula β ($\beta Tsc2^{-/-}$) Shigeyama *et al.*, 2008. El modelo fue primeramente descrito presentando un aumento temprano de la masa de célula β , que llega hasta las 30-40 semanas, acompañado de hiperinsulinemia e hipoglucemia. Posteriormente la masa de célula β regresa, apareciendo hipoinsulinemia e hiperglicemia (Shigeyama *et al.*, 2008).



Las observaciones previas sobre el perfil bifásico del modelo fueron reproducidas, la hipoglucemia se mostró hasta la semana 40 (Figura 4.24, a), debido al aumento de masa de célula β en los ratones $\beta Tsc2^{-/-}$ respecto a los controles (Figura 4.24, b). A partir de la semana 40 la masa de célula β quedó muy disminuida y aparece hiperglicemia.

Figura 4.24. (página anterior) Respuesta bifásica de la masa de célula β y glucemia en el modelo $\beta Tsc2^{-/-}$.

(a) Glucemias medidas de manera previa al sacrificio de los animales de diferentes edades.

(b) Secciones de páncreas fueron sometidas a marcaje con anticuerpos anti-insulina, y con la ayuda de un microscopio automatizado se tomaron fotos de toda la sección. Posteriormente se reconstruyó una imagen completa y se cuantificó, en tanto por ciento, el área positiva para insulina (masa de célula β) frente al total del páncreas. Los datos mostrados son medias \pm s.d. ($n=3-8$ por edad y modelo), *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

Se muestran imágenes representativas de islotes de animales de 35 y 47 semanas, los ratones $\beta Tsc2^{-/-}$ presentaron islotes generalmente más grandes, pero tras la pérdida de masa de célula β se observaron islotes compuestos mayoritariamente de células α (Figura 4.25, a). La presencia de caspasa-3 activa, fenómeno indicativo de apoptosis, fue evidente a las 35 semanas, y su presencia específica en célula β quedó demostrada por inmunohistoquímica (Figura 4.25, b). Extractos proteicos de islotes de ratones de 40 semanas también demostraron la mayor inducción de caspasa-3 activa en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ (Figura 4.25, c). Reconstrucciones de imágenes de inmunofluorescencia en páncreas también mostraron claramente como la masa de célula β se encuentra aumentada y posteriormente involuciona (Figura 4.26).

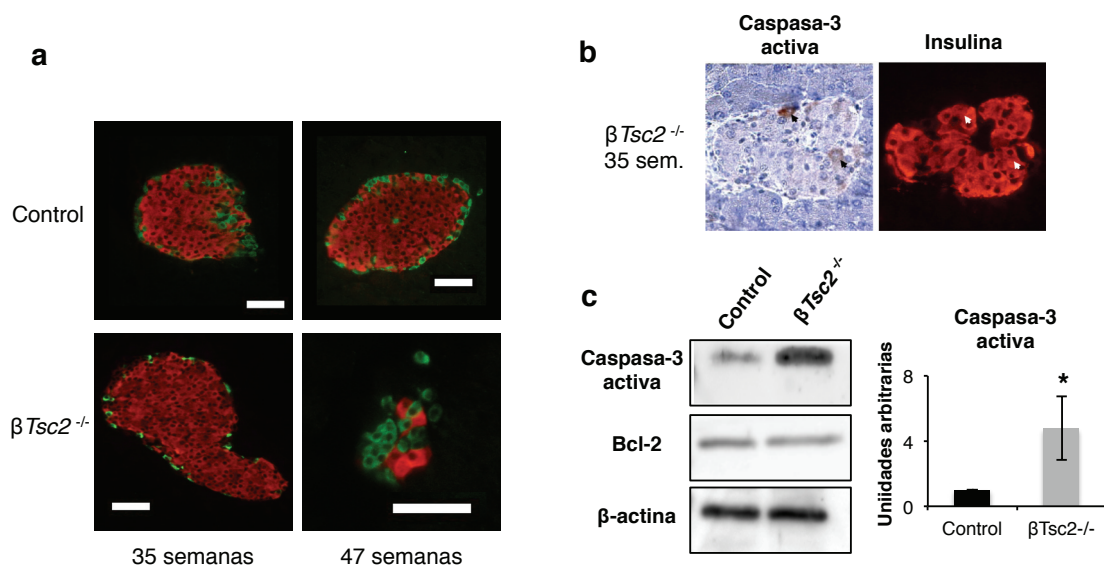


Figura 4.25. Pérdida selectiva de células β por apoptosis

(a) Imágenes representativas de islotes obtenidas de secciones de páncreas por inmunofluorescencia frente a insulina (célula β , en rojo) y glucagón (célula α , en verde). Las barras representan 50 μ m.

(b) Presencia de caspasa-3 activa por inmunohistoquímica, las secciones fueron incubadas posteriormente para marcar específicamente las células β con anticuerpo anti-insulina.

(c) Extractos proteicos de islotes de animales de 40 semanas fueron sometidos a *western-blot*. A la derecha se muestra la cuantificación de caspasa-3 activa como media \pm s.d. ($n=2$), *, $P < 0.05$.

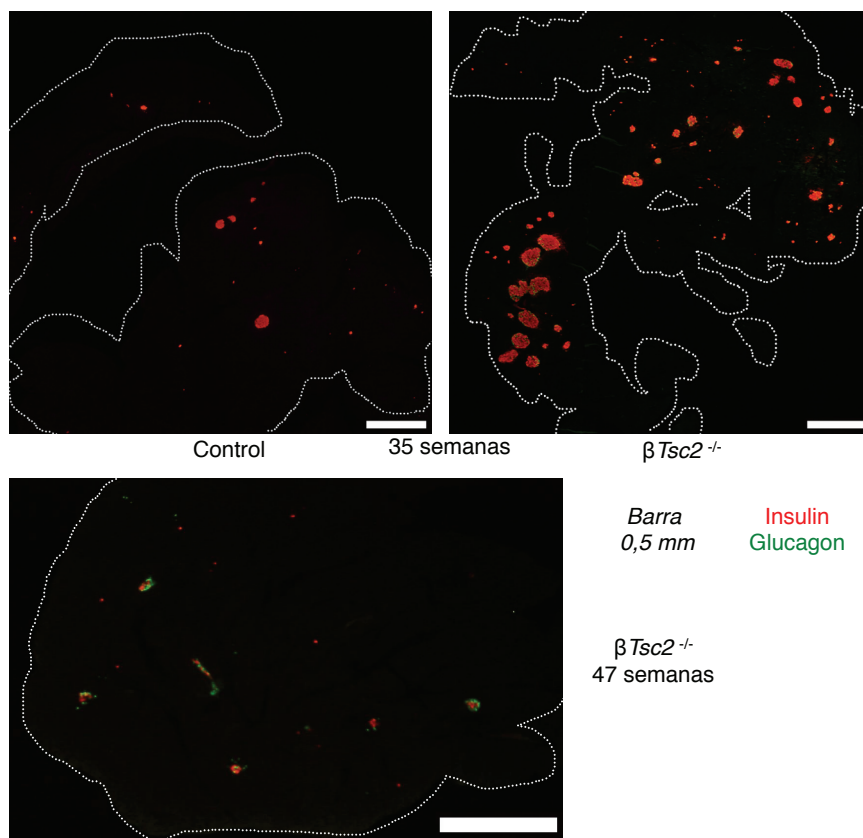


Figura 4.26. Involución de la masa de célula β en páncreas de $\beta Tsc2^{-/-}$.

Secciones de páncreas fueron marcadas con anticuerpos frente a insulina y glucagón. Las imágenes que se muestran son reconstrucciones de múltiples imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia automatizado.

4.3.2 La hiperactivación de mTORC1 conduce a un aumento de masa de célula β mediado por hipertrofia celular

La delección de *Tsc2* conlleva la hiperactivación de mTORC1, así en extractos de islotes de ratones $\beta Tsc2^{-/-}$ se encontró un aumento de fosforilación de S6K-Thr³⁸⁹, residuo fosforilado directamente por mTORC1. La propia diana de S6K, la proteína ribosomal S6, también se encontró hiperfosforilada en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ (Figura 4.27, a). El aumento de masa de célula β observado anteriormente podría deberse a un aumento del número de células (hiperplasia), al aumento del tamaño de estas (hipertrofia), o bien ambas. Para obtener una aproximación cuantitativa del tamaño celular individual se obtuvieron imágenes tomográficas de islotes aislados mediante microscopía confocal. Los islotes fueron marcados con insulina (célula β), glucagón (célula α) y β -catenina para marcar membranas y ayudar a la segmentación celular. La reconstrucción de las imágenes obtenidas permitió recrear modelos tridimensionales de los islotes y la cuantificación del volumen celular. Los resultados obtenidos reflejan un aumento de 4-5 veces el volumen medio de las células β de islotes $\beta Tsc2^{-/-}$, los núcleos también doblaron su volumen. Mientras tanto el volumen medio de las células α , aunque también aumentó posiblemente debido a mecanismos compensatorios, lo hizo en mucha menor medida (Figura 4.27, b). Las secuencias de imágenes tomográficas representativas así como un ejemplo de reconstrucción tridimensional son mostrados en los *videos suplementarios 1-3*.

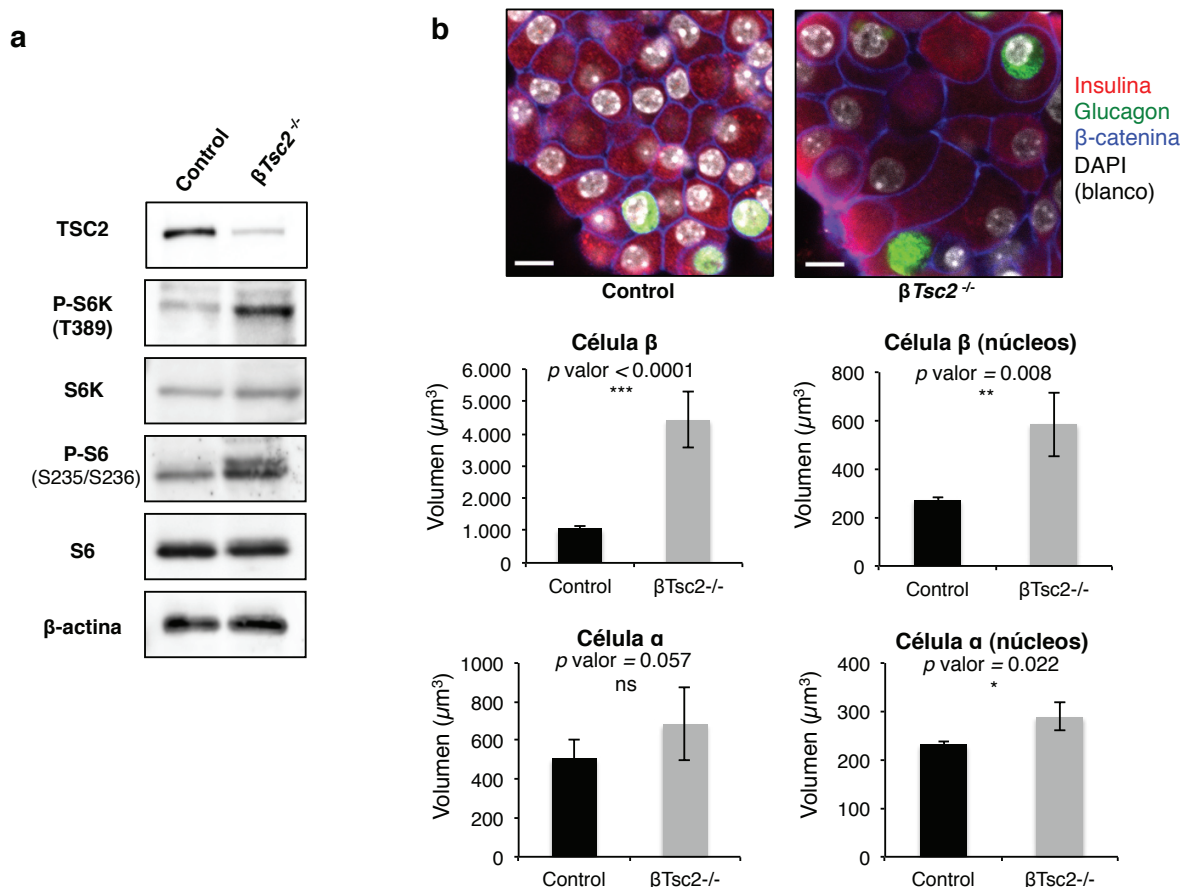


Figura 4.27. Hiperactivación de mTORC1 y tamaño celular.

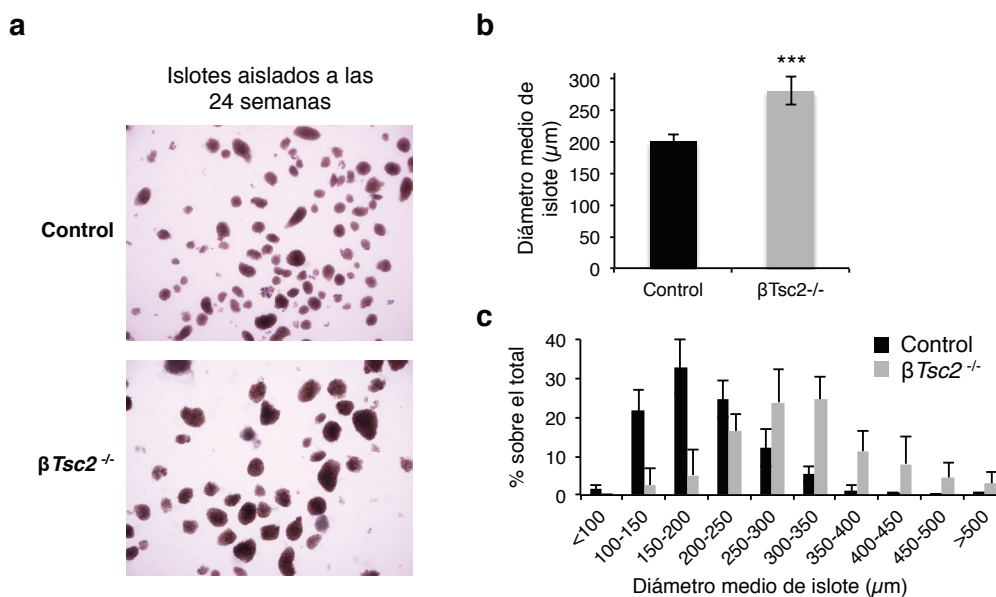
(a) Extractos proteicos de islotes fueron sometidos a *western-blot* con anticuerpos específicos.

(b) Islotes de ratones de 24 semanas fueron aislados, e incubados con anticuerpos específicos para el marcaje de células α (glucagón, verde), células β (insulina, rojo), membrana citoplasmática (β -catenina, azul), y núcleos con DAPI (blanco). Los islotes fueron visualizados en un microscopio confocal y se obtuvieron imágenes tomográficas, con las cuales se pudieron realizar reconstrucciones tridimensionales para la cuantificación del volumen celular, representado en las gráficas como medias de volumen por islote \pm s.d.

Para cuantificar el tamaño medio de los islotes existen dos técnicas, el análisis estereológico de secciones de páncreas (utilizado aquí para la estimación de masa de célula β) o la medida directa de los islotes aislados por digestión enzimática del páncreas. El primer método tiene como principal inconveniente el que las dimensiones observadas para cada islote dependen de la sección, mientras que el segundo permite observar las dimensiones totales de cada islote, y por lo tanto fue el utilizado para obtener el tamaño medio de los islotes en ratones de 24 semanas. Mientras que el diámetro medio de los islotes en animales control es de $201 \pm 10 \mu m$, en el modelo $\beta Tsc2^{-/-}$ es de $281 \pm 20 \mu m$ (Figura 4.28, a-b). También se obtuvo una distribución de tamaño de los islotes, que claramente muestra el mayor tamaño de los islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ (Figura 4.28, c).

4.3.2 La delección de *Tsc2* en célula β induce resistencia a la insulina y confinamiento nuclear de FoxO1

La delección de *Tsc2* y la consecuente hiperactivación de mTORC1/S6K inducen resistencia a la insulina por fosforilación de IRS (Shah *et al.*, 2004; Um *et al.*, 2004). En célula β la interferencia de *Tsc2* también produce resistencia a la acción de la insulina, como es mostrado en la primera parte de esta tesis (Figura 4.7). Se obtuvo una línea de célula β proveniente de



insulinoma (MIN6) en la cual se interfirió *Tsc2* de manera estable, mediado por shARN. En estas células, S6 se encontró hiperfosforilada por la hiperactivación constitutiva de mTORC1 y la estimulación de Akt mediada por IGF-I se estuvo impedida, no recuperándose totalmente con rapamicina (Figura 4.29, a), como ha sido descrito previamente (Huang *et al.*, 2008). La señalización de la insulina es necesaria para una correcta función y el mantenimiento de la masa de célula β (Withers *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 2000; Ueki *et al.*, 2006), y Akt fosforila directamente a FoxO1 en Thr²¹, promoviendo su exclusión nuclear (Nakae *et al.*, 2002). FoxO1 juega un importante papel en proliferación y respuesta al estrés de célula β , y normalmente se encuentra excluida del núcleo por la acción autocrina de la insulina secretada por las propias células β . Sin embargo, resistencia a la insulina y localización nuclear de FoxO1 inhiben la expresión de *Pdx1* y proliferación de célula (Kitamura *et al.*, 2002). Tanto en MIN6 *Tsc2*-shARN como en MEF *Tsc2*^{-/-} la fosforilación de FoxO1-Thr²¹ en presencia de suero se encontró disminuida, recuperándose tras tratamiento con rapamicina (Figura 4.29, b). El bajo estado de fosforilación de FoxO1 coincidió con la localización nuclear observada por inmunofluorescencia (Figura 4.30). En células β de islotes primarios de $\beta Tsc2^{-/-}$ la localización de FoxO1 fue exclusivamente nuclear. Esta localización se puede atribuir a la hiperactivación de mTORC1, ya que el tratamiento *ex vivo* con rapamicina durante 24 h fue capaz de recuperar totalmente la localización citoplasmática (Figura 4.29, c). Estas observaciones fueron repetidas en animales de 8, 24 y 40 semanas de edad, con idénticos resultados (datos no mostrados).

Pdx1 es un factor de transcripción necesario para el desarrollo del páncreas (Jonsson *et al.*, 1994), y uno de los principales reguladores de función y proliferación de célula β (McKinnon y Docherty, 2001). Previamente fue descrito como la presencia nuclear de FoxO1 inhibe la expresión de *Pdx1* (Kitamura *et al.*, 2002). Imágenes de inmunofluorescencia obtenidas de islotes aislados permitieron ver como en islotes de $\beta Tsc2^{-/-}$, la presencia nuclear de *Pdx1* se encontró disminuida respecto a los controles, y de manera similar en animales de 8, 24 y 40 semanas (Figura 4.31).

Figura 4.28. La hiperactivación de mTORC1 produce un aumento del tamaño de los islotes.

(a) Fotos representativas de islotes aislados de ratones de 24 semanas. (b) Diámetro medio de los islotes, representado como medias por ratón \pm s.d. (n=4). ***, $P < 0.001$. (c) Distribución de frecuencias del diámetro medio de islotes representado como porcentaje frente al número total de islotes, expresando medias por animal \pm s.d. (n=4).

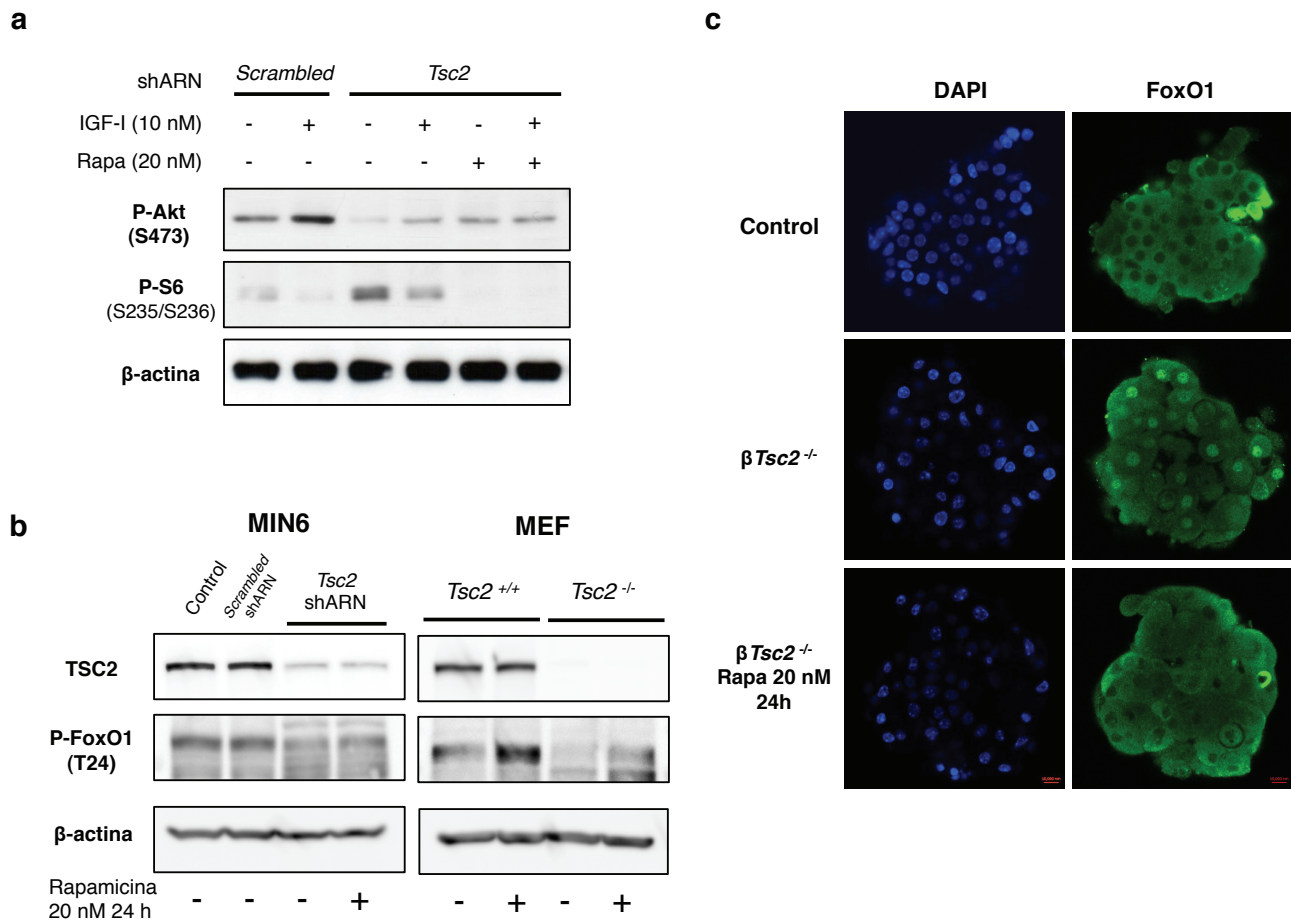


Figura 4.29. La hiperactivación de mTORC1 en célula β induce resistencia a la insulina.

(a) MIN6 expresando establemente shARN control que no interfiere la expresión de ningún gen (*scrambled*-shARN), o interfiriendo la expresión de *Tsc2* fueron deprivadas 3 h en medio DMEM sin suero y sin glucosa 0.1% BSA (en presencia o ausencia de rapamicina 20 nM), y estimuladas con IGF-I 10 nM durante 5 min. Se muestran blots representativos.

(b) MIN6 o MEF creciendo en presencia de suero, fueron tratadas o no con rapamicina 20 nM 24h.

(c) Islotes aislados fueron incubados en RPMI 10% FBS en presencia o ausencia de rapamicina 20 nM durante 24h. Se obtuvieron imágenes de inmunofluorescencia en un microscopio confocal.

4.3.4 La delección de *Tsc2* en célula β produce estrés de RE

mTORC1 dirige la síntesis proteica a través de la fosforilación de 4E-BP1 y S6K (aumento de traducción de ARNm), además de incrementar la biogénesis ribosomal. La activación crónica mTORC1 lleva a un aumento descontrolado de la síntesis de proteínas, poniendo a prueba la integridad del retículo endoplasmático (RE) Ozcan *et al.*, 2008.

Dado que el modelo β Tsc2^{-/-} muestra un perfil bifásico, con aumento temprano de la masa de célula β y fracaso posterior mediado por apoptosis, se quiso comprobar qué papel podría estar jugando el estrés de RE en esta segunda fase. Para ello se analizaron proteínas del UPR (*unfolded protein response*) en extractos proteicos obtenidos de islotes aislados a las 40 semanas. La fosforilación de PERK-Thr⁹⁸⁹ así como la de su diana Eif2a-Ser⁵¹ se encontró aumentada en islotes β Tsc2^{-/-} (Figura 4.32, a). En condiciones de estrés de RE, la traducción de mensajeros es reducida por el secuestro de Eif2b mediado por Eif2a fosforilado, pero paradójicamente la traducción de algunos mensajeros como ATF4 es aumentada (Harding *et al.*, 2000a), así los niveles de ATF4 se encontraron aumentados en islotes de β Tsc2^{-/-}, al igual que los niveles de la chaperona del RE BiP/GRP78 (Figura 4.32, a). Por otro lado, factores de transcripción relacionados con apoptosis inducida por estrés de RE en célula β como CHOP (Oyadomari

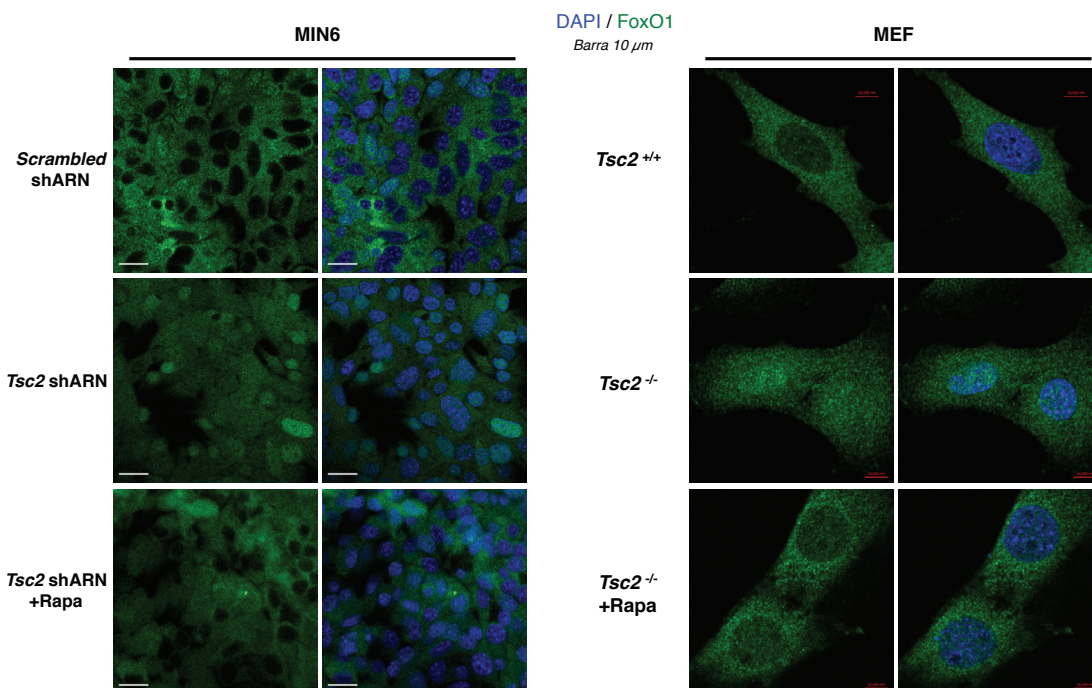


Figura 4.30. La hiperactivación de mTORC1 en célula β induce localización nuclear de FoxO1.

MIN6 o MEF creciendo en presencia de suero, fueron tratadas o no con rapamicina 20 nM 24h. Las células fueron fijadas y se obtuvieron imágenes de inmunofluorescencia en un microscopio confocal.

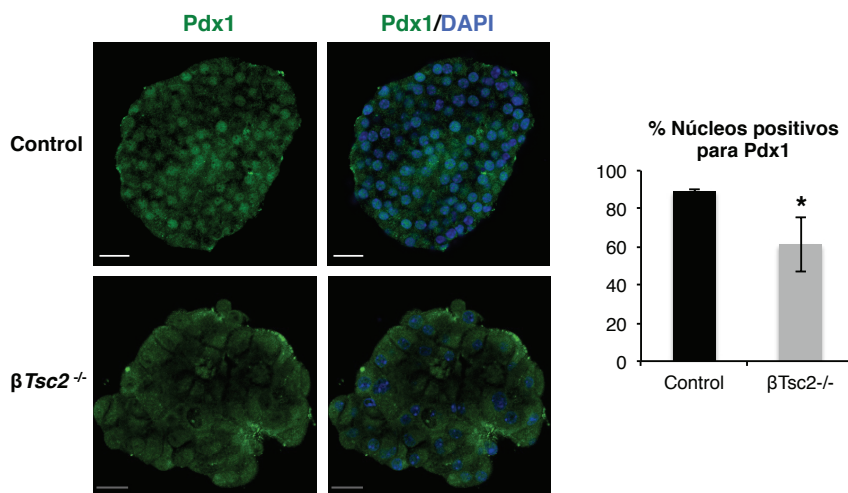


Figura 4.31. La hiperactivación de mTORC1 en célula β disminuye la localización nuclear de Pdx1.

Islotes aislados fueron incubados en RPMI 10% FBS durante 24h. Se obtuvieron imágenes de inmunofluorescencia en un microscopio confocal. El gráfico representa % de células con Pdx1 nuclear, expresado como media por islote \pm s.d. (n=5). *, $P < 0.05$

et al., 2002) y C/EBP β (Matsuda *et al.*, 2010), también se encontraron aumentados en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ (Figura 4.32, a).

Para comprobar la evolución de la respuesta del UPR con la edad, se obtuvo ARN de islotes de animales de 8 y 40 semanas. La expresión medida por PCR cuantitativa de *Bip*, *Cebpb* y *Chop* aumenta en islotes con la edad, y en mucha mayor medida en los animales $\beta Tsc2^{-/-}$ (Figura 4.32, b). A nivel de proteína, CHOP es indetectable en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ de animales de 8 semanas, encontrándose expresado a las 40 semanas (Figura 4.32, c). Otras observaciones en $\beta Tsc2^{-/-}$, como el aumento de p62/SQSTM1 son constantes a lo largo de la vida de los animales, lo cual no pasa con los marcadores de estrés de RE, que aumentan con la edad. Para

localizar específicamente en célula β a algunos de los marcadores que se vieron aumentados por *western-blot* y PCR cuantitativa en extractos totales de islotes $\beta Tsc2^{-/-}$, se realizaron aproximaciones de inmunomarcaje. CHOP es localizable en núcleos de células β en animales de 40 semanas (Figura 4.32, d), y fosfo Eif2a-Ser⁵¹ en células β de cortes de páncreas de animales de 35 semanas (Figura 4.32, e). No se encontró CHOP o fosfo Eif2a en islotes de animales control (datos no mostrados).

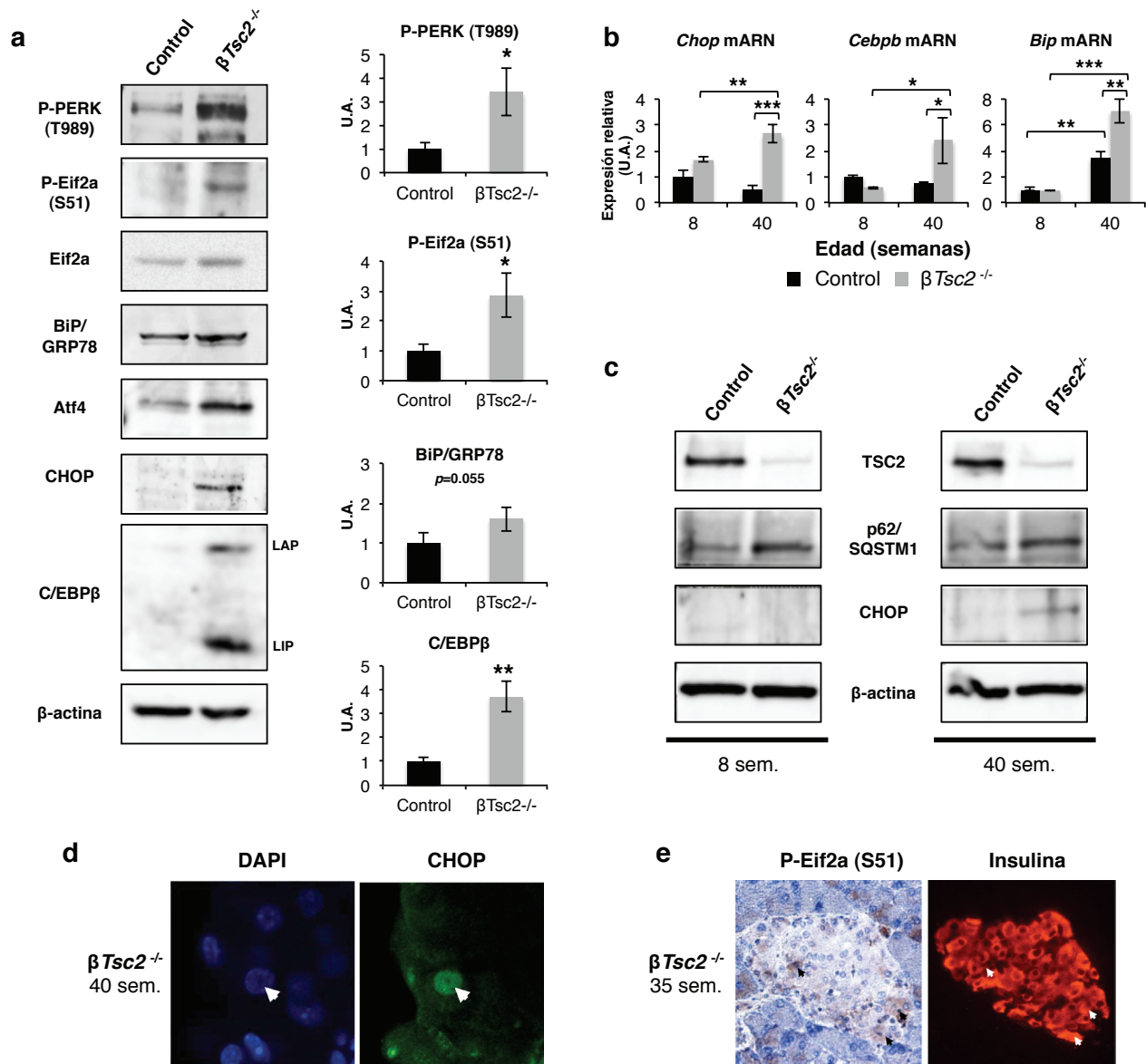


Figura 4.32. Estrés de RE en célula β del modelo $\beta Tsc2^{-/-}$.

(a) Extractos proteicos de islotes de ratones de 40 semanas fueron sometidos a *western-blot* con anticuerpos específicos. Se muestran *blots* representativos. A la derecha se muestra la cuantificación de P-PERK Ser⁹⁸⁹, P-Eif2a Ser⁵¹, BiP y C/EBP β (LAP) en unidades arbitrarias (U.A.) como medias \pm s.d. (n=2-3). *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

(b) Los niveles de mensajeros en islotes de animales de 8 y 40 semanas fueron analizado por PCR cuantitativa. Datos expresados en unidades arbitrarias como medias \pm s.d. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

(c) Extractos proteicos de islotes de animales de 8 y 40 semanas fueron sometidos a *western-blot*.

(d) Islotes aislados de animales de 40 semanas fueron analizados por microscopía confocal. Se muestra imagen representativa donde se observa CHOP en núcleo (verde), núcleos visualizados con DAPI (azul).

(e) Preparaciones pancreáticas en parafina fueron sometidas a inmunohistoquímica con un anticuerpo que detecta la fosforilación de Eif2a en Ser⁵¹, posteriormente las secciones fueron incubadas con anticuerpos anti-insulina para localizar las células β dentro del islote.

Como ha sido expuesto en la sección 2 de esta tesis, el estrés de RE se encuentra comúnmente asociado a un incremento en la ubiquitinización de proteínas, lo cual indica acumulación de proteínas mal plegadas (Huang *et al.*, 2007). El perfil de proteínas ubiquitinadas fue ligeramente mayor en extractos proteicos de islotes de $\beta Tsc2^{-/-}$, en comparación con los controles (Figura 4.33, a). Preparaciones de páncreas en parafina también mostraron mayor inmunoreactividad de islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ frente a un anticuerpo que detecta proteína poli-ubiquitinadas, y de manera específica en célula β como demostró la contra-tinción con insulina (Figura 4.33, a). Secciones de páncreas incubados con IgG normal de conejo, como controles negativos, son mostrados (Figura 4.33, c).

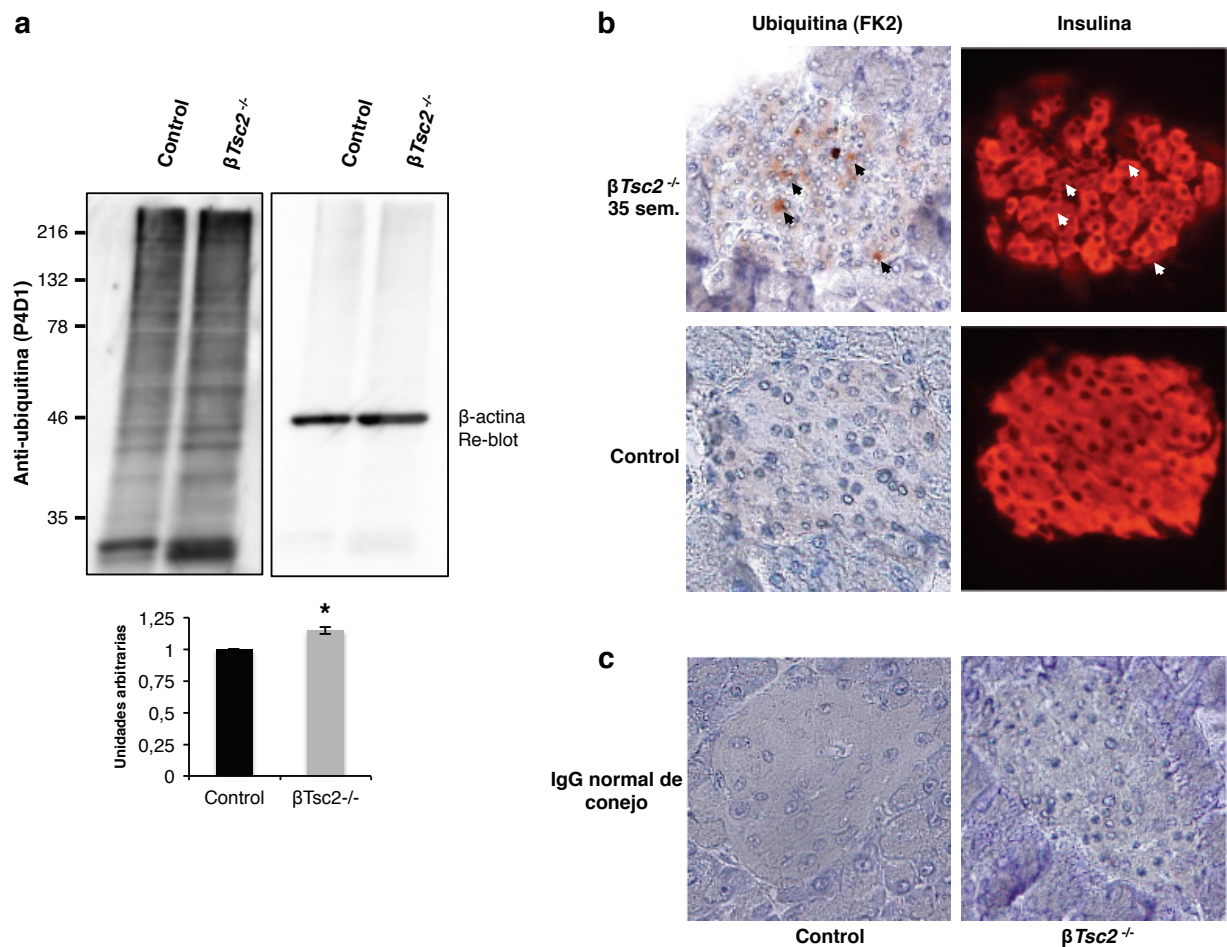


Figura 4.33. Acumulación de proteínas ubiquitinadas en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$.

(a) Extractos proteicos de islotes de 24 semanas fueron sometidos a SDS-PAGE 12%, y *western-blot* con el anticuerpo monoclonal anti-poli-ubiquitina (P4D1). Se muestra densitometría representada como unidades arbitrarias en media \pm s.d. (n=2). *, $P < 0.05$.

(b) Secciones pancreáticas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-poli-ubiquitina (FK2), detectando acúmulos positivos en célula β .

(c) Secciones pancreáticas incubadas con IgG normal de conejo (como control negativo) y procesadas en paralelo a otras inmunohistoquímicas mostradas en este trabajo.

4.3.5 La hiperactivación de mTORC1 como causa de autofagia deficiente

mTORC1 es un importante regulador negativo de autofagia (Noda y Ohsumi, 1998; Ravikumar *et al.*, 2004), por lo tanto cabe esperar que su hiperactivación crónica debido a la delección de *Tsc2* pueda llevar a una actividad autofágica deficiente. Los niveles basales de LC3B-II en lisados de islotes son muy similares entre controles y $\beta Tsc2^{-/-}$, sin embargo p62/SQSTM1 se encuentra claramente acumulado (Figura 4.34, a). Imágenes de microscopio confocal también muestran como el punteado de p62/SQSTM1 es de mayor número, y estos acúmulos son mayor tamaño en células β de $\beta Tsc2^{-/-}$ (Figura 4.34, b). También permitió observar como la acumulación de p62/SQSTM1 es exclusiva de célula β y no ocurre en células α (Figura 4.34, e).

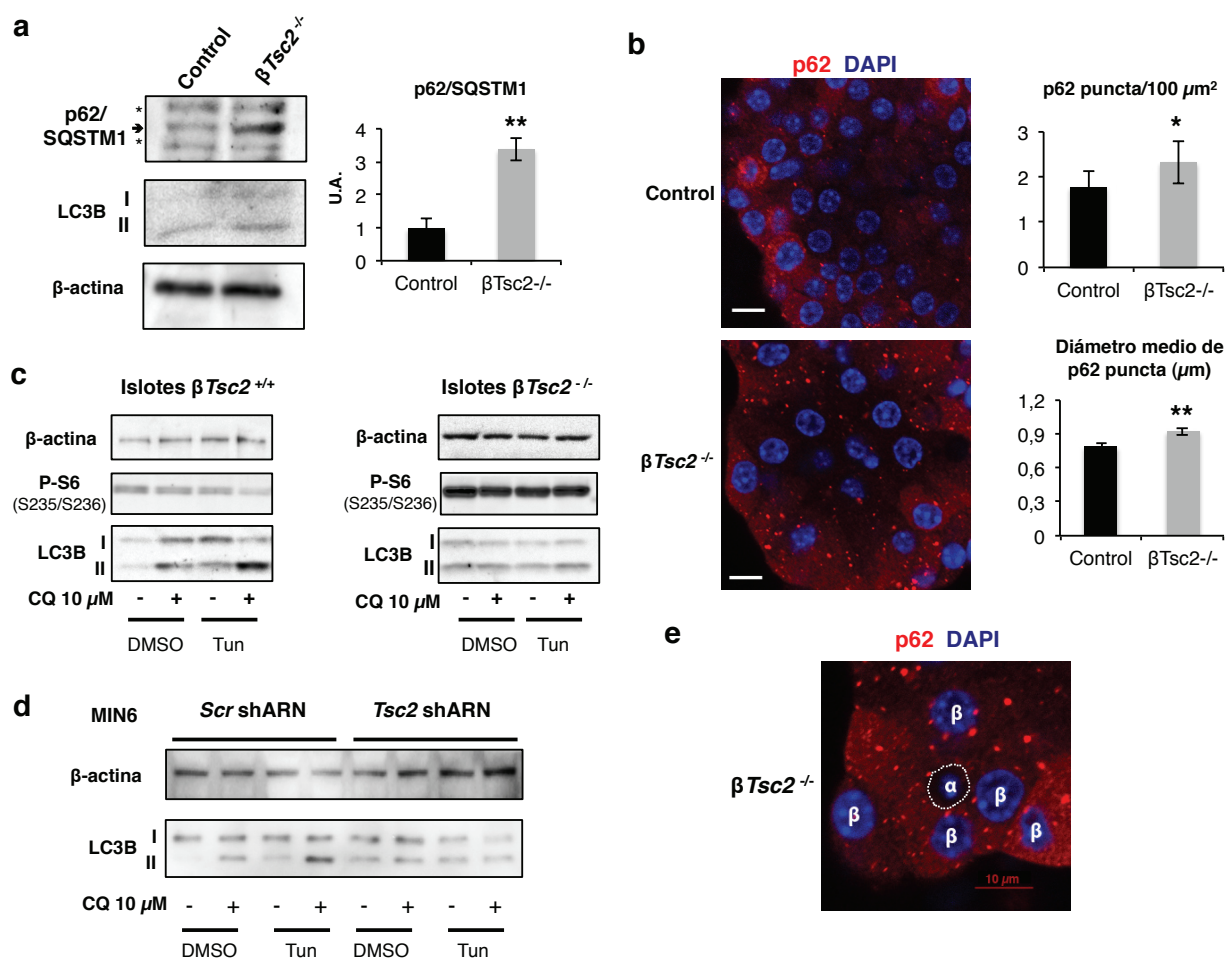


Figura 4.34. Autofagia deficiente en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$.

(a) Extractos proteicos de islotes de 24 semanas fueron sometidos a western-blot. (*) indica bandas inespecíficas. Se muestra densitometría de p62/SQSTM1 representada como unidades arbitrarias en media \pm s.d. (n=3). **, $P < 0.01$.

(b) Islotes de 24 semanas fueron observados a microscopio confocal (barras 10 μm), se contó el número de puntos positivos para p62/SQSTM1 en varios islotes de al menos 5 animales por grupo, representando media por animal \pm s.d. El diámetro medio en μm de los puntos positivos está expresado como media \pm s.d. por islotes en al menos 3-4 animales. *, $P < 0.05$. **, $P < 0.01$.

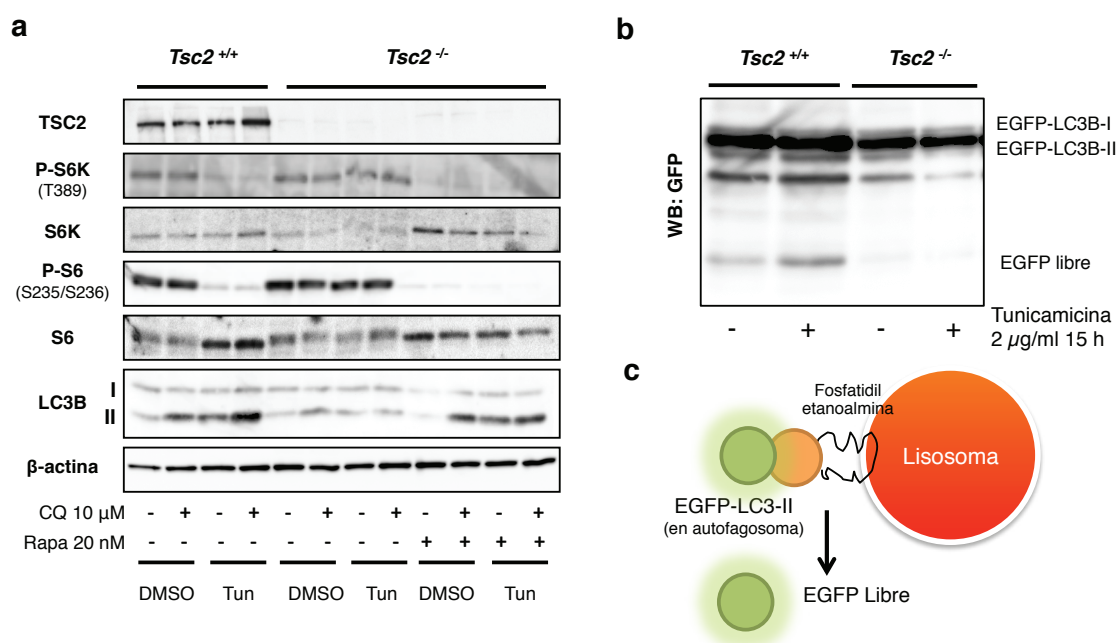
(c) Islotes aislados de animales de 24 semanas fueron incubados en RPMI 10% FBS y tratados con tunicamicina (Tun) 2 $\mu g/ml$ o DMSO durante 15 h en presencia o ausencia de cloroquina (CQ) 10 μM .

(d) Células MIN6 fueron tratados con tunicamicina (Tun) 2 $\mu g/ml$ o DMSO durante 15 h en presencia o ausencia de cloroquina (CQ) 10 μM .

(e) Imagen de microscopio confocal mostrando detalle de islote de $\beta Tsc2^{-/-}$ en el cual se aprecia acumulación de p62 específicamente en célula β .

Para observar diferencias en la conversión de LC3B fue preciso someter a los islotes a tratamiento *ex vivo* con el fin de poner a prueba su capacidad de inducir autofagia. Para ello islotes aislados fueron tratados con tunicamicina, agente que inhibe la N-glucosilación de proteínas causando estrés de RE de forma aguda. El tratamiento se hizo en presencia o ausencia de cloroquina, la cual permite hacerse una idea del flujo autofágico al disminuir la acidificación de lisosomas y la degradación de LC3B-II en ellos. En islotes control, el tratamiento con tunicamicina disminuyó la actividad de mTORC1, visto como reducida fosforilación de S6-Ser²³⁵⁻²³⁶, y estimuló la conversión de LC3B. Sin embargo en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ no se observa disminución de la fosforilación de S6, y la respuesta a la tunicamicina fue nula, indicando una respuesta autofágica deficiente frente a estrés de RE (Figura 4.34, c). Este experimento se repitió en líneas de MIN6 con expresión de *Tsc2* interferida, obteniéndose similares resultados (Figura 4.34, d)

Para confirmar como la hiperactivación de mTORC1 por delección de *Tsc2* produce una respuesta autofágica deficiente a estrés de RE se realizaron experimentos *in vitro* usando MEF



Tsc2^{-/-}. La estimulación con tunicamicina en células control MEF *Tsc2*^{+/+} es capaz de disminuir la actividad de mTORC1 y reducir la fosforilación de S6K y S6. La conversión de LC3B tras estímulo con tunicamicina fue claramente observada. Sin embargo, en MEF *Tsc2*^{-/-} el estímulo no fue capaz de bloquear la fosforilación de S6K/S6 y la conversión de LC3B resultó impedida. Este fenómeno es atribuible al aumento constitutivo de actividad de mTORC1 en MEF *Tsc2*^{-/-}, ya que el tratamiento con rapamicina en estas células fue capaz de recuperar el patrón observado en las células control MEF *Tsc2*^{+/+} (Figura 4.35, a). Otro método para observar actividad autofágica es monitorizar la liberación de EGFP de la proteína de fusión EGFP-LC3B, ya que EGFP es más resistente a la degradación por enzimas lisosomales que LC3B. La liberación de EGFP da idea del nivel de formación de autofagosomas, en los cuales LC3B será degradado (esquemático en Figura 4.35, c). MEF fueron transfectados transitoriamente para la expresión EGFP-LC3B, y tras tratamiento con tunicamicina, se observó la liberación de EGFP, claramente mayor en MEF *Tsc2*^{+/+} (Figura 4.35, b).

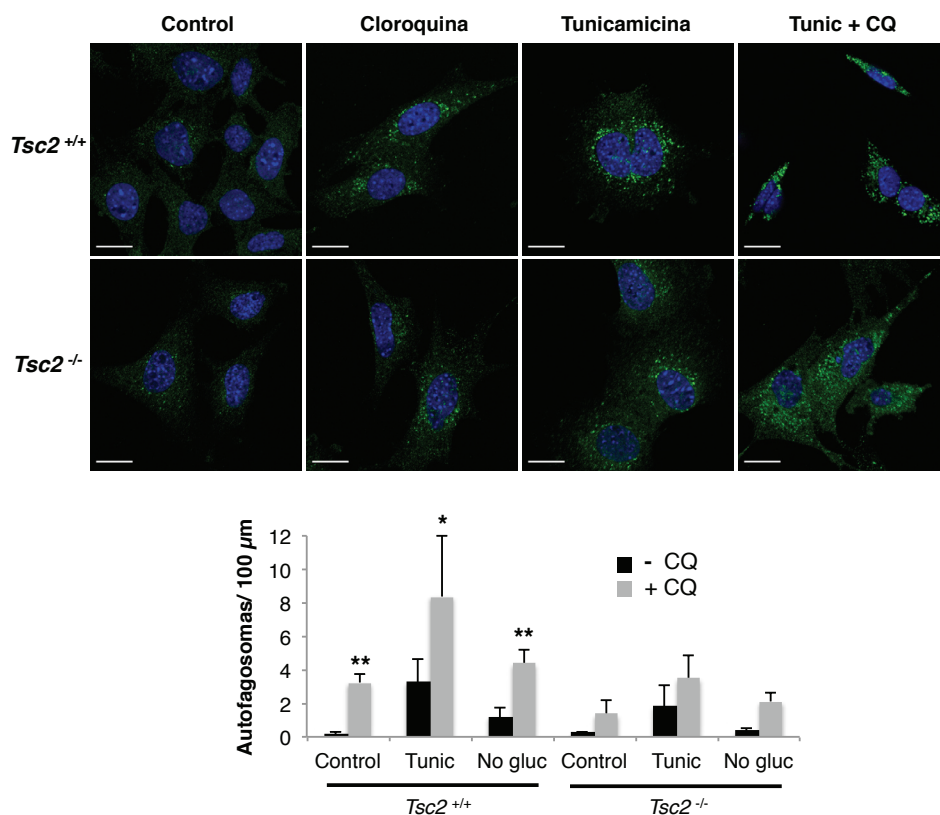
Figura 4.35. Respuesta autofágica deficiente a estrés de RE en MEF *Tsc2*^{-/-}.

(a) MEF fueron tratados con tunicamicina 2 μ g/ml o DMSO durante 15 h, en presencia o ausencia de rapamicina 20 nM y/o cloroquina 10 μ M en los puntos indicados. Se muestran *blots* representativos.

(b) MEF transfectados transitoriamente para la expresión de la proteína de fusión EGFP-LC3B, tras 24 h fueron tratados por 15 h con tunicamicina 2 μ g/ml. Los extractos fueron sometidos a SDS-PAGE 12% e incubados con anticuerpo que reconoce GFP, visualizándose tanto la proteína de fusión EGFP-LC3B (convertible a EGFP-LC3B-II) como EGFP libre.

(c) Esquema explicativo del experimento anterior.

Por inmunofluorescencia frente a LC3B también se observó un menor número de autofagosomas en MEF $Tsc2^{-/-}$ tanto en condiciones basales como en respuesta a tunicamicina o privación de glucosa (Figura 4.36).



Para corroborar los resultados vistos hasta ahora, se sometieron islotes de controles y $\beta Tsc2^{-/-}$ a tratamiento *ex vivo* con tunicamicina para obtener imágenes tomográficas de islotes marcados con LC3B y permitir el conteo de autofagosomas. Al ser las células β de $\beta Tsc2^{-/-}$ de un tamaño significativamente mayor, los resultados fueron normalizados por área. Se observa efectivamente como en condiciones basales el número de autofagosomas por 100 μm^2 fue de 2.5 ± 0.6 , mientras que tras tratamiento con tunicamicina aumentó su número a 6.6 ± 1.5 . Al detener el flujo autofágico con cloroquina, el número de autofagosomas observado alcanzó los 9.7 ± 0.8 por 100 μm^2 (Figura 4.37). Sin embargo, en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ el conteo de autofagosomas arrojó resultados similares a los mostrados en los *immunoblots* de figura 4.34, ya que no hubo respuesta significativa tras el tratamiento con tunicamicina (Figura 4.37).

Otro estímulo que fue utilizado para probar la actividad autofágica en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ fue la privación de glucosa. Al igual que la tunicamicina inhibe la N-glucosilación de proteínas, la privación de glucosa también produce estrés de RE al impedir la N- y O-glucosilación de proteínas por la propia falta de glucosa, aunque quizás de manera menos drástica que lo que se observa tras tratamiento con tunicamicina. Además, la privación energética *per se* es un estímulo que en parte estimula autofagia por la ruta AMPK/TSC2 la cual lleva a la inhibición de mTORC1 (Inoki *et al.*, 2003b; Hosokawa *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). En islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ la respuesta autofágica a privación de glucosa también es deficiente cuando se compara a

controles (Figura 4.38, a). Esta respuesta impedida es específica de célula β ya que imágenes de microscopio confocal muestran como las células α del islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ si muestran un aumentado número de autofagosomas tras privación de glucosa (Figura 4.38, b). Por último se muestran comparaciones de los resultados de número de autofagosomas en experimentos de estímulo con tunicamicina y privación de glucosa en controles y $\beta Tsc2^{-/-}$ referido por área y por célula (Figura 4.38, c).

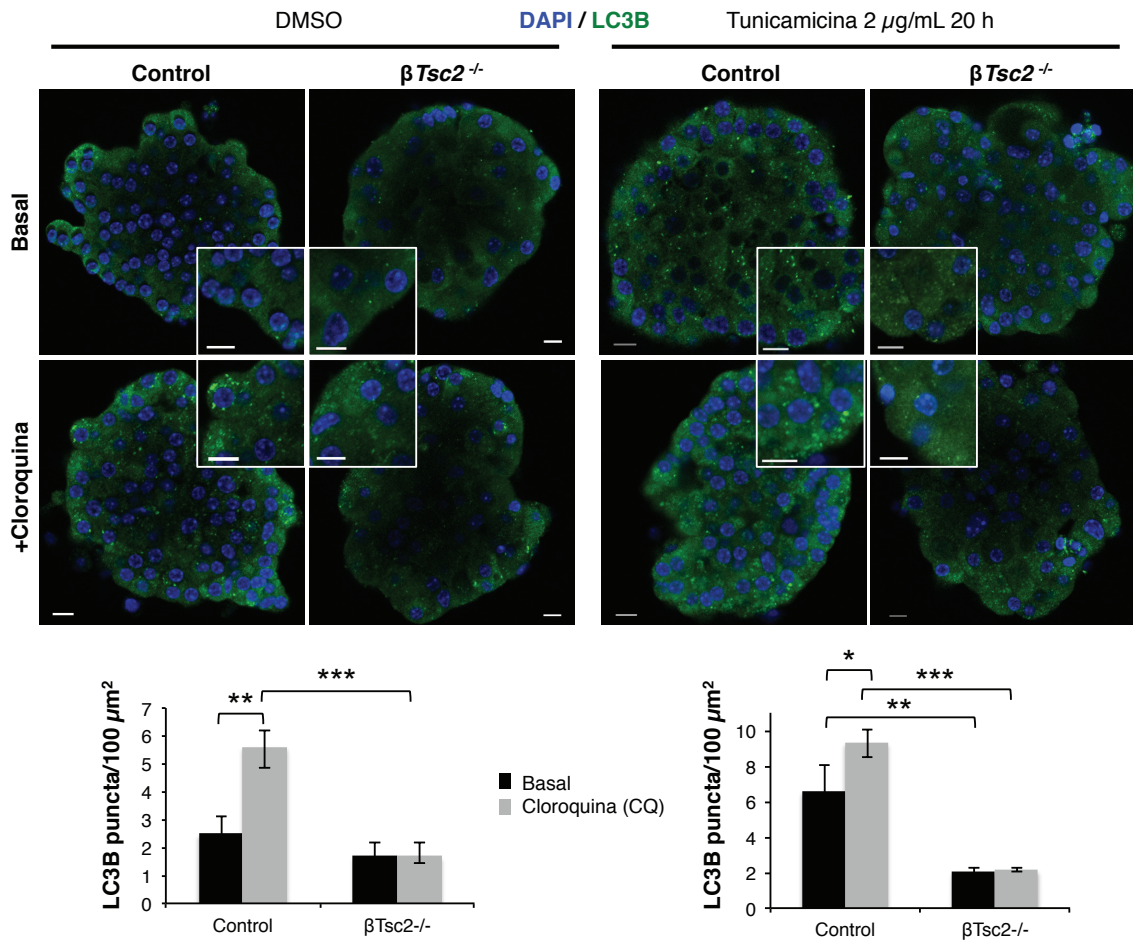


Figura 4.37. Menor número de autofagosomas tras estimulación de estrés de RE en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$.

Islotes aislados de animales de 24 semanas fueron incubados en RPMI 10% FBS y tratados con tunicamicina 2 µg/ml durante 20 h en presencia o ausencia de cloroquina 10 µM. Se contaron número de autofagosomas por área en varios islotes de 3-5 animales. Representado el número de autofagosomas por 100 µm² como media por animal ± s.d. Gráfica de la izquierda para condiciones basales y de la derecha para estímulos con tunicamicina. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

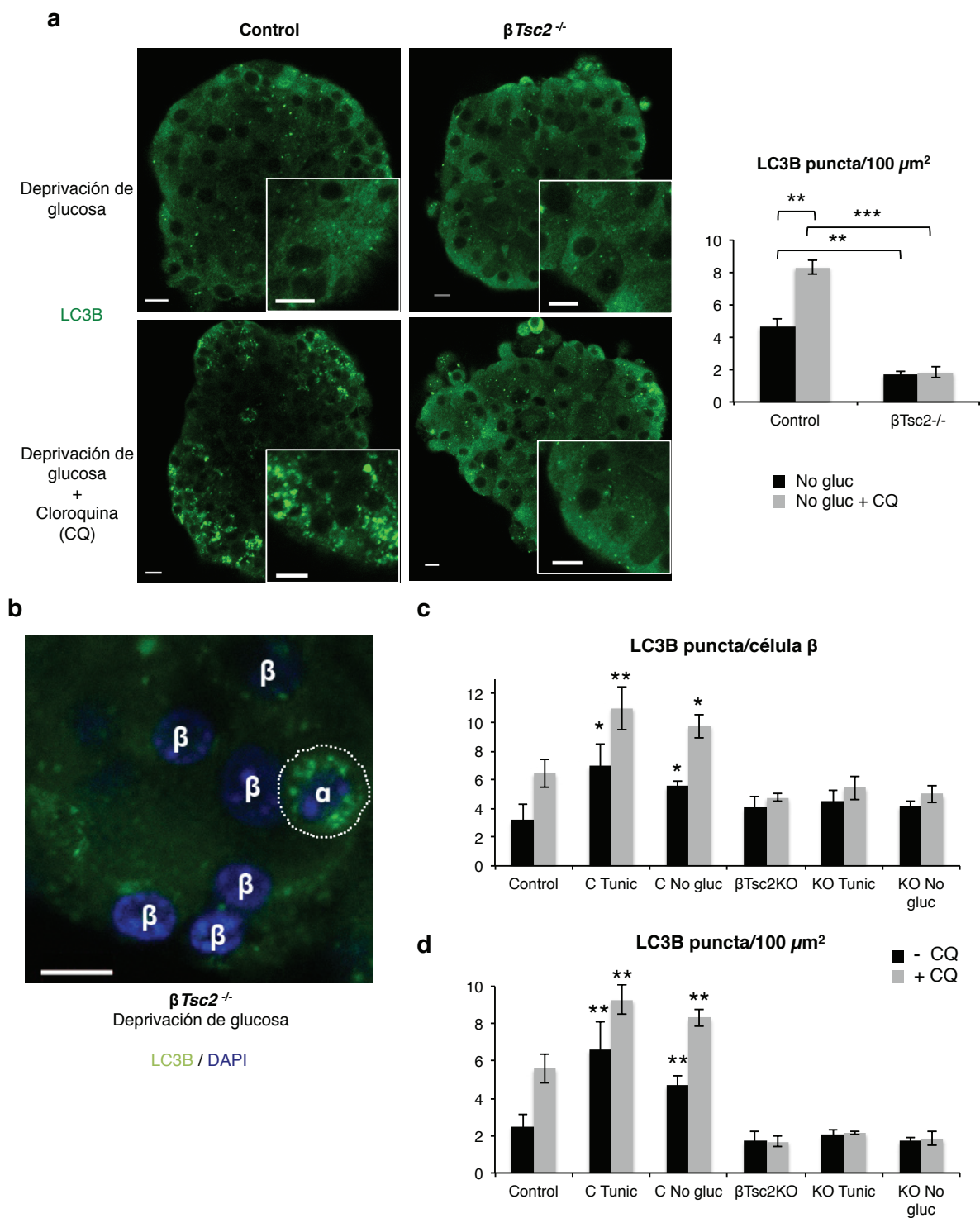


Figura 4.38. Menor respuesta autofágica a deprivación de glucosa en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$.

(a) Islotes aislados de ratones de 24 semanas fueron incubados en RPMI 10% FBS durante una noche, y después incubados en medio sin glucosa durante 20 h en presencia o ausencia de cloroquina 10 μM . Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal (Barra 10 μm). Se contaron número de autofagosomas por área en varios islotes de 3-5 animales. Representado el n° de autofagosomas por 100 μm^2 como media por animal \pm s.d. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

(b) Imagen de microscopio confocal mostrando detalle de islote de $\beta Tsc2^{-/-}$ en el cual se aprecia respuesta autofágica deficiente en célula β , pero no en célula α .

(c) Representación de todos los experimentos de conteo de autofagosomas expresados por área. (d) Representación de todos los experimentos expresando resultados por célula. Nótese como al ser de mayor tamaño las células β de $\beta Tsc2^{-/-}$ en comparación con los controles, un método u otro arroja diferentes resultados. Se muestran resultados del test estadístico al comparar cada punto de los controles (C) con el correspondiente en $\beta Tsc2^{-/-}$ (KO). *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

4.3.6. Hiperactivación de mTORC1 y mitofagia deficiente.

Debido a las observaciones que evidenciaron una autofagia deficiente, y a otras observaciones previas que demostraron la mayor masa mitocondrial en célula β de animales $\beta Tsc2^{-/-}$ (Koyanagi *et al.*, 2011). Se planteó la hipótesis de una posible menor degradación mediada por autofagia de las mitocondrias (mitofagia) en célula β de este modelo. Esto podría estar contribuyendo al fracaso de la célula β , al acumularse mitocondrias dañadas. Recientemente el proceso de mitofagia ha sido propuesto como protector frente apoptosis, aunque no existen demasiadas evidencias al respecto (Green *et al.*, 2011).

Para probar la hipótesis, se aislaron islotes de ratones de 40 semanas, y se llevó a cabo un doble marcaje con COX4 (proteína mitocondrial) y p62/SQSTM1, la cual permite el reconocimiento de agregados proteicos u orgánulos dañados, por la maquinaria autofágica (Pankiv *et al.*, 2007). Los islotes fueron observados a microscopio confocal con objetivo de alto aumento, con el fin de obtener imágenes tomográficas con detalle de las células β dentro del islote. En células β de islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ se encontró mayor número de estructuras p62/SQSTM1 positivas, como ha sido mostrado anteriormente en la [Figura 4.34](#). Sorprendentemente, parte de estas estructuras colocalizaron con COX4, indicando la presencia de mitocondrias marcadas para su degradación por autofagia ([Figura 4.39](#)) Okatsu *et al.*, 2010. Experimentalmente, es difícil encontrar mitocondrias colocalizando con la maquinaria autofágica (Twig *et al.*, 2008). Se ha descrito que el proceso de digestión de mitocondrias una vez reconocidas por los autofagosomas es de 5-7 min (Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007), aunque en célula β está descrito que pérdida de potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se produce en el rango de horas antes de la degradación autofágica (Twig *et al.*, 2008). Nuestras observaciones evidenciaron una colocalización de p62/SQSTM1 con mitocondrias resultó prácticamente inexistente en islotes control, mientras que $\beta Tsc2^{-/-}$ se encontró con frecuencia, lo cual indicó que estas mitocondrias podrían acumularse debido a una eliminación por mitofagia deficiente.

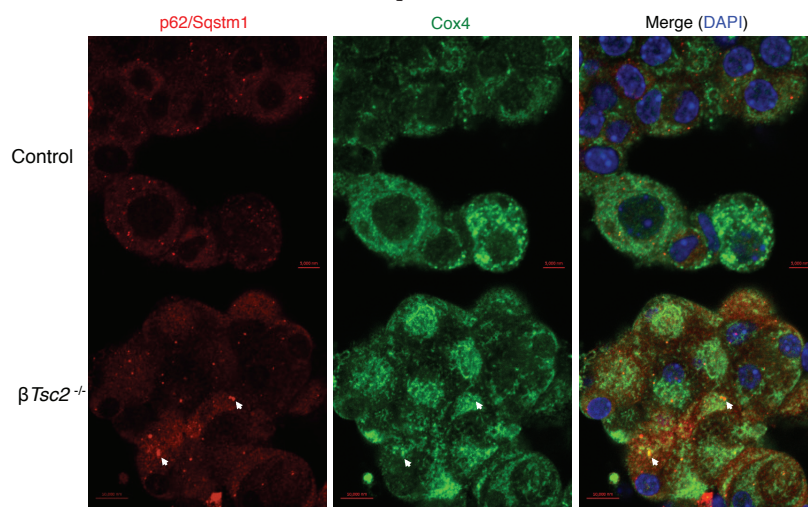


Figura 4.39. Acumulación de mitocondrias p62 positivas en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$.

Islotes aislados en animales de 40 semanas fueron sometidos a inmunofluorescencia con COX4 (mitocondrias) y p62/SQSTM1. Se marcan con flechas mitocondrias que colocalizan con p62/SQSTM1. Barras representan 10 μ m.

Con el fin de observar el estado de las mitocondrias que colocalizaron con p62/SQSTM1, se realizó un triple marcaje con TOM20, p62/SQSTM1 y Mitotracker CMTMRos, según el esquema mostrado ([Figura 4.39, b](#)). Mitotracker CMTMRos se acumula específicamente en mitocondrias respirando activamente (alto $\Delta\psi_m$), permitiendo diferenciar mitocondrias activas de aquellas despolarizadas (colapso de $\Delta\psi_m$), y además el marcaje no se pierde tras fijación con aldehídos, permitiendo el marcaje múltiple con anticuerpos. Al igual que en la figura anterior, la colocalización de p62/SQSTM1 con mitocondrias fue mucho mayor en $\beta Tsc2^{-/-}$, y se produce específicamente en mitocondrias despolarizadas ([Figura 4.40, a, c, y videos suplementarios 4 y 5](#)). Este experimento fue llevado a cabo con islotes de animales de 8,

24 y 40 semanas con el fin de observar la evolución del fenómeno con la edad de los animales. Curiosamente se encontró que el número de mitocondrias despolarizadas y marcadas con p62/SQSTM1 fue aumentando en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ con la edad, mientras que en controles su presencia resultó anecdótica y sin variaciones respecto a la edad. Por otro lado, encontrar experimentalmente mitocondrias respirando activamente y colocalizando con p62/SQSTM1 fue bastante inusual, y no hubo diferencias según modelo o edad. (Figura 4.40, c). Cabe puntualizar que más que mitocondrias *per se*, se observaron regiones negativas para Mitotracker con colocalización de p62/SQSTM1 y marcadores mitocondriales, en las que posiblemente se encuentren acúmulos de mitocondrias dañadas ya que p62/SQSTM1 juega un importante papel en el reconocimiento y agrupación de mitocondrias previo al reconocimiento por la maquinaria autofágica (Narendra *et al.*, 2010; Okatsu *et al.*, 2010). Para confirmar estas observaciones, los experimentos fueron además repetidos utilizando COX4 como marcador mitocondrial alternativo a TOM20, con iguales resultados (datos no mostrados). Las grandes diferencias observadas en este experimento entre islotes controles y $\beta Tsc2^{-/-}$ solo son explicables asumiendo una mitofagia deficiente en célula β por la hiperactivación de mTORC1 en el modelo $\beta Tsc2^{-/-}$.

Se usaron MEF $Tsc2^{-/-}$ para ensayar cómo era la respuesta autofágica frente CCCP, un agente que produce pérdida de $\Delta\Psi_m$ y es usado comúnmente como inductor de mitofagia (Narendra *et al.*, 2008). Dosis crecientes de CCCP llevaron a la disminución de la actividad de mTORC1, visto como menor fosforilación de S6, y aumento de conversión de LC3B en células $Tsc2^{+/+}$. Sin embargo en células $Tsc2^{-/-}$ la fosforilación de S6 no disminuyó tras tratamiento con CCCP y la estimulación de autofagia resultó menor, observándose además mayor acumulación de p62/SQSTM1 en células $Tsc2^{-/-}$ (Figura 4.41, a). Con el fin de atribuir la respuesta deficiente a la hiperactividad de mTORC1, se repitió el experimento en presencia de rapamicina. Como era esperable, el tratamiento con rapamicina redujo totalmente la fosforilación de S6, aumentando la conversión de LC3B, y reduciendo la acumulación de p62/SQSTM1 tras tratamiento con CCCP. Esto permitió observar en células $Tsc2^{-/-}$ tratadas con rapamicina un perfil similar al observado en células $Tsc2^{+/+}$ (Figura 4.41, b).

Se obtuvieron imágenes de inmunofluorescencia de células MEF control $Tsc2^{+/+}$ y $Tsc2^{-/-}$, las cuales fueron marcadas con Mitotracker y posteriormente con anticuerpos frente a p62/SQSTM1 y LC3B. Dado lo rápido del proceso de digestión tras el reconocimiento de mitocondrias, resulta muy raro poder observar mitocondrias respirando activamente (positivas para Mitotracker), que colocalicen con marcadores de autofagosoma (LC3B), sin embargo resultó aún más raro en células $Tsc2^{-/-}$, mientras que en $Tsc2^{+/+}$ fue posible ocasionalmente. La frecuencia de mitocondrias observables colocalizando con LC3B aumentó tras tratamiento con cloroquina en células $Tsc2^{+/+}$ (Figura 4.42), mientras que en células $Tsc2^{-/-}$ fue posible observar grandes acúmulos de p62/SQSTM1 que no colocalizaron con LC3B, de nuevo indicando un defecto en el funcionamiento de la maquinaria autofágica en células $Tsc2^{-/-}$. En células control resulta raro observar acúmulos positivos para p62/SQSTM1 que no colocalicen con el marcador de autofagosomas LC3B (Figura 4.42).

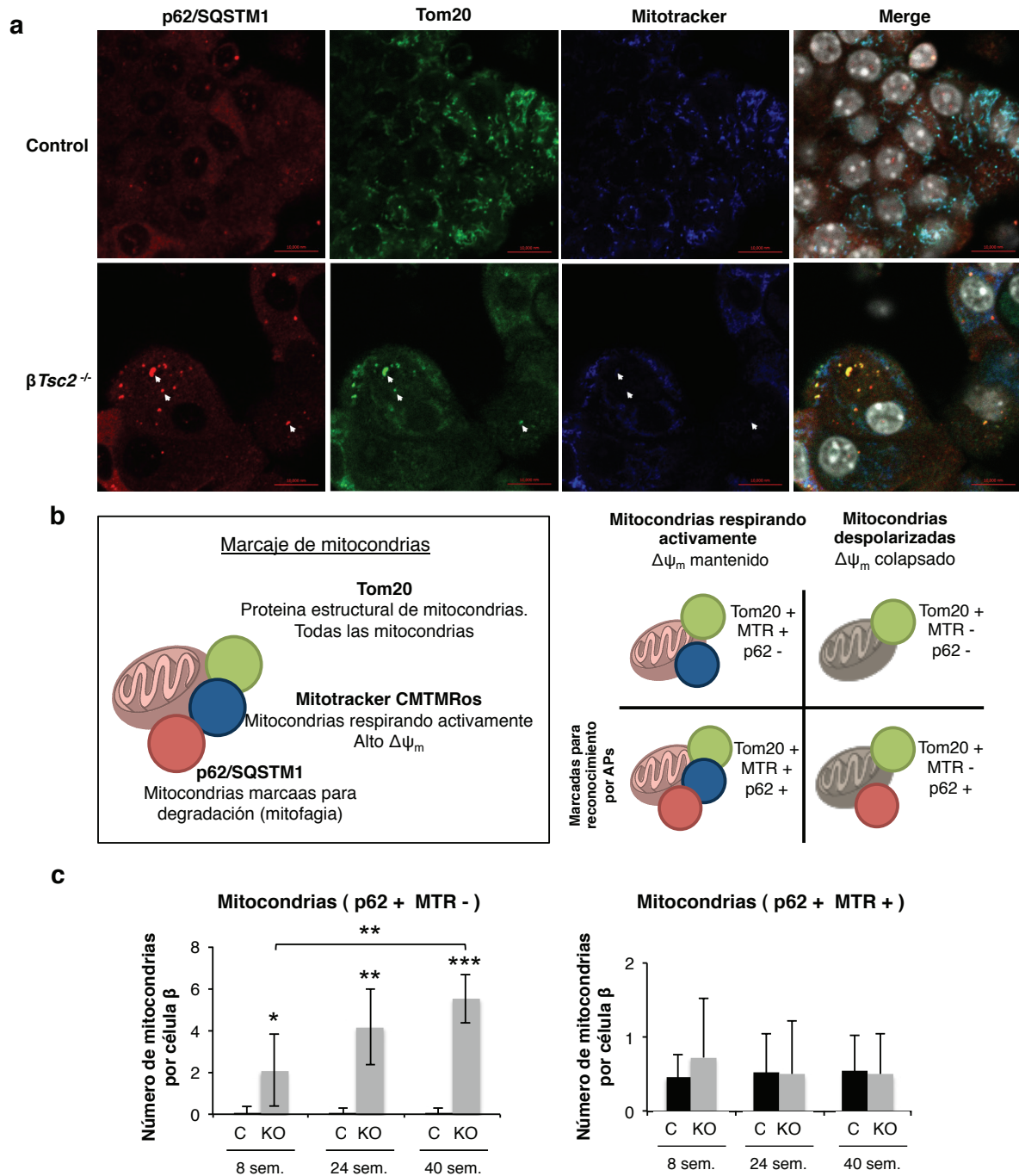


Figura 4.40. Acumulación progresiva con la edad de mitocondrias despolarizadas en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$.

(a) Islotes aislados de ratones de 24 semanas fueron incubados en RPMI 10% FBS durante una noche, y al día siguiente tratados con 500 nM Mitotracker Orange CMTMRos (clorometil-tetrametilrosamina) durante 30 min en medio sin suero. Posteriormente fueron fijados e incubados con anticuerpos específicos. Se muestran imágenes de islotes de 40 semanas, y las flechas blancas indican mitocondrias con bajo $\Delta\Psi_m$, negativas para Mitotracker (MTR), y positivas para p62. Barras representan 10 μ m.

(b) Esquema que ilustra el marcaje llevado a cabo en el experimento mostrado en esta figura.

(c) Cuantificación del número de mitocondrias por célula β ($p62^+$ -MTR⁻, izquierda) y ($p62^+$ -MTR⁺, derecha). Se contabilizaron por célula en diferentes secciones, en varios islotes por animal. Medias por animal \pm s.d. (n=3-4). Diferencias significativas al comparar $\beta Tsc2^{-/-}$ con $\beta Tsc2^{+/+}$, o $\beta Tsc2^{-/-}$ de 8 y 40 semanas. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

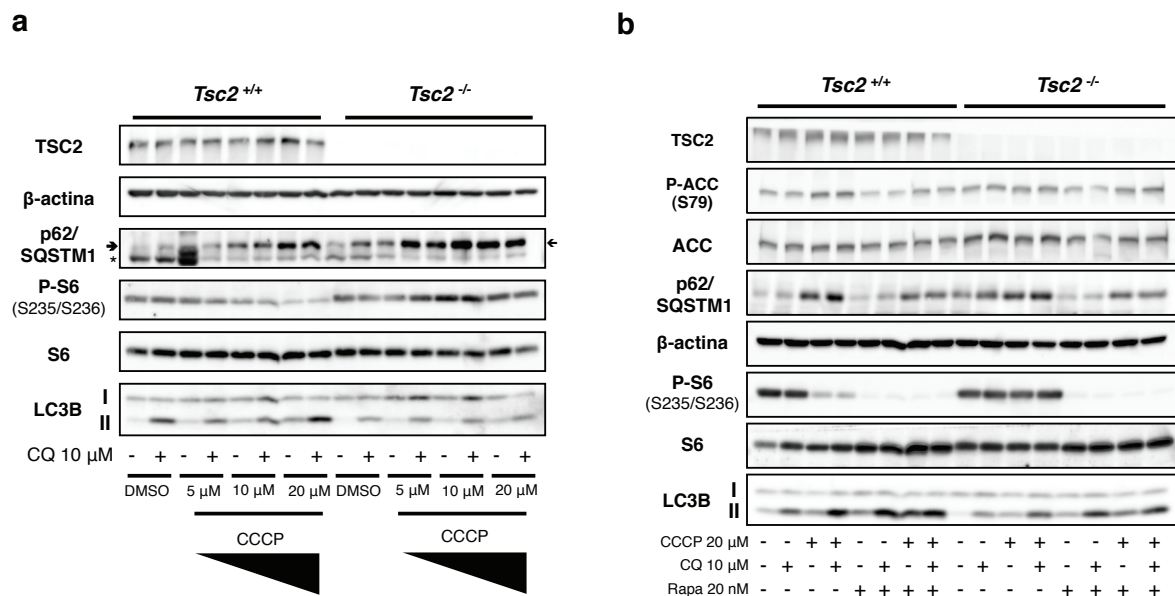


Figura 4.41. La hiperactivación de mTORC1 disminuye la respuesta autofágica inducida por desacoplamiento mitocondrial.
(a) MEF control *Tsc2*^{+/+} y *Tsc2*^{-/-} fueron tratados con diferentes dosis del desacoplante mitocondrial carbonilcianuro *m*-clorofenilhidrazona (CCCp) durante 15 h, en presencia o ausencia de cloroquina 10 μ M. (*) Indica banda no específica.
(b) MEF fueron tratados con CCCp durante 15 h en presencia o ausencia de rapamicina 20 nM. Se muestran *blots* representativos.

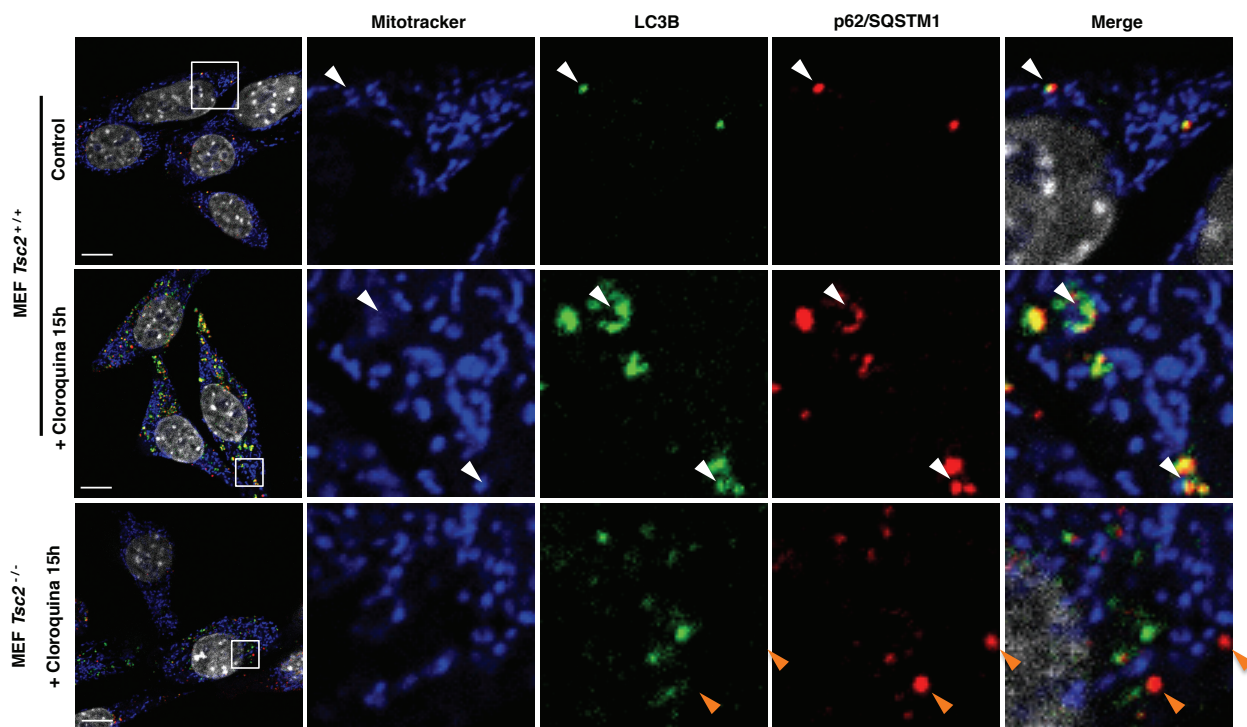


Figura 4.42. Mitofagia disminuida en MEF *Tsc2*^{-/-}.
 MEF fueron ensayados por inmunofluorescencia en condiciones basales o tras inhibición del flujo autofágico con cloroquina 10 μ M durante 15 h. Previo a la fijación con 4% (p/v) paraformaldehído, las células fueron incubadas con Mitotracker Orange CMTRox 200 nM en medio sin suero durante 30 min, y posteriormente incubadas con anticuerpos para la visualización de LC3B (verde) y p62 (rojo), además de núcleos con DAPI (blanco). Puntas blancas indican mitocondrias que colocalizan con LC3B/p62 en MEF *Tsc2*^{+/+}. En MEF *Tsc2*^{-/-} se encuentran agregados positivos para p62 que son negativos para LC3B (puntas naranjas).

4.3.7. La deficiencia de *Tsc2* produce aumento de la masa mitocondrial y acumulación de proteínas mitocondriales oxidadas

El papel de mTORC1 sobre la función mitocondrial fue primeramente descrito al observarse como la rapamicina disminuía los niveles de PGC-1 α y la expresión de genes claves para el metabolismo mitocondrial, los cuales estaban anormalmente aumentados en MEF *Tsc2*^{-/-} (Cunningham *et al.*, 2007). En el modelo β *Tsc2*^{-/-} también fue demostrado como animales de 8 semanas contaban con una mayor masa mitocondrial en célula β (Koyanagi *et al.*, 2011).

Usando secciones pancreáticas de ratones control y β *Tsc2*^{-/-} se realizó inmunohistoquímica frente a diferentes marcadores mitocondriales (COX4, VDAC1 y TOM20). Mientras que la inmunoreactividad en islotes de animales control es uniforme a lo largo de todo el islote, en β *Tsc2*^{-/-} se muestra muy aumentada específicamente en célula β para los tres marcadores mencionados (Figura 4.43).

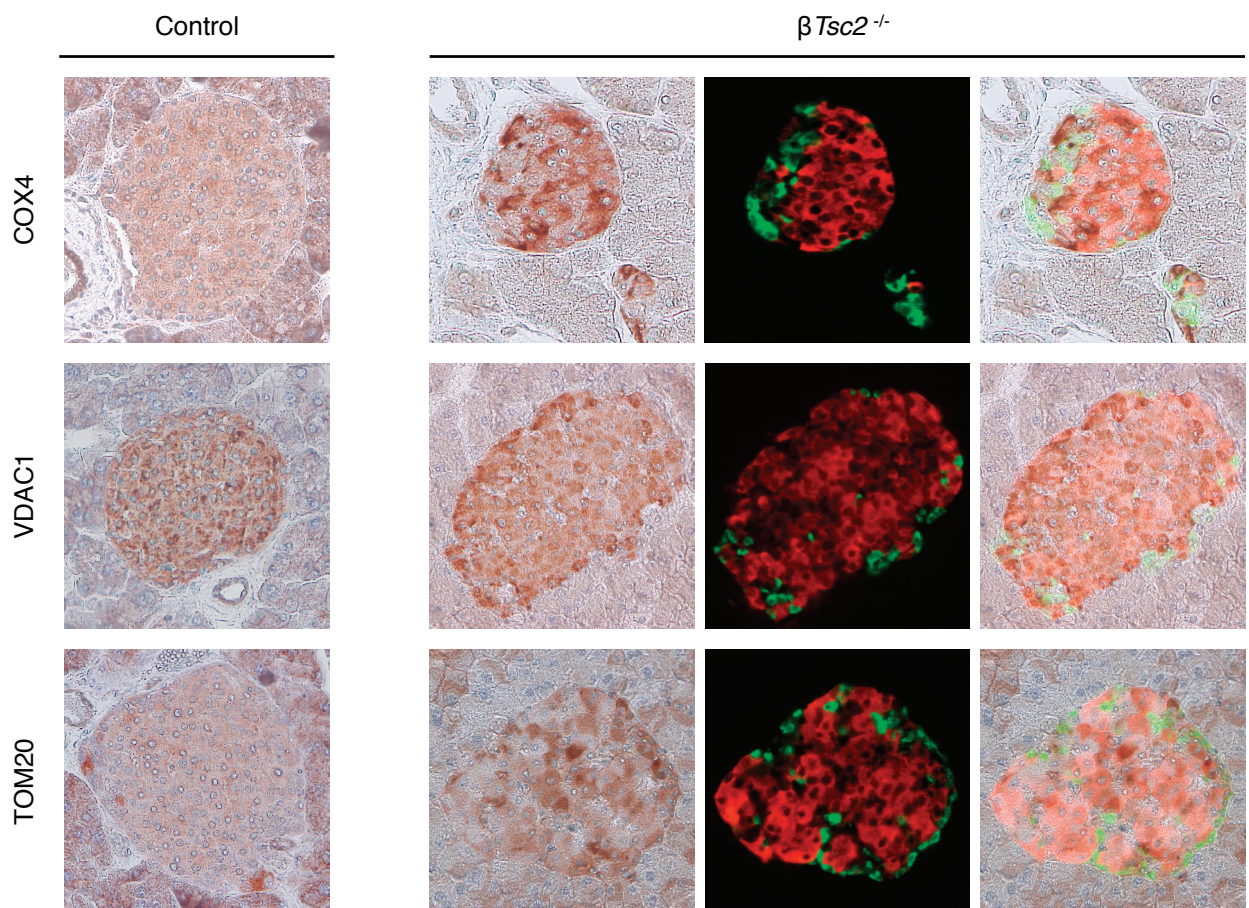


Figura 4.43. Mayor masa mitocondrial en células β de islotes β *Tsc2*^{-/-}.

Secciones de páncreas de animales de 35 semanas fueron sometidas a inmunohistoquímica con anticuerpos específicos de proteínas mitocondriales (COX4, VDAC1, TOM20). Se muestran imágenes de islotes β *Tsc2*^{-/-} donde se aprecia la mayor inmunoreactividad específicamente en célula β , revelado tras post-tinción con insulina (rojo) y glucagón (verde).

Una menor degradación autofágica de las mitocondrias podría estar llevando a la acumulación de mitocondrias no funcionales, lo cual ha sido relacionado con envejecimiento y muerte celular (Terman y Brunk, 2004; Yen y Klionsky, 2008). Las mitocondrias son la fuente primaria de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que su maquinaria proteica y mtADN son especialmente propensos a daño por ROS (Kim y Lemasters, 2011). Una disfunción de la degradación de mitocondrias resulta en la acumulación de proteínas mitocondriales oxidadas (Twig *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009).

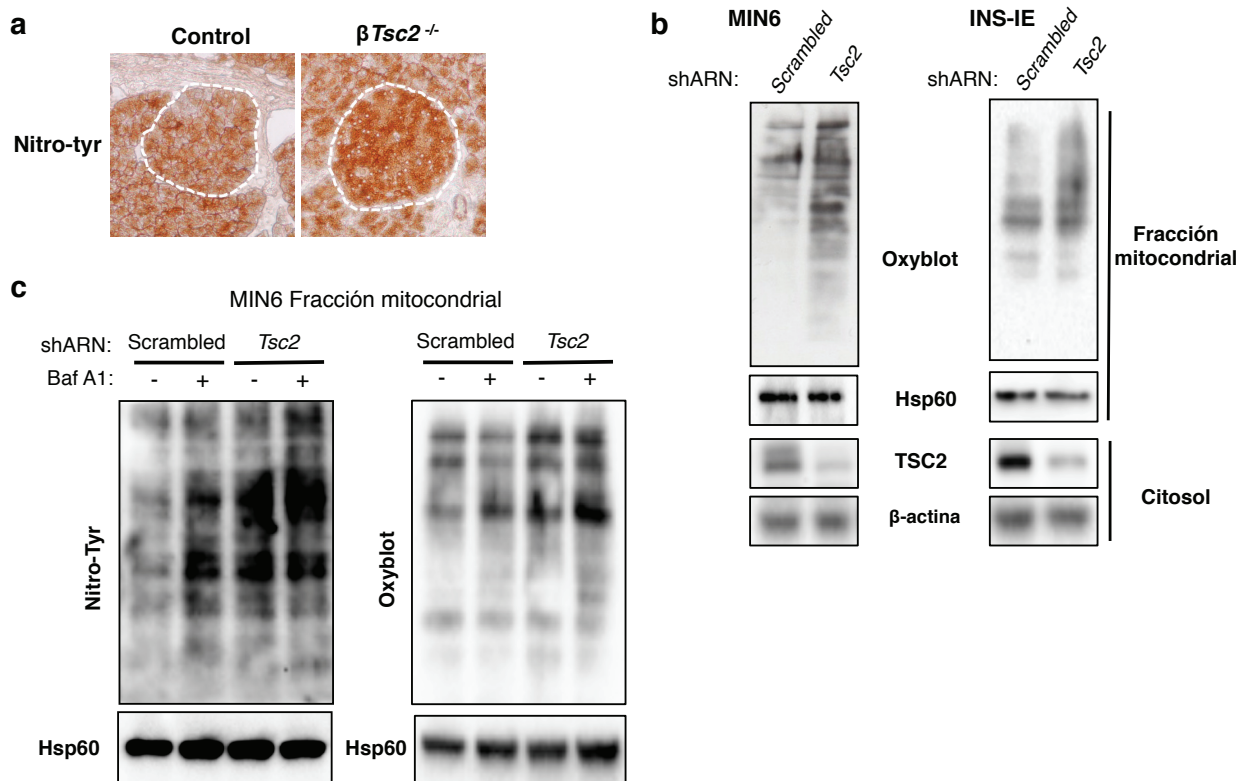


Figura 4.44. Acumulación de proteínas mitocondriales oxidadas en modelos de célula β con hiperactivación de mTORC1.

(a) Secciones pancreáticas de animales de 35 semanas fueron sometidas a inmunohistoquímica con anticuerpo que detecta residuos de nitrofosina (Nitro-Tyr). Se encuentran delineados los márgenes del islote.

(b) Células MIN6 o INS-1E expresando shARN control (*scrambled*) o frente a *Tsc2* fueron sometidas a fraccionamiento (mitocondria/citosol), y los extractos proteicos mitocondriales fueron derivados con dinitrofenil-hidrazona, reaccionando con residuos oxidados para su detección mediante *western-blot* (Oxyblot). Hsp60 fue usado como control de carga mitocondrial

(c) Células MIN6 fueron tratadas con 20 nM bafilomicina A₁ o DMSO durante 3 h. Se obtuvieron extractos proteicos de las fracciones mitocondriales para su análisis por *western-blot* directo (Nitro-Tyr) o tras derivación previa (Oxyblot).

Se quiso comprobar si la mitofagia defectiva en $\beta Tsc2^{-/-}$ tenía como consecuencia la acumulación de proteínas oxidadas. Secciones pancreáticas fueron hibridadas con un anticuerpo que reconoce residuos de tirosina nitrada (nitro-Tyr), fruto de la reacción de ROS con proteínas, y cuya presencia es relacionada con situaciones patológicas (Pacher *et al.*, 2005). En secciones de páncreas de $\beta Tsc2^{-/-}$ se observa un aumento significativo de la inmunoreactividad de los islotes frente a nitro-Tyr (Figura 4.44, a). Además se puso de manifiesto la mayor presencia de proteínas mitocondriales oxidadas en líneas de célula β con expresión interferida de *Tsc2*

(MIN6 e INS-1E) **Figura 4.44, b**. Por último se implicó al defecto autofágico debido a la interferencia de *Tsc2* y la hiperactividad de mTORC1 como causa de la acumulación de proteínas mitocondriales oxidadas. Para ello células MIN6 control y *Tsc2*-shARN fueron tratadas con un inhibidor de autofagia, y posteriormente los extractos proteicos mitocondriales fueron analizados por dos métodos de detección de proteínas oxidadas: *immunoblot* directo frente a nitrotirosina, o tras derivación de proteínas oxidadas con dinitrofenil-hidrazona (Oxyblot). La inhibición de autofagia con bafilomicina A₁ aumenta el perfil de proteínas mitocondriales oxidadas en MIN6 control, pero no en MIN6 *Tsc2*-shARN, cuyo nivel de proteínas oxidadas ya es más alto de forma basal (**Figura 4.44, c**). Estos resultados indican que la autofagia juega un papel en la eliminación selectiva de proteínas mitocondriales dañadas, y que la interferencia de *Tsc2* e hiperactividad de mTORC1, al ser causa de un funcionamiento deficiente de la maquinaria autofágica, producirían una acumulación de mitocondrias oxidadas.

4.3.8 Discusión

La señalización a través de TSC2/mTORC1 es esencial para el aumento de masa de célula β en circunstancias de mayor demanda de insulina (Zahr *et al.*, 2007; Fraenkel *et al.*, 2008). Esta ruta es la principal reguladora de síntesis de proteínas, esencial para ejecutar los mecanismos compensatorios que llevan a mayor masa de célula β y en consecuencia una mayor síntesis y secreción de insulina. TSC2/mTORC1 integran la señalización de estatus energético y señales hormonales (Bartolomé *et al.*, 2010), ambos factores aumentados en condiciones de resistencia a la insulina, permitiendo el aumento de masa de célula β (Um *et al.*, 2004; Tremblay *et al.*, 2005).

Para estudiar el papel de la ruta en célula β , fue previamente generado el modelo $\beta Tsc2^{-/-}$, el cual presenta un aumento de masa de célula β temprano, acompañado de hiperinsulinemia e hipoglucemia (Shigeyama *et al.*, 2008). Sin embargo, a partir de las 35 semanas la masa de célula β declina y los animales $\beta Tsc2^{-/-}$ desarrollaron diabetes por deficiencia insulínica. Esta segunda fase de fracaso es dependiente de la hiperactivación de mTORC1, ya que tratamiento de animales con rapamicina fue capaz de revertirlo (Shigeyama *et al.*, 2008).

Debido a que la hiperactivación de mTORC1 es un hecho comúnmente encontrado en la progresión a la diabetes, se quiso investigar la posible implicación de este hecho en el fracaso de la célula β pancreática. En nuestro nuevo estudio de los animales $\beta Tsc2^{-/-}$ se encontró hipoglucemia y masa de célula β aumentada en animales hasta las 35-40 semanas. Posteriormente la masa de célula β regresó por apoptosis y dio lugar a la aparición de hiperglucemia, de forma consistente con las observaciones previas. Los islotes de animales $\beta Tsc2^{-/-}$ presentaron hiperactivación de la vía de mTORC1, y el aumento de masa fue directamente atribuido a hipertrofia de célula β , al demostrar los estudios de volumen celular un aumento de hasta 5 veces en células β de animales $\beta Tsc2^{-/-}$ comparados a los controles.

Las conclusiones a las que se llega con estos resultados *in vivo* difieren parcialmente de las obtenidas tras los resultados *in vitro* en la primera parte de esta tesis. La delección de *Tsc2* en célula β *in vivo* produce hipertrofia y no hiperplasia, mientras que *in vitro* el aumento de proliferación por interferencia de *Tsc2* resultó evidente (Figura 4.11). Si bien las diferencias son fácilmente explicables por el hecho de que las células en cultivo presentan un ritmo proliferativo elevado, y en este caso la hiperactivación de mTORC1 puede ser traducida como hiperplasia. Otras evidencias confirman esta posibilidad, MEF deficientes en *Tsc1* o *Tsc2* presentan mayor capacidad proliferativa *in vitro* (Zhang *et al.*, 2003), algo también observado por nosotros (datos no mostrados). Sin embargo, tumores asociados al complejo de esclerosis tubular presentan células hipertróficas pero son considerados benignos al ser poco proliferativos (Manning *et al.*, 2005; Harvey *et al.*, 2008).

En la literatura existen varios modelos de hiperactivación de mTORC1 en célula β . Shigeyama y colaboradores describieron en primer lugar el animal $\beta Tsc2^{-/-}$, el cual presentó un fenotipo bifásico con pérdida de masa de célula β en la segunda fase (Shigeyama *et al.*, 2008). Sorprendentemente posteriores modelos que se aproximaban a este no muestran una segunda fase de disminución de función de célula β , el modelo $\beta Tsc2^{-/-}$ de Rachdi y colaboradores presenta masa de célula β aumentada hasta las 52 semanas (Rachdi *et al.*, 2008). Según los autores estas diferencias pueden deberse bien a un diferente *background* genético de los animales (E. Bernal-Mizrachi, comunicación personal), o diferencias en la generación del modelo (Y. Kido, comunicación personal).

El modelo $\beta Tsc1^{-/-}$ tampoco presentó una segunda fase de disminución de la masa de célula β , aunque solo fue estudiado a las 4 y 8 semanas (Mori *et al.*, 2009b). Estos animales expresan *Cre* recombinasa bajo el promotor RIP2 y sufren delección de *Tsc1* en también en neuronas hipotalámicas, lo cual posibilitó a los autores el estudio de las consecuencias de este efecto (Mori *et al.*, 2009a). Este hecho hace que los animales $\beta Tsc1^{-/-}$ desarrollen tumores neuroendocrinos, y no lleguen a vivir más de 20 semanas (K-L. Guan, comunicación personal, datos no publicados), lo cual imposibilita la observación del efecto de la hiperactivación de mTORC1 a largo plazo en el modelo $\beta Tsc1^{-/-}$.

Por otro lado, el modelo que sobreexpresa Rheb en célula β (Hamada *et al.*, 2009), presenta una masa de célula β aumentada, la cual no disminuye hasta las 50 semanas en las que fue estudiado. Si bien el fenotipo es menor comparado con otros modelos al ser la hiperactivación de mTORC1 más ligera (K. Hara, comunicación personal). Esto se puede explicar por la actividad GAP de TSC2 presumiblemente aumentada por resistencia a la insulina, y capaz de actuar sobre Rheb aún cuando se encuentra sobreexpresado.

Por último, el modelo $\beta S6k^{CA}$ si presenta una apoptosis aumentada en célula β debido a la hiperactivación crónica de S6K, los autores demuestran cómo la progresión a través del ciclo celular se encuentra impedida por la resistencia crónica a la acción de la insulina, la cual induce acumulación de p27^{Kip1} en núcleos de células β desde las 16 semanas (Elghazi *et al.*, 2010).

Ninguno de estos trabajos estudió mecanismos relacionados directamente con mTORC1 como autofagia y estrés de RE. Para ello estudiamos el modelo $\beta Tsc2^{-/-}$, con el fin de investigar

la posible implicación de estos procesos en la fase de fracaso de célula β . En el anterior trabajo se mostró como la hiperactivación de mTORC1 era causa de resistencia a insulina en islotes. Aquí se ha profundizado en este asunto y se observó acumulación de FoxO1 en núcleos de islotes $\beta Tsc2^{-/-}$, de manera dependiente de mTORC1 ya que fue revertido con rapamicina. Este hecho se correlacionó con el menor número de núcleos positivos para Pdx1 en $\beta Tsc2^{-/-}$. Estudios previos demostraron como FoxoO1 actúa como represor de Pdx1, factor de transcripción clave en célula β (Kitamura *et al.*, 2002), y puede explicar en parte la tendencia al fracaso de célula β observado en animales $\beta Tsc2^{-/-}$. La localización nuclear de FoxO1, junto con la resistencia a la acción de la insulina fue un fenómeno también observado en líneas celulares, con idénticos resultados.

Recientemente, tanto la presencia de FoxO1 en núcleos, como la ausencia de Pdx1 han sido relacionados con estrés de RE aumentado. La expresión de una forma constitutivamente activa de FoxO1 en hígado es capaz de aumentar la expresión de BiP por regulación directa del promotor, y desencadenar de forma crónica la señalización del UPR (Kamagate *et al.*, 2010). Por el contrario, la expresión de un dominante negativo de FoxO1 protege a célula β del estrés de retículo causado por exposición a ácidos grasos, al revertir la expresión de CHOP (Martinez *et al.*, 2008). Además, animales $Pdx1^{+/-}$ son susceptibles al desarrollo de estrés de RE en célula β , al desregular la producción de genes responsables de la homeostasis del RE, incluyendo genes del UPR o responsables de la formación de puentes disulfuro (Sachdeva *et al.*, 2009).

La propia hiperactivación de mTORC1 es una causa demostrada de estrés de RE (Ozcan *et al.*, 2008). Por lo tanto se exploró la presencia de estrés de RE en islotes de $\beta Tsc2^{-/-}$, y efectivamente se encontró mayor respuesta de la señalización del UPR, y expresión de factores de transcripción relacionados con apoptosis mediada por estrés de RE. BiP, CHOP y C/EBP β fueron expresados de manera creciente con la edad de los animales $\beta Tsc2^{-/-}$. Además se encontró acumulación de proteínas ubiquitinadas en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$, algo previamente relacionado con el fracaso de célula β (Kaniuk *et al.*, 2007).

Dado que mTORC1 es uno de los principales reguladores de autofagia y se encuentra hiperactivado en $\beta Tsc2^{-/-}$, esperábamos encontrar autofagia disminuida. Primeramente se encontró una acumulación basal de p62/SQSTM1 en islotes, indicando un aclaramiento defectivo de proteínas u orgánulos marcados con la proteína adaptadora p62/SQSTM1. Tumores de pacientes con TSC también presentan acumulación de p62/SQSTM1, y se postula que la autofagia teóricamente disminuida en estos tumores pueda contribuir a su baja agresividad (Parkhitko *et al.*, 2011).

Evidencias de la baja actividad autofágica en islotes de $\beta Tsc2^{-/-}$ fue obtenida por experimentos con islotes *ex vivo* usando agentes que causan estrés de RE de forma aguda o privación de glucosa. Estos tratamientos no fueron capaces de inducir autofagia en islotes de $\beta Tsc2^{-/-}$, ni tampoco en modelos celulares con hiperactivación de mTORC1. La autofagia deficiente ha sido también directamente relacionada con mayor estrés de RE en islotes de animales $\beta Atg7^{-/-}$ (Quan *et al.*, 2012a). Nuestro estudio previo muestra como la autofagia juega un

papel protector en célula β frente a estrés de RE (Bartolomé *et al.*, 2012), y como la inhibición de autofagia acelera la muerte por agentes que causan estrés de RE. Aunque hay evidencias que relacionan la actividad de mTORC1 con inhibición de autofagia por un lado, y con estrés de RE por otro; la posibilidad de que el estrés de RE sea consecuencia directa de la insuficiencia autofágica no ha sido estudiada en modelos de hiperactivación de mTORC1. Sin embargo, según las conclusiones de la segunda parte de esta tesis, ambos hechos contribuirían de forma sinérgica a la muerte celular.

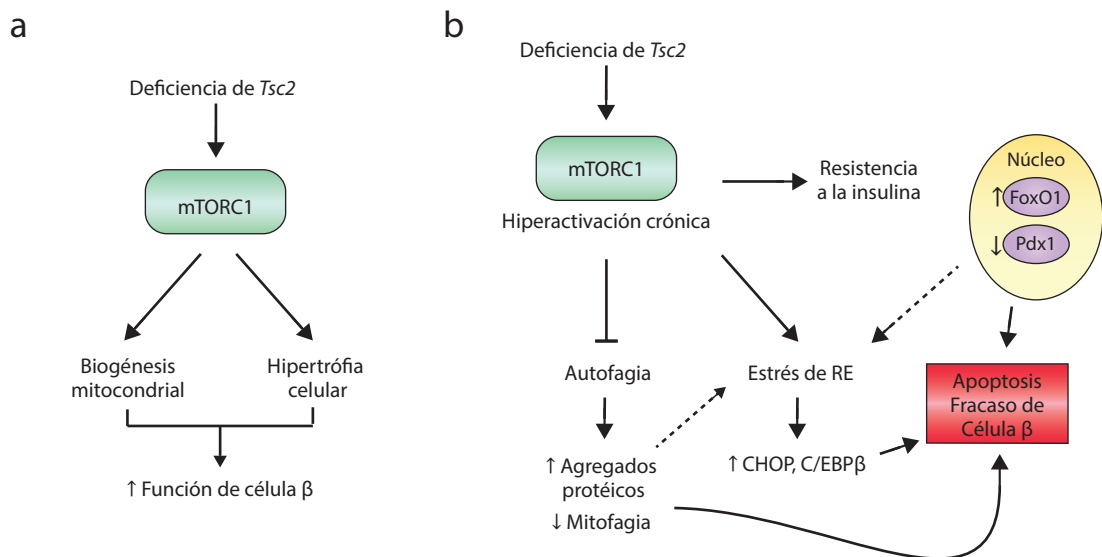
mTORC1 ha sido caracterizado previamente como regulador de masa y actividad mitocondrial (Schieke *et al.*, 2006; Cunningham *et al.*, 2007). Y recientemente se observó como animales $\beta Tsc2^{-/-}$ mostraban una mayor masa mitocondrial a las 8 semanas de edad, lo cual aumentó la función secretora de los islotes y puede explicar la hiperinsulinemia encontrada en animales de esta edad (Koyanagi *et al.*, 2011). Sin embargo, esta función declina con la edad (M. Koyanagi, datos no publicados). Recientemente Bravo y colaboradores han descrito como en una primera fase de respuesta al estrés de RE, la masa mitocondrial sufre una reorganización en la cual se asocia en mayor medida con RE, aumentando $\Delta\Psi_m$ y producción de ATP (Bravo *et al.*, 2011). Estos resultados apoyan la observación de función mitocondrial aumentada en una primera fase, observado en animales $\beta Tsc2^{-/-}$ jóvenes, pero que no puede ser mantenida en animales de más edad. Aunque la función no se mantiene, en este estudio la masa mitocondrial resulto evidentemente aumentada en islotes de animales $\beta Tsc2^{-/-}$ de todas las edades estudiadas. El hecho de encontrar una actividad autofágica disminuida llevo a proponer el estudio de la autofagia selectiva de mitocondrias (mitofagia).

Sorprendentemente, los islotes de $\beta Tsc2^{-/-}$ mostraron acumulación de mitocondrias marcadas con p62/SQSTM1, lo cual indicó un deficiente aclaramiento de mitocondrias por mitofagia. Recientemente observaciones similares han sido realizadas en fibroblastos $Ulk1^{-/-}$, estas células fueron caracterizadas como deficientes en mitofagia, observándose una masa mitocondrial aumentada, pero con defectos morfológicos (Egan *et al.*, 2011). Además, extractos proteicos de fibroblastos $Ulk1^{-/-}$ presentaron acumulación de p62/SQSTM1, si bien no se comprobó si p62 colocalizaba con mitocondrias (R.J. Shaw, comunicación personal). Nosotros además comprobamos como fibroblastos $Tsc2^{-/-}$ tienen una respuesta autofágica deficiente a la estimulación con agentes que causan desacoplamiento mitocondrial. Este defecto fue directamente dependiente de mTORC1, ya que el tratamiento con rapamicina consiguió recuperar una respuesta normal.

Además, se describió cómo las mitocondrias que colocalizaron con p62/SQSTM1 en islotes $\beta Tsc2^{-/-}$ presentaron un potencial mitocondrial colapsado. Esto indica que el mecanismo de degradación de mitocondrias que han sobrepasado su vida útil se encuentra impedido en célula β de animales $\beta Tsc2^{-/-}$. Acumulación de mitocondrias despolarizadas en célula β ha sido relacionado con mayor sensibilidad a apoptosis (Molina *et al.*, 2009), y en este sentido ha sido puesto de relevancia el papel de mitofagia para la correcta disposición de mitocondrias que pueden ser peligrosas para la supervivencia de la célula (Green *et al.*, 2011).

Por último, se observó como islotes β *Tsc2*^{-/-} presentan mayor nivel de proteínas oxidadas. Este hecho fue confirmado con líneas celulares tras interferencia de *Tsc2*, las cuales presentaron mayor oxidación de proteínas mitocondriales, de manera relacionada con autofagia impedida. Otros estudios demostraron como una fisión y mitofagia deficiente en líneas de célula β produjeron acumulación de proteínas oxidadas (Twig *et al.*, 2008). Además el modelo β *Atg7*^{-/-} mostró disfunción mitocondrial y aumento de ROS en islotes, junto con pérdida de masa de célula β y desarrollo de diabetes (Wu *et al.*, 2009). Estas observaciones apoyan la importancia de la autofagia de mitocondrias en célula β para el correcto mantenimiento de la homeostasis celular, y como una deficiencia de autofagia, y más concretamente de mitofagia puede contribuir a la muerte celular, fracaso de la masa de célula β y progresión a la diabetes.

En resumen, el modelo β *Tsc2*^{-/-} muestra hiperactivación de mTORC1, el cual en una primera fase es un jugador activo en el aumento de masa de célula β mediado por hipertrofia. Pero por otro lado, la activación crónica de mTORC1 produce una serie de alteraciones que quedan recogidas en la [Figura 4.45](#), y que pueden contribuir al posterior fracaso de la célula β y desarrollo de diabetes. La activación crónica de mTORC1 causa resistencia a la acción de la insulina, acumulación nuclear de FoxO1 y pérdida de Pdx1. Las células β de estos animales presentan estrés de RE de manera dependiente de la edad, y por otro lado una respuesta autofágica deficiente. Al ser mTORC1 uno de los principales reguladores de autofagia es de esperar que su activación crónica esté impidiendo autofagia, pero además recientemente se



ha caracterizado la necesidad de FoxO1 citoplasmático para la ejecución de autofagia (Zhao *et al.*, 2010a). Aunque no se ha caracterizado el papel de GSK3 β en estos animales, estudios demuestran que la ablación de *Tsc2* hace a GSK3 β independiente de la señalización de insulina al ser directamente fosforilado por S6K (Zhang *et al.*, 2006a), y recientemente se ha caracterizado su papel antiautofágico (Lin *et al.*, 2012). Por lo tanto evidencias múltiples en la literatura apoyan nuestras observaciones de autofagia deficiente por hiperactivación de mTORC1. Modelos previos con autofagia deficiente por delección de un gen crítico, *Atg7*, de

Figura 4.45. Esquema que muestra efectos observados por la hiperactivación de mTORC1 en islotes de animales β *Tsc2*^{-/-} en una primera fase (a), y una segunda fase que lleva al fracaso de célula β (b).

forma específica en célula β , muestran su papel clave en el mantenimiento de la masa de célula β (Ebato *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009).

Aquí se ha puesto de manifiesto por primera vez como la hiperactivación *in vivo* de mTORC1 en célula β produce estrés de RE, deficiencia autofágica y una mitofagia deficiente que lleva a acumulación de mitocondrias despolarizadas y oxidadas. Estas observaciones son de gran importancia, ya que mTORC1 es activado durante la progresión a la diabetes, y aunque su papel es esencial en una primera fase, su hiperactivación crónica puede llevar al fracaso de célula β . La terapia dirigida frenar la progresión a la diabetes mediante el bloqueo de mTORC1, resulta infructuosa al impedir la primera fase de compensación (Fraenkel *et al.*, 2008). Pero es posible que esta misma terapia aplicada en una segunda fase en la cual la masa de célula β ya se encuentra aumentada, pueda ayudar a retrasar el fracaso de célula β y el desarrollo de diabetes. Esta hipótesis es apoyada con estudios que demuestran como el tratamiento de animales con rapamicina es capaz de alargar la vida, pero solo cuando se aplica a partir de una fase tardía de la vida (Harrison *et al.*, 2009). La caracterización de los eventos que regulan la muerte o supervivencia de la masa de célula β y los mecanismos moleculares responsables, serán necesarios para la aparición de nuevas terapias que permitan detener el fracaso de la masa de célula β , con el fin de frenar la progresión de la diabetes tipo 2.

5.

Conclusiones

La resistencia a la acción de la insulina, y la disfunción de la célula β son los rasgos más característicos de la diabetes tipo 2. La naturaleza progresiva de la diabetes tipo 2, junto con la relación entre la función de la célula β , y la aparición de hiperglucemia y complicaciones, ha sido reafirmada en diferentes estudios prospectivos (UKPDS, 1998; Weyer *et al.*, 1999; Kahn, 2001). Individuos que presentan resistencia a la insulina, son capaces de mantener una tolerancia a la glucosa normal, gracias a una hipersecreción adaptativa de insulina, que compensa la menor acción de la hormona. En ciertos individuos, estos mecanismos compensatorios fallan con el tiempo, apareciendo hiperglucemia y las manifestaciones clínicas de la diabetes. Comprender la naturaleza de los mecanismos de la célula β que permiten adaptarse a la resistencia a la insulina, y las razones de su fallo con el tiempo en determinados individuos, son clave para discernir la fisiopatología de la diabetes tipo 2, y así poder abordarla convenientemente.

Esta tesis se ha centrado en el estudio de las vías de señalización en célula β que convergen en TSC2/mTORC1 y los eventos que se encuentran bajo su control para modular proliferación, muerte y supervivencia. En una primera parte se estudiaron las vías de señalización molecular controladas por insulina y glucosa, y que inciden sobre mTORC1 para el control de proliferación celular. La segunda parte hace hincapié en el estudio de mecanismos como estrés de RE y autofagia, y su papel en condiciones de secreción de insulina deficiente. Y por último en la tercera parte se abordó el papel *in vivo* de la hiperactivación de mTORC1 en célula β , y su posible relación con el fracaso de la masa de célula β .

Las conclusiones obtenidas en esta tesis son las siguientes:

1. La activación de Akt en célula β , media con una cinética similar a su propia activación, la fosforilación de TSC2 en Ser⁹³⁹ y Thr¹⁴⁶², estimulando de esta manera la actividad de mTORC1 sobre sus efectores (S6K, 4E-BP1).
2. La señalización de las isoformas del receptor de insulina IR_A e IR_B, se produce tanto a través de las rutas PI3K/Akt, como de Ras-MAPK. Las diferencias radican en una diferente potencia de señalización, siendo más duradera y no completamente inhibible por wortmanina la señalización a través de IR_A.
3. La glucosa y la insulina son capaces de estimular en célula β , la fosforilación de TSC2-Ser⁶⁶⁴, mediada a través de la ruta de Ras-MAPK. Esta fosforilación aumenta la actividad de mTORC1.
4. AMPK en célula β es capaz de inactivar a mTORC1 por fosforilación de TSC2 y de Raptor. La glucosa en célula β , de forma independiente de insulina, es capaz de activar a mTORC1 modulando la actividad de AMPK.

5. La interferencia de *Tsc2* en célula β produce un aumento de actividad de mTORC1/S6K y resistencia a la acción de la insulina sobre las rutas PI3K/Akt y Ras-MAPK. Esta resistencia es contrarrestada por la expresión de IR_A .
6. La expresión de IR_A confiere una mayor capacidad proliferativa a la célula β frente a IR_B , de forma dependiente de la mayor activación de mTORC1.
7. La interferencia de *Tsc2* en célula β *in vitro*, produce un aumento de proliferación dependiente de mTORC1. El bloqueo de mTORC1 con rapamicina induce el efecto inverso.
8. Células β con secreción deficiente de insulina muestran una autofagia basal aumentada, posiblemente como consecuencia de la acumulación de agregados proteicos. La eliminación de los agregados se lleva a cabo a través de la regulación autofágica mediada por mTORC1.
9. Las células β con secreción deficiente presentan una alta sensibilidad a la muerte por estrés de RE agudo, expresan bajos niveles de Bcl-2 y Bcl-x_L, y presentan una interacción Beclina1/Bcl-2 más lábil, mecanismo molecular que puede explicar la elevada autofagia basal.
10. La ruta IRE1 α /JNK se hiperactiva ante estrés de RE en células con secreción de insulina deficiente, lo cual puede ser explicado por los niveles de Bax y Bcl-2, y posiblemente responsable de la alta inducción de autofagia en estas células.
11. La inhibición de mTORC1 mediada por rapamicina aumenta autofagia y rescata parcialmente de la muerte inducida por estrés de RE. Sin embargo, la inhibición de autofagia aumenta la muerte tras estrés de RE. Por lo tanto queda patente el efecto protector de la autofagia frente a estrés de RE en célula β .
12. La hiperactivación de mTORC1 en célula β *in vivo* lleva al aumento temprano de masa celular e hipoglicemia. El aumento de masa está mediado por hipertrofia celular. Sin embargo, la hiperactivación crónica lleva a una segunda fase de fracaso de la masa de célula β por apoptosis, y la aparición de hiperglicemia.
13. La hiperactivación de mTORC1 causa resistencia a la acción de la insulina en célula β , traducido en acumulación nuclear de FoxO1 y pérdida de Pdx1.
14. La hiperactivación crónica de mTORC1 produce estrés RE en célula β y expresión de factores de transcripción proapoptóticos como CHOP y C/EBP β , de manera dependiente de la edad.
15. La hiperactivación de mTORC1 causa una respuesta autofágica deficiente, con acumulación basal de agregados proteicos en células β de islotes.

16. mTORC1 produce un incremento de la masa mitocondrial en célula β , pero además se encuentra inhibiendo mitofagia. Esto puede conducir a disfunción mitocondrial, aumento de radicales libres y contribuir al fracaso de la masa de célula β y desarrollo de diabetes.

CONCLUSIÓN FINAL: El complejo TSC1-TSC2 y mTORC1 actúan como integradores de señales nutricionales y hormonales para la regulación de la masa de célula β . Un aumento de la actividad de mTORC1 es un contribuyente positivo y esencial para el aumento de la masa de célula β . Sin embargo la hiperactivación crónica de mTORC1 puede influir negativamente sobre la viabilidad de la célula β al causar resistencia a la insulina e inhibir procesos citoprotectores como la autofagia. En la progresión a la diabetes, situaciones típicamente encontradas como defectos en la secreción de insulina o aumento de estrés de RE, pueden necesitar de la acción protectora de la autofagia. Es por esto que la hiperactivación crónica de mTORC1 en progresión a la diabetes, puede acabar siendo negativa para la masa de célula β

6. Agradecimientos

Esta tesis es el fruto de años de trabajo y dedicación, pero no habría sido posible sin el apoyo de otras muchas personas a las cuales estoy enormemente agradecido. Dicen que esta es la parte más leída una tesis. Sois muchas las personas a las que aquí incluyo, todas merecéis mucho más que una simple mención.

En primer lugar, quiero agradecer a mis Directores el haberme enseñado y guiado en este camino. A Manuel por confiar en mí y aceptarme en su grupo. A Carlos, gracias por transmitirme tu pasión por la ciencia y haber hecho de mí lo que soy. Te lo debo todo, esta tesis es tuya.

Gracias a nuestra Directora de Departamento, Pilar, por ser tan atenta y dispuesta a ayudar con todo. A Fernando por su ayuda con los gradientes de densidad, a Carmen Álvarez y Paloma Navarro por su protocolo para generar líneas de célula β , y a Elisa por enseñarme los secretos del aislamiento de islotes. Gracias a Pili por ayudarme a buscar cualquier tipo de reactivo por raro que fuera. No me quiero olvidar del resto de profesores del Departamento, por sus consejos y por prestarnos material siempre que lo hemos necesitado. Gracias a Lourdes y por supuesto a Manoli, el Departamento no sería lo mismo sin ti.

A todos mis queridos compañeros de grupo, Gema y Silvia por toda su ayuda, a Elena, Almudena, Iria, Beatriz y a Óscar por sus consejos. A Lily por su amistad y hacerme compañía las largas tardes en el laboratorio, y a los nuevos fichajes Sabela y Vanesa que también me han hecho buena compañía estos últimos meses. Debo recordar a otros becarios del Departamento que ya se fueron hace tiempo, no olvido su ayuda en mis primeros pasos en el laboratorio, gracias a Carmen, Álvaro y Yolanda. También a Anne por acompañarnos en el día a día del laboratorio, como una más del " *β cell team*" durante medio año. Y cómo no a Anita, el futuro del equipo. ¡Queda en buenas manos!

A nuestros vecinos de hígado, gracias a Dora y Ami por aguantarme pidiendo cualquier cosa y estar ahí todos los días, habéis sido buenas amigas y espero volver a veros. También a María y Diego y a los otros vecinos del laboratorio 15: María, Ana, Neibla, Dani y Rebe. A las chicas del laboratorio de Cáncer: Tamara, Jackie e Irene, gracias por vuestra ayuda y amistad.

Mención especial para Víctor, por los innumerables cafés y comidas, por escuchar siempre y ayudar con cualquier problema, infinitas gracias por tu amistad, esos pequeños descansos de cada día han sido vitales para mantener la cordura, ánimo con el sprint final (la Figura 1.12 es suya, menudo artista). Gracias a Elena por sacarnos de nuestro pequeño mundo con tus historias y ser una buena amiga.

Agradecer la ayuda de otros Departamentos de la Facultad de Farmacia, sobre todo la de Microbiología por sus consejos sobre plásmidos y todos los reactivos que nos salvaron la vida en más de una ocasión. Nunca me olvidaré de los gramos de cloroquina que me dejaron en Parasitología, pues gracias a ellos empezaron los experimentos sobre autofagia, y con ellos seguimos trabajando, incluso viajaron hasta la otra punta del planeta.

Respecto a la ayuda recibida por otros centros, gracias a la Unidad de Genómica y Secuenciación, mil gracias a Amalia por su ayuda con el citómetro, a Marisa por enseñarme a fijar muestras para micro electrónica y sus fabulosos ultra-cortes y a Agustín por su paciencia y experiencia con el microscopio.

De mi estancia de medio año en Kobe, estaré siempre agradecido a todo el laboratorio. Llegar a un país como Japón (lo más parecido a Marte), y recibir todo el apoyo que recibí es algo que me ha marcado y que no podré olvidar jamás. Gracias por hacerme vivir una experiencia maravillosa, os llevaré siempre conmigo. Fuisteis más que compañeros, después de tanto llegasteis a ser amigos y familia. Gracias a Kido-*sensei* por aceptarme en el laboratorio y permitirme trabajar con su modelo animal. A todos los *sensei* por su ayuda y generosidad: a Koyanagi por mantener la colonia de animales para mi llegada, a Asahara por sus consejos de laboratorio y sobre costumbres japonesas, a Kanno por su buen humor y ser muchas veces mi intérprete particular. Al resto del laboratorio por enseñarme la ciudad, ayudarme con cualquier cosa y estar siempre atentos de que estuviese contento, especialmente a Taka-Taka, Inochi, Yoshitomi, Eto, Teri y "Bruce-Lee" Takemura, por su buen humor y hacer del laboratorio un lugar al que no costaba llegar cada día, más bien costaba irse. Por último, agradecer a Shino toda la ayuda que me prestó, fue mi compañero de poyata, asistente en problemas del día a día, descifrador de jeroglíficos personal y mejor amigo durante mi periplo por tierras niponas, estoy en deuda eterna contigo. Además, gracias a todos por ser mis profesores particulares de ese peculiar idioma que me ha acompañado durante casi toda la tesis どうもありがとうございました、皆さんはいつまでも心の中にいるでしょう、必ずもう一度会いましょう。

Debo de agradecer el apoyo de otros muchos investigadores, que nos dejaron materiales, protocolos, buenos consejos o que se ofrecieron a discutir nuestros resultados. Muchas de las cosas que se han conseguido aquí no habrían sido posibles sin su generosa ayuda: P. Paolo Pandolfi, Pierre Maechler, Ana Belén Ropero, Ronald Kahn, James de Caprio, Jinkyu Suk, Cheol O. Joe, Pedro Herrera, Tomokazu Matsuda, David Kwiatkowski Fumihiko Urano, Kenta Hara, Reuben Shaw, Noboru Mizushima, Xiaoping Yang, Kun-Liang Guan, Brendan Manning, Ernesto Bernal-Mizrachi, Claudio Hetz, Patricio Aller, Enrique de la Rosa, Flora de Pablo y Ángela M. Valverde.

De mi vida fuera del laboratorio estos años, me gustaría agradecer su amistad a mis compañeros de carrera, Cris, Marga, Belén, Bea, María S, María C, Cova, Vero, Concha, Héctor, Javi y Andrés. Mis amigos del Sumiyoshi Ten, de Kobe. A mis compañeros y profesores de japonés. Y especialmente a toda la pandilla de amiguetes de siempre, el "núcleo duro": Gonzo, Pablo, Elías, Lolo y Fede, sin olvidarme de Ballestas.

A Lara por haberme acompañado todos estos años, la tesis entera. Gracias por aguantarme y por todos los momentos geniales que hemos pasado juntos. Posiblemente sin ti, esta tesis hubiese sido escrita en Comic Sans o algo peor. Y por último, aunque deberían ser los primeros, a mi familia, por haberme querido y apoyado siempre, esta tesis también es de todos vosotros.

7.

Bibliografía

- Accili, D., Drago, J., Lee, E.J., Johnson, M.D., Cool, M.H., Salvatore, P., Asico, L.D., José, P.A., Taylor, S.I., y Westphal, H. (1996). Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 12, 106–109.
- Alexander, A., Cai, S.-L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K.H., Inoki, K., Guan, K.-L., Shen, J., Person, M.D., *et al.* (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 4153–4158.
- Alliouachene, S., Tuttle, R.L., Boumard, S., Lapointe, T., Berissi, S., Germain, S., Jaubert, F., Tosh, D., Birnbaum, M.J., y Pende, M. (2008). Constitutively active Akt1 expression in mouse pancreas requires S6 kinase 1 for insulinoma formation. *J Clin Invest* 118, 3629–3638.
- American Diabetes Association (1998). Economic consequences of diabetes mellitus in the U.S. in 1997. *Diabetes Care* 21, 296–309.
- Araki, E., Lipes, M.A., Patti, M.-E., Brüning, J.C., Haag, B., III, Johnson, R.S., y Kahn, C.R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372, 186–190.
- Aronovitz, A., Josefson, J., Fisher, A., Newman, M., Hughes, E., Chen, F., Moons, D.S., Kiyokawa, H., y Lowe, W.L. (2008). Rapamycin inhibits growth factor-induced cell cycle regulation in pancreatic beta cells. *J Investig Med* 56, 985–996.
- Asahara, S.-I., Matsuda, T., Kido, Y., y Kasuga, M. (2009). Increased ribosomal biogenesis induces pancreatic beta cell failure in mice model of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 367–371.
- Ashcroft, F.M., y Rorsman, P. (2012). Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. *Cell* 148, 1160–1171.
- Ashford, T.P., y Porter, K.R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 12, 198–202.
- Assmann, A., Ueki, K., Winnay, J.N., Kadowaki, T., y Kulkarni, R.N. (2009). Glucose effects on beta-cell growth and survival require activation of insulin receptors and insulin receptor substrate 2. *Mol Cell Biol* 29, 3219–3228.
- Astrinidis, A., Senapedis, W., Coleman, T.R., y Henske, E.P. (2003). Cell cycle-regulated phosphorylation of hamartin, the product of the tuberous sclerosis complex 1 gene, by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B. *J Biol Chem* 278, 51372–51379.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., y Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 182, 685–701.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., y Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–495.
- Balcazar, N., Sathyamurthy, A., Elghazi, L., Gould, A., Weiss, A., Shiojima, I., Walsh, K., y Bernal-Mizrachi, E. (2009). mTORC1 activation regulates beta-cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *J Biol Chem* 284, 7832–7842.
- Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., y Fletcher, A.A. (1922). Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* 12, 141–146.
- Bartolomé, A., Guillén, C., y Benito, M. (2010). Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signaling involved in pancreatic beta-cell proliferation. *Endocrinology* 151, 3084–3094.
- Bartolomé, A., Guillén, C., y Benito, M. (2012). Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic β cell death. *Autophagy*, en prensa.
- Bassik, M.C., Scorrano, L., Oakes, S.A., Pozzan, T., y Korsmeyer, S.J. (2004). Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca^{2+} homeostasis and apoptosis. *Embo J* 23, 1207–1216.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., y Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 30, 586–623.
- Bell, E., Cao, X., Moibi, J.A., Greene, S.R., Young, R., Trucco, M., Gao, Z., Matschinsky, F.M., Deng, S., Markman, J.F., *et al.* (2003). Rapamycin has a deleterious effect on MIN-6 cells and rat and human islets. *Diabetes* 52, 2731–2739.
- Benito, M., Porras, A., y Santos, E. (1993). Establishment of permanent brown adipocyte cell lines achieved by transfection with SV40 large T antigen and ras genes. *Exp Cell Res* 209, 248–254.
- Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C.M., y Permutt, M.A. (2001). Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J Clin Invest* 108, 1631–1638.
- Bernales, S., McDonald, K.L., y Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 4, e423.
- Bernales, S., Schuck, S., y Walter, P. (2007). ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy* 3, 285–287.
- Birnboim, H.C., y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.

- Bommer, G., Schäfer, H.J., y Klöppel, G. (1976). Morphologic effects of diazoxide and diphenylhydantoin on insulin secretion and biosynthesis in B cells of mice. *Virchows Arch a Pathol Anat Histol* 371, 227–241.
- Bozidis, P., Williamson, C.D., y Colberg-Poley, A.M. (2001). *Current Protocols in Cell Biology* (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.).
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
- Bravo, R., Vicencio, J.M., Parra, V., Troncoso, R., Muñoz, J.P., Bui, M., Quiroga, C., Rodríguez, A.E., Verdejo, H.E., Ferreira, J., *et al.* (2011). Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci* 124, 2143–2152.
- Briaud, I., Dickson, L.M., Lingohr, M.K., McCuaig, J.F., Lawrence, J.C., y Rhodes, C.J. (2005). Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by a mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in beta-cells. *J Biol Chem* 280, 2282–2293.
- Briaud, I., Lingohr, M.K., Dickson, L.M., Wrede, C.E., y Rhodes, C.J. (2003). Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 52, 974–983.
- Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., y Powers, A.C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53, 1087–1097.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.V., y Kaelin, W.G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 18, 2893–2904.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., *et al.* (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011–2015.
- Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J.C., y Abraham, R.T. (1996). Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *Embo J* 15, 5256–5267.
- Brüning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., Hayashi, T., Hörsch, D., Accili, D., Goodyear, L.J., y Kahn, C.R. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2, 559–569.
- Buteau, J., Roduit, R., Susini, S., y Prentki, M. (1999). Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia* 42, 856–864.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., y Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., y Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92–96.
- Cao, Y., Kamioka, Y., Yokoi, N., Kobayashi, T., Hino, O., Onodera, M., Mochizuki, N., y Nakae, J. (2006). Interaction of FoxO1 and TSC2 induces insulin resistance through activation of the mammalian target of rapamycin/p70 S6K pathway. *J Biol Chem* 281, 40242–40251.
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A.T., Thomas, G., Kozma, S.C., *et al.* (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 118, 3065–3074.
- Carter, J.D., Dula, S.B., Corbin, K.L., Wu, R., y Nunemaker, C.S. (2009). A practical guide to rodent islet isolation and assessment. *Biol Proced Online* 11, 3–31.
- Chan, E.Y.W., Longatti, A., McKnight, N.C., y Tooze, S.A. (2009). Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 29, 157–171.
- Chen, C., Dudenhausen, E.E., Pan, Y.-X., Zhong, C., y Kilberg, M.S. (2004). Human CCAAT/enhancer-binding protein beta gene expression is activated by endoplasmic reticulum stress through an unfolded protein response element downstream of the protein coding sequence. *J Biol Chem* 279, 27948–27956.
- Chen, R.H., Sarnecki, C., y Blenis, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12, 915–927.
- Chick, W.L., y Like, A.A. (1970). Studies in the diabetic mutant mouse: III. Physiological factors associated with alterations in beta cell proliferation. *Diabetologia* 6, 243–251.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., y Birnbaum, M.J. (2001a). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728–1731.

- Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F., y Birnbaum, M.J. (2001 b). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 276, 38349–38352.
- Cho, H.J., Park, J., Lee, H.W., Lee, Y.S., y Kim, J.B. (2004). Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 942–948.
- Choi, S.-E., Lee, S.-M., Lee, Y.-J., Li, L.-J., Lee, S.-J., Lee, J.-H., Kim, Y., Jun, H.-S., Lee, K.-W., y Kang, Y. (2009). Protective role of autophagy in palmitate-induced INS-1 beta-cell death. *Endocrinology* 150, 126–134.
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156–159.
- Chong-Kopera, H., Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Garcia-Gonzalo, F.R., Rosa, J.L., y Guan, K.-L. (2006). TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 281, 8313–8316.
- Cnop, M., Hughes, S.J., Igoillo-Esteve, M., Hoppa, M.B., Sayyed, F., van de Laar, L., Gunter, J.H., de Koning, E.J.P., Walls, G.V., Gray, D.W.G., *et al.* (2010). The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation. *Diabetologia* 53, 321–330.
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Jörns, A., Lenzen, S., y Eizirik, D.L. (2005). Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2, S97–S107.
- Cooper, G.J., Willis, A.C., Clark, A., Turner, R.C., Sim, R.B., y Reid, K.B. (1987). Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 8628–8632.
- Cousin, S.P., Hügl, S.R., Myers, M.G., White, M.F., Reifel-Miller, A., y Rhodes, C.J. (1999). Stimulation of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent: signal transduction via janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) with no crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling. *Biochem J* 344 Pt 3, 649–658.
- Creutzfeldt, W., Creutzfeldt, C., Frerichs, H., Perings, E., y Sicklinger, K. (1969). The morphological substrate of the inhibition of insulin secretion by diazoxide. *Horm Metab Res* 1, 53–64.
- Crino, P.B., Nathanson, K.L., y Henske, E.P. (2006). The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med* 355, 1345–1356.
- Cuervo, A.M. (2010). Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab* 21, 142–150.
- Cunha, D.A., Hekerman, P., Ladriere, L., Bazzarra-Castro, A., Ortis, F., Wakeham, M.C., Moore, F., Rasschaert, J., Cardozo, A.K., Bellomo, E., *et al.* (2008). Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 121, 2308–2318.
- Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., y Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450, 736–740.
- D**a Silva Xavier, G., Leclerc, I., Salt, I.P., Doiron, B., Hardie, D.G., Kahn, A., y Rutter, G.A. (2000). Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 4023–4028.
- de Duve, C., y Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28, 435–492.
- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., y Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60, 604–617.
- De Souza, C.T., Araújo, E.P., Stoppiglia, L.F., Pauli, J.R., Ropelle, E., Rocco, S.A., Marin, R.M., Franchini, K.G., Carvalheira, J.B., Saad, M.J., *et al.* (2007). Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *Faseb J* 21, 1153–1163.
- De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., y Schuit, F. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* 96, 2489–2495.
- DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E., y Livingston, D.M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275–283.
- Del Guerra, S., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Bugliani, M., Sbrana, S., Torri, S., Pollera, M., Boggi, U., Mosca, F., *et al.* (2005). Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 727–735.
- Delépine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G.M., y Julier, C. (2000). EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet* 25, 406–409.
- Deng, S., Vatamaniuk, M., Huang, X., Doliba, N., Lian, M.-M., Frank, A., Velidedeoglu, E., Desai, N.M., Koerberlein, B., Wolf, B., *et al.* (2004). Structural and Functional Abnormalities in the Islets Isolated From Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes*.
- Denley, A., Bonython, E.R., Booker, G.W., Cosgrove, L.J., Forbes, B.E., Ward, C.W., y Wallace, J.C. (2004). Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol Endocrinol* 18, 2502–2512.

- Denley, A., Wallace, J.C., Cosgrove, L.J., y Forbes, B.E. (2003). The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Horm Metab Res* 35, 778–785.
- Desai, N.M., Goss, J.A., Deng, S., Wolf, B.A., Markmann, E., Palanjian, M., Shock, A.P., Feliciano, S., Brunnicardi, F.C., Barker, C.F., et al. (2003). Elevated portal vein drug levels of sirolimus and tacrolimus in islet transplant recipients: local immunosuppression or islet toxicity? *Transplantation* 76, 1623–1625.
- Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., et al. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol* 191, 155–168.
- Dibble, C.C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J.M., Finan, P.M., Kwiatkowski, D.J., Murphy, L.O., y Manning, B.D. (2012). TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Mol Cell* 47, 535–546.
- Dickson, L.M., Lingohr, M.K., McCuaig, J., Hugl, S.R., Snow, L., Kahn, B.B., Myers, M.G., y Rhodes, C.J. (2001). Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 276, 21110–21120.
- Ding, W.-X., Ni, H.-M., Gao, W., Hou, Y.-F., Melan, M.A., Chen, X., Stolz, D.B., Shao, Z.-M., y Yin, X.-M. (2007a). Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* 282, 4702–4710.
- Ding, W.-X., Ni, H.-M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D.B., Ron, D., y Yin, X.-M. (2007b). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* 171, 513–524.
- Ding, W.-X., Ni, H.-M., Li, M., Liao, Y., Chen, X., Stolz, D.B., Dorn, G.W., y Yin, X.-M. (2010). Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem* 285, 27879–27890.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., y Melton, D.A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41–46.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N., y Montminy, M. (2003). TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300, 1574–1577.
- E**bato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., y Kominami, E. (2008). Autophagy Is Important in Islet Homeostasis and Compensatory Increase of Beta Cell Mass in Response to High-Fat Diet. *Cell Metab* 8, 325–332.
- Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., et al. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96–99.
- Edvell, A., y Lindström, P. (1995). Development of insulin secretory function in young obese hyperglycemic mice (Umeå ob/ob). *Metab. Clin. Exp.* 44, 906–913.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., et al. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283, 1544–1548.
- Elghazi, L., Balcazar, N., Blandino-Rosano, M., Cras-Méneur, C., Fatrai, S., Gould, A.P., Chi, M.M., Moley, K.H., y Bernal-Mizrachi, E. (2010). Decreased IRS signaling impairs beta-cell cycle progression and survival in transgenic mice overexpressing S6K in beta-cells. *Diabetes* 59, 2390–2399.
- Escribano, O., Guillén, C., Nevado, C., Gómez-Hernández, A., Kahn, C.R., y Benito, M. (2009). Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes* 58, 820–828.
- European TSC Consortium (1993). Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 75, 1305–1315.
- F**adok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., y Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207–2216.
- Fatrai, S., Elghazi, L., Balcazar, N., Cras-Méneur, C., Krits, I., Kiyokawa, H., y Bernal-Mizrachi, E. (2006). Akt induces beta-cell proliferation by regulating cyclin D1, cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity. *Diabetes* 55, 318–325.
- Figeac, F., Ilias, A., Bailbe, D., Portha, B., y Movassat, J. (2012). Local In Vivo GSK3β Knockdown Promotes Pancreatic b Cell and Acinar Cell Regeneration in 90% Pancreatctomized Rat. *Mol. Ther.*
- Fonseca, S.G., Burcin, M., Gromada, J., y Urano, F. (2009). Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and development of diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 9, 763–770.
- Fonseca, S.G., Lipson, K.L., y Urano, F. (2007). Endoplasmic reticulum stress signaling in pancreatic beta-cells. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 2335–2344.

- Fouillet, A., Levet, C., Virgone, A., Robin, M., Dourlen, P., Rieusset, J., Belaidi, E., Ovize, M., Touret, M., Nataf, S., *et al.* (2012). ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy* 8, 915–926.
- Fraenkel, M., Ketzinel-Gilad, M., Ariav, Y., Pappo, O., Karaca, M., Castel, J., Berthault, M.-F., Magnan, C., Cerasi, E., Kaiser, N., *et al.* (2008). mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* 57, 945–957.
- Frescas, D., Valenti, L., y Accili, D. (2005). Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* 280, 20589–20595.
- Frödin, M., Sekine, N., Roche, E., Filloux, C., Prentki, M., Wollheim, C.B., y van Obberghen, E. (1995). Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J Biol Chem* 270, 7882–7889.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E., y Cantley, L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67, 481–507.
- Fu, A., Ng, A.C.-H., Depatie, C., Wijesekara, N., He, Y., Wang, G.-S., Bardeesy, N., Scott, F.W., Touyz, R.M., Wheeler, M.B., *et al.* (2009). Loss of Lkb1 in adult beta cells increases beta cell mass and enhances glucose tolerance in mice. *Cell Metab* 10, 285–295.
- Fujimoto, K., Hanson, P.T., Tran, H., Ford, E.L., Han, Z., Johnson, J.D., Schmidt, R.E., Green, K.G., Wice, B.M., y Polonsky, K.S. (2009). Autophagy regulates pancreatic beta cell death in response to Pdx1 deficiency and nutrient deprivation. *J Biol Chem* 284, 27664–27673.
- Fujimuro, M., y Yokosawa, H. (2005). Production of antipolyubiquitin monoclonal antibodies and their use for characterization and isolation of polyubiquitinated proteins. *Meth Enzymol* 399, 75–86.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., *et al.* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107–120.
- Ganley, I.G., Wong, P.-M., Gammoh, N., y Jiang, X. (2011). Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest. *Mol Cell* 42, 731–743.
- Gardner, B.M., y Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 333, 1891–1894.
- Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., y Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12, 119–131.
- Geng, J., y Klionsky, D.J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein modifications: beyond the usual suspects” review series. *EMBO Rep.* 9, 859–864.
- George, S., Rochford, J.J., Wolfrum, C., Gray, S.L., Schinner, S., Wilson, J.C., Soos, M.A., Murgatroyd, P.R., Williams, R.M., Acerini, C.L., *et al.* (2004). A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* 304, 1325–1328.
- Ghosh, H.S., McBurney, M., y Robbins, P.D. (2010). SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *PLoS ONE* 5, e9199.
- Gjoerup, O., Chao, H., DeCaprio, J.A., y Roberts, T.M. (2000). pRB-dependent, J domain-independent function of simian virus 40 large T antigen in override of p53 growth suppression. *J Virol* 74, 864–874.
- Granot, Z., Swisa, A., Magenheimer, J., Stolovich-Rain, M., Fujimoto, W., Manduchi, E., Miki, T., Lennerz, J.K., Stoeckert, C.J., Meyuhos, O., *et al.* (2009). LKB1 regulates pancreatic beta cell size, polarity, and function. *Cell Metab* 10, 296–308.
- Green, D.R., Galluzzi, L., y Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 333, 1109–1112.
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossman, H., y Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103–106.
- Gu, Y., Lindner, J., Kumar, A., Yuan, W., y Magnuson, M.A. (2011). Rictor/mTORC2 is essential for maintaining a balance between beta-cell proliferation and cell size. *Diabetes* 60, 827–837.
- Guillen, C., Navarro, P., Robledo, M., Valverde, A.M., y Benito, M. (2006). Differential mitogenic signaling in insulin receptor-deficient fetal pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 147, 1959–1968.
- Gurlo, T., Ryazantsev, S., Huang, C.-J., Yeh, M.W., Reber, H.A., Hines, O.J., O'Brien, T.D., Glabe, C.G., y Butler, P.C. (2010). Evidence for proteotoxicity in beta cells in type 2 diabetes: toxic islet amyloid polypeptide oligomers form intracellularly in the secretory pathway. *Am J Pathol* 176, 861–869.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., y Shaw, R.J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol Cell* 30, 214–226.
- Hamada, S., Hara, K., Hamada, T., Yasuda, H., Moriyama, H., Nakayama, R., Nagata, M., y Yokono, K. (2009). Upregulation of the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway by Ras homolog enriched in brain in pancreatic beta-cells leads to increased beta-cell mass and prevention of hyperglycemia. *Diabetes* 58, 1321–1332.

- Han, D., Yang, B., Olson, L.K., Greenstein, A., Baek, S.-H., Claycombe, K.J., Goudreau, J.L., Yu, S.-W., y Kim, E.-K. (2010). Activation of autophagy through modulation of 5'-AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from high glucose. *Biochem J* 425, 541–551.
- Hara, K. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 Phosphorylation by mTOR. *Journal of Biological Chemistry* 272, 26457–26463.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K.-I., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., y Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177–189.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., y Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 251–262.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., y Ron, D. (2000a). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099–1108.
- Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D., y Ron, D. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 7, 1153–1163.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., y Ron, D. (2000b). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5, 897–904.
- Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., et al. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* 166, 213–223.
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392–395.
- Hartley, T., Brumell, J., y Volchuk, A. (2009). Emerging roles for the ubiquitin-proteasome system and autophagy in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E1–E10.
- Hartley, T., Siva, M., Lai, E., Teodoro, T., Zhang, L., y Volchuk, A. (2010). Endoplasmic reticulum stress response in an INS-1 pancreatic beta-cell line with inducible expression of a folding-deficient proinsulin. *BMC Cell Biol* 11, 59.
- Harvey, K.F., Mattila, J., Sofer, A., Bennett, F.C., Ramsey, M.R., Ellisen, L.W., Puig, O., y Hariharan, I.K. (2008). FOXO-regulated transcription restricts overgrowth of Tsc mutant organs. *J Cell Biol* 180, 691–696.
- Hashimoto, N., Kido, Y., Uchida, T., Asahara, S.-I., Shigeyama, Y., Matsuda, T., Takeda, A., Tsuchihashi, D., Nishizawa, A., Ogawa, W., et al. (2006). Ablation of PDK1 in pancreatic beta cells induces diabetes as a result of loss of beta cell mass. *Nat Genet* 38, 589–593.
- Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., y Täljedal, I.B. (1995). The pancreatic beta-cell recognition of insulin secretagogues. Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone. *Arch Biochem Biophys* 162, 448–457.
- Hernández-Sánchez, C., Mansilla, A., de Pablo, F., y Zardoya, R. (2008). Evolution of the insulin receptor family and receptor isoform expression in vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1043–1053.
- Herrera, P.L. (2000). Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127, 2317–2322.
- Hetz, C., y Glimcher, L.H. (2009). Fine-Tuning of the Unfolded Protein Response: Assembling the IRE1α; Interactome. *Mol Cell* 35, 551–561.
- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.-H., Bassik, M.C., Antonsson, B., Brandt, G.S., Iwakoshi, N.N., Schinzel, A., Glimcher, L.H., et al. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1α. *Science* 312, 572–576.
- Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A.M., Brown, R.H., y Glimcher, L.H. (2009). XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev* 23, 2294–2306.
- Hodges, A.K., Li, S., Maynard, J., Parry, L., Braverman, R., Cheadle, J.P., DeClue, J.E., y Sampson, J.R. (2001). Pathological mutations in TSC1 and TSC2 disrupt the interaction between hamartin and tuberlin. *Hum Mol Genet* 10, 2899–2905.
- Holst, J.J., y Gromada, J. (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E199–E206.
- Hoorens, A., van de Castele, M., Klöppel, G., y Pipeleers, D. (1996). Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *J Clin Invest* 98, 1568–1574.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S.-I., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 20, 1981–1991.
- Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., y Spiegelman, B.M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-α- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665–668.

- Hribal, M.L., Perego, L., Lovari, S., yreozzi, F., Menghini, R., Perego, C., Finzi, G., Usellini, L., Placidi, C., Capella, C., *et al.* (2003). Chronic hyperglycemia impairs insulin secretion by affecting insulin receptor expression, splicing, and signaling in RIN beta cell line and human islets of Langerhans. *Faseb J* 17, 1340–1342.
- Hsu, Y.-C., Chern, J.J., Cai, Y., Liu, M., y Choi, K.-W. (2007). Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* 445, 785–788.
- Huang, C.-J., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A.E., Wu, X., Soeller, W.C., y Butler, P.C. (2007). Induction of endoplasmic reticulum stress-induced beta-cell apoptosis and accumulation of polyubiquitinated proteins by human islet amyloid polypeptide. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1656–E1662.
- Huang, J., y Manning, B.D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 412, 179–190.
- Huang, J., Dibble, C.C., Matsuzaki, M., y Manning, B.D. (2008). The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol* 28, 4104–4115.
- Hughes, S.J. (1994). The role of reduced glucose transporter content and glucose metabolism in the immature secretory responses of fetal rat pancreatic islets. *Diabetologia* 37, 134–140.
- Hughes, T., y Rusten, T.E. (2007). Origin and evolution of self-consumption: autophagy. *Adv Exp Med Biol* 607, 111–118.
- Hull, R.L., Westermark, G.T., Westermark, P., y Kahn, S.E. (2004). Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3629–3643.
- Hügl, S.R., White, M.F., y Rhodes, C.J. (1998). Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J Biol Chem* 273, 17771–17779.
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., *et al.* (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* 25, 193–205.
- Kenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., y Guan, K.-L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *Embo J* 27, 1919–1931.
- Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Suzuki, T., Kudo, H., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Kaneko, K., *et al.* (2008). Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 322, 1250–1254.
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., y Guan, K.-L. (2003a). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17, 1829–1834.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., y Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648–657.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., *et al.* (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126, 955–968.
- Inoki, K., Zhu, T., y Guan, K.-L. (2003b). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577–590.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., y Mizushima, N. (2012). Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *J Cell Sci* 125, 1488–1499.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüeegg, M.A., Hall, A., y Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6, 1122–1128.
- Jackson, W.T., Giddings, T.H., Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., y Kirkegaard, K. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3, e156.
- Jahreiss, L., Menzies, F.M., y Rubinsztein, D.C. (2008) The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic* 9, 574–587.
- Jansen, R., Dzwolak, W., y Winter, R. (2005). Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy. *Biophys J* 88, 1344–1353.
- Jenne, D.E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Müller, O., Back, W., y Zimmer, M. (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 18, 38–43.
- Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., y Youle, R.J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* 191, 933–942.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., y Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606–609.
- Jung, C.H., Seo, M., Otto, N.M., y Kim, D.-H. (2011). ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy* 7, 1212–1221.

- Jung, H.S., Chung, K.W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y.H., Kang, T.M., Yoon, K.-H., Kim, J.-W., *et al.* (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab* 8, 318–324.
- K**ahn, B.B. (1998). Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92, 593–596.
- Kahn, S.E. (2001). Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4047–4058.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., y Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150, 1507–1513.
- Kamagate, A., Kim, D.H., Zhang, T., Slusher, S., Gramignoli, R., Strom, S.C., Bertera, S., Ringquist, S., y Dong, H.H. (2010). FoxO1 links hepatic insulin action to endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 151, 3521–3535.
- Kaneko, K., Ueki, K., Takahashi, N., Hashimoto, S., Okamoto, M., Awazawa, M., Okazaki, Y., Ohsugi, M., Inabe, K., Umehara, T., *et al.* (2010). Class IA phosphatidylinositol 3-kinase in pancreatic β cells controls insulin secretion by multiple mechanisms. *Cell Metab* 12, 619–632.
- Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., y Tang, D. (2011a). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18, 571–580.
- Kang, Y.J., Lu, M.-K., y Guan, K.-L. (2011b). The TSC1 and TSC2 tumor suppressors are required for proper ER stress response and protect cells from ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 18, 133–144.
- Kaniuk, N.A., Kiraly, M., Bates, H., Vranic, M., Volchuk, A., y Brumell, J.H. (2007). Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes* 56, 930–939.
- Karaskov, E., Scott, C., Zhang, L., Teodoro, T., Ravazzola, M., y Volchuk, A. (2006). Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 147, 3398–3407.
- Kasuga, M., Karlsson, F.A., y Kahn, C.R. (1982a). Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215, 185–187.
- Kasuga, M., Zick, Y., Blith, D.L., Karlsson, F.A., Häring, H.U., y Kahn, C.R. (1982b). Insulin stimulation of phosphorylation of the beta subunit of the insulin receptor. Formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. *J Biol Chem* 257, 9891–9894.
- Kasuga, M., Zick, Y., Blithe, D.L., Crettaz, M., y Kahn, C.R. (1982c). Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature* 298, 667–669.
- Kefas, B.A., Cai, Y., Kerckhofs, K., Ling, Z., Martens, G., Heimberg, H., Pipeleers, D., y van de Castelee, M. (2004). Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis. *Biochem Pharmacol* 68, 409–416.
- Kefas, B.A., Cai, Y., Ling, Z., Heimberg, H., Hue, L., Pipeleers, D., y van de Castelee, M. (2003a). AMP-activated protein kinase can induce apoptosis of insulin-producing MIN6 cells through stimulation of c-Jun-N-terminal kinase. *J Mol Endocrinol* 30, 151–161.
- Kefas, B.A., Heimberg, H., Vaulont, S., Meisse, D., Hue, L., Pipeleers, D., y van de Castelee, M. (2003b). AICA-riboside induces apoptosis of pancreatic beta cells through stimulation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 46, 250–254.
- Kho, S., y Cobb, M.H. (1997). Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 5599–5604.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., y Guan, K.-L. (2008a). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 10, 935–945.
- Kim, I., y Lemasters, J.J. (2011). Mitophagy selectively degrades individual damaged mitochondria after photoirradiation. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1919–1928.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., y Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 462, 245–253.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., y Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13, 132–141.
- Kim, J.-W., Cho, J.-H., Ko, S.-H., Park, H.-S., Ha, J., Song, K.-H., Son, H.-Y., Kim, S.-S., Yoon, K.-H., y Suh-Kim, H. (2008b). Transcriptional mechanism of suppression of insulin gene expression by AMP-activated protein kinase activator 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside (AICAR) in beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 365, 614–620.
- Kitamura, T., Kahn, C.R., y Accili, D. (2003). Insulin receptor knockout mice. *Annu Rev Physiol* 65, 313–332.
- Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W.H., Wright, C.V.E., White, M.F., Arden, K.C., y Accili, D. (2002). The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* 110, 1839–1847.
- Kitiphongspattana, K., Mathews, C.E., Leiter, E.H., y Gaskins, H.R. (2005). Proteasome inhibition alters glucose-stimulated (pro)insulin secretion and turnover in pancreatic {beta}-cells. *J Biol Chem* 280, 15727–15734.

- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., *et al.* (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5, 539–545.
- Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., Dunn, W.A., Levine, B., van der Kleij, I., y Seglen, P.O. (2007). How shall I eat thee? *Autophagy* 3, 413–416.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., y van Oers, M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415–1420.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., y Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* 14, 230–239.
- Koyanagi, M., Asahara, S.-I., Matsuda, T., Hashimoto, N., Shigeyama, Y., Shibutani, Y., Kanno, A., Fuchita, M., Mikami, T., Hosooka, T., *et al.* (2011). Ablation of TSC2 Enhances Insulin Secretion by Increasing the Number of Mitochondria through Activation of mTORC1. *PLoS ONE* 6, e23238.
- Köhler, C.U., Olewinski, M., Tannapfel, A., Schmidt, W.E., Fritsch, H., y Meier, J.J. (2011). Cell cycle control of β -cell replication in the prenatal and postnatal human pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300, E221–E230.
- Kroemer, G., y Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 1004–1010.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., y Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99–163.
- Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Suzuki, R., Tsubamoto, Y., Komeda, K., Nakano, R., Miki, H., *et al.* (2000). Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49, 1880–1889.
- Kulkarni, R.N., Holzenberger, M., Shih, D.Q., Ozcan, U., Stoffel, M., Magnuson, M.A., y Kahn, C.R. (2002). beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat Genet* 31, 111–115.
- Kwon, G., Marshall, C.A., Pappan, K.L., Remedi, M.S., y McDaniel, M.L. (2004). Signaling elements involved in the metabolic regulation of mTOR by nutrients, incretins, and growth factors in islets. *Diabetes* 53 Suppl 3, S225–S232.
- Ladiges, W.C., Knoblaugh, S.E., Morton, J.F., Korth, M.J., Sopher, B.L., Baskin, C.R., MacAuley, A., Goodman, A.G., LeBoeuf, R.C., y Katze, M.G. (2005). Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK. *Diabetes* 54, 1074–1081.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nuñez, G., Miesfeld, R.L., y Distelhorst, C.W. (1994). Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6569–6573.
- Langerhans, P. (1869). Beiträge Zur Mikroskopischen Anatomie Der Bauchspeicheldrüse. Universidad de Berlín (Tesis doctoral).
- Lankisch, P.G., Manthey, G., Otto, J., Koop, H., Talaulicar, M., Willms, B., y Creutzfeldt, W. (1982). Exocrine pancreatic function in insulin-dependent diabetes mellitus. *Digestion* 25, 211–216.
- Leclerc, I., Woltersdorf, W.W., da Silva Xavier, G., Rowe, R.L., Cross, S.E., Korbitt, G.S., Rajotte, R.V., Smith, R., y Rutter, G.A. (2004). Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E1023–E1031.
- Lee, D.-F., Kuo, H.-P., Chen, C.-T., Hsu, J.-M., Chou, C.-K., Wei, Y., Sun, H.-L., Li, L.-Y., Ping, B., Huang, W.-C., *et al.* (2007a). IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 130, 440–455.
- Lee, I.H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D.B., Liu, J., Bruns, N.E., Tsokos, M., Alt, F.W., y Finkel, T. (2008). A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 3374–3379.
- Lee, M.N., Ha, S.H., Kim, J., Koh, A., Lee, C.S., Kim, J.H., Jeon, H., Kim, D.-H., Suh, P.-G., y Ryu, S.H. (2009). Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb. *Mol Cell Biol* 29, 3991–4001.
- Lee, S.B., Kim, S., Lee, J., Park, J., Lee, G., Kim, Y., Kim, J.-M., y Chung, J. (2007b). ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase. *EMBO Rep.* 8, 360–365.
- Leibiger, B., Leibiger, I.B., Moede, T., Kemper, S., Kulkarni, R.N., Kahn, C.R., de Vargas, L.M., y Berggren, P.O. (2001). Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell* 7, 559–570.
- Leibowitz, G., Yuli, M., Donath, M.Y., Neshler, R., Melloul, D., Cerasi, E., Gross, D.J., y Kaiser, N. (2001). beta-cell glucotoxicity in the Psammomys obesus model of type 2 diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1, S113–S117.
- Lenzen, S., Drinkgern, J., y Tiedge, M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20, 463–466.

- Leroux, L., Desbois, P., Lamotte, L., Duvillié, B., Cordonnier, N., Jackerott, M., Jami, J., Bucchini, D., y Joshi, R.L. (2001). Compensatory responses in mice carrying a null mutation for *Ins1* or *Ins2*. *Diabetes* 50 Suppl 1, S150–S153.
- Levine, B., y Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463–477.
- Li, Y., Inoki, K., Vacratsis, P., y Guan, K.-L. (2003). The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberlin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3. *J Biol Chem* 278, 13663–13671.
- Li, Y., Inoki, K., Yeung, R., y Guan, K.-L. (2002). Regulation of TSC2 by 14-3-3 binding. *J Biol Chem* 277, 44593–44596.
- Lin, S.-Y., Li, T.Y., Liu, Q., Zhang, C., Li, X., Chen, Y., Zhang, S.-M., Lian, G., Liu, Q., Ruan, K., *et al.* (2012). GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science* 336, 477–481.
- Lingohr, M.K., Briaud, I., Dickson, L.M., McCuaig, J.F., Alárcón, C., Wicksteed, B.L., y Rhodes, C.J. (2006). Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem* 281, 15884–15892.
- Lingohr, M.K., Buettner, R., y Rhodes, C.J. (2002). Pancreatic beta-cell growth and survival—a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends in Molecular Medicine* 8, 375–384.
- Lipson, K.L., Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Nguyen, L.X., Foss, E., Bortell, R., Rossini, A.A., y Urano, F. (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4, 245–254.
- Liu, H., Remedi, M.S., Pappan, K.L., Kwon, G., Rohatgi, N., Marshall, C.A., y McDaniel, M.L. (2009a). Glycogen synthase kinase-3 and mammalian target of rapamycin pathways contribute to DNA synthesis, cell cycle progression, and proliferation in human islets. *Diabetes* 58, 663–672.
- Liu, H.-Y., Han, J., Cao, S.Y., Hong, T., Zhuo, D., Shi, J., Liu, Z., y Cao, W. (2009b). Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem* 284, 31484–31492.
- Liu, Y., Tanabe, K., Baronnier, D., Patel, S., Woodgett, J., Cras-Méneur, C., y Permutt, M.A. (2010). Conditional ablation of Gsk-3 β in islet beta cells results in expanded mass and resistance to fat feeding-induced diabetes in mice. *Diabetologia* 53, 2600–2610.
- Liu, Z., Tanabe, K., Bernal-Mizrachi, E., y Permutt, M.A. (2008). Mice with beta cell overexpression of glycogen synthase kinase-3 β have reduced beta cell mass and proliferation. *Diabetologia* 51, 623–631.
- Löffler, A.S., Alers, S., Dieterle, A.M., Keppeler, H., Franz-Wachtel, M., Kundu, M., Campbell, D.G., Wesselborg, S., Alessi, D.R., y Stork, B. (2011). Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy* 7, 696–706.
- Lupi, R., Dotta, F., Marselli, L., Del Guerra, S., Masini, M., Santangelo, C., Patané, G., Boggi, U., Piro, S., Anello, M., *et al.* (2002). Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51, 1437–1442.
- Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., y Pandolfi, P.P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121, 179–193.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Bonner, P., Bernardi, R., Franz, D.N., Witte, D., Cordon-Cardo, C., y Pandolfi, P.P. (2007). Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer. *Cancer Res* 67, 7106–7112.
- Ma, X.M., y Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 307–318.
- Maedler, K., Spinas, G.A., Lehmann, R., Sergeev, P., Weber, M., Fontana, A., Kaiser, N., y Donath, M.Y. (2001). Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 50, 1683–1690.
- Mak, B.C., Kenerson, H.L., Aicher, L.D., Barnes, E.A., y Yeung, R.S. (2005). Aberrant beta-catenin signaling in tuberous sclerosis. *Am J Pathol* 167, 107–116.
- Manning, B.D. (2004). Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J Cell Biol* 167, 399–403.
- Manning, B.D., Logsdon, M.N., Lipovsky, A.I., Abbott, D., Kwiatkowski, D.J., y Cantley, L.C. (2005). Feedback inhibition of Akt signaling limits the growth of tumors lacking Tsc2. *Genes Dev* 19, 1773–1778.
- Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J., y Cantley, L.C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 10, 151–162.
- Marchetti, P., Del Guerra, S., Marselli, L., Lupi, R., Masini, M., Pollera, M., Bugliani, M., Boggi, U., Vistoli, F., Mosca, F., *et al.* (2004). Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5535–5541.
- Marsh, B.J., Soden, C., Alárcón, C., Wicksteed, B.L., Yaekura, K., Costin, A.J., Morgan, G.P., y Rhodes, C.J. (2007). Regulated autophagy controls hormone content in secretory-deficient pancreatic endocrine beta-cells. *Mol Endocrinol* 21, 2255–2269.

- Martinez, S.C., Tanabe, K., Cras-Méneur, C., Abumrad, N.A., Bernal-Mizrachi, E., y Permutt, M.A. (2008). Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Diabetes* 57, 846–859.
- Masaki, Y., Tanigawa, K., Ohguni, S., y Note, S. (1987). Rat fetal islets as a useful model for the study of insulin release failure. *Pancreas* 2, 632–637.
- Matsuda, T., Kido, Y., Asahara, S.-I., Kaisho, T., Tanaka, T., Hashimoto, N., Shigeyama, Y., Takeda, A., Inoue, T., Shibutani, Y., *et al.* (2010). Ablation of C/EBPbeta alleviates ER stress and pancreatic beta cell failure through the GRP78 chaperone in mice. *J Clin Invest* 120, 115–126.
- Matveyenko, A.V., y Butler, P.C. (2006). Beta-cell deficit due to increased apoptosis in the human islet amyloid polypeptide transgenic (HIP) rat recapitulates the metabolic defects present in type 2 diabetes. *Diabetes* 55, 2106–2114.
- McCarthy, M.I. (2010). Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med* 363, 2339–2350.
- McClain, D.A. (1991). Different ligand affinities of the two human insulin receptor splice variants are reflected in parallel changes in sensitivity for insulin action. *Mol Endocrinol* 5, 734–739.
- McKinnon, C.M., y Docherty, K. (2001). Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 44, 1203–1214.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., y Burgering, B.M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782–787.
- Meier, J.J., Breuer, T.G.K., Bonadonna, R.C., Tannapfel, A., Uhl, W., Schmidt, W.E., Schrader, H., y Menge, B.A. (2012). Pancreatic diabetes manifests when beta cell area declines by approximately 65% in humans. *Diabetologia* 55, 1346–1354.
- Meier, J.J., Butler, A.E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., Rizza, R.A., y Butler, P.C. (2008). Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57, 1584–1594.
- Menge, B.A., Tannapfel, A., Belyaev, O., Drescher, R., Müller, C., Uhl, W., Schmidt, W.E., y Meier, J.J. (2008). Partial pancreatectomy in adult humans does not provoke beta-cell regeneration. *Diabetes* 57, 142–149.
- Menzies, R.A., y Gold, P.H. (1971). The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats. *J Biol Chem* 246, 2425–2429.
- Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C.B., y Maechler, P. (2004). Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* 145, 667–678.
- Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., y Kahn, C.R. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6, 87–97.
- Mijaljica, D., Prescott, M., y Devenish, R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682.
- Milani, M., Rzymiski, T., Mellor, H.R., Pike, L., Bottini, A., Generali, D., y Harris, A.L. (2009). The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res* 69, 4415–4423.
- Miyazaki, J.I., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., y YAMAMURA, K.I. (1990). Establishment of a Pancreatic β Cell Line That Retains Glucose-Inducible Insulin Secretion: Special Reference to Expression of Glucose Transporter Isoforms. *Endocrinology* 127, 126–132.
- Moffat, J., Grueneberg, D.A., Yang, X., Kim, S.Y., Kloepfer, A.M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T.M., Luo, B., Grenier, J.K., *et al.* (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124, 1283–1298.
- Molina, A.J.A., Wikstrom, J.D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B.E., *et al.* (2009). Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 58, 2303–2315.
- Montagne, J., Stewart, M.J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S.C., y Thomas, G. (1999). Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285, 2126–2129.
- Montanya, E., Nacher, V., Biarnés, M., y Soler, J. (2000). Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49, 1341–1346.
- Mori, H., Inoki, K., Münzberg, H., Opland, D., Faouzi, M., Villanueva, E.C., Ikenoue, T., Kwiatkowski, D.J., MacDougald, O.A., Myers, M.G., *et al.* (2009a). Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell Metab* 9, 362–374.
- Mori, H., Inoki, K., Opland, D., Münzberg, H., Villanueva, E.C., Faouzi, M., Ikenoue, T., Kwiatkowski, D.J., MacDougald, O.A., Myers, M.G., *et al.* (2009b). Critical roles for the TSC-mTOR pathway in β -cell function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E1013–E1022.
- Muller, D., Huang, G.C., Amiel, S., Jones, P.M., y Persaud, S.J. (2007). Gene expression heterogeneity in human islet endocrine cells in vitro: the insulin signalling cascade. *Diabetologia* 50, 1239–1242.
- Muoio, D.M., y Newgard, C.B. (2005). Metabolism: A is for adipokine. *Nature* 436, 337–338.

- Murphy, R., Ellard, S., y Hattersley, A.T. (2008). Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4, 200–213.
- Myers, M.G., Backer, J.M., Sun, X.J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., Yoakim, M., Schaffhausen, B., y White, M.F. (1992). IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10350–10354.
- Nakae, J., Biggs, W.H., Kitamura, T., Cavenee, W.K., Wright, C.V.E., Arden, K.C., y Accili, D. (2002). Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat Genet* 32, 245–253.
- Nakagawa, T., y Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150, 887–894.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., y Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98–103.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., y Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 458–467.
- Narendra, D., Kane, L.A., Hauser, D.N., Fearnley, I.M., y Youle, R.J. (2010). p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 6, 1090–1106.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., y Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183, 795–803.
- Nellist, M., Burgers, P.C., van den Ouweland, A.M.W., Halley, D.J.J., y Luidert, T.M. (2005). Phosphorylation and binding partner analysis of the TSC1-TSC2 complex. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 818–826.
- Nemoto, S., Fergusson, M.M., y Finkel, T. (2004). Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* 306, 2105–2108.
- Nevado, C., Benito, M., y Valverde, A.M. (2008). Role of insulin receptor and balance in insulin receptor isoforms A and B in regulation of apoptosis in simian virus 40-immortalized neonatal hepatocytes. *Mol Biol Cell* 19, 1185–1198.
- Newgard, C.B., Quade, C., Hughes, S.D., y Milburn, J.L. (1990). Glucokinase and glucose transporter expression in liver and islets: implications for control of glucose homeostasis. *Biochem Soc Trans* 18, 851–853.
- Newsholme, P., Bender, K., Kiely, A., y Brennan, L. (2007). Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochem Soc Trans* 35, 1180–1186.
- Ng, S., Wu, Y.-T., Chen, B., Zhou, J., y Shen, H.-M. (2011). Impaired autophagy due to constitutive mTOR activation sensitizes TSC2-null cells to cell death under stress. *Autophagy* 7, 1173–1186.
- Noda, T., y Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273, 3963–3966.
- Nolan, C.J., Leahy, J.L., Delghingaro-Augusto, V., Moibi, J., Soni, K., Peyot, M.-L., Fortier, M., Guay, C., Lamontagne, J., Barbeau, A., et al. (2006). Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia* 49, 2120–2130.
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D.G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Löhr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., et al. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* 11, 45–51.
- Ogata, M., Hino, S.-I., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 26, 9220–9231.
- Okada, T., Liew, C.W., Hu, J., Hinault, C., Michael, M.D., Krtzfeldt, J., Yin, C., Holzenberger, M., Stoffel, M., y Kulkarni, R.N. (2007). Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 8977–8982.
- Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y.-S., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., et al. (2010). p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells* 15, 887–900.
- Otani, K., Kulkarni, R.N., Baldwin, A.C., Krutzfeldt, J., Ueki, K., Stoffel, M., Kahn, C.R., y Polonsky, K.S. (2004). Reduced beta-cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in betaIRKO mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E41–E49.
- Oyadomari, S., y Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11, 381–389.
- Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., y Mori, M. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 109, 525–532.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., y Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457–461.

- Ozcan, U., Ozcan, L., Yilmaz, E., Düvel, K., Sahin, M., Manning, B.D., y Hotamisligil, G.S. (2008). Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Mol Cell* 29, 541–551.
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Görgün, C.Z., y Hotamisligil, G.S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313, 1137–1140.
- P**acher, P., Obrosova, I.G., Mabley, J.G., y Szabó, C. (2005). Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutic strategies. *Curr. Med. Chem.* 12, 267–275.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., y Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282, 24131–24145.
- Papadakis, E.S., Finegan, K.G., Wang, X., Robinson, A.C., Guo, C., Kayahara, M., y Tournier, C. (2006). The regulation of Bax by c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) is a prerequisite to the mitochondrial-induced apoptotic pathway. *FEBS Lett* 580, 1320–1326.
- Parkhitko, A., Myachina, F., Morrison, T.A., Hindi, K.M., Auricchio, N., Karbowniczek, M., Wu, J.J., Finkel, T., Kwiatkowski, D.J., Yu, J.J., et al. (2011). Tumorigenesis in tuberous sclerosis complex is autophagy and p62/sequestosome 1 (SQSTM1)-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 12455–12460.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., y Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939.
- Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N.J.G., Comai, L., y Reddy, S. (2006). Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *Embo J* 25, 4271–4283.
- Pechhold, K., Koczwara, K., Zhu, X., Harrison, V.S., Walker, G., Lee, J., y Harlan, D.M. (2009). Blood glucose levels regulate pancreatic beta-cell proliferation during experimentally-induced and spontaneous autoimmune diabetes in mice. *PLoS ONE* 4, e4827.
- Pende, M., Kozma, S.C., Jaquet, M., Oorschot, V., Burcelin, R., Le Marchand-Brustel, Y., Klumperman, J., Thorens, B., y Thomas, G. (2000). Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 408, 994–997.
- Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., y Sabatini, D.M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873–886.
- Pick, A., Clark, J., Kubstrup, C., Levisetti, M., Pugh, W., Bonner-Weir, S., y Polonsky, K.S. (1998). Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47, 358–364.
- Poitout, V., y Robertson, R.P. (2002). Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143, 339–342.
- Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.-L., y Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab* 8, 224–236.
- Pouyssegur, J., Volmat, V., y Lenormand, P. (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64, 755–763.
- Proikas-Cezanne, T., Waddell, S., Gaugel, A., Frickey, T., Lupas, A., y Nordheim, A. (2004). WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene* 23, 9314–9325.
- Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C., et al. (2003). JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 38, 899–914.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337–1349.
- Q**in, L., Wang, Z., Tao, L., y Wang, Y. (2010). ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy* 6, 239–247.
- Quan, W., Hur, K.Y., Lim, Y., Oh, S.H., Lee, J.-C., Kim, K.H., Kim, G.H., Kim, S.-W., Kim, H.L., Lee, M.-K., et al. (2012a). Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia* 55, 392–403.
- Quan, W., Lim, Y.M., y Lee, M.-S. (2012b). Role of autophagy in diabetes and endoplasmic reticulum stress of pancreatic β -cells. *Exp. Mol. Med.* 44, 81–88.
- R**achdi, L., Balcazar, N., Osorio-Duque, F., Elghazi, L., Weiss, A., Gould, A., Chang-Chen, K.J., Gambello, M.J., y Bernal-Mizrachi, E. (2008). Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 9250–9255.
- Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P., y Barbacid, M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* 22, 44–52.

- Ravikumar, B., Duden, R., y Rubinsztein, D.C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11, 1107–1117.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O’Kane, C.J., et al. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36, 585–595.
- Rhodes, C.J. (2005). Type 2 diabetes—a matter of beta-cell life and death? *Science* 307, 380–384.
- Richards, S.K., Parton, L.E., Leclerc, I., Rutter, G.A., y Smith, R.M. (2005). Over-expression of AMP-activated protein kinase impairs pancreatic {beta}-cell function in vivo. *J Endocrinol* 187, 225–235.
- Rivera, J.F., Gurlo, T., Daval, M., Huang, C.J., Matveyenko, A.V., Butler, P.C., y Costes, S. (2010). Human-IAPP disrupts the autophagy/lysosomal pathway in pancreatic b-cells: protective role of p62-positive cytoplasmic inclusions. *Cell Death Differ* 18, 415–426.
- Robertson, R.P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279, 42351–42354.
- Rodríguez-Enriquez, S., Kim, I., Currin, R.T., y Lemasters, J.J. (2006). Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy* 2, 39–46.
- Ron, D., y Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519–529.
- Roux, P.P., Ballif, B.A., Anjum, R., Gygi, S.P., y Blenis, J. (2004). Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 13489–13494.
- Roux, P.P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M.K., Cohen, M.S., Taunton, J., Sonenberg, N., y Blenis, J. (2007). RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* 282, 14056–14064.
- Russell, W.C., Newman, C., y Williamson, D.H. (1975). A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* 253, 461–462.
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., y Meyuhos, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev* 19, 2199–2211.
- Sachdeva, M.M., Claiborn, K.C., Khoo, C., Yang, J., Groff, D.N., Mirmira, R.G., y Stoffers, D.A. (2009). Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 19090–19095.
- Sakaki, K., Wu, J., y Kaufman, R.J. (2008). Protein kinase C θ is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 283, 15370–15380.
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., y Yagihashi, S. (2002). Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 85–96.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I.J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vázquez, P., Blázquez, C., Torres, S., García, S., et al. (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* 119, 1359–1372.
- Salt, I.P., Johnson, G., Ashcroft, S.J., y Hardie, D.G. (1998). AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. *Biochem J* 335 (Pt 3), 533–539.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., y Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496–1501.
- Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., y Sabatini, D.M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25, 903–915.
- Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S.K., Schumacher, A., Prchal, J.T., Chen, M., y Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454, 232–235.
- Sansbury, F.H., Flanagan, S.E., Houghton, J.A.L., Shuixian Shen, F.L., Al-Senani, A.M.S., Habeb, A.M., Abdullah, M., Karimnejad, A., Ellard, S., y Hattersley, A.T. (2012). SLC2A2 mutations can cause neonatal diabetes, suggesting GLUT2 may have a role in human insulin secretion. *Diabetologia* 55, 2381–2385.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., y Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 1296–1302.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., y Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22, 159–168.
- Sarbassov, D.D., y Sabatini, D.M. (2005). Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J Biol Chem* 280, 39505–39509.

- Sarbasov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., y Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101.
- Sauer, B., y Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5166–5170.
- Scaglia, L., Cahill, C.J., Finegood, D.T., y Bonner-Weir, S. (1997). Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138, 1736–1741.
- Scaglia, L., Smith, F.E., y Bonner-Weir, S. (1995). Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 136, 5461–5468.
- Scheuner, D., vander Mierde, D., Song, B., Flamez, D., Creemers, J.W.M., Tsukamoto, K., Ribick, M., Schuit, F.C., y Kaufman, R.J. (2005). Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat Med* 11, 757–764.
- Schieke, S.M., Phillips, D., McCoy, J.P., Aponte, A.M., Shen, R.-F., Balaban, R.S., y Finkel, T. (2006). The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem* 281, 27643–27652.
- Schuit, F.C., In't Veld, P.A., y Pipeleers, D.G. (1988). Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 3865–3869.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., y Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135–139.
- Seino, S., y Bell, G.I. (1989). Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 159, 312–316.
- Seino, S., Shibasaki, T., y Minami, K. (2011). Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest* 121, 2118–2125.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia-Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., *et al.* (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332, 1429–1433.
- Shah, O.J., Wang, Z., y Hunter, T. (2004). Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol* 14, 1650–1656.
- Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbutt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., y Rajotte, R.V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343, 230–238.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., y Zimmet, P.Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87, 4–14.
- Shigeyama, Y., Kobayashi, T., Kido, Y., Hashimoto, N., Asahara, S.-I., Matsuda, T., Takeda, A., Inoue, T., Shibutani, Y., Koyanagi, M., *et al.* (2008). Biphasic response of pancreatic beta-cell mass to ablation of tuberous sclerosis complex 2 in mice. *Mol Cell Biol* 28, 2971–2979.
- Shimizu, S., Hosooka, T., Matsuda, T., Asahara, S.-I., Koyanagi-Kimura, M., Kanno, A., Bartolomé, A., Etoh, H., Fuchita, M., Teruyama, K., *et al.* (2012). DPP4 inhibitor vildagliptin preserves β -cell mass through amelioration of endoplasmic reticulum stress in C/EBP β transgenic mice. *J Mol Endocrinol* 49, 125–135.
- Shumway, S.D., Li, Y., y Xiong, Y. (2003). 14-3-3beta binds to and negatively regulates the tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) tumor suppressor gene product, tuberin. *J Biol Chem* 278, 2089–2092.
- Siddappa, N.B., Avinash, A., Venkatramanan, M., y Ranga, U. (2007). Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. *BioTechniques* 42, 186, 188–192.
- Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A., y Feldman, E.L. (2010). How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nat Rev Neurol* 6, 551–559.
- Sleeman, M.W., Wortley, K.E., Lai, K.-M.V., Gowen, L.C., Kintner, J., Kline, W.O., Garcia, K., Stritt, T.N., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., *et al.* (2005). Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nat Med* 11, 199–205.
- Sorenson, R.L., y Brelje, T.C. (1997). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29, 301–307.
- Soriguer, F., Goday, A., Bosch-Comas, A., Bordiú, E., Calle-Pascual, A., Carmena, R., Casamitjana, R., Castañó, L., Castell, C., Catalá, M., *et al.* (2012). Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 55, 88–93.
- Stevens, C., Lin, Y., Harrison, B., Burch, L., Ridgway, R.A., Sansom, O., y Hupp, T. (2009). Peptide combinatorial libraries identify TSC2 as a death-associated protein kinase (DAPK) death domain-binding protein and reveal a stimulatory role for DAPK in mTORC1 signaling. *J Biol Chem* 284, 334–344.

- Stiles, B.L., Kuralwalla-Martinez, C., Guo, W., Gregorian, C., Wang, Y., Tian, J., Magnuson, M.A., y Wu, H. (2006). Selective deletion of Pten in pancreatic beta cells leads to increased islet mass and resistance to STZ-induced diabetes. *Mol Cell Biol* 26, 2772–2781.
- Stoffers, D.A., Ferrer, J., Clarke, W.L., y Habener, J.F. (1997). Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17, 138–139.
- Strappazzon, F., Vietri-Rudan, M., Campello, S., Nazio, F., Florenzano, F., Fimia, G.M., Piacentini, M., Levine, B., y Cecconi, F. (2011). Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *Embo J* 30, 1195–1208.
- Stumvoll, M., Goldstein, B.J., y van Haeften, T.W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365, 1333–1346.
- Sturis, J., Pugh, W.L., Tang, J., Ostrega, D.M., Polonsky, J.S., y Polonsky, K.S. (1994). Alterations in pulsatile insulin secretion in the Zucker diabetic fatty rat. *Am. J. Physiol.* 267, E250–E259.
- Støy, J., Edghill, E.L., Flanagan, S.E., Ye, H., Paz, V.P., Pluzhnikov, A., Below, J.E., Hayes, M.G., Cox, N.J., Lipkind, G.M., *et al.* (2007). Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15040–15044.
- Suk, J., Kwak, S.S., Lee, J.H., Choi, J.H., Lee, S.-H., Lee, D.H., Byun, B., Lee, G.-H., y Joe, C.O. (2011). Alkaline stress-induced autophagy is mediated by mTORC1 inactivation. *J Cell Biochem* 112, 2566–2573.
- Sun, G., Tarasov, A.I., McGinty, J., McDonald, A., Da Silva Xavier, G., Gorman, T., Marley, A., French, P.M., Parker, H., Gribble, F., *et al.* (2010). Ablation of AMP-activated protein kinase alpha1 and alpha2 from mouse pancreatic beta cells and RIP2.Cre neurons suppresses insulin release in vivo. *Diabetologia* 53, 924–936.
- Swenne, I., Borg, L.A.H., Crace, C.J., y Landström, A.S. (1992). Persistent reduction of pancreatic Beta-cell mass after a limited period of protein-energy malnutrition in the young rat. *Diabetologia* 35, 939–945.
- Swift, S., Lorens, J., Achacoso, P., y Nolan, G.P. (2001). Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol Chapter 10*, Unit10.17C.
- Szegezdi, E., Macdonald, D.C., Ní Chonghaile, T., Gupta, S., y Samali, A. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol, Cell Physiol* 296, C941–C953.
- Szeto, J., Kaniuk, N.A., Canadien, V., Nisman, R., Mizushima, N., Yoshimori, T., Bazett-Jones, D.P., y Brumell, J.H. (2006). ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy* 2, 189–199.
- Tanemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., y Satoh, S. (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182–186.
- Tanemura, M., Ohmura, Y., Deguchi, T., Machida, T., Tsukamoto, R., Wada, H., Kobayashi, S., Marubashi, S., Eguchi, H., Ito, T., *et al.* (2012). Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo. *Am. J. Transplant.* 12, 102–114.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., y Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 85–96.
- Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., *et al.* (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 10, 676–687.
- Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., *et al.* (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117, 246–257.
- Terman, A., y Brunk, U.T. (2004). Myocyte aging and mitochondrial turnover. *Exp. Gerontol.* 39, 701–705.
- Teta, M., Long, S.Y., Wartschow, L.M., Rankin, M.M., y Kushner, J.A. (2005). Very Slow Turnover of β -Cells in Aged Adult Mice. *Diabetes* 54, 2557–2567.
- Thomas, H.E., McKenzie, M.D., Angstetra, E., Campbell, P.D., y Kay, T.W. (2009). Beta cell apoptosis in diabetes. *Apoptosis* 14, 1389–1404.
- Tooze, S.A., y Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 12, 831–835.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., y Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249–258.
- Tremblay, F., Brûlé, S., Hee Um, S., Li, Y., Masuda, K., Roden, M., Sun, X.J., Krebs, M., Polakiewicz, R.D., Thomas, G., *et al.* (2007). Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 14056–14061.
- Tremblay, F., Krebs, M., Dombrowski, L., Brehm, A., Bernroider, E., Roth, E., Nowotny, P., Waldhäusl, W., Marette, A., y Roden, M. (2005). Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. *Diabetes* 54, 2674–2684.

- Tsuboi, T. (2003). 5'-AMP-activated Protein Kinase Controls Insulin-containing Secretory Vesicle Dynamics. *Journal of Biological Chemistry* 278, 52042–52051.
- Tsukada, M., y Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333, 169–174.
- Tu, J., y Tuch, B.E. (1996). Glucose regulates the maximal velocities of glucokinase and glucose utilization in the immature fetal rat pancreatic islet. *Diabetes* 45, 1068–1075.
- Tuduri, E., Filiputti, E., Carneiro, E.M., y Quesada, I. (2008). Inhibition of Ca²⁺ signaling and glucagon secretion in mouse pancreatic alpha-cells by extracellular ATP and purinergic receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E952–E960.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., *et al.* (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J* 27, 433–446.
- Ueki, K., Okada, T., Hu, J., Liew, C.W., Assmann, A., Dahlgren, G.M., Peters, J.L., Shackman, J.G., Zhang, M., Artner, I., *et al.* (2006). Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic beta cells causes overt diabetes. *Nat Genet* 38, 583–588.
- Uhles, S., Moede, T., Leibiger, B., Berggren, P.-O., y Leibiger, I.B. (2007). Selective gene activation by spatial segregation of insulin receptor B signaling. *Faseb J* 21, 1609–1621.
- UKPDS (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352, 837–853.
- Ullman, E., Fan, Y., Stawowczyk, M., Chen, H.-M., Yue, Z., y Zong, W.-X. (2008). Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. *Cell Death Differ* 15, 422–425.
- Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J., *et al.* (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200–205.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., y Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666.
- Van Slegtenhorst, M., de Hoogt, R., Hermans, C., Nellist, M., Janssen, B., Verhoef, S., Lindhout, D., van den Ouweland, A., Halley, D., Young, J., *et al.* (1997). Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 277, 805–808.
- Verfaillie, T., Salazar, M., Velasco, G., y Agostinis, P. (2010). Linking ER Stress to Autophagy: Potential Implications for Cancer Therapy. *Int J Cell Biol* 2010, 930509.
- Verhoef, L.G.G.C., Lindsten, K., Masucci, M.G., y Dantuma, N.P. (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet* 11, 2689–2700.
- Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R.L.A., Kim, J., May, J., Tocilescu, M.A., Liu, W., Ko, H.S., *et al.* (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 378–383.
- Wei, M.C., Zong, W.-X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., y Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730.
- Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D.M., y Pratley, R.E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 104, 787–794.
- Whittaker, J., Sørensen, H., Gadsbøll, V.L., y Hinrichsen, J. (2002). Comparison of the functional insulin binding epitopes of the A and B isoforms of the insulin receptor. *J Biol Chem* 277, 47380–47384.
- Wiederkehr, A., y Wollheim, C.B. (2012). Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic β -cell. *Mol Cell Endocrinol* 353, 128–137.
- Wijesekara, N., Konrad, D., Eweida, M., Jefferies, C., Liadis, N., Giacca, A., Crackower, M., Suzuki, A., Mak, T.W., Kahn, C.R., *et al.* (2005). Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. *Mol Cell Biol* 25, 1135–1145.
- Williams, J.A., y Goldfine, I.D. (1985). The insulin-pancreatic acinar axis. *Diabetes* 34, 980–986.
- Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., *et al.* (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900–904.
- Wu, J.J., Quijano, C., Chen, E., Liu, H., Cao, L., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Gutkind, S., Daniels, M.P., Komatsu, M., *et al.* (2009). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging (Albany NY)* 1, 425–437.
- Yamaguchi, Y., Flier, J.S., Benecke, H., Ransil, B.J., y Moller, D.E. (1993). Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology* 132, 1132–1138.

- Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T.M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M., y Ohsumi, Y. (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J Cell Biol* 198, 219–233.
- Yang, Q., Inoki, K., Ikenoue, T., y Guan, K.-L. (2006). Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev* 20, 2820–2832.
- Yen, W.-L., y Klionsky, D.J. (2008). How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda, Md)* 23, 248–262.
- Yi, C., Ma, M., Ran, L., Zheng, J., Tong, J., Zhu, J., Ma, C., Sun, Y., Zhang, S., Feng, W., et al. (2012). Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science* 336, 474–477.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., y Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* 281, 30299–30304.
- Young, A.R.J., Chan, E.Y.W., Hu, X.W., Köchl, R., Crawshaw, S.G., High, S., Hailey, D.W., Lippincott-Schwartz, J., y Tooze, S.A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* 119, 3888–3900.
- Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., et al. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465, 942–946.
- Yu, Y., y Alwine, J.C. (2008). Interaction between simian virus 40 large T antigen and insulin receptor substrate 1 is disrupted by the K1 mutation, resulting in the loss of large T antigen-mediated phosphorylation of Akt. *J Virol* 82, 4521–4526.
- Yusta, B., Baggio, L.L., Estall, J.L., Koehler, J.A., Holland, D.P., Li, H., Pipeleers, D., Ling, Z., y Drucker, D.J. (2006). GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 4, 391–406.
- Zahr, E., Molano, R.D., Pileggi, A., Ichii, H., Jose, S.S., Bocca, N., An, W., Gonzalez-Quintana, J., Fraker, C., Ricordi, C., et al. (2007). Rapamycin impairs in vivo proliferation of islet beta-cells. *Transplantation* 84, 1576–1583.
- Zhang, C.Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A.J., Boss, O., Kim, Y.B., et al. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105, 745–755.
- Zhang, H., Cicchetti, G., Onda, H., Koon, H.B., Asrican, K., Bajraszewski, N., Vazquez, F., Carpenter, C.L., y Kwiatkowski, D.J. (2003). Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *J Clin Invest* 112, 1223–1233.
- Zhang, H.H., Huang, J., Düvel, K., Boback, B., Wu, S., Squillace, R.M., Wu, C.-L., y Manning, B.D. (2009). Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS ONE* 4, e6189.
- Zhang, H.H., Lipovsky, A.I., Dibble, C.C., Sahin, M., y Manning, B.D. (2006a). S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. *Mol Cell* 24, 185–197.
- Zhang, N., Su, D., Qu, S., Tse, T., Bottino, R., Balamurugan, A.N., Xu, J., Bromberg, J.S., y Dong, H.H. (2006b). Sirolimus is associated with reduced islet engraftment and impaired beta-cell function. *Diabetes* 55, 2429–2436.
- Zhao, Y., Xiong, X., y Sun, Y. (2011). DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(bTrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Mol Cell* 44, 304–316.
- Zhao, Y., Yang, J., Liao, W., Liu, X., Zhang, H., Wang, S., Wang, D., Feng, J., Yu, L., y Zhu, W.-G. (2010a). Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. *Nat Cell Biol* 12, 665–675.
- Zhao, Z., Zhang, X., Zhao, C., Choi, J., Shi, J., Song, K., Turk, J., y Ma, Z.A. (2010b). Protection of pancreatic beta-cells by group VIA phospholipase A(2)-mediated repair of mitochondrial membrane peroxidation. *Endocrinology* 151, 3038–3048.
- Zid, B.M., Rogers, A.N., Katewa, S.D., Vargas, M.A., Kolipinski, M.C., Lu, T.A., Benzer, S., y Kapahi, P. (2009). 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*. *Cell* 139, 149–160.
- Zoncu, R., Efeyan, A., y Sabatini, D.M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 21–35.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., y Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72, 9873–9880.

8.

Anexos

Role of the TSC1-TSC2 Complex in the Integration of Insulin and Glucose Signaling Involved in Pancreatic β -Cell Proliferation

Alberto Bartolomé,* Carlos Guillén,* and Manuel Benito

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A.B., C.G., M.B.), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain; and Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) (A.B., C.G., M.B.), Mallorca 183, 08036 Barcelona, Spain

Tuberous sclerosis complex proteins 1–2 (TSC1-TSC2) complex integrates both nutrient and hormonal signaling and is a critical negative regulator of mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1. The use of different β -cell lines expressing or not the insulin receptor (IR^{+/+} and IR^{-/-}) or with a reconstituted expression of IR isoform A or B (Rec A and Rec B) revealed that both phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/TSC/mTOR complex 1 and MAPK kinase/ERK pathways mediate insulin signaling in IR^{+/+}, IRA-, or IRB-expressing cells. However, glucose signaling was mediated by MAPK kinase/ERK and AMP-activated protein kinase pathways as assessed in IR^{-/-} cells. The effect of insulin on Akt phosphorylation was completely inhibited by the use of the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin in IR^{+/+} and Rec B cells, a partial inhibitory effect being observed in Rec A cell line. The knockdown of TSC2 expression up-regulated the downstream basal phosphorylation of 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) and mTOR. More importantly, upregulation of p70S6K signaling impaired insulin-stimulated phosphorylation of Akt Ser⁴⁷³ and p70S6K in IR^{+/+} and Rec B but not in Rec A cell lines. In fact, insulin receptor substrate-1 Ser³⁰⁷ phosphorylation signal in Rec B was stronger than in Rec A cell line during insulin action. Rec A cells induced a higher proliferation rate compared with Rec B or IR^{+/+} during serum stimulation. Thus, we propose that the regulation of TSC2 phosphorylation by insulin or glucose independently integrates β -cell proliferation signaling, the relative expression of IRA or IRB isoforms in pancreatic β cells playing a major role. (*Endocrinology* 151: 3084–3094, 2010)

Pancreatic β cells are the main source of insulin, a hormone required for maintaining metabolic homeostasis. Through a tight regulation of insulin levels, β cell is the energetic sensor for the metabolic control of the whole organism. Insulin demand is increased under different physiological and pathological conditions, such as pregnancy, obesity, or aging (1, 2). These various conditions enforce the β -cell mass to adapt to higher insulin synthesis and secretion requirements. Thus, β -cell plasticity can be accomplished by an increase in β -cell mass, which is the

net result of both cell hyperplasia and cell hypertrophy (3). Under certain conditions, β -cell mass and insulin levels can achieve a dramatic compensation up to 40- to 50-fold increase (4). The failure of these compensatory mechanisms results in an insulin deficiency that leads to hyperglycemia and clinical manifestations of type 2 diabetes (3).

Several signals or protein transducers have shown to be of great importance in these compensatory mechanisms. On this regard, insulin and IGF-I signaling through tyrosine kinase receptors and insulin receptor substrates

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.

Copyright © 2010 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/en.2010-0048 Received January 13, 2010. Accepted April 7, 2010.
First Published Online April 28, 2010

* A.B. and C.G. contributed equally to this work.

Abbreviations: AICAR, 5-Amino-4-imidazole carboxamide riboside; AMPK, AMP-activated protein kinase; 2-DG, 2-deoxyglucose; FBS, fetal bovine serum; GAP, GTPase-activating protein; iLIRKO, inducible-liver IR knockout; IR, insulin receptor; IRA, insulin receptor isoform A; IRB, insulin receptor isoform B; IRS, insulin receptor substrate; MEK, MAPK kinase; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; p70S6K, 70-kDa ribosomal protein S6 kinase; PBT, Tween 20 at 0.05% in PBS; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; Rheb, Ras homolog enriched in brain; siRNA, small interfering RNA; TSC, tuberous sclerosis complex protein.

(IRS) is essential for β -cell compensation in insulin-resistant states (5, 6). Downstream effectors of insulin signaling, such as Akt and the 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K), have proven to be positive key regulators of β -cell mass (7, 8).

Glucose is the main effector of insulin secretion in β cells, but it also plays a role in β -cell proliferation. Mice haploinsufficient for glucokinase are unable to increase β -cell mass in response to high-fat diet (9). Furthermore, glucose has been found to stimulate ERK 1/2 activation (10, 11). This activation is independent of insulin signaling as seen in insulin receptor IR^{-/-} β cells (12). Glucose directly increases ATP/AMP ratio, inhibiting AMP-activated protein kinase (AMPK) activity. This enzyme has been described as a crucial node of energy sensing in controlling cell metabolism and proliferation. Its importance in β cells has been reviewed recently (13).

The tuberous sclerosis complex protein TSC1-TSC2 complex is located in the crossroad of this signaling network, integrating different signals to determine the cellular fate through regulation of protein synthesis, cell size, and proliferation (14). The GTPase-activating protein (GAP) activity of TSC2 toward Ras homolog enriched in brain (Rheb) negatively regulates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. Akt stimulation directly phosphorylates TSC2 Ser⁹³⁹ and Thr¹⁴⁶², leading to a diminished GAP activity, and thus increasing mTORC1 signaling (15). MAPK kinase (MEK)/ERK signaling can also stimulate mTORC1 through TSC2 phosphorylation of Ser⁶⁶⁴ (16). In contrast, AMPK activation has been found to phosphorylate TSC2 and stabilize the TSC1-TSC2 complex, leading to a diminished mTORC1 activity under low energetic states (17). In addition, AMPK can directly inhibit mTORC1 by phosphorylation of Raptor Ser⁷⁹² (18). TSC/mTORC1/p70S6K signaling pathway is tightly regulated. On one hand, a diminished mTORC1/p70S6K activity leads to a decrease in β -cell mass and diabetes as described previously. On the other hand, its hyperactivity induces an insulin-resistance state by a negative feedback loop on IRS-1/2 (19–21). Just recently, animal models have shown the key role of TSC1-TSC2 complex in pancreatic β cells. Specific disruption of the complex in β cells by either TSC1 (22) or TSC2 (23, 24) deletion or Rheb overexpression (25) results in hyperinsulinemia and improved glucose tolerance mainly as a result of an increase in β -cell size.

Alternative splicing of the IR results in two isoforms, one encoding the 36 nucleotide exon 11 (IRB) and the other one without it (IRA) (26). Although some authors have reported a stronger binding affinity for insulin of IRA vs. IRB (27), more recent data support no differences of affinity between both IR isoforms (28). The relative ex-

pression of the two isoforms varies among different tissues (29) and may play a role in different pathological conditions such as cancer or insulin resistance (30). A differential signaling of IRA and IRB through *p70S6K-insulin* gene or *Akt-glucokinase* gene, respectively, was observed previously (31). Chronic hyperglycemia was found to drive an isoform shift from IRA to IRB in β -cell cultures (32). Finally, we have observed recently an increase of IRA in pancreatic islets from inducible-liver IR knockout (iLIRKO) mice showing compensatory β -cell hyperplasia in response to hepatic insulin resistance (33).

Here, we report a differential regulation of TSC2 phosphorylation and mTORC1 signaling by insulin or glucose in pancreatic β -cell lines. Insulin effects are dependent on both phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and MEK/ERK pathways, whereas glucose can exert its effects through MEK/ERK and AMPK. The use of different β -cell lines expressing IRA or IRB revealed that both PI3K/Akt/TSC/mTORC1 and MEK/ERK pathways mediate insulin signaling in either IRA- or IRB-expressing cells. Interestingly, this signaling was more sustained through the IRA isoform, and Akt/TSC phosphorylation was not completely blunted by wortmannin. A marker of insulin resistance, IRS-1 Ser³⁰⁷ phosphorylation, is differently regulated in IRA- or IRB-expressing cell lines. Furthermore, specific expression of IRA overcame the insulin-resistance state induced by small interfering RNA (siRNA)-mediated TSC2 expression knockdown in control or in Rec B β -cell lines, suggesting a differential insulin signaling mediated by both IR isoforms.

Materials and Methods

Antibodies and reagents

All antibodies were from Cell Signaling Biotechnology (Danvers, MA) unless stated otherwise. Exceptions were IR- β (sc-711; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), TSC1 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX), phospho-mTOR Ser²⁴⁴⁸ (BioSource International, Camarillo, CA), β -actin (Sigma, St. Louis, MO), and phospho-TSC2 Ser⁶⁶⁴ used for immunocytochemistry (BioLegend, San Diego, CA). Antibody against phospho-TSC2 Ser⁶⁶⁴ used for Western blot was a generous gift from P. P. Pandolfi (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA). U0126 [1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(*o*-aminophenylmercapto)butadiene], wortmannin, and rapamycin were from Calbiochem (San Diego, CA), and insulin, cycloheximide, AICAR, and 2-deoxyglucose (2-DG) were from Sigma.

Origin of pancreatic β -cell lines and cell culture

Pancreatic β cells from IR *loxP* mice were generated as described previously (12). Briefly, cells were immortalized by transfection with attenuated simian virus 40, and the IR^{-/-} cell line was generated after infection with adenovirus encoding Cre recombinase. Individual colonies were selected for IR recombinase

tion by PCR. For reconstitution of single IR isoforms, viral Bosc-23 packaging cells were transfected by the calcium phosphate method, with 3 μ g per 6-cm dish of the pBabe hygromycin-resistance retroviral vector containing either IRA or IRB, kindly provided by C. R. Kahn (Joslin Diabetes Center, Boston, MA). Cells were infected with 8 μ g/ml polybrene-supplemented retroviral particles and, after 72 h, were subjected to hygromycin selection (200 μ g/ml) for at least 2 wk. Expression of the IR isoform mRNA was assessed by RT-PCR as described previously (34). All cell lines express β -cell-specific markers, checked routinely as described previously (12). Although these β cells are still immature and cannot secrete insulin, expression and regulation of insulin mRNA is produced by glucose stimulation (12). Pancreatic β -cell lines were grown in 1 g/liter glucose and 10% fetal bovine serum (FBS)-DMEM, and all of the experiments were performed in cells from passage 3 to 15. RKO cells (CLR-2577; American Type Culture Collection, Manassas, VA) were used as control for immunocytochemistry against phospho-TSC Ser⁶⁶⁴.

Cell signaling

For cell signaling experiments, cells were serum and glucose starved for 3 h in DMEM containing 0.2 mM glucose and 0.5% BSA and subsequently stimulated with 10 nM insulin or 5 mM glucose for 5 or 15 min, respectively. Such a dose of glucose is sufficient to stimulate cell signaling. Inhibitors were added 30 min before stimulus. Cells were washed and lysed for protein extraction according to standard procedures (35). Protein determination was performed by the Bradford dye method, using the Bio-Rad (Hercules, CA) reagent and BSA as the standard.

Immunoprecipitation and Western blotting

For immunoprecipitation, equal amounts of protein (300–1000 μ g) were immunoprecipitated at 4 C with the corresponding antibodies. The immune complexes were collected on protein A-agarose beads. Protein samples were submitted to SDS-PAGE. Then, gels were transferred to Immobilon-P membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA), and they were blocked using 5% nonfat dried milk or 5% BSA in 10 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl (pH 7.5) and incubated overnight with several antibodies as indicated in 0.05% Tween 20, 10 mM Tris-HCl, and 150 mM NaCl (pH 7.5). Immunoreactive bands were visualized using the ECL Western Blotting Detection kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

siRNA transfection

siRNA against the expression of mouse TSC2 was designed and chemically synthesized by Bionova Científica (Madrid, Spain). For siRNA transfection, cells were electroporated using Nucleofector II and Cell Line Kit T (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MS) following the instructions from the manufacturer. A pool of three siRNA (2 μ g) was added to the transfection reagent per 2×10^6 cells. After transfection, cells were seeded, and protein expression was checked after 24–48 h.

Violet crystal assay

Immediately after transfection with TSC2 siRNA, cells were seeded in 12-well plates at a density of 5000 cells/cm² in DMEM supplemented with 10% FBS. After 24–48 h, assay was performed as described previously (36). These cells were tested for apoptosis resulting negative.

Cell cycle analysis

After siRNA transfection, cells were seeded and grown in 1 g/liter glucose and 10% FBS-DMEM. At 24 h later, adherent and nonadherent cells were collected by centrifugation and fixed with cold ethanol (70% vol/vol). The cells were then washed, resuspended in PBS, and incubated with Rnase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) for 30 min at 37 C. After addition of 0.05% propidium iodide (Sigma), cellular DNA content and cell size was quantified by flow cytometry.

Phospho-TSC2 Ser⁶⁶⁴ immunocytochemistry

After treatment, cells were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde 4% (weight/vol) during 10 min at 4 C. Cells were washed with PBT (Tween 20 at 0.05% in PBS) and permeabilized with 0.2% (vol/vol) Triton X-100 in PBS for 5 min. Cells were subsequently treated with H₂O₂ 3% (vol/vol) in 50% MeOH for 45 min to quench endogenous peroxidases. After cell wash with PBT and 45 min of blocking with 3% BSA in PBT, cells were incubated with anti-phospho-TSC2 Ser⁶⁶⁴ antibody at 1:50 (BioLegend) overnight. The next day, cells were washed with PBT and incubated with the secondary antibody, peroxidase-conjugated antirabbit IgG at 1:200. After cell wash with PBT, color development was followed under microscope, using the diaminobenzidine reagent (Dako, Carpinteria, CA) and following the instructions of the manufacturer. Image captures were obtained with a Nikon (Tokyo, Japan) Eclipse TE 300 inverted microscope and the software Nis-Elements F.

λ -Phosphatase treatment

Total lysates (100 μ g) were mixed in λ -phosphatase buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM Na₂EDTA, 5 mM dithiothreitol, 0.01% BRIJ-35 (polyoxyethylene lauryl ether), and 2 mM MnCl₂] with 400 U of λ -phosphatase (Sigma), and then the mixture was incubated for 1 h at 30 C.

Statistics

Statistically significant differences between mean values were determined using paired Student's *t* test for paired comparisons.

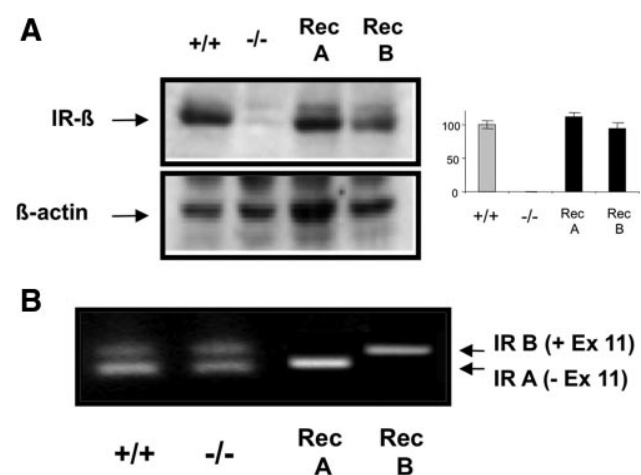


FIG. 1. IR and TSC1-TSC2 complex in β cells. A, IR expression by Western blot in the different pancreatic β -cell lines: IR^{+/+}, IR^{-/-}, and reconstituted cell lines stably expressing IRA (Rec A) or IRB (Rec B). A densitometric analysis of the IR levels is shown; data are presented as means \pm SEM (n = 5). B, Total RNA was isolated, and IR exon 11 (Ex 11) expression was checked by RT-PCR as described in *Materials and Methods*.

One-way ANOVA and Tukey's tests were used for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Characterization of pancreatic β -cell lines

Four different cell lines were used in our study (IR^{+/+}, IR^{-/-}, Rec A, and Rec B). From an IR^{-/-} β -cell line generated in our previous work (12), Rec A and Rec B cell lines were reconstituted by retrovirus-mediated transfection with a human IRA or IRB encoding plasmid and their corresponding empty vectors. IR levels were measured by Western blotting (Fig. 1A), and RT-PCR of IR exon 11 mRNA determined the specific expression of both isoforms (Fig. 1B). Expression of TSC1 and TSC2 and its association were found in all cell lines (see Supplemental Fig. 1A published on The Endocrine Society's Journals

Online web site at <http://endo.endojournals.org>). In addition, cells submitted for 3 h to serum and glucose withdrawal did not modify the TSC1-TSC2 protein expression (Supplemental Fig. 1B). Thus, all additional experiments were performed under these conditions.

Insulin stimulates TSC/mTORC1 signaling pathway through PI3K/Akt in pancreatic β cells

To assess the effect of insulin on TSC2 phosphorylation, we stimulated β cells bearing IR (IR^{+/+}, Rec A, and Rec B) with 10 nM insulin at different time points (from 15 min to 24 h). TSC2 Ser⁹³⁹ and Thr¹⁴⁶² phosphorylation are directly correlated to Akt activation (as measured by Akt Ser⁴⁷³ phosphorylation), and mTORC1 activity was determined by p70S6K Thr³⁸⁹ phosphorylation (Supplemental Fig. 2) as seen previously in HEK293 cells (15). In the Rec A cell line, the stimulation of Akt/TSC2 was more sustained than in Rec B cells. In IR^{-/-} cells, glucose did not

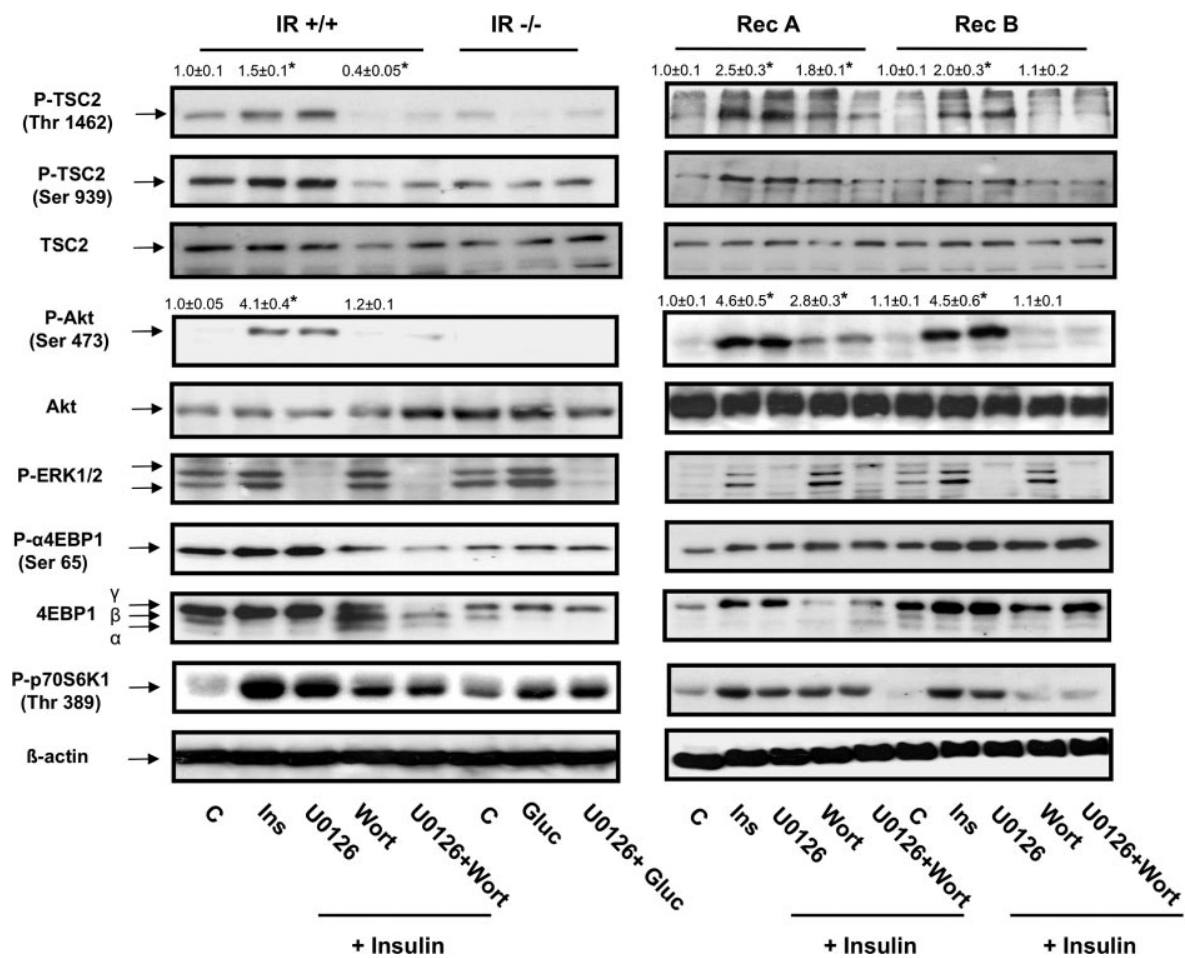


FIG. 2. Insulin and glucose action on the PI3K/TSC/mTORC1 pathway. Exponentially growing cells were glucose and serum deprived for 3 h. After that, cells were stimulated with insulin at 10 nM for 5 min (IR^{+/+}, Rec A, and Rec B) or glucose at 5 mM (IR^{-/-}) for 15 min. Specific inhibitors were added 30 min before stimulation (wortmannin at 40 nM, U0126 at 5 μ M). Protein extracts were collected and submitted to Western blot with the use of specific antibodies. Blots are representative of three independent experiments. Quantification of the most significant points is shown (control, insulin stimulation, and insulin plus wortmannin). Data are presented as means \pm SEM. *, $P < 0.05$ compared with control points. C, Control; Ins, insulin; Wort, wortmannin; Gluc, glucose.

stimulate either TSC2 or Akt phosphorylation in these residues. However, glucose stimulated p70S6K Thr³⁸⁹ phosphorylation (Supplemental Fig. 2).

To assess the signaling pathway specificity, we used selective inhibitors of the class I PI3K (wortmannin at 40 nM) and MEK 1/2 (U0126 at 5 μ M). Use of wortmannin blocked insulin-stimulated Akt Ser⁴⁷³ phosphorylation and subsequently TSC2 Ser⁹³⁹ and Thr¹⁴⁶² phosphorylation and mTORC1 activity. Inhibition of the MEK/ERK pathway did not affect either Akt or TSC2 phosphorylation levels. Surprisingly, although both reconstituted cell lines express similar levels of IR (Fig. 1A), wortmannin at 40 nM only partially impaired Akt/TSC2 phosphorylation in the IRA-expressing β -cell line. However, this phosphorylation was totally blunted in IR^{+/+}- or IRB-expressing β cells (Fig. 2).

Glucose activates TSC/mTORC1 signaling via ERK 1/2 independently from insulin signaling in pancreatic β cells

In a previous study, we described an insulin-independent activation of ERK 1/2 and mTORC1/p70S6K by stimulation with 5 mM glucose in IR^{-/-} β cells (12). Described previously was an ERK-dependent phosphorylation site of TSC2 in Ser⁶⁶⁴, inhibiting the repressor function of TSC1-TSC2 toward mTORC1 (16). To test whether glucose by itself was capable of stimulating TSC2 Ser⁶⁶⁴ phosphorylation in pancreatic β cells, we submitted IR^{-/-} β cells to 5 mM glucose stimulation. We found a

glucose-mediated activation of TSC2 Ser⁶⁶⁴ phosphorylation by Western blot analysis (Fig. 3A). This phosphorylation was completely blunted by the addition of U0126. TSC2 Ser⁶⁶⁴ phosphorylation has been described as a marker of hyperactivation of MEK/ERK signaling in tuberous sclerosis and human breast and colon cancer (37). In addition, we also observed its phosphorylation status by immunocytochemistry (Supplemental Fig. 3). Thus, glucose stimulated TSC Ser⁶⁶⁴ phosphorylation in IR^{-/-} and insulin in IR^{+/+} cell lines. As a positive control, we performed glucose or insulin stimulation in a human cancer cell line (RKO cells).

Energetic status-dependent modulation of mTORC1

AMPK is the energetic sensor of the cell, and it is activated by a rise in the AMP/ATP ratio (38). Thus, AMPK Thr¹⁷² phosphorylation is decreased by glucose and increased by 2-DG in a dose-dependent manner as well as by 4 mM AICAR in IR^{+/+} β cells. Activation of AMPK by 2-DG or AICAR addition to the culture medium inhibited mTOR and p70S6K phosphorylation. Conversely, inactivation of AMPK by glucose resulted in an enhancement of mTOR and p70S6K phosphorylation (Fig. 3B). Thus, activation of AMPK can directly regulate mTORC1 inhibition. In a similar manner, AMPK activation caused Raptor Ser⁷⁹² phosphorylation, which has been described as an additional mechanism to down-regulate mTORC1 signaling, independently from the TSC1-TSC2 complex (18).

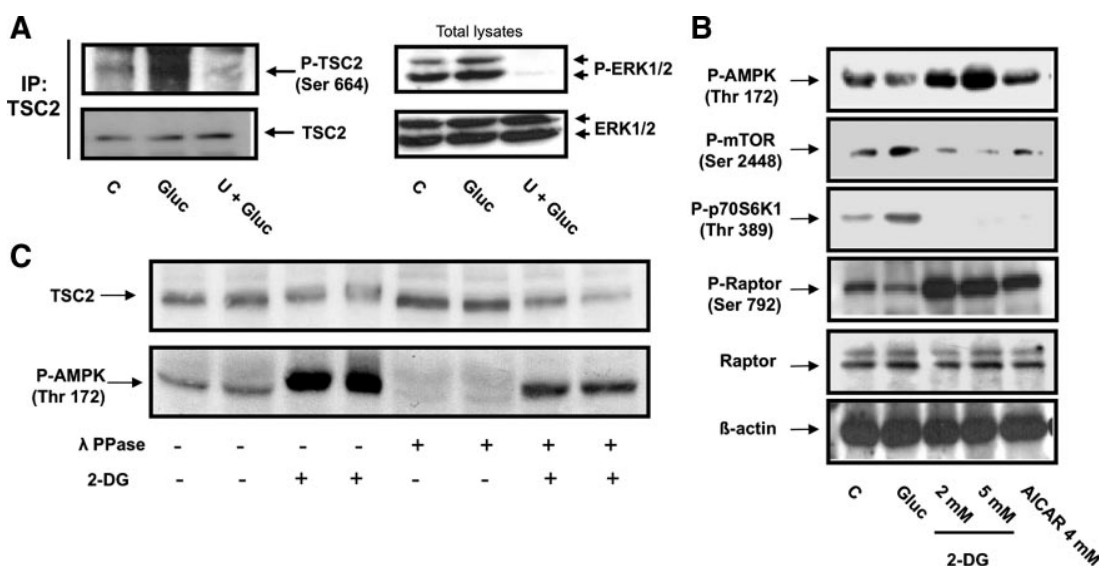


FIG. 3. Glucose and energy-dependent modulation of TSC2 and mTORC1. A, IR^{-/-} cells were glucose and serum deprived for 3 h and then were stimulated with glucose at 5 mM for 15 min. U0126 at 5 μ M was added 30 min before the addition of glucose. Protein extracts were submitted to immunoprecipitation (IP) with anti-TSC2 antibody and were incubated with a phospho-specific anti-TSC2 Ser⁶⁶⁴ antibody. Total lysates were used for Western blot against phospho-ERK 1/2. B, IR^{+/+} cells were serum and glucose deprived for 3 h and subsequently stimulated with glucose at 5 mM, 2-DG at 2–5 mM, or AICAR at 4 mM. Protein extracts were subjected to SDS-PAGE and incubated with specific antibodies. C, Exponentially growing IR^{+/+} cells were stimulated or not with 2-DG at 5 mM for 15 min, protein extracts were collected, and part of the samples were treated with λ -phosphatase. Samples were subjected to SDS-PAGE and incubated with specific antibodies. Blots are representative of at least three independent experiments. C, Control; Gluc, glucose; U, U0126.

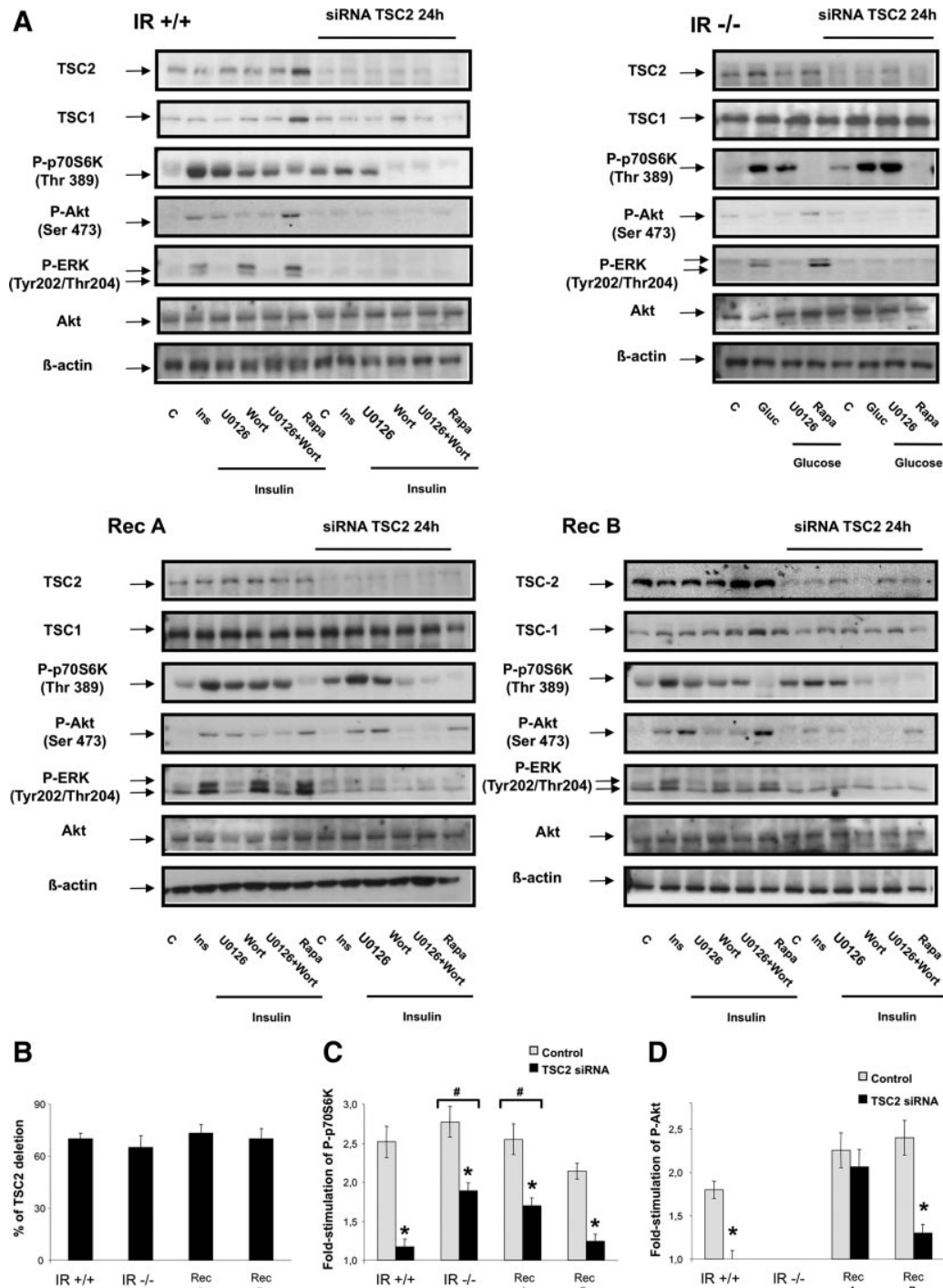


FIG. 4. Effect of TSC2 interference on insulin and glucose signaling. **A**, At 24 h after siRNA transfection, with the combination of siRNA (TSC2-1, TSC2-2, and TSC2-3) used in Supplemental Fig. 5, cells were stimulated with insulin at 10 mM for 5 min (IR^{+/+}, Rec A, and Rec B) or glucose at 5 mM for 15 min (in IR^{-/-} cells, right top). Specific inhibitors (wortmannin at 40 nM, U0126 at 5 μM, or rapamycin at 40 nM) were added 30 min before stimulation. Protein samples were collected, subjected to SDS-PAGE, and incubated with specific antibodies. Blots are representative of four independent experiments. **B**, Densitometric analysis showing the percentage of TSC2 deletion in TSC2-interfered cells compared with control cells. Results are means ± SEM of the level of interference reached. **C**, Fold increase of p70S6K Thr³⁸⁹ phosphorylation after insulin or glucose stimulation in control and TSC2-interfered cells. Results are means ± SEM. *, *P* < 0.05 compared with control cells. The differences between the ratios of fold stimulation between control and TSC2-interfered cells were calculated, and significant differences are indicated. #, *P* < 0.05. **D**, Fold increase of Akt Ser⁴⁷³ phosphorylation after insulin or glucose stimulation in control and TSC2-interfered cells. Results are means ± SEM. *, *P* < 0.05 compared with control cells. C, Control; Ins, insulin; Wort, wortmannin; Rapa, rapamycin.

The role of the TSC complex in energy-sensing response was observed, because the phosphorylation of TSC2 by AMPK activation causes a mobility shift of the TSC2 protein in PAGE, which is reverted by λ -phosphatase treatment of the samples (Fig. 3C). When comparing the responses of all cell lines energy deprivation, we observed that AMPK activation by 2-DG was significantly lower in $IR^{-/-}$ β cells compared with $IR^{+/+}$ or Rec A or Rec B β -cell lines (Supplemental Fig. 4). As expected, AMPK activation by 2-DG was related to mTORC1/p70S6K pathway inhibition in all cell lines studied. In addition, AMPK inactivation by glucose enhanced mTORC1/p70S6K signaling. Insulin in the presence of glucose induced an additional mTORC1/p70S6K activation signaling independently from AMPK (Supplemental Fig. 4).

Effect of TSC2 interference on pancreatic β -cell signaling

To assess the importance of TSC complex in the integration of β -cell signaling, we targeted the expression of TSC2 with siRNA. TSC2 bears the GAP activity of the TSC1-TSC2 complex, so its interference ensures the dysfunction of the complex (39–41). To maximize TSC2 interference, we transfected β cells with different oligonucleotides alone or in combination. The activation of p70S6K was related to the level of TSC2 interference achieved, and TSC1 protein levels remained unaltered in all conditions (Supplemental Fig. 5). The next step was to explore the effect of TSC2 interference on the insulin or glucose signaling in the different β -cell lines studied (Fig. 4A). A similar rate of TSC2 knockdown was achieved in all the cell lines, close to 70% of protein expression interference (Fig. 4B). TSC2 knockdown induced p70S6K basal phosphorylation in all cell lines studied (Fig. 4A). TSC2 interference generated insulin resistance, decreasing Akt and p70S6K phosphorylation in response to insulin in $IR^{+/+}$ (Fig. 4, A and C). However, this insulin resistance effect was dependent on the IR isoform expression. Thus, Rec A, but not Rec B, cells overcome insulin resistance on Akt Ser⁴⁷³ and p70S6K phosphorylation (Fig. 4, A, C, and D). In addition, TSC2 interference generated insulin resistance, decreasing ERK 1/2 phosphorylation in $IR^{+/+}$, Rec A, or Rec B cell lines (Fig. 4A). The insulin resistance induced by TSC inactivation in $IR^{+/+}$ or Rec B cells was blunted by rapamycin treatment, indicating a requirement for mTORC1 signaling. In contrast, the effect observed on ERK 1/2 was rapamycin independent in all cell lines studied (Fig. 4A). In $IR^{-/-}$ cells, TSC2 interference impaired glucose-mediated ERK 1/2 phosphorylation. However, glucose induced p70S6K signaling regardless of the presence of the MEK 1/2 inhibitor U0126 through the ERK 1/2-independent pathway (Fig. 4A, *top right panel*). To

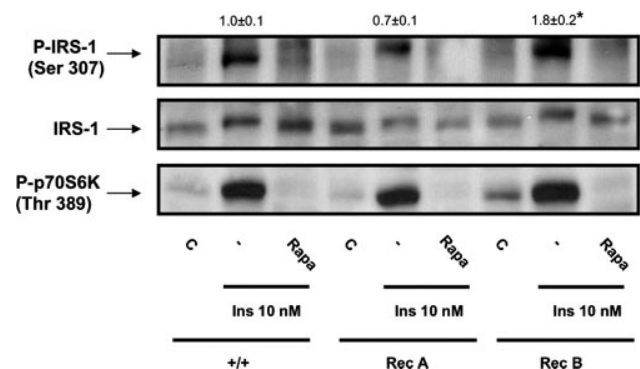


FIG. 5. Feedback loop on IRS-1 Ser³⁰⁷ is differentially activated depending on IR isoform expression. Cells were glucose and serum deprived for 3 h and then were stimulated with insulin at 10 nM for 15 min. Rapamycin at 40 nM was added 30 min before stimulation. Protein samples were collected, subjected to SDS-PAGE, and incubated with specific antibodies. Blots are representative of three independent experiments. Results are means \pm SEM. *, $P < 0.05$ compared with $IR^{+/+}$ cells. C, Control; Rapa, rapamycin.

further investigate the differences between IRA or IRB expression on insulin resistance, we stimulated cells with insulin at 10 nM for 15 min and observed a different modulation of IRS-1 Ser³⁰⁷ phosphorylation. This phosphorylation is mediated by p70S6K, as described previously (21), reverted by rapamycin, and up-regulated in Rec B cells compared with Rec A or $IR^{+/+}$ cells (Fig. 5).

Role of the TSC2/mTORC1 pathway in the proliferation of pancreatic β cells bearing IRA or IRB isoforms

To assess the role played by mTORC1 in the proliferation rate of β -cell lines studied, we submitted those cells to 10% FBS in the presence or absence of rapamycin at 40 nM (Fig. 6). The rate of proliferation as estimated by cell counting increased by 8-fold in $IR^{+/+}$ or Rec B cells and by 4-fold in $IR^{-/-}$ cells (Fig. 6, A and B). In addition, Rec A cells showed a much higher rate of proliferation under the same experimental conditions (10-fold increase). Addition of rapamycin lowered the proliferation rate in all the cell lines studied, but this effect was of different magnitude. In Rec A cells, the effect of rapamycin on proliferation was a 4-fold decrease, whereas in Rec B cells only a 2-fold decrease was observed (Fig. 6, A and B). Flow cytometry assays showed a tendency in cell size increase after TSC2 interference, although it was not statistically significant (data not shown). In addition, TSC2 interference increased the number of cells in S/G₂-M phase in all cell lines studied (Fig. 6C). These data were confirmed by crystal violet assays (Fig. 6D) Rapamycin treatment reverted the increased proliferation mediated by TSC2 knockdown in all cell lines studied (Fig. 6A–C).

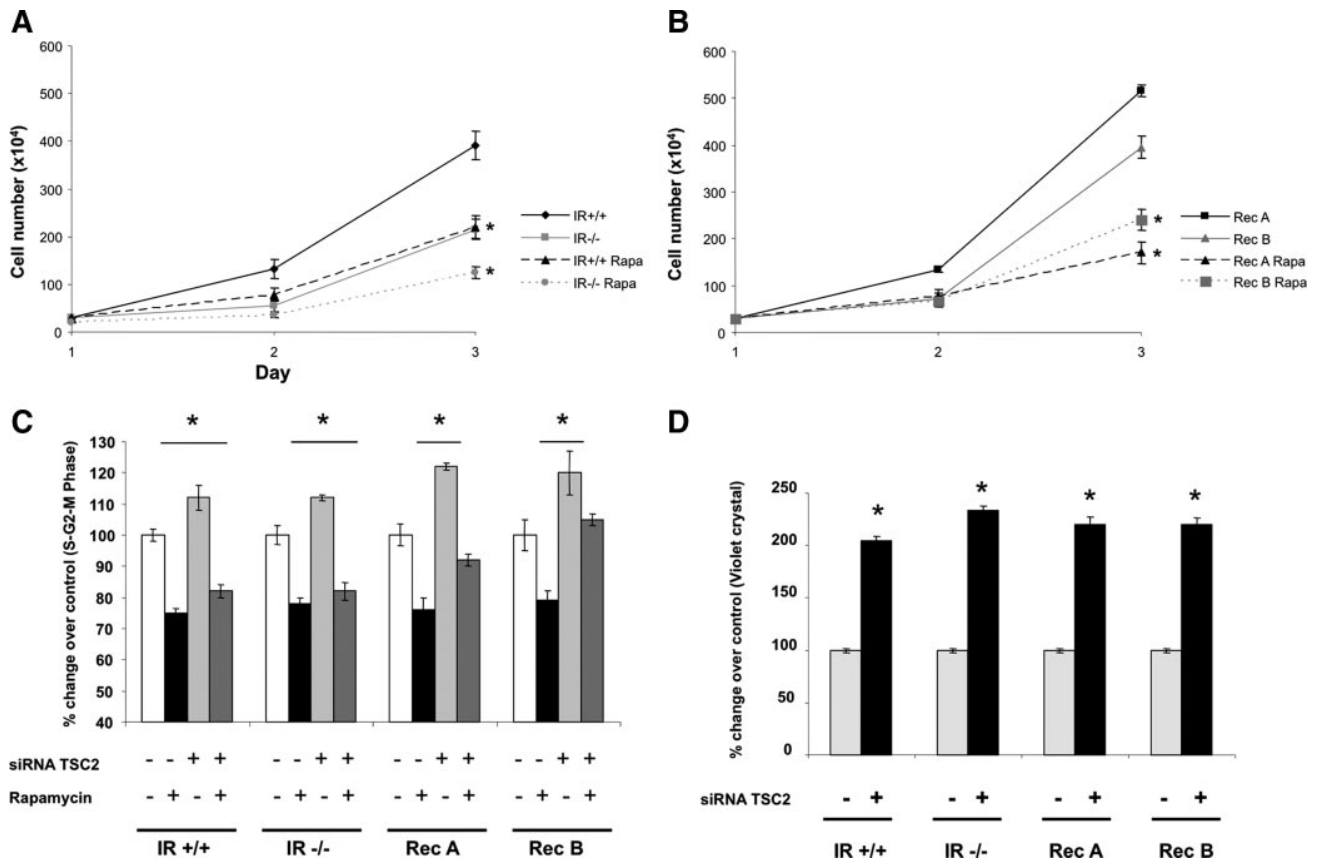


FIG. 6. Effect of mTORC1 inhibition or overactivation on β -cell proliferation. A, IR^{+/+} and IR^{-/-} cells were counted and seeded at the same density and grown in 1 g/liter glucose and 10% FBS-DMEM in the presence or absence of 40 nM rapamycin (Rapa). At 24 and 48 h, cells were counted. B, Same experiment for Rec A and Rec B cells. Results are means \pm SEM. *, $P < 0.05$ compared with control points. C, Transfected and control cells were grown in 1 g/liter glucose and 10% FBS-DMEM in the presence or absence of rapamycin at 40 nM. β -Cell DNA content was analyzed by flow cytometry as described in *Materials and Methods*. The bars represent the percentage change of cells in S/G₂-M phase compared with controls for each cell line. D, TSC2 down-regulated cells and control cells were seeded at the same density. After 24 and 48 h, violet crystal stain was measured as described. The differences between absorbances at 24 and 48 h, in control or TSC2 down-regulated cells, are represented. Results are means \pm SEM. *, $P < 0.05$ compared with controls for each cell line.

Discussion

Recent animal models have pointed out the relevance of the TSC1-TSC2 complex acting as a repressor of mTORC1 for the control of β -cell mass. Thus, β -cell-specific knockout models of TSC1 or TSC2 result in an augmented β -cell mass, mainly because of a huge cell hypertrophy (22–24). Similarly, a model overexpressing Rheb in β cells lose the regulation by the TSC1-TSC2 complex, and, as a consequence, β -cell mass is also increased (25). The importance of mTORC1 functioning in human β cells is also patent; progressive impairment in β -cell function was observed in patients who received β -cell transplantation and were treated with rapamycin as an immunosuppressant (42). We previously demonstrated that insulin or glucose independently induced proliferation signaling in pancreatic β cells of fetal origin (12). Now, we address the important issue of the integration of both independent signaling in the regulation of β -cells proliferation.

Insulin stimulation mediates TSC2 phosphorylation in a PI3K/Akt-dependent manner, leading to diminished

TSC2 activity toward Rheb and subsequently producing downstream mTORC1 activation (15, 43). TSC2 phosphorylation leads to an increase in p70S6K or the eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. More importantly, insulin stimulates Akt/TSC2/p70S6K and MEK/ERKs pathways in either IRA- or IRB-expressing cell lines. These results contrast with previous data showing specific signaling for each of the IR isoforms (31, 44). However, insulin induced a more sustained signaling in Rec A compared with Rec B cell lines. In fact, wortmannin did not completely block either Akt or TSC2 phosphorylation in Rec A compared with Rec B β cells. These results suggest that IRA confers a stronger proliferation capability compared with IRB in response to insulin, as we recently published in iLIRKO primary islets (33) and discussed below.

Glucose is an essential proliferation and survival factor for pancreatic β cells (12, 45). Its metabolism is necessary for β -cell compensation in response to insulin resistance

(9). Glucose stimulation *in vitro* is able to induce ERK 1/2 phosphorylation by a not yet well-defined mechanism (10, 11), but it has been found to be independent of insulin secretion in β cells (12, 45). ERK 2 directly phosphorylates TSC Ser⁶⁶⁴ in HEK293T cells (16) and was increased in several human tumors, leading to an up-regulation of mTORC1 signaling (37). We have found previously that glucose itself is capable of stimulate ERK 1/2 phosphorylation in IR^{-/-} β cells and thus induce mTORC1/p70S6K activation (12). Neither TSC2 Ser⁹³⁹ nor Thr¹⁴⁶² phosphorylation was observed during glucose stimulation. However, TSC2 Ser⁶⁶⁴ was stimulated by glucose in a MEK/ERK-dependent manner. Glucose can also exert its effects on mTORC1 signaling by modulation of ATP levels and therefore by AMPK inhibition. AMPK, on one hand, directly stabilizes the TSC1-TSC2 complex (17) and, on the other hand, modulates an essential component of mTORC1, Raptor (18). AMPK is a crucial regulator of β -cell insulin secretion (46), cell proliferation, and survival (47, 48). Its activation implicates a strong inhibition of mTORC1, which can be reverted by glucose addition. We have proven that AMPK activation can induce Raptor Ser⁷⁹² phosphorylation in pancreatic IR^{+/+} β cells, contributing to energy-deprivation-mediated impairment in mTORC1/p70S6K signaling. In addition, AMPK activation was found to be less sensitive to energy deprivation in IR^{-/-} cells compared with IR-bearing cell lines. These differences between cell lines with or without IR expression are correlated with previous observations of IR/glucose transporter-2-mediated glucose uptake in β -cell lines (33) or neonatal hepatocytes (34). Whereas the maximum glucose uptake was achieved in the Rec A cell line, IR^{-/-} cells showed a decreased glucose uptake. These data paralleled with the rate of proliferation in those β cells.

TSC2 interference causes an increase in p70S6K activity and insulin resistance in IR^{+/+} or Rec B β cells on Akt stimulation, as demonstrated previously in other cell types (19, 21, 49). Thus, a chronic exposure to high levels of glucose mediates hyperactivation of mTORC1 and proteasomal degradation of IRS-2 in INS-1 β cells (20). Lately, some animal and cellular models have shown the importance of the regulation of mTORC1 in the physiology of β cells. Although mTORC1/p70S6K hyperactivity can lead to IRS-mediated insulin resistance, trials failed to globally diminish it by blocking mTORC1 with the use of rapamycin, because a functional mTORC1 is required for β -cell adaptation (50, 51). In addition, here we describe a novel mechanism of insulin resistance mediated by TSC2 down-regulation, because TSC2 interference also impairs ERK 1/2 signaling. This effect is consistent with a previous report that describes ERK 1/2 hyperactivation after mTORC1 blocking in samples from human tumors (52).

However, the inhibition of mTORC1 with rapamycin did not revert the insulin resistance on ERK 1/2 signaling in IR^{+/+} cells, Rec B β cells, or Rec A reconstituted cells, suggesting an mTORC1-independent feedback mechanism on ERK 1/2 signaling. In IR^{-/-} TSC2 knockdown cells, glucose induced mTORC1/p70S6K activity independently from the TSC complex, more likely through AMPK/Raptor.

The inhibition of mTORC1 with rapamycin reverted the insulin resistance on Akt stimulation in our cell lines. More importantly, IRA reconstituted cells overcome the insulin resistance seen above showing insulin-mediated Akt stimulation but TSC2 knockdown. Our data suggest that the inhibition of the upstream insulin signaling mediated by p70S6K overactivation feedback mechanism may be differentially modulated in IRA- or IRB-expressing cells. Phosphorylation of IRS-1 Ser³⁰⁷ is considered a marker of insulin resistance (53). The negative loop concerning IRS-1 Ser³⁰⁷ phosphorylation was up-regulated in Rec B cells compared with Rec A cells in response to insulin. This might explain the differences observed on Akt Ser⁴⁷³ phosphorylation between Rec A and Rec B cells when we interfered TSC2 expression.

In animal models with a specific deletion of TSC1 or TSC2 in pancreatic β cells, although a cell hypertrophy is always observed (22–24), β -cell hyperplasia was only

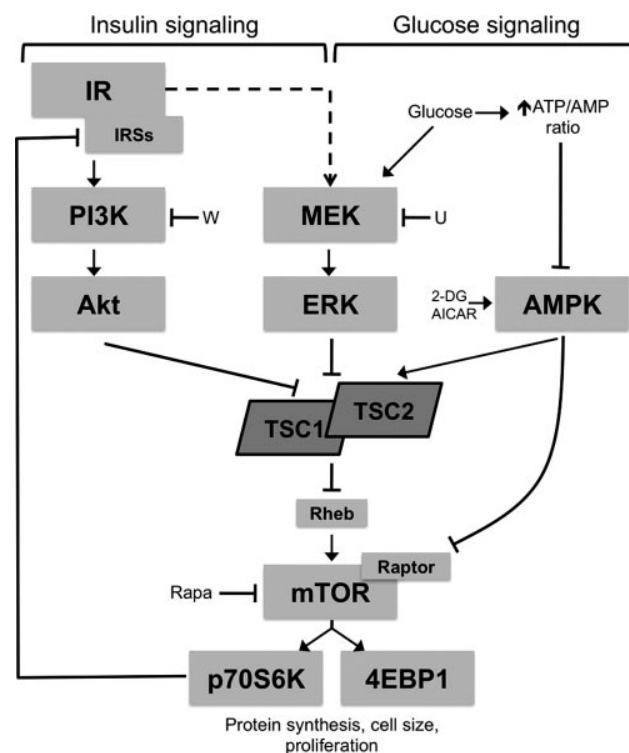


FIG. 7. Insulin and glucose signaling toward TSC complex and mTORC1. Integration of insulin- or glucose-independent signaling by TSC1-TSC2 complex converging on mTORC1/p70S6K proliferation pathway in pancreatic β -cells of fetal origin.

found in one of them (23). In our β -cell lines, we found an increase of proliferation in all cell lines when TSC2 was interfered. This increase was dependent on mTORC1 activity because rapamycin addition blocked the stimulatory effect of TSC2 interference on cell proliferation. More importantly, rapamycin inhibited the rate of proliferation observed in Rec A β cells by 4-fold. This effect of rapamycin on Rec B cells was only 2-fold. Our results point out the higher mitogenic effect of IRA *vs.* IRB isoform in the regulation of β -cell proliferation. This results are consistent with those described previously in iLIRKO mice, in which hepatic insulin resistance induced compensatory β -cell hyperplasia associated with a change in the isoforms profile of IR. Thus, IRA isoform was up-regulated and IRB isoform down-regulated in primary islets from those mice (33).

In conclusion, here we described the relevance of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin- and glucose-independent signaling in pancreatic β -cell proliferation (Fig. 7). This complex participates in coordinating multiple signals from either energetic or hormonal status, determining the functioning of protein synthesis through mTORC1. This route has been described as critical for β -cell-mass maintenance and may play a very important role in the β -cell-mass hyperplasia associated with insulin-resistance states. At this stage, the relative expression of IRA *vs.* IRB within the β cells may play an essential role in the regulation of pancreatic β -cell proliferation. A better knowledge of the molecular mechanisms involved in the β -cell plasticity is needed to understand its role in type 2 diabetes progression.

Acknowledgments

We thank Silvia Fernández and Gema García for their technical assistance, P. P. Pandolfi (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) for providing the phospho-TSC2 Ser⁶⁶⁴ antibody used for Western blot, and C. R. Kahn (Joslin Diabetes Center, Boston, MA) for the generous gift of the plasmids encoding IRA and IRB.

Address all correspondence and requests for reprints to: Manuel Benito, Ph.D., Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain. E-mail: benito@farm.ucm.es.

This work was supported by Spanish Ministry of Science and Innovation Grants SAF2005/00014, SAF2007/60058, and SAF2008/00031. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is an Instituto de Salud Carlos III project. A.B. acknowledges a Formación de Profesorado Universitario grant from the Spanish Ministry of Education.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Sorenson RL, Brelje TC 1997 Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: β -cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29:301–307
2. Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky KS 1998 Role of apoptosis in failure of β -cell mass compensation for insulin resistance and β -cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47:358–364
3. Muoio DM, Newgard CB 2008 Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:193–205
4. Brüning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR 1997 Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88:561–572
5. Ueki K, Okada T, Hu J, Liew CW, Assmann A, Dahlgren GM, Peters JL, Shackman JG, Zhang M, Artner I, Satin LS, Stein R, Holzberger M, Kennedy RT, Kahn CR, Kulkarni RN 2006 Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic β cells causes overt diabetes. *Nat Genet* 38:583–588
6. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF 1998 Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900–904
7. Bernal-Mizrachi E, Wen W, Stahlhut S, Welling CM, Permutt MA 2001 Islet β cell expression of constitutively active Akt1/PKB α induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J Clin Invest* 108:1631–1638
8. Pende M, Kozma SC, Jaquet M, Oorschot V, Burcelin R, Le Marchand-Brustel Y, Klumperman J, Thorens B, Thomas G 2000 Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished β -cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 408:994–997
9. Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K, Hara A, Toyoda Y, Miwa I, Aizawa S, Tsutsumi S, Tsubamoto Y, Hashimoto S, Eto K, Nakamura A, Noda M, Tobe K, Aburatani H, Nagai R, Kadowaki T 2007 Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory β cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117:246–257
10. Frödin M, Sekine N, Roche E, Filloux C, Prentki M, Wollheim CB, Van Obberghen E 1995 Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting β -cell line, INS-1. *J Biol Chem* 270:7882–7889
11. Briaud I, Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, Rhodes CJ 2003 Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic β -cells. *Diabetes* 52:974–983
12. Guillen C, Navarro P, Robledo M, Valverde AM, Benito M 2006 Differential mitogenic signaling in insulin receptor-deficient fetal pancreatic β -cells. *Endocrinology* 147:1959–1968
13. Rutter GA, Leclerc I 2009 The AMP-regulated kinase family: enigmatic targets for diabetes therapy. *Mol Cell Endocrinol* 297:41–49
14. Huang J, Manning BD 2008 The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 412:179–190
15. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL 2002 TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4:648–657
16. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP 2005 Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121:179–193
17. Inoki K, Zhu T, Guan KL 2003 TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115:577–590
18. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ 2008 AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30:214–226
19. Shah OJ, Wang Z, Hunter T 2004 Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol* 14:1650–1656
20. Briaud I, Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig JF, Lawrence JC,

- Rhodes CJ 2005 Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by a mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in β -cells. *J Biol Chem* 280:2282–2293
21. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR, Gout I, Downes CP, Lamb RF 2004 The TSC1–2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* 166:213–223
 22. Mori H, Inoki K, Opland D, Muenzberg H, Villanueva EC, Faouzi M, Ikenoue T, Kwiatkowski D, Macdougald OA, Myers Jr MG, Guan KL 2009 Critical roles for the TSC-mTOR pathway in β -cell function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1013–E1022
 23. Rachdi L, Balcazar N, Osorio-Duque F, Elghazi L, Weiss A, Gould A, Chang-Chen KJ, Gambello MJ, Bernal-Mizrachi E 2008 Disruption of Tsc2 in pancreatic β cells induces β cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:9250–9255
 24. Shigeyama Y, Kobayashi T, Kido Y, Hashimoto N, Asahara S, Matsuda T, Takeda A, Inoue T, Shibutani Y, Koyanagi M, Uchida T, Inoue M, Hino O, Kasuga M, Noda T 2008 Biphasic response of pancreatic β -cell mass to ablation of tuberous sclerosis complex 2 in mice. *Mol Cell Biol* 28:2971–2979
 25. Hamada S, Hara K, Hamada T, Yasuda H, Moriyama H, Nakayama R, Nagata M, Yokono K 2009 Upregulation of the mTOR complex 1 pathway by Rheb in pancreatic β cells leads to increased β cell mass and prevention of hyperglycemia. *Diabetes* 58:1321–1332
 26. Seino S, Bell GI 1989 Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 159:312–316
 27. Yamaguchi Y, Flier JS, Benecke H, Ransil BJ, Moller DE 1993 Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology* 132:1132–1138
 28. Whittaker J, Sørensen H, Gadsbøll VL, Hinrichsen J 2002 Comparison of the functional insulin binding epitopes of the A and B isoforms of the insulin receptor. *J Biol Chem* 277:47380–47384
 29. McClain DA 1991 Different ligand affinities of the two human insulin receptor splice variants are reflected in parallel changes in sensitivity for insulin action. *Mol Endocrinol* 5:734–739
 30. Denley A, Wallace JC, Cosgrove LJ, Forbes BE 2003 The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Horm Metab Res* 35:778–785
 31. Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR, de Vargas LM, Berggren PO 2001 Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic β cells. *Mol Cell* 7:559–570
 32. Hribal ML, Perego L, Lovari S, Andreozzi F, Menghini R, Perego C, Finzi G, Usellini L, Placidi C, Capella C, Guzzi V, Lauro D, Bertuzzi F, Davalli A, Pozza G, Pontiroli A, Federici M, Lauro R, Brunetti A, Folli F, Sesti G 2003 Chronic hyperglycemia impairs insulin secretion by affecting insulin receptor expression, splicing, and signaling in RIN β cell line and human islets of Langerhans. *FASEB J* 17:1340–1342
 33. Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M 2009 β -Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes* 58:820–828
 34. Nevado C, Benito M, Valverde AM 2008 Role of insulin receptor and balance in insulin receptor isoforms A and B in regulation of apoptosis in simian virus 40-immortalized neonatal hepatocytes. *Mol Biol Cell* 19:1185–1198
 35. Fabregat I, Lorenzo M, Benito M 1989 Precocious induction of malic enzyme by nutritional and hormonal factors in rat foetal hepatocyte primary cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 161:1028–1034
 36. Guillen C, Bartolomé A, Nevado C, Benito M 2008 Biphasic effect of insulin on β cell apoptosis depending on glucose deprivation. *FEBS Lett* 582:3855–3860
 37. Ma L, Teruya-Feldstein J, Bonner P, Bernardi R, Franz DN, Witte D, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP 2007 Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer. *Cancer Res* 67:7106–7112
 38. Towler MC, Hardie DG 2007 AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 100:328–341
 39. Corradetti MN, Inoki K, Guan KL 2005 The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem* 280:9769–9772
 40. Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD 2008 The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol* 28:4104–4115
 41. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin Jr WG 2004 Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 18:2893–2904
 42. Desai NM, Goss JA, Deng S, Wolf BA, Markmann E, Palanjian M, Shock AP, Feliciano S, Brunicardi FC, Barker CF, Naji A, Markmann JF 2003 Elevated portal vein drug levels of sirolimus and tacrolimus in islet transplant recipients: local immunosuppression or islet toxicity? *Transplantation* 76:1623–1625
 43. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC 2002 Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 10:151–162
 44. Uhles S, Moede T, Leibiger B, Berggren PO, Leibiger IB 2007 Selective gene activation by spatial segregation of insulin receptor B signaling. *FASEB J* 21:1609–1621
 45. Assmann A, Ueki K, Winnay JN, Kadowaki T, Kulkarni RN 2009 Glucose effects on β -cell growth and survival require activation of insulin receptors and insulin receptor substrate-2. *Mol Cell Biol* 29:3219–3228
 46. Salt IP, Johnson G, Ashcroft SJ, Hardie DG 1998 AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic β cells, and may regulate insulin release. *Biochem J* 335:533–539
 47. Kefas BA, Heimberg H, Vaulont S, Meisse D, Hue L, Pipeleers D, Van de Casteele M 2003 AICA-riboside induces apoptosis of pancreatic β cells through stimulation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 46:250–254
 48. Richards SK, Parton LE, Leclerc I, Rutter GA, Smith RM 2005 Over-expression of AMP-activated protein kinase impairs pancreatic β -cell function in vivo. *J Endocrinol* 187:225–235
 49. Zhang HH, Huang J, Düvel K, Boback B, Wu S, Squillace RM, Wu CL, Manning BD 2009 Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS ONE* 4:e6189
 50. Fraenkel M, Ketzinel-Gilad M, Ariav Y, Pappo O, Karaca M, Castel J, Berthault MF, Magnan C, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G 2008 mTOR inhibition by rapamycin prevents β -cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* 57:945–957
 51. Zahr E, Molano RD, Pileggi A, Ichii H, Jose SS, Bocca N, An W, Gonzalez-Quintana J, Fraker C, Ricordi C, Inverardi L 2007 Rapamycin impairs in vivo proliferation of islet β -cells. *Transplantation* 84:1576–1583
 52. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP 2008 Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 118:3065–3074
 53. Shah OJ, Hunter T 2005 Tuberous sclerosis and insulin resistance. Unlikely bedfellows reveal a TORrid affair. *Cell Cycle* 4:46–51

Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic β cell death

Alberto Bartolome,^{1,2} Carlos Guillen^{1,2,*} and Manuel Benito^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular; Facultad de Farmacia; Universidad Complutense; Madrid, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM); Barcelona, Spain

Keywords: pancreatic beta cells, insulin secretion deficiency, endoplasmic reticulum stress, apoptosis, autophagy, rapamycin

Abbreviations: ACTB, actin beta; BAK1, BCL2-antagonist/killer 1; BAX, BCL2-associated X protein; BCL2L1, BCL2-like 1; DDIT3, DNA-damage inducible transcript 3; ER, endoplasmic reticulum; ERN1, ER to nucleus signaling 1; HSPA5, heat shock protein 5; MAPK8/9, mitogen-activated protein kinase 8/9; LC3B, microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta; MTORC1, mechanistic target of rapamycin complex 1; *Pdx1*, pancreatic and duodenal homeobox 1; PI, propidium iodide; EIF2AK3, eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3; RAB3A, ras-related protein Rab-3; RHEB, Ras homolog enriched in brain; RPS6, ribosomal protein S6; RPS6KB1, ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1; shRNA, short-hairpin RNA; TSC, tuberous sclerosis complex; UPR, unfolded protein response; XBP1, x-box binding protein 1

There is a growing evidence of the role of autophagy in pancreatic β cell homeostasis. During development of type 2 diabetes, β cells are required to supply the increased demand of insulin. In such a stage, β cells have to address high ER stress conditions that could lead to abnormal insulin secretion, and ultimately, β cell death and overt diabetes. In this study, we used insulin secretion-deficient β cells derived from fetal mice. These cells present an increased accumulation of polyubiquitinated protein aggregates and LC3B-positive puncta, when compared with insulinoma-derived β cell lines. We found that insulin secretion deficiency renders these cells hypersensitive to endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated cell death. Chemical or shRNA-mediated inhibition of autophagy increased β cell death under ER stress. On the other hand, rapamycin treatment increased both autophagy and cell survival under ER stress. Insulin secretion-deficient β cells showed a marked reduction of the antiapoptotic protein BCL2, together with increased BAX expression and ERN1 hyperactivation upon ER stress induction. These results showed how insulin secretion deficiency in β cells may be contributing to ER stress-mediated cell death, and in this regard, we showed how the autophagic response plays a prosurvival role.

Introduction

β cells are a highly specialized cell type for the production and secretion of insulin. Its endoplasmic reticulum (ER) has a high capacity of protein synthesis and folding, which in turn makes them extremely prone to misfolded protein accumulation and ER stress when biosynthetic needs are chronically increased.¹ The natural history of type 2 diabetes includes insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia, but only when the β cell mass fails to maintain insulin levels, hyperglycemia and complications occur.² During the prediabetic stage, the β cell mass needs to cope with the increased demand of insulin and the molecular environment that is causing insulin resistance, thus the ER is overwhelmed, and ER stress,³ incomplete processing of insulin,⁴ or abnormalities in insulin secretion,^{5,6} may occur. The unfolded protein response (UPR) plays a critical role in order to counterbalance protein synthesis, folding and degradation, thus relieving cellular stress. The UPR consist of three signaling cascades initiated by three ER-resident proteins: ER to nucleus signaling

1 (ERN1/Ire1 α), activating transcription factor-6 (ATF6) and eukaryotic translation initiation factor 2 α kinase 3 (EIF2AK3/PERK). UPR signaling is essential to preserve ER homeostasis in β cells.⁷⁻⁹ However, prolonged UPR signaling can lead to the expression of the proapoptotic transcription factor DNA-damage inducible transcript 3 (DDIT3, also known as CHOP) and β cell apoptosis.¹⁰ Some events, such as oxidative stress or expression of mutant or misfolded proteins, produce the accumulation of protein aggregates in the ER,^{11,12} chronically increasing UPR and triggering apoptosis. Previous reports from yeast show the direct link between ER stress and macroautophagy,¹³ which is a prosurvival effector in mouse embryo fibroblasts after ER stress induction.¹⁴ Macroautophagy (hereafter called 'autophagy') is a catabolic process involving the degradation of cytoplasmic material, playing an important role in cellular homeostasis by the elimination of damaged organelle and aggregated proteins. Autophagy is an important response mechanism under different kinds of cellular stress,¹⁵ generally promoting cell survival and counteracting apoptotic cell death.¹⁶ Conditional knockout of

*Correspondence to: Carlos Guillen; Email: cguillen@farm.ucm.es
Submitted: 05/22/12; Revised: 07/31/12; Accepted: 08/27/12
<http://dx.doi.org/10.4161/auto.21994>

Atg7 in β cells shows the importance of autophagy in vivo for β cell homeostasis and its possible implication in diabetes pathogenesis.¹⁷⁻¹⁹ Autophagy plays a protective role in β cell cultures under high glucose or after palmitate-induced cell death,^{20,21} and is also involved in the clearance of polyubiquitin protein aggregates formed in pancreatic islets after oxidative stress.¹¹ A long time before the molecular mechanisms of autophagy were described, increased lysosomal degradation was found on islets from rodents treated with diazoxide, an agent capable of blocking insulin secretion.²² More recently, increased autophagy has been found in insulin secretion-deficient islets from *Rab3a*^{-/-} mice,²³ again indicating its possible involvement in the regulation of insulin content. However, little is known from the role that autophagy may be playing in the fate of β cells under ER stress or impaired insulin secretion conditions.

Here, we explored the role of autophagy under ER stress in pancreatic β cells caused either by chemical ER stressors and accumulation of protein aggregates due to secretory incapacity. For this purpose, we used an insulin secretion deficient β cell line generated from fetal islets. These cells could resemble the defective secretion situation observed in the late prediabetic stage, and were a useful tool to study β cell death under ER stress conditions. We propose that a failure in the appropriate folding or secretion of insulin by β cells may be promoting ER stress-mediated cell death, and we discuss the possible role of autophagy as a protective strategy for cell survival under these conditions.

Results

Generation of an insulin secretion-deficient β cell line. To explore the role of autophagy under insulin secretion deficiency, we generated a β cell line from islets isolated on 17-d mouse fetuses. Fetal islets are insulin secretion-deficient due to immaturity of the complex metabolic machinery required for secretion in β cells,²⁴⁻²⁶ although we and others have previously shown that β cells isolated from fetal islets, and being unable to secrete insulin, still express insulin and other specific β cell markers (Fig. S1A and S1B).²⁷

High basal autophagy in insulin secretion-deficient β cells. Insulin synthesis and secretion are two independent processes. It has been previously shown that insulin secretion deficiency increases autophagic flux, as seen in *Rab3a*-deficient mice,²³ or in fatty acid-exposed human β cells.²⁸ We found basal autophagy highly increased in fetal β cell lines, when compared with insulinoma-derived cell lines from adult animals (INS-1E or MIN6). Blocking the autophagic flux with chloroquine, a lysosomotropic agent which blocks autophagolysosome formation and protein degradation by raising lysosomal pH, further increased the autophagic marker LC3B-II. This observation indicated that basal differences observed were not due to inefficient autophagosomal degradation of LC3B-II in fetal β cells (Fig. 1A). Immunofluorescence assays clearly showed a much higher rate of cells with LC3B puncta in fetal β cells. Rapamycin treatment, as positive control, efficiently increased LC3B puncta in all cell lines (Fig. 1B and D). Electron micrographs also revealed a huge content of autophagic vacuoles in fetal β cell lines (Fig. 1C, 1-5, and E), which were scarce in control MIN6 cells (Fig. 1C, 6, and E). These autophagic vacuoles

were recognized as double-membrane structures with contents ranging from granular cytoplasm, degenerated organelles, endoplasmic reticulum or protein aggregates. Presence of amphisomes by fusion of autophagosomes with multivesicular bodies was also observed (Fig. 1C, 4-5). There were no significant differences between the average diameter of autophagic vacuoles found in fetal β cells or MIN6 (Fig. 1E).

Presence of protein aggregates in secretion-deficient β cells. The presence of poly-ubiquitinated protein aggregates was assessed by immunofluorescence with FK2 antibody, which recognizes ubiquitinated proteins but no free ubiquitin. FK2-positive puncta were abundant in fetal β cells, but not found in control cells (INS-1E, MIN6) (Fig. 2A). Autophagy was found to play a major role in protein aggregate clearance. LC3B puncta positively colocalized with FK2 staining, rapamycin treatment further increased LC3B puncta while decreasing ubiquitin-protein signal in fetal β cells; whereas chloroquine treatment blocked the ubiquitin-protein clearance observed with rapamycin alone (Fig. 2B), as was also confirmed by immunoblotting (Fig. S2A). This indicated that efficient autophagy was needed for rapamycin-mediated increase in ubiquitinated protein clearance. Comparison between fetal β cell and insulinoma-derived cell lines was also performed by immunoblotting, ubiquitinated-protein pattern was higher in fetal β cells in both soluble and insoluble fractions (Fig. 2C). In addition, electron micrographs clearly showed the presence of these protein aggregates, sometimes found inside autophagic vacuoles (Fig. 2D, 1-3; Fig. S2B), as well as ER dilation, characteristic of ER stress (Fig. 2D, 2 and 4).

Higher sensitivity to ER stress-induced cell death in secretion-deficient β cells. When submitted to chemical ER stressors such as thapsigargin (which blocks ER Ca²⁺ ATPase) or MG132 (proteasome inhibitor), fetal β cells showed greater sensitivity to ER stress-induced cell death (Fig. 3A-C). Stimulation with low doses of thapsigargin (10 nM), still caused unresolvable ER stress and cell death in fetal β cells. Analysis of the UPR showed phosphorylation on EIF2A Ser51 as a response to thapsigargin-induced ER stress. However, fetal β cells already showed basal stimulation of EIF2A, and were not able to increase it to the extent observed in INS-1E. On the other hand, ERN1 Ser724 phosphorylation was greatly upregulated in fetal β cells upon thapsigargin stimulation, as well as *Xbp1* mRNA splicing. In contrast, ERN1 phosphorylation was not detected on INS-1E cells, and *Xbp1* mRNA splicing was highly delayed compared with fetal β cells. Although mitogen-activated protein kinase (MAPK8/9) phosphorylation was increased in both cell lines, a longer induction was observed in fetal β cells, probably as a result of the higher ERN1 activity found in this cell line. The ER chaperone HSPA5 (also known as BiP/Grp78), a classic marker of ER stress, was highly induced only in fetal β cells. Reduced expression of BCL2, as well as an increased DDIT3 expression or the cleaved form of CASP/caspase-3 were also observed on fetal β cells after ER stress stimulation (Fig. 3A). Dose-response survival assays showed much higher sensitivity of fetal β cells to ER stressors (Fig. 3B). In addition, increased apoptosis in fetal β cells under low doses of thapsigargin or MG132, was confirmed by flow cytometry analysis of annexin-V/PI staining of cells (Fig. 3C), as well as the

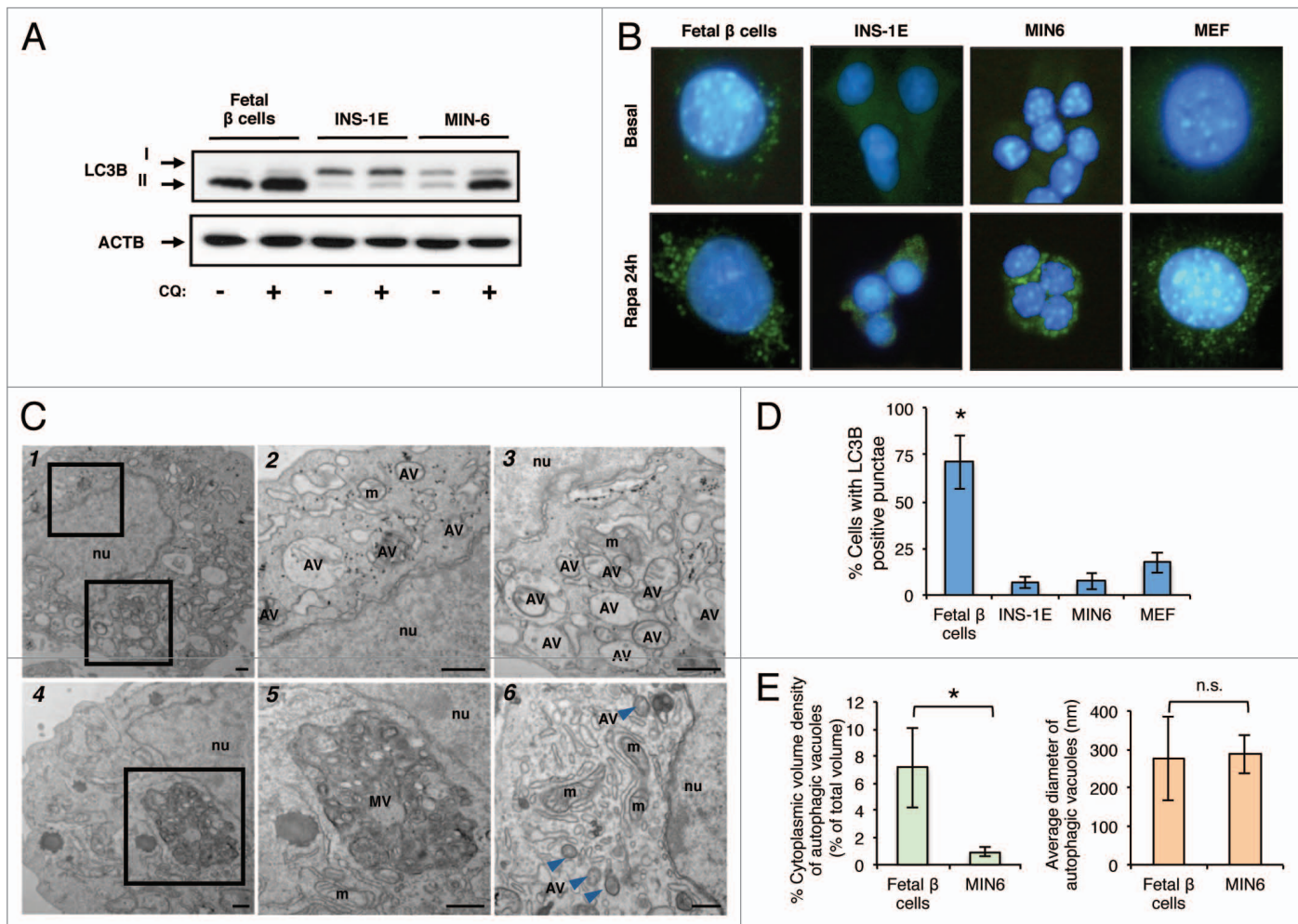


Figure 1. Autophagy on insulin secretion-deficient β cells. (A) Fetal β cells, INS-1E and MIN6 cells were assayed in the presence or absence of chloroquine (CQ, 10 μ M, 24 h) for basal conversion of LC3B-I to -II by immunoblot. (B) Immunofluorescence images of cells treated or untreated with rapamycin (Rapa, 40 nM, 24 h). Puncta is representative of LC3B presence in autophagosomal structures. Nuclei were visualized by DAPI staining and UV fluorescence. (C) Electron micrographs of fetal β cells (1–5), and MIN6 (6). Sections from (1) were amplified in (2–3), and amplified section from (4) is shown in (5). Bars represent 500 nm. MIN6 autophagic vacuoles are highlighted with blue arrowheads. AV, autophagic vacuole; nu, nucleus; m, mitochondria; MV, multivesicular body. (D) Bars represent the proportion of cells showing puncta under basal conditions from the experiment shown in (B), expressed as mean \pm s.d. (n = 3), *p < 0.001 compared with each other cell line. (E) Quantification of cytoplasmic volume occupied by autophagosomes (left graph), and mean diameter of autophagosomes (right graph), *p < 0.001.

presence of a hypodiploid DNA peak in cell cycle analysis by flow cytometry (Fig. 3D).

Role of BCL2 and other BCL2 family members in ER stress-induced autophagy. The level of BCL2 expression in fetal β cells was highly decreased when compared with INS-1E cells, both under basal conditions and after thapsigargin stimulation. As shown before, LC3B conversion was observed in both cell lines but DDIT3 was only induced in fetal β cells (Fig. 4A). BCL2 exerts both antiapoptotic and anti-autophagic actions, inhibiting autophagy through direct interaction with BECN1 in the ER.²⁹ Immunoprecipitation assays showed the higher lability of BCL2 and BECN1 interaction in insulin secretion-deficient cells (Fig. 4B). Moreover, ER fractionation revealed low levels of BCL2 on ER in fetal β cells (Fig. 4C). On the other hand, proapoptotic BCL2 family members BAX and BAK1 positively modulate ERN1 activity through direct interaction in the ER.³⁰ Increased

levels of BAX were found in fetal β cells on basal conditions or after thapsigargin stimulus (Fig. 4A). BAX protein levels in the ER were also higher when compared with INS-1E cells (Fig. 4C). This might explain higher ERN1 phosphorylation and RNase activity toward *Xbp1* as showed earlier.

MTORC1 role in autophagy and cell fate after acute ER stress. Rapamycin, a specific inhibitor of MTORC1 is a potent inducer of autophagy.³¹ To investigate the role of MTORC1 in ER stressed β cells, fetal β cells were submitted to 40 nM rapamycin pretreatment, and were subsequently stimulated with low doses of thapsigargin (10 nM). Rapamycin partly reverted the effect of thapsigargin on cell viability (Fig. 5A–D). Autophagy induction as measured by LC3B lipidation, was inversely related to MTORC1 activity taken as phosphorylation of RPS6KB1 Thr389 (Fig. 5A). Rapamycin treatment alone was able to reduce basal levels of DDIT3 and HSPA5 observed on these cells.

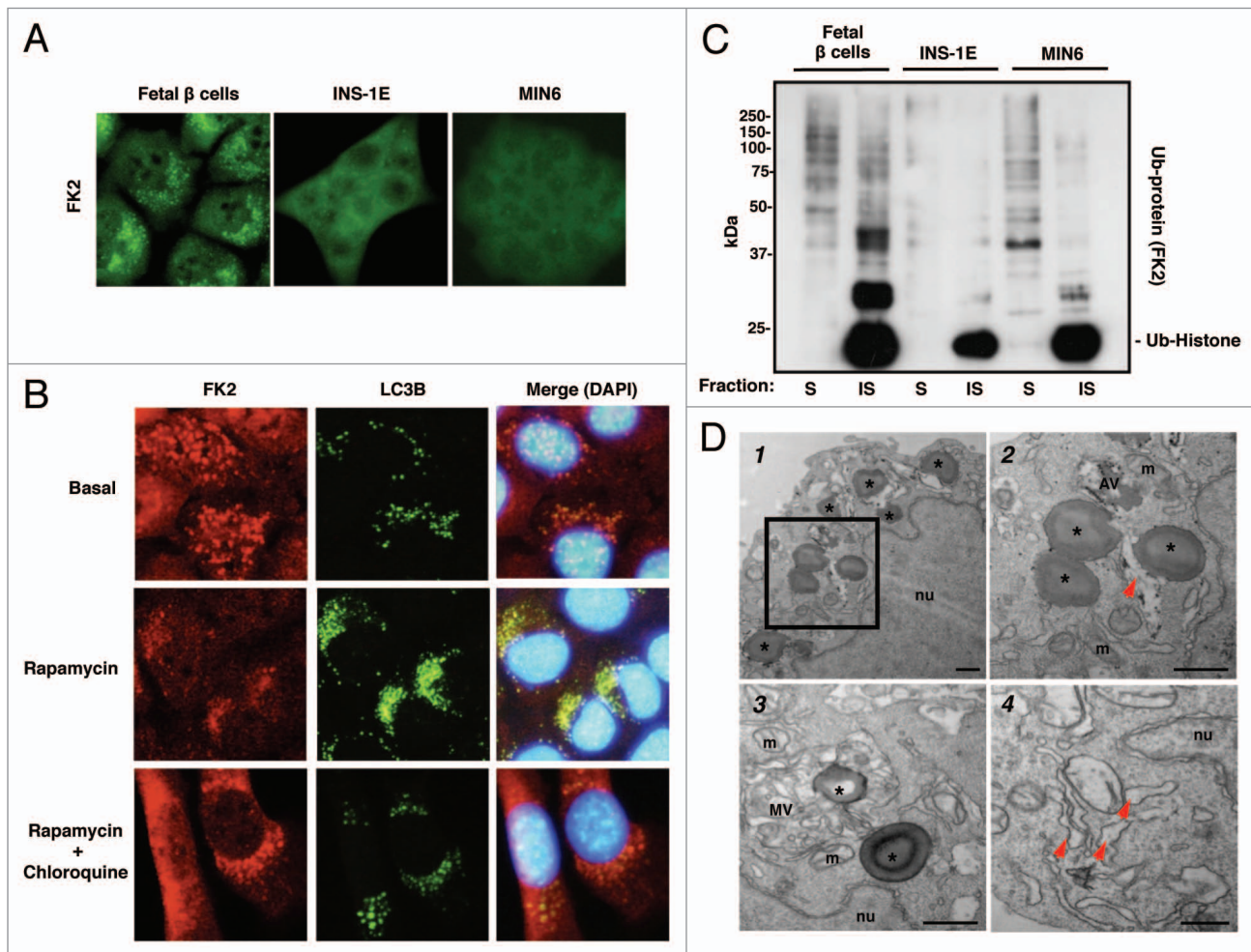


Figure 2. Protein aggregates in insulin secretion-deficient β cells. (A) Immunofluorescence images of fetal β cells, INS-1E and MIN6 cells with, ubiquitin-conjugated protein aggregates were visualized using FK2 mAb. (B) Immunofluorescence images of fetal β cells, under rapamycin treatment (40 nM, 24 h) alone or in combination with chloroquine (10 μ M, 24 h). Images show signal from FK2 mAb (red puncta), LC3B (green puncta), and nuclei (blue). (C) Soluble or insoluble protein fractions were subjected to 12% SDS-PAGE, and analyzed with FK2 mAb. (D) Electron micrographs from fetal β cells, amplified region from (1) is shown in (2). Bars represent 500 nm. Protein aggregates are marked with (*), arrows indicate dilated ER. AV, autophagic vacuole; nu, nucleus; m, mitochondria; MV, multivacuolar body.

Moreover, rapamycin pretreatment previous to acute ER stress induction potentiated the recovery of antiapoptotic proteins such as BCL2 or BCL2L1, together with reduction of CASP3 cleavage (Fig. 5A and B), and increased cell survival (Fig. 5C). Flow cytometry analysis of annexin-V/PI staining also revealed the protective action of rapamycin, as it was able to almost fully revert annexin-V staining of cells after 15 h treatment with low doses of thapsigargin or MG132 (Fig. 5D). However, rapamycin treatment for more than 24 h was toxic for β cells and no longer protected from ER stress induced cell death (data not shown). To further examine MTORC1 effects on β cell fate after ER stress, we took the opposite approach. In order to increase MTORC1 activity, *Tsc2* knockdown or transient transfection with constitutively active *Rheb* (Q64L) was performed. RHEB-GTP was able to bind to MTORC1, and somehow activate it. On the other hand, TSC2 displayed GTPase activating protein (GAP) activity toward RHEB, acting as brake of MTORC1. Transient expression of FLAG-tagged *Rheb*-Q64L impaired LC3B lipidation and

increased levels of cleaved CASP3 and HSPA5 after thapsigargin treatment (Fig. 6A), MTORC1 was not properly downregulated by thapsigargin stimulation, observed as phosphorylation of ribosomal protein S6 (RPS6), and autophagy was not induced to the same extent as RHEB-WT-expressing cells. Likewise, lentiviral-mediated knockdown of *Tsc2* rendered the cells more sensitive to ER stress mediated cell death, also impairing LC3B conversion and increasing HSPA5 and cleaved CASP3, and diminishing BCL2 after thapsigargin stimulation (Fig. 6B).

Autophagy protected from ER stress-mediated β cell death. After pretreatment of cells with chloroquine in order to inhibit a proper autophagic response, cells were submitted to different doses of thapsigargin. Autophagy inhibition alone increased HSPA5 levels along with DDIT3 expression. Upon thapsigargin stimulation, levels of DDIT3 or cleaved CASP3 were further increased, together with diminished antiapoptotic BCL2 (Fig. 7A). As autophagosomes cannot be properly processed in chloroquine-treated cells, LC3B-II accumulates in autophagosome

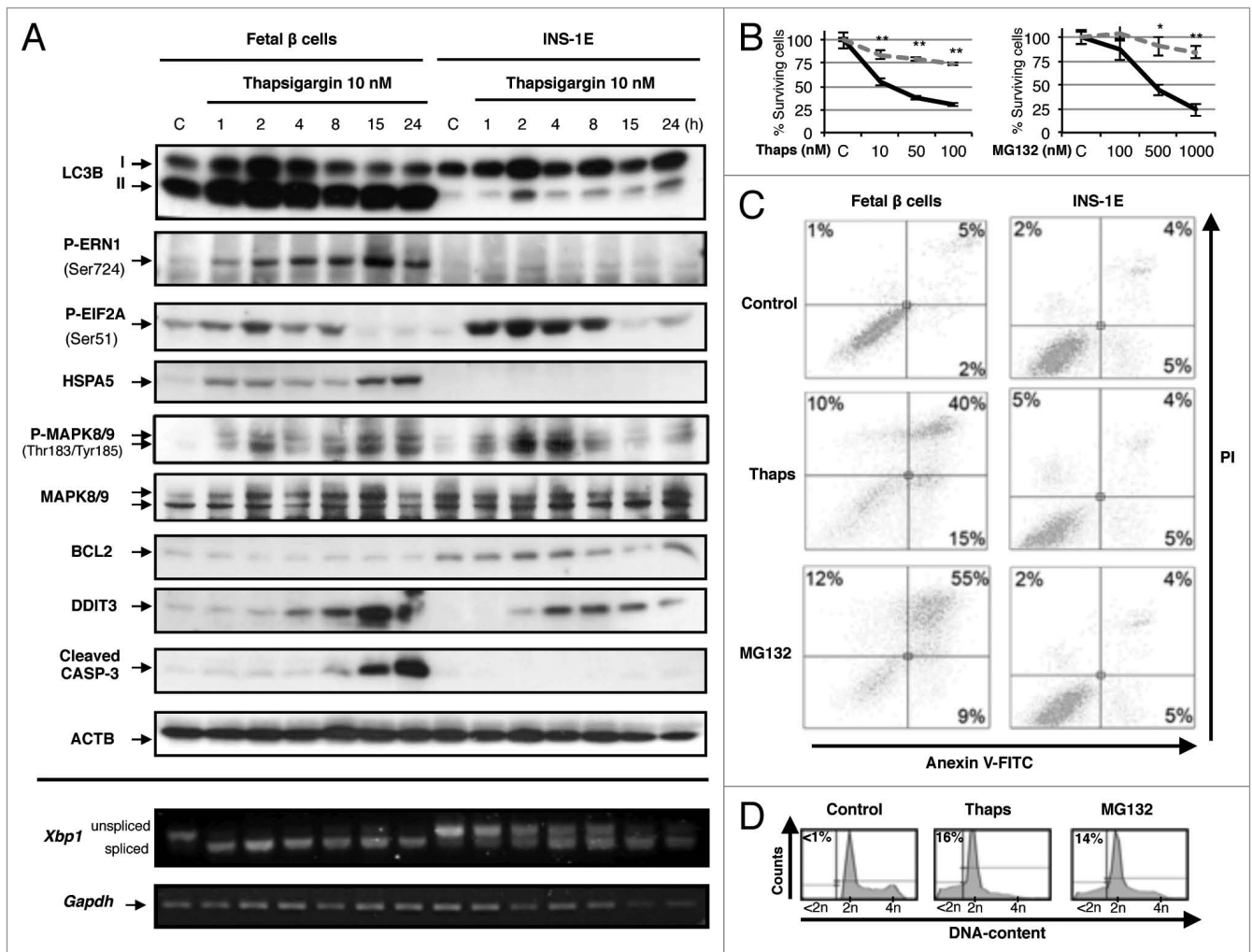


Figure 3. Differential UPR response and sensitivity to ER stress mediated cell death. (A) Representative immunoblots of fetal β cells and INS-1E stimulated with thapsigargin (10 nM) for the indicated times (upper part of the panel). Below, agarose gel images showing *Xbp1* cDNA (cDNA) amplified by RT-PCR. Unspliced (171 bp) or spliced (145 bp) forms of *Xbp1* are shown. (B) Cell survival assay by violet crystal staining, after 15 h of treatment with the designed doses of thapsigargin or MG132. Percentage of surviving fetal β cells (black line) and INS-1E (gray dashed line) is shown, expressed as mean \pm s.d., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (C) Fetal β cells or INS-1E were left untreated (control panels), or treated for 24 h with 10 nM thapsigargin (Thaps), or 100 nM MG132 and FITC-annexin V/propidium iodide (PI) staining were analyzed by flow cytometry. Dot-plots from a representative experiment are shown. (D) Fetal β cells from the experiment shown in (C) were fixed and DNA content was measured by PI staining and flow cytometry. Percentages of hypodiploid cells from representative histograms are shown.

membranes, therefore the increased LC3B-II levels under chloroquine treatment did not necessarily indicate increased efficient autophagy, but rather as the increased flux of autophagosomes not being properly processed. In a similar fashion, lentiviral-mediated interference of either *Atg5* or *Atg7* impaired LC3B lipidation and made the cells hypersensitive to thapsigargin mediated cell death, seen as increased cleaved CASP3 and HSPA5 expression (Fig. 7B). Furthermore, cell survival assays, and flow cytometry analysis of annexin-V/PI showed as well, the deleterious effect of autophagy inhibitors chloroquine or bafilomycin A₁ on cell fate after acute ER stress stimulation (Fig. 7C and D).

Discussion

In the present studies, we used a fetal β cell line as a model of insulin secretion deficiency due to immaturity of secretion

machinery of these cells, as described previously.²⁴⁻²⁶ We found increased autophagy in fetal β cells as a response to the accumulation of protein aggregates. Protein aggregates and their autophagic clearance have been previously observed in β cells from Zucker-diabetic fatty rats,¹¹ β cells from these animals have also been described as insulin secretion-deficient.^{32,33} Likewise, insulin secretion deficiency by either diazoxide treatment,²² or RAB3A deficiency,²³ was found to elicit an autophagic response.

A proper maintaining of β cell mass and function is essential to stop the progression to type 2 diabetes, β cell apoptosis is a critical contributing factor in the development of the disease.³² In this regard, chronic ER overload leading to ER stress and prolonged UPR may be leading to β cell apoptosis.^{1,10} Here we described a higher sensitivity to acute ER stress in secretion-deficient β cells, these cells already showed EIF2A phosphorylation

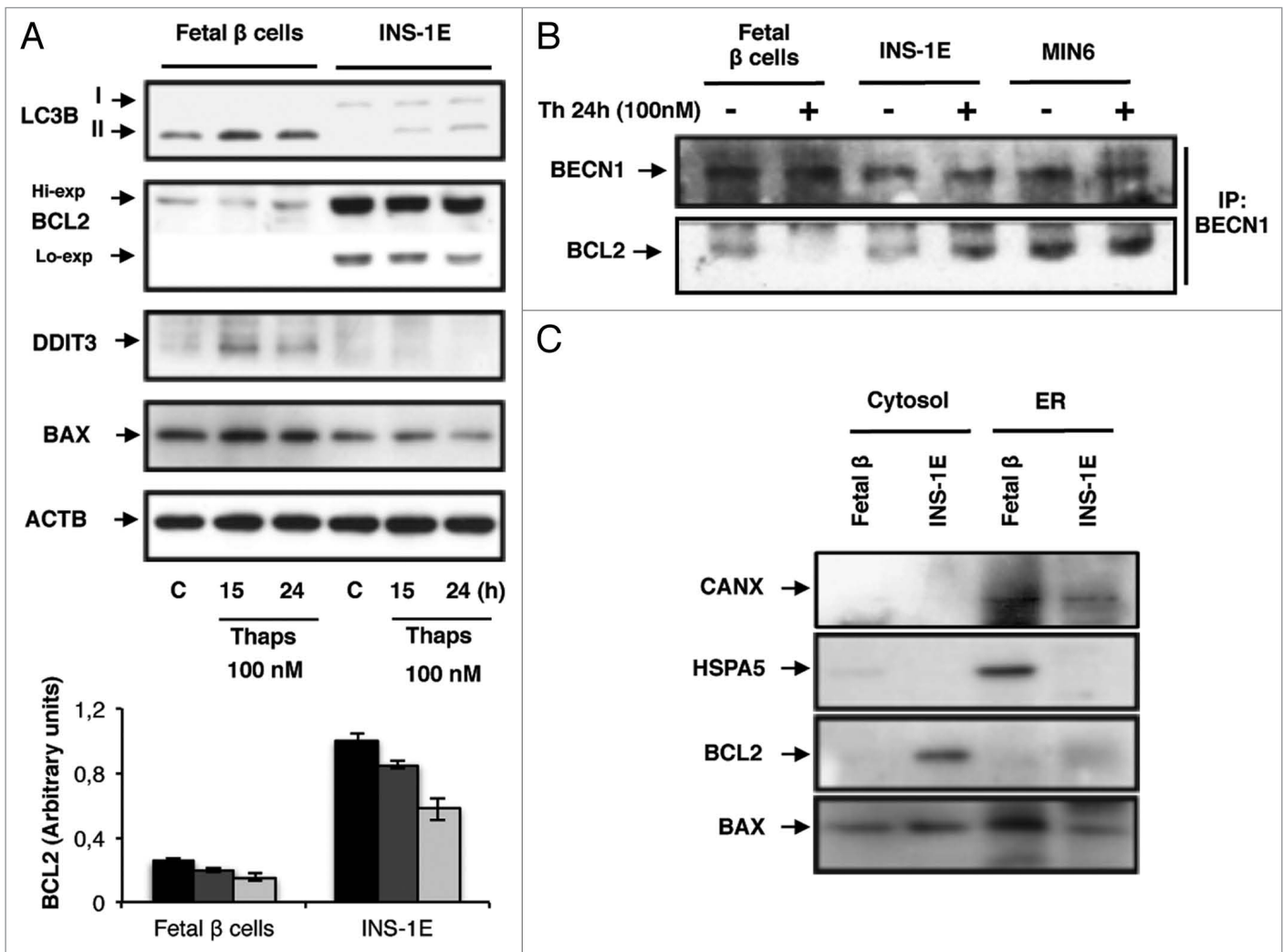


Figure 4. Role of BCL2 family proteins in ER stress-mediated autophagy. (A) Cells were submitted to thapsigargin 100 nM for 15 h or 24 h, representative immunoblots are shown. Below, densitometric analysis of Bcl-2 from immunoblots, differences between fetal β cells and INS-1E were significant on all time points, $p < 0.01$. (B) Protein extracts from control cells or submitted to thapsigargin 100 nM treatment were subjected to immunoprecipitation with anti-BECN1 antibody and western blot. (C) Cytosolic extracts or endoplasmic reticulum (ER)-enriched fraction were subjected to western blot. CANX represents calnexin used as ER fraction marker.

and higher basal HSPA5 and DDIT3 expression. Upon ER stress stimulation, even with low doses of ER stressors, they rapidly underwent ERN1 activation, *Xbp1* splicing and massive induction of HSPA5 and DDIT3, with DDIT3 induction being likely the explanation of the high level of observed β cell apoptosis.¹⁰ Huge differences were observed in BCL2 family protein expression between insulin-secreting and secretion-deficient β cells. BCL2 was highly reduced in secretion-deficient β cells, and its interaction with BECN1 was weaker, probably contributing to the much higher basal and induced autophagy found in these cells. Apart from being a classic antiapoptotic effector in the mitochondria, BCL2 function in the ER is also important, exerting its antiapoptotic action by its interaction with BECN1.²⁹ Mitochondrial BCL2 has also been recently described as an inhibitor of AMBRA1-induced autophagy.³⁴ We found lower BCL2 levels in total and ER enriched protein fractions, supporting the findings of higher autophagy on these cells. On the other

hand, proapoptotic BAX was found increased, as well its specific expression on the ER. This observation may explain the higher ERN1 activity found, as BAX is described as positive modulator of ERN1 in the ER.³⁰

Previous *in vivo* studies show the essential role of autophagy in β cells in the basal turnover of organelles and maintenance of function.^{17,18} Decreased expression of UPR genes and increased ER stress mediated β cell death has been recently observed in β cell *Atg7* conditional knockout mice.¹⁹ These authors also show increased thapsigargin-mediated cell death in isolated islets from β *Atg7* knockout mice.³⁵ Other reports also describe the positive effect that autophagy plays in β cells under different stress conditions such as exposure to fatty acids or hyperglycemia.^{20,21} Human islet amyloid polypeptide (IAPP) oligomerization alters β cell autophagy and rapamycin-induced autophagy enhancement is able to reduce IAPP-mediated β cell apoptosis.³⁶ However, other authors also describe a possible involvement

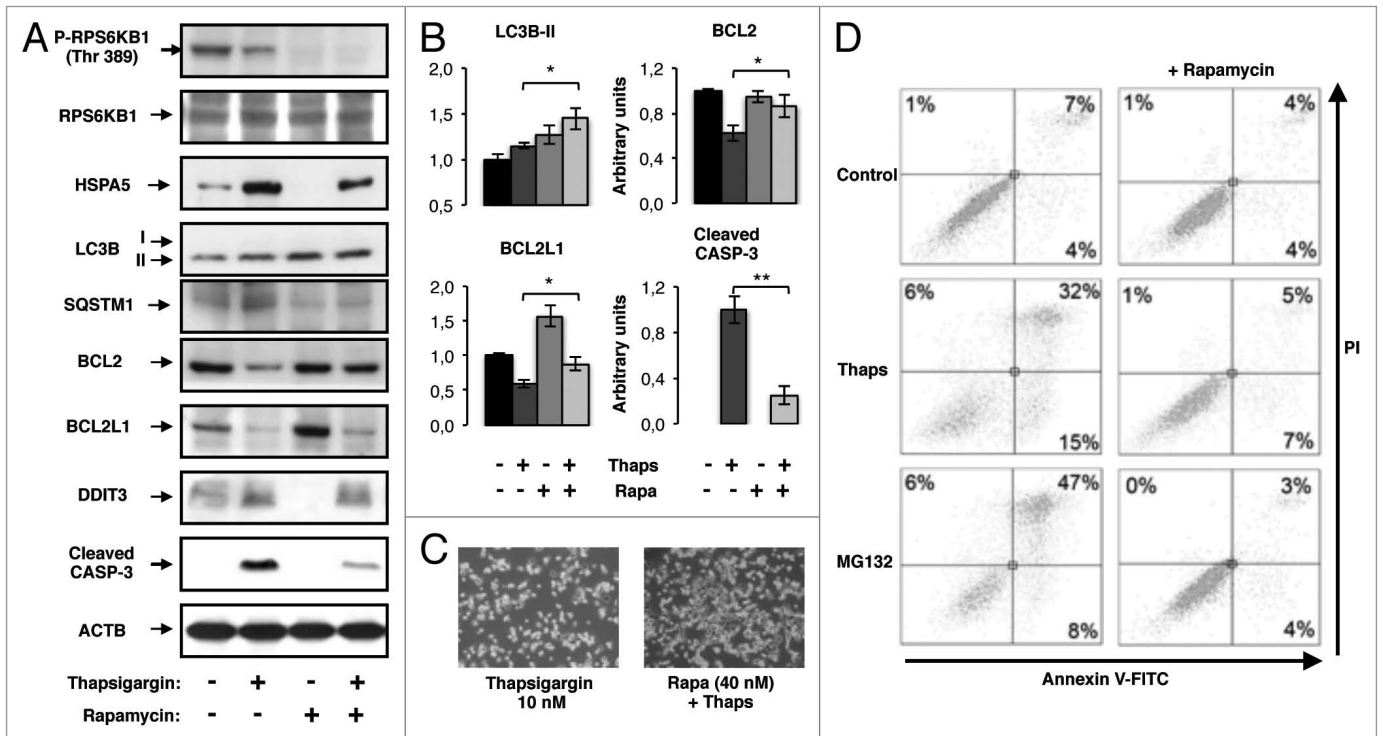


Figure 5. Rapamycin treatment protected from ER stress-induced cell death in fetal β cells. (A) Cells were left untreated or treated with rapamycin 40 nM for 24 h. Thapsigargin 10 nM treatment was undertaken during the last 15 h of the experiment. Representative immunoblots are shown (B) From the same experiment, densitometric quantification of LC3B-II, BCL2, BCL2L1 and cleaved caspase-3 blots are shown. Significant differences were found between thapsigargin and thapsigargin plus rapamycin treatments, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (C) Images from fetal β cells after thapsigargin treatment in the presence or absence of rapamycin (D) FITC-annexin V/PI staining from the described experiment was analyzed by flow cytometry. Dot-plots from a representative experiment are shown.

of autophagy in β cell death in conditions such as *Pdx1* deficiency.³⁷ Recently, it has been described that rapamycin-mediated stimulation of autophagy in healthy pancreatic islets from mice, impairs islet function and survival,³⁸ this probably indicates that hyperstimulation of autophagy in nonstressed β cells may have a negative effect.

Beyond the fact that insulin secretion deficient β cells showed increased autophagy, we aimed to investigate the role that it might be playing on β cell fate. MTORC1 is a major negative regulator of autophagy when nutrients and growth factors are present.³¹ Rapamycin-mediated MTORC1 inhibition was able to further increase the clearance of protein aggregates in insulin secretion deficient fetal β cells, increased autophagy was found to be the mechanism underlying ubiquitinated protein aggregate clearance. Furthermore, rapamycin treatment conferred resistance to ER stress-mediated cell death in these cells. Likewise, both TSC2 downregulation and constitutive active RHEB overexpression impaired the autophagic response to ER stress and increased cell death. However, autophagy modulation in β cells with MTORC1 inhibitors such as rapamycin must be interpreted with caution. MTORC1 positive activity is a key player in β cell mass increase,^{39,40} and chronic rapamycin treatment has proved to impair β cell mass and function.⁴¹ Previous reports suggest the positive role of autophagy on palmitate-induced cell death in INS-1E cells. Autophagic response induced by palmitate was partly reduced by the chemical

chaperone 4-PBA, which could be indicating that palmitate induces autophagy by increasing ER stress.²¹ Increased sensitivity to ER stress was also shown in *Tsc2* or *Tsc1* knockout fibroblasts.^{42,43}

Finally, we showed that either chemical inhibition of autophagy or *Atg5* or *Atg7* gene silencing increased β cell death after stimulation with ER stressors. Autophagy is a protective response to ER stress,^{13,14} also playing a prosurvival role in different disease models.⁴⁴⁻⁴⁶ However, implication of autophagy on cell survival after ER stress is not always clear through the literature. The outcome might be dependent on the cell line studied,^{13,14,47,48} and probably on the different doses or compounds used to produce ER stress. In our study, we concluded that autophagy is a protective response in β cells after ER stress. We used the lowest doses of thapsigargin and MG132 capable of elicit UPR signaling and induce cell death in less than 24 h, while other studies have used 10- to 100-fold higher doses of these compounds.

During progression to type 2 diabetes, β cells may function improperly. Abnormalities in insulin secretion have been reported, this along with parallel observations of protein aggregation and ER stress may lead to β cell death. We propose that defects on insulin secretion might be accelerating β cell loss by increasing ER stress sensitivity. In this scenario, we found autophagy to play a protective role. Autophagy modulation could be a possible strategy to consider at such a stage.

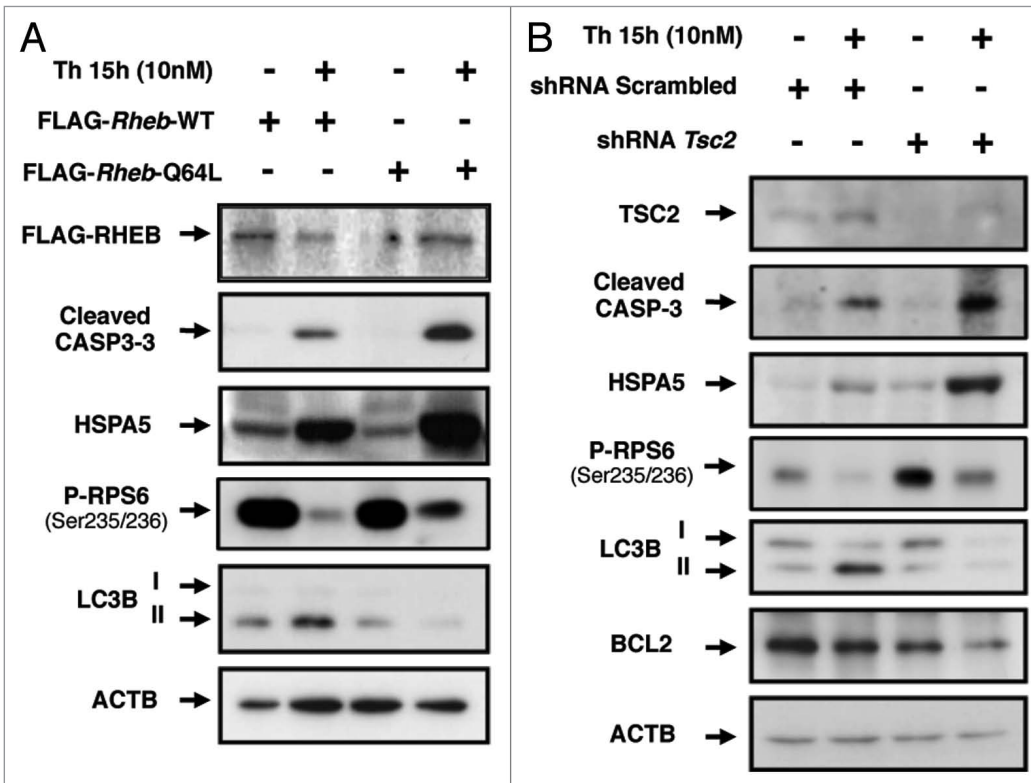


Figure 6. MTORC1 upregulation increased ER stress-mediated cell death on fetal β cells. (A) Fetal β cells were transiently transfected with a vector encoding FLAG-tagged wild-type *Rheb* (*Rheb*-WT), or constitutive active *Rheb* (*Rheb*-Q64L), and subjected or not to 10 nM thapsigargin treatment during 15 h. (B) 24 h after infection with scrambled or *Tsc2* shRNA-encoding lentivirus, cells were left untreated or treated for 15 h with 10 nM thapsigargin. Representative immunoblots are shown.

Materials and Methods

Antibodies and reagents. The following antibodies were obtained from Cell Signaling Biotechnology: LC3B, #4108; P-EIF2A, #3597; HSPA5, #3177; P-MAPK8/9, #9251; MAPK8/9, #9252; BCL2, #2876; cleaved CASP3/caspase-3, #9661; P-RPS6KB1, #9205; RPS6KB1, #9202. Other antibodies and reagents sources: Anti-mono and poly-ubiquitinated protein conjugates FK2 mAb (Enzo Life Sciences, BML-PW0150), DDIT3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7351), BCL2L1 (Becton Dickinson, 610209), P-ERN1 Ser-724 (Novus Biologicals, NB100-2323), P-RPS6 (Thermo Scientific, MA5-15140), calnexin (Millipore, MAB3126), FLAG and ACTB (Sigma, F1804 and A-5316 respectively), rapamycin (Merck, 553210), MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) (Enzo Life Sciences, BML-PII02-0005) and thapsigargin, chloroquine, and bafilomycin A₁ (Sigma, T9033, C6628, B1793, respectively).

Origin of pancreatic β cell lines and cell culture. Fetal pancreatic β cells were generated as described before.²⁷ Briefly, pancreatic tissue from 17-d mouse fetuses was collected under a magnifying glass and suspended on Hank's Balanced Salt Solution. Tissue was digested with collagenase P (Roche Applied

Science, 11213865001) and islets were recovered by gravity sedimentation, seeded and immortalized by retrovirus-mediated transfection of attenuated SV40 T-antigen. After 72 h, islets were handpicked under magnifying glass and seeded for selection with puromycin (1 μ g/ml) during 3 weeks. Then, several subclones were obtained and in order to select β cells between the islet population *Ins2*, and *IAPP* expression were assayed. Cell lines were used from passage 3 to 15 and cultured in 10% FBS DMEM.

Lentivirus production and cell infection. HEK293T cells were co-transfected using Lipofectamine2000 (Invitrogen, 11668-019) with lentiviral packaging plasmid pMD2.G (Addgene, 12259) and psPAX2 (Addgene, 12260), along with lentiviral vector pLKO.1 *neo* or *hygro* for shRNA production (Addgene, 13425 and 24150 respectively). Different sequences were cloned between EcoRI (Roche, 10-200-310-001) and *Age*I (New England Biolabs, R-0552S) sites of pLKO.1 lentiviral vector, following the recommendations from Addgene. Sequences of oligonucleotides used:

Tsc2-sense: 5'-CCG Gcc cga tat gtg ttc tcc aaC TCG Agt tgg aga aca cat atc ggg TTT TTG-3', *Tsc2*-antisense: 5'-AAT TCA AAA Acc cga tat gtg ttc tcc aaC TCG Agt tgg aga aca cat atc ggg-3',

Figure 7 (See opposite page). Autophagy inhibition increased ER stress-mediated fetal β cell death. (A) Fetal β cells were treated with different concentrations of thapsigargin for 15 h, in the presence or absence of 10 μ M chloroquine. Representative immunoblots from the experiment are shown. (B) 24 h after infection with scrambled, *Atg5* or *Atg7* shRNA-encoding lentivirus, cells were left untreated or treated for 15 h with 10 nM thapsigargin. Protein and RNA were collected for western blot (upper panels) and RT-PCR (lower panels), respectively. Below is shown the densitometric quantification of *Atg5* or *Atg7* mRNA levels. (C) Cells were left untreated (control), or treated for 24 h with autophagy inhibitors (10 μ M chloroquine, CQ; 2 nM bafilomycin A₁, BafA1) in the presence or absence of 10 nM thapsigargin (Thaps), or 100 nM MG132 during the last 15 h of the experiment. Bars represent surviving cells from cell survival assay by violet crystal staining, expressed as mean \pm s.d., *p < 0.05. (D) From the experiment described in (C), FITC-annexin V/PI staining was analyzed by flow cytometry. Dot-plots from a representative experiment are shown.

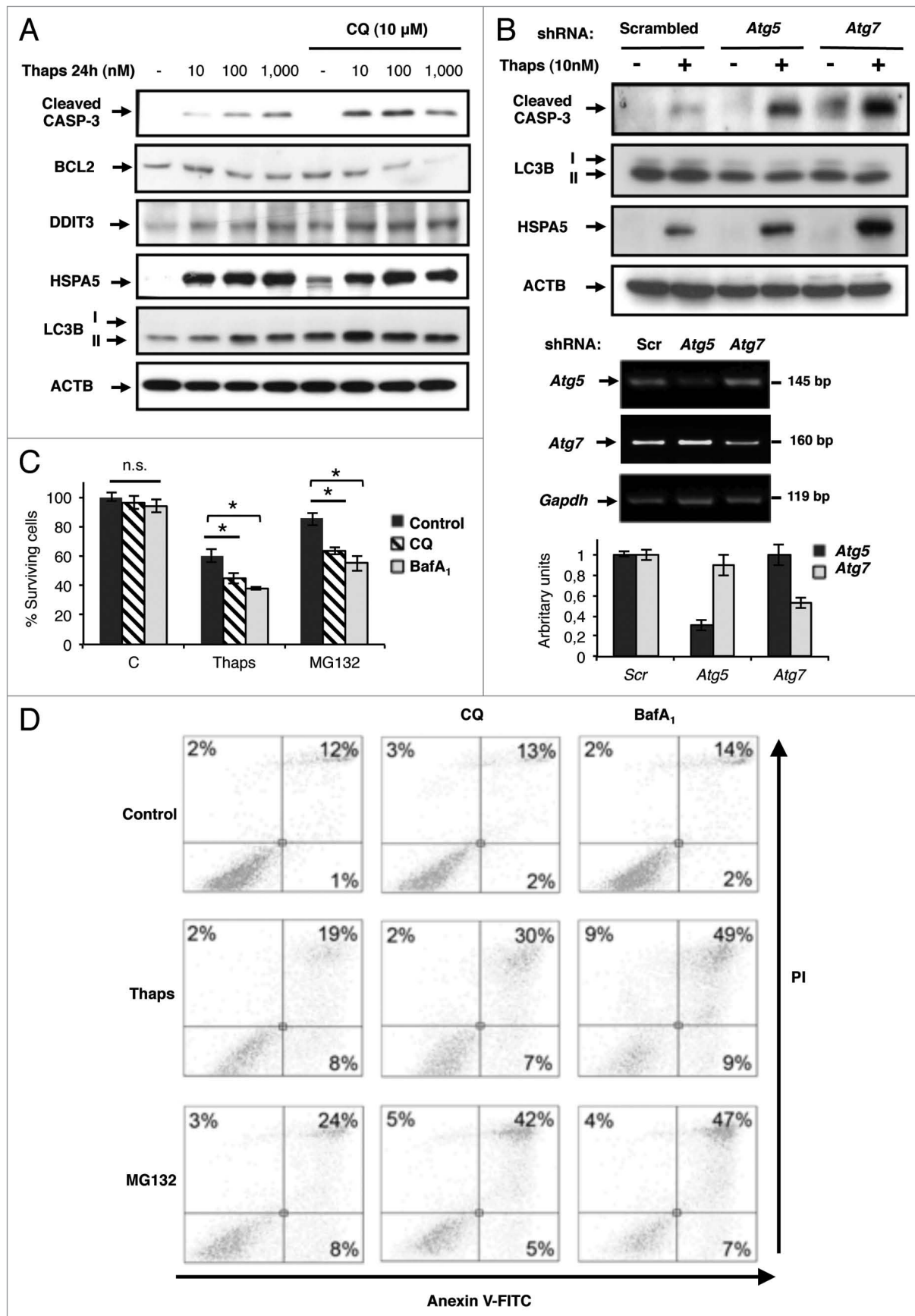


Figure 7. For figure legend, see page 8.

Atg5-sense: 5'-CCG Gcc ctg aaa tgg cat tat cca aCT CGA Gtt gga taa tgc cat ttc agg gTT TTTG-3',

Atg5-antisense: 5'-AAT TCA AAA Acc ctg aaa tgg cat tat cca aCT CGA Gtt gga taa tgc cat ttc agg g-3',

scrambled-sense: 5'-CCG Gcc taa ggt taa gtc gcc ctc gCT CGA Gcg agg gcg act taa cct tag gTT TTT G-3',

scrambled-antisense: 5'-AAT TCA AAA Acc taa ggt taa gtc gcc ctc gCT CGA Gcg agg gcg act taa cct tag g-3', nucleotides for the targeting region are displayed in lower case.

Pairs were annealed and cloned into pLKO.1 using restriction enzymes from Roche and New England Biolabs and a T4 ligation kit (Roche Applied Sciences, 11635379001).

Supernatants containing lentiviral particles from 24 and 48 h after HEK293T transfection were collected and passed through 0.45 μ m filters. Cells were infected with lentiviral particles in polybrene (8 μ g/ml) supplemented-media. After 24 h cells were used for experiments. Lentiviral particles encoding shRNA against mouse *Atg7* (TRCN0000092164), were obtained from Sigma.

Electron microscopy. Cell pellets were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, 15710), 2.5% glutaraldehyde grade I (Sigma, G8882) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.3) for 3 h. Samples were postfixed in 1% OsO₄ (Electron Microscopy Sciences, 19172) 1.5% K₄[Fe(CN)₆] during 1h, dehydrated with ethanol and embedded in Epon812 (TAAB, T004). Thin sections (60–70 nm) were obtained with an Ultracut E (Leica) ultramicrotome, stained with lead citrate and examined under a JEM-1010 transmission electron microscope (JEOL).

Culture of insulinoma derived cell lines. Rat insulinoma INS-IE cells were kindly provided by P. Maechler (Université de Genève),⁴⁹ and cultured in 10% FBS RPMI 1640 supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 50 μ M 2-mercaptoethanol. Mouse insulinoma MIN6 cells were cultured in 15% FBS DMEM supplemented with 50 μ M 2-mercaptoethanol.

Preparation of detergent-soluble or -insoluble fractions of cell lysates. Cells were lysed in 1% NP-40-containing lysis buffer and subjected to 16,800 \times g centrifugation for 15 min, supernatant was used as the detergent-soluble fraction. In order to obtain the detergent-insoluble fraction, pellets were washed twice with PBS and resuspended in lysis buffer for sonication and protein solubilization.

Violet crystal assay. Cells were seeded in 12-well plates at a density of 5000 cells/cm² in DMEM supplemented with FBS 10%. After the end of experiment, cells were washed once with cold PBS and stained with 0.2% violet crystal (w/v) in 2% EtOH (v/v) for 10 min. Then, plates were rinsed with ddH₂O, dried, and after addition of 1% sodium dodecyl sulfate (w/v), absorbance of each point was read at 560 nm.

Flow cytometry analysis. For cell cycle analysis, adherent and nonadherent cells were collected by centrifugation and fixed with cold ethanol (70% v/v). The cells were then washed, resuspended in PBS, and incubated with RNase (Roche Applied Sciences, 10109169001) for 30 min at 37°C. After addition of 0.05% propidium iodide (w/v) (Sigma, P4170), cellular DNA content was quantified by flow cytometry. Additionally,

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Immunostep, ANNEXINVKIT) assays were carried following the instructions from the manufacturer.

RNA isolation and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). RNA was isolated with Trizol (Invitrogen, 15596-026), cDNA was obtained with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368813). Primers encompassing the *Xbp1* intron excised by *Ern1* exonuclease activity were mouse-*Xbp1*-sense 5'-ACA CGC TTG GGA ATG GAC AC-3', rat-*Xbp1*-sense 5'-ACA CGC TTG GGG ATG GAT GC-3', mouse/rat-*Xbp1*-antisense 5'-CCA TGG GAA GAT GTT CTG GG-3'. Other primer used were: *Atg5*-sense 5'-ATG CGG TTG AGG CTC ACT TTA-3', *Atg5*-antisense 5'-GCC CAA AAC TGG TCA AAT CTG TC-3', *Atg7*-sense 5'-TTC AGT GCT TTT GAC ATG AGT GC-3', *Atg7*-antisense 5'-CAC CTG ACT TTA TGG CTT CCC-3', mouse/rat-*Gapdh*-sense: 5'-CAT CAA GAA GGT GGT GAA GC-3', mouse/rat-*Gapdh*-antisense: 5'-CAT CGA AGG TGG AAG AGT TGG-3', *Ins2*-sense 5'-TTT GTC AAG CAG CAC CTT TG-3', *Ins2*-antisense 5'-GGT CTG AAG GTC ACC TGC TC-3', *Iapp*-sense 5'-CCT CAT CCT CTC TGT GGC AC-3', *Iapp*-antisense 5'-CAC GTT GGT TGG TGG GAG-3'. PCR products were resolved on 2% agarose gels stained with GelRed (Biotium, 41003).

Isolation of endoplasmic reticulum fraction. The procedure was performed following a methodology previously described.⁵⁰ Briefly, approximately 10 \times 100-mm culture dishes were seeded per condition. Cells were trypsinized, washed with PBS, resuspended in MTE buffer (270 mM D-manitol, 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM, pH 7.4), and lysed by soft sonication. After pelleting cellular debris and mitochondria by two-step centrifugation (10 min 1,400 \times g, and 10 min 15,000 \times g), supernatant was collected and added in top of a 2.0:1.5:1.3 M sucrose gradients, covered with MTE buffer to avoid collapse during ultracentrifugation. After 70 min 152,000 \times g ultracentrifugation, the interphase between 1.5 M and 1.3 M sucrose solutions was collected, diluted in MTE buffer and subsequently subjected to 22 min 40,000 \times g ultracentrifugation. Pellets containing ER fraction were resuspended in lysis buffer and sonicated. 10–20 μ g of protein were loaded and resolved by sodium dodecyl sulfate PAGE (SDS-PAGE).

Western blotting, immunoprecipitation and immunofluorescence. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE, followed by western blot and incubated with specific antibodies. Immunoreactive bands were visualized using the ECL Western Blotting Detection kit (GE Healthcare Bio-Sciences, RPN2106). Immunofluorescence assays were performed as described previously. For BECN1 immunoprecipitation, goat anti-BECN1 antibody (Santa Cruz, H-300) was used. Immunoprecipitation was carried using protein-A dynabeads and DynaMag magnet (Invitrogen, 100.01D/02D), following the instructions from the manufacturer.

Statistics. Statistically significant differences between mean values were determined using paired Student t-test for paired comparisons. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Silvia Fernández and Gema García for their technical assistance. We would like to thank Pierre Maechler (Université de Genève, Switzerland) for providing us INS-1E cells, and Cheol O. Joe (Korea Advanced Institute of Science and Technology) for his generous gift of *Rheb*-encoding plasmids. This work was

supported by Grants SAF2011-22555 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, Spain, and a grant for young researchers from Sociedad Española de Diabetes. A.B. acknowledges an FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education, Spain. CIBERDEM is an Instituto de Salud Carlos III project.

Supplemental Materials

Supplemental materials may be found here:
www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/21994

References

1. Fonseca SG, Burcin M, Gromada J, Urano F. Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and development of diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:763-70; PMID:19665428; <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2009.07.003>
2. Kahn SE. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4047-58; PMID:11549624; <http://dx.doi.org/10.1210/jc.86.9.4047>
3. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306:457-61; PMID:15486293; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1103160>
4. Kahn SE, Halban PA. Release of incompletely processed proinsulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of NIDDM. *Diabetes* 1997; 46:1725-32; PMID:9356018; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.46.11.1725>
5. Lang DA, Matthews DR, Burnett M, Turner RC. Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes* 1981; 30:435-9; PMID:7014311; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.30.5.435>
6. Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, et al. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988; 318:1231-9; PMID:3283554; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198805123181903>
7. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, et al. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 2001; 7:1153-63; PMID:11430819; [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00264-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00264-7)
8. Scheuner D, Vander Mierde D, Song B, Flamez D, Creemers JW, Tsukamoto K, et al. Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat Med* 2005; 11:757-64; PMID:15980866; <http://dx.doi.org/10.1038/nm1259>
9. Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, Nguyen LX, Foss E, Bortell R, et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 2006; 4:245-54; PMID:16950141; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.007>
10. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109:525-32; PMID:11854325
11. Kaniuk NA, Kiraly M, Bates H, Vranic M, Volchuk A, Brumell JH. Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes* 2007; 56:930-9; PMID:17395740; <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1160>
12. Huang C-J, Haataja L, Gurlo T, Butler AE, Wu X, Soeller WC, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress-induced beta-cell apoptosis and accumulation of polyubiquitinated proteins by human islet amyloid polypeptide. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293:E1656-62; PMID:17911343; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00318.2007>
13. Bernales S, McDonald KL, Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* 2006; 4:e423; PMID:17132049; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0040423>
14. Ogata M, Hino S-I, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2006; 26:9220-31; PMID:17030611; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01453-06>
15. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; 40:280-93; PMID:20965422; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>
16. Boya P, González-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 2005; 25:1025-40; PMID:15657430; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005>
17. Ebaro C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab* 2008; 8:325-32; PMID:18840363; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.009>
18. Jung HS, Chung KW, Won Kim J, Kim J, Komatsu M, Tanaka K, et al. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab* 2008; 8:318-24; PMID:18840362; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.013>
19. Quan W, Hur KY, Lim Y, Oh SH, Lee J-C, Kim KH, et al. Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia* 2012; 55:392-403; PMID:22075916; <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-011-2350-y>
20. Han D, Yang B, Olson LK, Greenstein A, Baek S-H, Claycombe KJ, et al. Activation of autophagy through modulation of 5'-AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from high glucose. *Biochem J* 2010; 425:541-51; PMID:19903169; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20090429>
21. Choi S-E, Lee S-M, Lee Y-J, Li L-J, Lee S-J, Lee J-H, et al. Protective role of autophagy in palmitate-induced INS-1 beta-cell death. *Endocrinology* 2009; 150:126-34; PMID:18772242; <http://dx.doi.org/10.1210/en.2008-0483>
22. Bommer G, Schäfer HJ, Klöppel G. Morphologic effects of diazoxide and diphenylhydantoin on insulin secretion and biosynthesis in B cells of mice. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1976; 371:227-41; PMID:823696; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00433070>
23. Marsh BJ, Soden C, Alarcón C, Wicksteed BL, Yaekura K, Costin AJ, et al. Regulated autophagy controls hormone content in secretory-deficient pancreatic endocrine beta-cells. *Mol Endocrinol* 2007; 21:2255-69; PMID:17579214; <http://dx.doi.org/10.1210/me.2007-0077>
24. Masaki Y, Tanigawa K, Ohguni S, Note S. Rat fetal islets as a useful model for the study of insulin release failure. *Pancreas* 1987; 2:632-7; PMID:3325983; <http://dx.doi.org/10.1097/0000676-198711000-00002>
25. Hughes SJ. The role of reduced glucose transporter content and glucose metabolism in the immature secretory responses of fetal rat pancreatic islets. *Diabetologia* 1994; 37:134-40; PMID:8163046; <http://dx.doi.org/10.1007/s001250050083>
26. Tu J, Tuch BE. Glucose regulates the maximal velocities of glucokinase and glucose utilization in the immature fetal rat pancreatic islet. *Diabetes* 1996; 45:1068-75; PMID:8690154; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.45.8.1068>
27. Guillen C, Navarro P, Robledo M, Valverde AM, Benito M. Differential mitogenic signaling in insulin receptor-deficient fetal pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 2006; 147:1959-68; PMID:16396989; <http://dx.doi.org/10.1210/en.2005-0831>
28. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytosstatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 2002; 51:1437-42; PMID:11978640; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.51.5.1437>
29. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122:927-39; PMID:16179260; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>
30. Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee A-H, Bassik MC, Antonsson B, et al. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 2006; 312:572-6; PMID:16645094; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1123480>
31. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 1998; 273:3963-6; PMID:9461583; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.7.3963>
32. Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 1998; 47:358-64; PMID:9519740; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.47.3.358>
33. Sturis J, Pugh WL, Tang J, Ostrega DM, Polonsky JS, Polonsky KS. Alterations in pulsatile insulin secretion in the Zucker diabetic fatty rat. *Am J Physiol* 1994; 267:E250-9; PMID:8074204
34. Strappazon F, Vietri-Rudan M, Campello S, Nazio F, Florenzano F, Fimia GM, et al. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *EMBO J* 2011; 30:1195-208; PMID:21358617; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.49>

35. Quan W, Lim YM, Lee M-S. Role of autophagy in diabetes and endoplasmic reticulum stress of pancreatic β -cells. *Exp Mol Med* 2012; 44:81-8; PMID:22257883; <http://dx.doi.org/10.3858/emm.2012.44.2.030>
36. Rivera JF, Gurlo T, Daval M, Huang CJ, Matveyenko AV, Butler PC, et al. Human-IAPP disrupts the autophagy/lysosomal pathway in pancreatic β -cells: protective role of p62-positive cytoplasmic inclusions. *Cell Death Differ* 2011; 18:415-26; PMID:20814419; <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.111>
37. Fujimoto K, Hanson PT, Tran H, Ford EL, Han Z, Johnson JD, et al. Autophagy regulates pancreatic beta cell death in response to Pdx1 deficiency and nutrient deprivation. *J Biol Chem* 2009; 284:27664-73; PMID:19654319; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.041616>
38. Tanemura M, Ohmura Y, Deguchi T, Machida T, Tsukamoto R, Wada H, et al. Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo. *Am J Transplant* 2012; 12:102-14; PMID:21966953; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03771.x>
39. Shigeyama Y, Kobayashi T, Kido Y, Hashimoto N, Asahara S-I, Matsuda T, et al. Biphasic response of pancreatic beta-cell mass to ablation of tuberous sclerosis complex 2 in mice. *Mol Cell Biol* 2008; 28:2971-9; PMID:18316403; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01695-07>
40. Bartolomé A, Guillén C, Benito M. Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signaling involved in pancreatic beta-cell proliferation. *Endocrinology* 2010; 151:3084-94; PMID:20427478; <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-0048>
41. Fraenkel M, Ketzinel-Gilad M, Ariav Y, Pappo O, Karaca M, Castel J, et al. mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* 2008; 57:945-57; PMID:18174523; <http://dx.doi.org/10.2337/db07-0922>
42. Kang YJ, Lu M-K, Guan K-L. The TSC1 and TSC2 tumor suppressors are required for proper ER stress response and protect cells from ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; 18:133-44; PMID:20616807; <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.82>
43. Qin L, Wang Z, Tao L, Wang Y. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy* 2010; 6:239-47; PMID:20104019; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.2.11062>
44. Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Court F, Kiffin R, et al. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev* 2009; 23:2294-306; PMID:19762508; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1830709>
45. Fouillet A, Levet C, Virgone A, Robin M, Dourlen P, Rieusset J, et al. ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy* 2012; 8:915-26; PMID:22660271; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.19716>
46. Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, Generali D, et al. The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res* 2009; 69:4415-23; PMID:19417138; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2839>
47. Ding W-X, Ni H-M, Gao W, Hou Y-F, Melan MA, Chen X, et al. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* 2007; 282:4702-10; PMID:17135238; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M609267200>
48. Ullman E, Fan Y, Stawowczyk M, Chen H-M, Yue Z, Zong W-X. Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. *Cell Death Differ* 2008; 15:422-5; PMID:17917679; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402234>
49. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* 2004; 145:667-78; PMID:14592952; <http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-1099>
50. Bozidis P, Williamson CD, Colberg-Poley AM. Isolation of endoplasmic reticulum, mitochondria, and mitochondria-associated membrane fractions from transfected cells and from human cytomegalovirus-infected primary fibroblasts. In: *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2001. Unit 3.27

CURRICULUM VITAE

Alberto Bartolomé Herranz, nacido el 4 de Septiembre de 1984 en Madrid.

ESTUDIOS

- **Licenciado en Farmacia** por la Universidad Complutense de Madrid, en Julio de 2007
Nota media de expediente: 3,11
- **Experto Universitario en Estadística Avanzada Aplicada**, Título propio de la Universidad Nacional de Educación a Distancia. Junio de 2008.
- **Diploma de Estudios Avanzados**, Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid. Junio de 2009

TRAYECTORIA EN INVESTIGACIÓN

- **Octubre 2011 – Abril 2012:** Estancia científica en la Universidad de Kobe (Japón), laboratorio del Dr. Yoshiaki Kido.
- **Septiembre 2008 – Septiembre 2012:** Becario de Formación de Profesorado Universitario (FPU), Ministerio de Ciencia e Innovación. Grupo del Dr. Manuel Benito de las Heras.
- **Enero 2008 – Actualidad:** Miembro del grupo Diabetes y Cardiovascular, afiliado al Centro de Investigación Biomédica en Red: Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM).
- **Enero – Abril 2008:** Becario Iniciación a la Investigación, Universidad Complutense de Madrid. Grupo del Dr. Manuel Benito de las Heras
- **Curso 2006-2007:** Becario de Colaboración con el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, grupo del Dr. Manuel Benito de las Heras.

PUBLICACIONES

Bartolomé, A., Guillén, C., Benito, M. (2012). Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic β cell death. *Autophagy*. En prensa.

Shimizu, S., Hosooka, T., Matsuda, T., Asahara, S., I., Koyanagi-Kimura, M., Kanno, A., **Bartolomé, A.**, Etoh, H., Fuchita, M., Teruyama, K., *et al.* (2012). DPP4 inhibitor vildagliptin preserves β -cell mass through amelioration of endoplasmic reticulum stress in C/EBPB transgenic mice. *J Mol Endocrinol.* 49(2), 125–135.

Bartolomé, A., Guillén, C., Benito, M. (2010). TSC1-TSC2 complex on the crossroad of pancreatic beta cell signaling. Role on cell proliferation, death and survival. *An R Acad Nac Farm*, 76(3), 357-377.

Bartolomé, A., Guillén, C., y Benito, M. (2010). Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signaling involved in pancreatic beta-cell proliferation *Endocrinology*, 151(7), 3084–3094.

Guillen, C., **Bartolomé, A.**, Nevado, C., y Benito, M. (2008). Biphasic effect of insulin on beta cell apoptosis depending on glucose deprivation *FEBS letters*, 582(28), 3855–3860.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- **Bartolome, A.**, Kimura-Koyanagi, A., Shimizu, S., Kanno, A., Guillen, C., Benito, M., Asahara, S.-I. Kido, Y.
Pancreatic beta cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment
48th Annual Meeting of the EASD (European Association for the Study of Diabetes).
Berlín (Alemania), 2012.
- **Bartolomé, A.**, Guillén, C., García-Aguilar, A., Benito, M.
mTORC1 hyperactivity: impaired mitophagy and macroautophagic response to endoplasmic reticulum stress.
- Guillén, C., **Bartolomé, A.**, García-Aguilar, A., Benito, M.
Metformin induces pancreatic beta cell apoptosis and modulates TSC2-SIRT1 interaction.
22nd IUBMB & 37th FEBS Congress (International Union of Biochemistry and Molecular Biology & Federation of European Biochemical Societies). Sevilla 2012.
- Koyanagi-Kimura, M., **Bartolome, A.**, Kanno, A., Matsuda, T., Shigeyama, Y., Asahara, S.,-I., Kasuga, M., Seino, S., Kido, Y.
The effect of TSC2 ablation on mitochondrial function and autophagy.
30th JES (Japanese Endocrine Society) Summer Seminar on Endocrinology and Metabolism.
Maebashi (Japón). 2012.
- **Bartolomé, A.**
ER stress and autophagy in pancreatic β cells, role of mTORC1.
The 4th Kobe Diabetes Night Seminar. Kobe (Japón), 2012.
- Guillen, C., **Bartolome, A.**, Kamitz, A., Benito, M.
Metformin induces cell death specifically in pancreatic β cells
4rd Annual Meeting CIBERDEM. Vall de Boí, 2011.
- **Bartolome, A.**, Kamitz, A., Benito, M., Guillen, C.
Estrés de retículo endoplasmático y autofagia en células beta con secreción de insulina deficiente
- Kamitz, A., **Bartolome, A.**, Benito, M., Guillen, C.
Estatus energético en la célula beta pancreática y la respuesta autofágica: papel de la AMP-proteín quinasa.
XXII Congreso de la Sociedad Española de Diabetes. Málaga, 2011.
- **Bartolome, A.**, Guillen, C., Benito, M.
Papel de la autofagia en situaciones asociadas a estrés de retículo endoplasmático en células beta pancreáticas.
Red Española de Apoptosis: X Aporeunión. Cuenca, 2011.
- **Bartolome, A.**, Guillen, C., Benito, M.
TSC1-TSC2 complex and IR isoforms in beta cells: Implications in insulin resistance
XI International symposium on Insulin Receptors and Insulin Action. Nápoles (Italia), 2010.
- Guillen, C., **Bartolome, A.**, Benito, M.
Endoplasmic reticulum stress in pancreatic β cell: role of the TSC2/mTORC1 pathway
- **Bartolome, A.**, Guillen, C., Benito, M.
Autophagy plays a protective role in stress mediated pancreatic beta cell death
3rd Annual Meeting CIBERDEM. Prullans, 2010.

- **Bartolome, A.**, Guillen, C., Benito, M.
Role of autophagy in endoplasmic reticulum stress associated scenarios in pancreatic beta cells
The European Molecular Biology Organization (EMBO) Meeting 2010. Barcelona, 2010.
- Guillen, C., **Bartolome, A.**, Benito, M.
Expresión diferencial de las isoformas del receptor de insulina en células beta pancreáticas y papel en la resistencia a la insulina. Papel del complejo TSC1-TSC2
XXI Congreso de la Sociedad Española de Diabetes. Barcelona, 2010.
- **Bartolome, A.**, Guillen, C., Benito, M.
Role of the TSC1-TSC2 complex on the regulation of pancreatic beta cells
2nd CIBERDEM Annual Meeting. Arnes, 2009.
- Guillen, C., **Bartolome, A.**, Benito, M.
La insulina induce apoptosis a largo plazo de las células beta pancreática
1st CIBERDEM Annual Meeting. Nuria, 2008.
- Guillen, C., **Bartolome, A.**, Benito, M.
Insulin induces apoptosis at long term in pancreatic beta cells
44th Annual Meeting of the EASD (European Association for the Study of Diabetes).
Roma (Italia), 2008.

OTROS MÉRITOS

- Nombrado Académico Correspondiente de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid, Enero de 2011.
- Premio de “Faes Farma” de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2009.
- Acreditación de Excelencia de la Comunidad de Madrid por el rendimiento académico excelente, para el curso 2006-2007.

