



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Papel de AnxA6 en la regulación del transportador de L-alanina, SNAT4, en hígado de ratón

Patricia Blanco Muñoz

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





Barcelona, 20 de Marzo de 2020  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

## **Papel de AnxA6 en la regulación del transportador de L-alanina, SNAT4, en hígado de ratón**

MEMORIA PRESENTADA POR:

**Patricia Blanco Muñoz**

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN BIOMEDICINA  
POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA



ESTA TESIS SE HA REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. CARLES ENRICH BASTÚS CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y LA CO-DIRECCIÓN DEL DR. CARLES RENTERO ALFONSO PROFESOR LECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA.

La interesada,

Director y co-director,

**Patricia Blanco Muñoz**

**Dr. Carles Enrich Bastús  
Dr. Carles Rentero Alfonso**







***A mis padres y a mis hermanos.***





***A Ignacio.***



***Algunas veces se gana y otras se aprende.***



## AGRADECIMIENTOS

Aún no me creo que esté escribiendo las últimas palabras de una de las tres cosas que se supone que hay que hacer en la vida, junto con vivir y ser feliz. Tampoco puedo creerme que hayan pasado cuatro años y medio desde que llegué a Barcelona. Supongo que nunca olvidaré mi primer día ni toda la gente buena que me ha acompañado en este camino. Ha sido un viaje de aprendizaje tanto personal como profesional, pero lo más importante es que me ha hecho ver lo que realmente importa y lo que más felicidad me aporta en la vida y siempre lo he tenido delante.

La primera persona que conocí de lo que ha sido mi lugar de trabajo durante 4 años es el director de mi tesis, Carles Enrich. Gracias por los buenos momentos científicos que tuvimos durante la realización de mi TFM, por toda la biología celular que me has enseñado, por tu puntualidad, eficiencia, claridad y honestidad. También quiero agradecerte las correcciones de la tesis. A Carles Rentero le agradezco los conocimientos adquiridos de microscopía, de biología molecular, de todos los programas que he utilizado durante la realización de la tesis como canvas e ImageJ. Gracias por hacerme entender que en ciencia hay que ser autosuficiente.

A mis compañeros de laboratorio Alba, Elsa, Judith, Nico, Cristina, Marc, Moi, Albert, Frede, Evelyn, María, Sonia, Débora y Fer agradecerles los buenos momentos que hemos pasado juntos, nuestras charlas, su apoyo, Barrokos y todo lo que me han aguantado jejeje. Alba, muchas gracias por todas las técnicas que me has enseñado, por tu claridad, objetividad y paciencia. A los investigadores Albert Pol, Siscu, Marta y Olivia por todo lo que me han escuchado, aconsejado y el soporte científico junto con su predisposición siempre de ayudarme.

Dejando a un lado el ámbito científico no podría seguir por otras personas que no fueran los que han marcado tanto esta etapa de mi vida como los Biomédicos Marchosoh. Esta tesis no habría terminado sin vosotros. Habéis sido durante años mi familia en Barcelona, no puedo describir la relación de

amistad que tenemos entre nosotros porque no tengo palabras. Es una amistad sincera, pura, diferente, de locura y fiestas, de domingos comiendo paella, de casas rurales, de Berlín y de bodas. Me voy muy tranquila de Barcelona pensando que siempre que quiera puedo volver y aquí estaréis y si no es así ya invadiremos la casa de alguien o nos reencontraremos en San Juan 2.0. Dave muchísimas gracias por las correcciones del inglés de mi tesis.

Mis compañeros y amigos de flamenco. Nuestros martes infinitos de bodega y McDonald, vuestro apoyo incondicional, el acogimiento, los cumpleaños, las actuaciones de “la peke” o “la polvorilla”, las cenas de quien viene a cenar conmigo y todos los platos con queso, tengo tanto que agradecer a Cris, Jona y Jorge que siempre tendréis una amiga y una casa en Almería. Nos vemos en el evento de 2021.

A mis compañeras de piso y amigas Lucía, Triana e Inés. Tanto que me habéis escuchado, apoyado, aconsejado, torturado jejeje. Travessera de les cort es el único motivo por el que no quiero irme, sé que me echaréis muchísimo de menos porque siempre estoy “Muy Contenta”.

Muchas gracias a mis amigas de siempre Ana, Andrea y Laura por venir a verme a Barcelona, por apoyarme, escucharme, aconsejarme, animarme, por estar siempre en Almería cuando yo he vuelto y por todo lo que nos queda.

También agradecer a Paco Marañón por haberse leído mi tesis a contrarreloj, por los consejos y por el apoyo. También agradecer a Pura por el cuidado y entrega que me ha dado todos estos años. Y a mi tía Raquel por estar siempre.

Y ahora viene la parte más dura de escribir, el agradecimiento a las personas más importantes de mi vida. A mis padres por haberme acompañado en este día tan especial e importante para mí y por todo el amor que me dan. Me siento muy afortunada. A mi hermana Paula por todo lo que hemos aprendido juntas y todo el cariño y amor que nos tenemos. Siento tanto todos estos años que he estado tan lejos de vosotros pero os he sentido muy cerca y sin vuestro apoyo no habría podido terminar. Tranquilos que ahora estaré allí perenne. Gracias a María José por venir a este día tan importante. Juanjo muchísimas gracias por toda la preparación y la ayuda que me has dado.

No me puedo creer que la última persona y la más importante que me queda por agradecer, haya caído en primera plana. Siempre recordaré el primer día de instituto que nos conocimos. Me has acompañado en todas las etapas determinantes desde aquel momento. Selectividad, los calentamientos de cabeza cuando estudiaba química, Erasmus, la nueva etapa de máster, todo mi doctorado, mis actuaciones y mi estancia internacional. Has sido mi mayor apoyo tanto en lo profesional como en lo personal. Siempre has tratado a mi familia como si fuera la tuya y me has ayudado y apoyado con ella. Hemos estado muchos años dedicados a nuestras carreras profesionales y no veíamos el momento para estar juntos, pero ya ha llegado. Muchas gracias por ser mi compañero de viaje. Te quiero.









Papel de AnxA6 en la regulación del transportador de  
L-alanina, SNAT4, en hígado de ratón.





# ÍNDICE

PRÓLOGO	29
ABREVIACIONES	31
RESUMEN	<b>37</b>
INTRODUCCIÓN	<b>43</b>
1. El hígado	43
1.1. Estructura del hígado	43
1.2. Las células del hígado	44
1.2.1. Hepatocitos	44
1.2.2. Células endoteliales	44
1.2.3. Células de Kupffer	44
1.2.4. Células estrelladas	45
1.2.5. Linfocitos y células dendríticas	45
1.2.6. Colangiocitos	46
1.3. La fisiología del hígado	46
1.3.1. Metabolismo de aminoácidos	46
1.3.2. Metabolismo de carbohidratos	50
1.3.2.1. Captación de glucosa por los hepatocitos	50
1.3.2.2. Glucólisis y glucogénesis	51
1.3.2.3. Glucogenólisis y gluconeogénesis	52
1.3.2.4. Regulación de la gluconeogénesis	53
1.3.2.5. Ciclo glucosa-alanina	55
1.3.3. Metabolismo de lípidos	56
1.3.3.1. Metabolismo de lípidos extrahepático	57
1.3.3.2. Lipogénesis hepática	57
1.3.3.3. Captación de ácidos grasos	58
1.3.3.4. Oxidación de ácidos grasos	58
1.4. Regeneración hepática	59
1.4.1. Fases de la regeneración hepática	60
1.4.1.1. Fase de activación	60
1.4.1.1.1. Citoquinas	61
1.4.1.1.2. Factores de crecimiento	62
1.4.1.2. Fase de proliferación	63
1.4.1.3. Fase de terminación	63
1.4.2. Metabolismo en la regeneración hepática	64
1.4.2.1. Metabolismo de aminoácidos	65
1.4.2.2. Metabolismo de carbohidratos	66
1.4.2.3. Metabolismo de lípidos	68
1.5. El hígado en estado postprandial y en ayuno	69
1.5.1. El hígado en estado postprandial	70
1.5.2. El hígado en ayuno	71
2. Familia transportadora de solutos	73

2.1. Estructura de la familia SLC38	73
2.2. Expresión de la familia SLC38	74
2.3. Localización de la familia SLC38	75
2.4. Funciones de la familia SLC38	76
2.4.1. El sistema A	76
2.4.2. El Sistema N	76
2.4.3. Papel de la familia SLC38 en las funciones hepáticas	77
2.4.4. Papel de la familia SLC38 en la fisiología del cerebro	78
3. Anexinas	79
3.1. Estructura de las anexinas	79
3.2. Expresión de las anexinas	80
3.3. Localización de las anexinas	81
3.4. Funciones de las anexinas	81
3.4.1. Anexinas como proteínas andamio	81
3.4.2. Anexinas como proteínas de transporte	82
3.4.3. Otras funciones de las anexinas	82
3.5. Patologías asociadas a las anexinas	84
3.6. Ratones genoanulados de las anexinas	84
4. Anexina A6	87
4.1. Estructura de la proteína Anexina A6	87
4.2. Expresión y localización de Anexina A6	88
4.3. Funciones de Anexina A6	88
4.3.1. Anexina A6 en la homeostasis de colesterol	88
4.3.2. Anexina A6 en el tráfico y la estructura de membrana	89
4.3.3. Anexina A6 en la señalización celular	90
4.3.4. Anexina A6 y el citoesqueleto de actina	90
4.4. Ratón genoanulado para la proteína Anexina A6	91
5. Homeostasis de calcio celular	93
5.1. Canales de calcio celulares	93
5.2. Molécula de interacción estromal, STIM1	94
5.3. Proteína 1 del canal de calcio activo por la liberación de calcio, Orai1	94
5.4. Entrada de calcio mediada por SOCE y metabolismo celular	95
<b>OBJETIVOS</b>	<b>99</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>105</b>
1. Antecedentes	105
2. Caracterizar la función de Anexina A6 en la regeneración hepática	109
2.1. Índice hepático	109
2.2. Expresión y localización de Anexina A6 en el hígado de ratón post PHx	110
2.3. Rescate del genotipo Anexina A6 en el hígado de ratón	111
2.4. Caracterización de la proliferación celular	113

2.5. Análisis de la fase de activación y transición G1/S del ciclo celular	114
3. Determinar la función de Anexina A6 en el metabolismo de la glucosa en hígado de ratón post PHx	115
3.1. Caracterización de la expresión génica de las enzimas principales en la vía gluconeogénica en la regeneración hepática	116
3.2. Niveles de expresión y actividad de la enzima ALAT post PHx	117
3.3. Niveles de triglicéridos en hígado de ratón post PHx	118
3.4. Cuerpos cetónicos en plasma de ratón post PHx	119
3.5. Niveles de L-alanina en plasma e hígado de ratón post PHx	120
3.6. Niveles de expresión de las proteínas SNAT en hígado de ratón post PHx	121
3.7. Cuantificación de los niveles de proteína de SNAT1 y SNAT4 en el hígado de ratón post PHx	122
3.8. Análisis de la interacción entre Anexina A6 y las proteínas SNAT1 y SNAT4 en hígado de ratón	123
3.9. Determinación de la localización de las proteínas SNAT1 y SNAT4 en hígado de ratón	124
3.10. Determinación de la localización de la proteína SNAT4 en el hígado de ratón AnxA6ko infectado con el virus rAAV8-AnxA6	127
4. Determinar la función de la proteína Anexina A6 en el metabolismo de la glucosa en ayuno	129
4.1. Metabolismo energético mediante calorimetría indirecta en ayuno	129
4.2. Caracterización de las enzimas implicadas en la vía gluconeogénica en ayuno	131
4.3. Niveles de expresión y actividad de la enzima ALAT en ayuno	132
4.4. Niveles de triglicéridos en el hígado de ratón en ayuno	133
4.5. Niveles de cuerpos cetónicos en plasma en ayuno	134
4.6. Niveles de L-alanina en plasma en ayuno	134
4.7. Análisis de la síntesis de glucógeno y cuerpos cetónicos en hepatocitos aislados de ratones	135
4.8. Caracterización de la actividad de las proteínas implicadas en la vía de señalización de mTOR	137
4.9. Niveles de expresión de los transportadores de L-alanina en ayuno	142
4.10. Cuantificación de los niveles de proteína endógena de las proteínas SNAT1 y SNAT4 en ayuno	143
4.11. Análisis de la interacción entre Anexina A6 y las proteínas SNAT1 y SNAT4 en hígado de ratón	144
4.12. Determinación de la localización de las proteína SNAT1 y SNAT4 en hígado de ratón	145
5. Caracterizar la la localización y topología <i>in vitro</i> de SNAT1, SNAT2 y SNAT4	149



5.1. Localización intracelular de los transportadores de L-alanina	150
5.2. Localización de las proteína SNAT1 y SNAT4 en fracciones subcelulares de hígados de rata	153
5.3. Orientación de los dominios terminales de los transportadores de L-alanina	153
6. Analizar los niveles de calcio intracelulares en función de la ausencia o presencia de Anexina A6	159
6.1. Determinación de los niveles de calcio intracelulares en función de la ausencia o presencia de Anexina A6 a través de SOCE	160
6.2. Análisis de la interacción entre Anexina A6 y Orai1	166
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>171</b>
1. Regulación del metabolismo de la glucosa por Anexina A6: papel en la regeneración hepática y en el ayuno	173
1.1. Caracterización del ratón AnxA6ko	173
1.2. Importancia de la proteína AnxA6 durante la regeneración hepática	174
1.3. Papel de AnxA6 en el metabolismo hepático	177
1.4. Implicación de AnxA6 en la regulación de los transportadores de L-alanina	180
1.5. Consideraciones finales y modelo de estudio	184
2. Caracterizar la localización y topología <i>in vitro</i> de SNAT1, SNAT2 y SNAT4	187
2.1 Localización intracelular de las proteínas SNAT1, SNAT2 y SNAT4	187
2.2 Topología de las proteínas SNAT1, SNAT2 y SNAT4	188
3. Papel de Anexina A6 en la regulación de los niveles de calcio intracelulares	191
3.1 Implicación de AnxA6 en la homeostasis de calcio regulada por SOCE	191
3.2 Complejo Orai1/AnxA6/STIM1	192
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>197</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>203</b>
1. Modelo animal para el estudio <i>in vivo</i> de Anexina A6	203
1.1. Genotipificado de los ratones AnxA6ko	203
1.1.1. Extracción ADN genómico	203
1.1.2. Técnica de PCR para genotipificar	203
1.1.3. Materiales utilizados en esta técnica	205
2. Hepatectomía parcial en ratones wt y AnxA6ko	206
2.1. Materiales utilizados en la PHx	206
3. Obtención y preparación de muestras de ratón	207
3.1. Extracción de hígado	207
3.2. Homogeneizado de hígado	207
3.3. Fijación del hígado e inclusión en O.C.T.™	208
3.4. Extracción de sangre intracardíaca	208

3.5. Materiales utilizados en este bloque de técnicas	208
4. Aislamiento de hepatocitos de ratón	209
4.1. Cultivo primario de hepatocitos	210
4.2. Materiales utilizados en la técnica de aislamiento de hepatocitos	211
5. Cuantificación de la expresión génica y proteica	212
5.1. Cuantificación de la expresión génica	212
5.1.1. Obtención de ARN de hígado de ratón	212
5.1.2. Retrotranscripción para obtener ADN complementario	212
5.1.3. PCR cuantitativa	212
5.2. Cuantificación de la expresión proteica	213
5.2.1. Cuantificación de proteínas mediante la técnica Bradford	213
5.2.2. Preparación de las muestras para electroforesis	213
5.2.3. Gel de acrilamida (SDS-PAGE) y electroforesis	214
5.2.4. Transferencia de proteínas a membrana	215
5.2.5. Técnica de <i>Western Blot</i>	216
5.3. Análisis de la actividad de la enzima ALAT en plasma	218
5.4. Análisis de los niveles de L-alanina en hígado y plasma sanguíneo	218
5.5. Análisis de los niveles de triglicéridos en hígado	218
5.6. Materiales utilizados en este bloque de técnicas	218
6. Técnicas para el estudio del metabolismo de la glucosa	220
6.1. Cuantificación de los niveles de glucosa en sangre <i>in vivo</i>	220
6.2. Análisis de la producción de glucosa en hepatocitos aislados	220
7. Cuantificación de los niveles de glucógeno en hepatocitos	221
7.1. Materiales utilizados en la extracción de glucógeno	222
8. Inmunohistoquímica en cortes histológicos de hígado de ratón	223
9. Expresión de las proteínas Anexina A6 y GFP en hígado de ratón mediante vectores víricos recombinantes adenoasociados	224
10. Inmunoprecipitación en homogeneizado de hígado de ratón	225
11. Modelo celular para el estudio <i>in vitro</i> de la proteína Anexina A6 y los transportadores de L-alanina	227
11.1. Líneas celulares	227
11.2. Mantenimiento celular	227
11.3. Congelación y descongelación de líneas celulares	228
11.4. Transfección	229
11.4.1. Expresión de ADN en bacteria	229
11.4.2. Purificación de ADN de bacteria	229
11.4.3. Método de transfección de ADN a células en cultivo	229
11.4.4. Expresión de ADN en bacteria	229
12. Inmunofluorescencia	231
12.1. Materiales utilizados en esta técnica	232
13. Citometría de flujo	233
13.1. Análisis de la acumulación de cuerpos lipídicos	233
13.2. Análisis de la fosforilación de proteínas	234

13.3.	Material utilizado en el desarrollo de esta técnica	236
14.	Análisis de los niveles de calcio intracelulares	237
14.1.	Materiales utilizados en la realización de esta técnica	238
15.	Inmunoprecipitación en una línea celular estable	239
16.	Producción del anticuerpo policlonal de conejo	241
17.	Aislamiento de endosomas de hígado de rata	242
18.	Microscopía	244
19.	Análisis estadístico	245
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>249</b>
	Artículos publicados durante la realización de la tesis doctoral	267





## PRÓLOGO

En la presente tesis doctoral se realiza la caracterización de la proteína Anexina A6 *in vivo* en el hígado de ratón. Anexina A6 es una proteína de unión a fosfolípidos de manera dependiente de calcio y constituye el 0.25% de la proteína hepática total en el hígado de ratón y de rata. El estudio de la función de Anexina A6 en la fisiología de este órgano se lleva a cabo en dos modelos fisiológicos, la regeneración hepática y el ayuno, utilizando un ratón que presenta la proteína Anexina A6 deplecionada en todos los tejidos.

En estudios previos se han determinado las funciones de la proteína Anexina A6 en modelos celulares *in vitro* mediante la sobreexpresión de esta proteína. Entre sus funciones descritas destaca la homeostasis de colesterol, la señalización celular y su participación en rutas de endocitosis y exocitosis.

En este estudio se muestra el papel de la proteína Anexina A6 en el hígado mediante su implicación en la regeneración hepática, en la homeostasis de glucosa y en la regulación del transportador de L-alanina, SNAT4. Es la primera vez que se asocia la proteína Anexina A6 con los transportadores de L-alanina.



## ABREVIACIONES

A	<i>Aldolase</i>
Aa	<i>Amino acids</i>
ACoA	<i>Acetyl Coenzyme A</i>
ACSL	<i>Acyl-CoA synthetase long-chain</i>
ADN	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
Ala	<i>L-alanine</i>
ALAT	<i>Alanine transaminase</i>
AMP	<i>Adenosine monophosphate</i>
AnxA1	<i>Annexin A1</i>
AnxA2	<i>Annexin A2</i>
AnxA3	<i>Annexin A3</i>
AnxA4	<i>Annexin A4</i>
AnxA5	<i>Annexin A5</i>
AnxA6	<i>Annexin A6</i>
AnxA6ko	<i>Annexin A6 knockout</i>
AnxA7	<i>Annexin A7</i>
AnxA8	<i>Annexin A8</i>
AnxA9	<i>Annexin A9</i>
AnxA10	<i>Annexin A10</i>
AnxA11	<i>Annexin A11</i>
AnxA13	<i>Annexin A13</i>
ASCT2	<i>Alanine serine and cysteine transporter system 2</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
Camp	<i>Adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate cycle</i>
Cav1ko	<i>Caveolin 1 knockout</i>
CHO	<i>Chinese Hamster ovary</i>
Chol	<i>Cholesterol</i>
CREB	<i>CAMP responsive element binding protein</i>
CURL	<i>Compartment of uncoupling of receptor and ligand</i>
E	<i>Enolase</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>
FA	<i>Fatty acids</i>
FABP	<i>Fatty acids binding proteins</i>
FATP	<i>Fatty acids transport proteins</i>
Fwd	<i>Forward</i>
FoxM1	<i>Forkhead box M1</i>



FoxO1	<i>Forkhead box O1</i>
F1,6P	<i>Fructose-1,6-biphosphatase</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
Glc	<i>Glucose</i>
GLUT2	<i>Glucose transporter 2</i>
Gln	<i>Glutamine</i>
Glu	<i>Glutamate</i>
Glyk	<i>Glycerol kinase</i>
GNG	<i>Gluconeogenesis</i>
GP130	<i>Glycoprotein 130</i>
G3PD	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
G6P	<i>Glucosa-6-phosphatase</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase-3</i>
GST	<i>Glutathione-S-transferase</i>
Gtp	<i>Glutamine pyruvate transaminase</i>
H	<i>Hexokinase</i>
HM	<i>Heavy membranes</i>
HEK-293	<i>Human embryonic kidney</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HNF-4	<i>Hepatocyte nuclear factor-4</i>
H-Ras	<i>Retrovirus associated protein</i>
ICRAC	<i>Inward calcium release-activated calcium</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IL-6R	<i>Interleukin-6 receptor</i>
IRS1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
IRS2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>
JAK	<i>Janus kinases</i>
JAK1	<i>Janus kinase 1</i>
KB	<i>Ketone Bodies</i>
$\alpha$ -KG	<i><math>\alpha</math>-ketoglutarate</i>
Lac	<i>Lactate</i>
LD	<i>Lipid droplets</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
LLL	<i>Left lower lobe</i>
LP	<i>Lipoproteins</i>
LUL	<i>Left upper lobe</i>
Malonil-CoA	<i>Malonil coenzime A</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
Marn	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MAT	<i>Methionine adenosyltransferase</i>

MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
MEF A6ko	<i>Mouse embryonic fibroblast AnxA6 knockout</i>
MEF A6oe	<i>Mouse embryonic fibroblast AnxA6 overexpression</i>
MKP-3	<i>Mitogen-activated protein kinase phosphatase-3</i>
MDL	<i>Minimal Disease Level</i>
mTORC1	<i>mammalian Target of rapamycin Complex 1</i>
mTORC2	<i>mammalian Target of rapamycin complex 2</i>
Myt	<i>Mitochondria</i>
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
NAD <sup>+</sup>	<i>Nicotine adenine dinucleotide</i>
NEFAs	<i>Nonesterified fatty acids</i>
Neo Rev	<i>Neomicina Reverse</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
OL	<i>Omental lobe</i>
Orai1	<i>Calcium release-activated calcium channel protein 1</i>
PC	<i>Pyruvate carboxylase</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
p120GAP	<i>Guanosine triphosphatase activating protein p120</i>
PGC-1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1 alpha</i>
PGK	<i>Phosphoglycerate kinase</i>
PGM	<i>Phosphoglycerate mutase</i>
PHI	<i>Phosphohexose isomerase</i>
PHx	<i>Partial hepatectomy</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PM	<i>Plasma membrane</i>
PRPP	<i>5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate</i>
Prx	<i>Peroxisome</i>
Pyr	<i>Pyruvate</i>
rAAV8	<i>recombinant adeno-associated virus serotype 8</i>
RCF	<i>Relative centrifugal force</i>
Rev	<i>Reverse</i>
RLL	<i>Right lower lobe</i>
RML	<i>Right Middle Lobe</i>
RRC	<i>Receptor recycling compartment</i>
RUL	<i>Right upper lobe</i>
S100A6	<i>S100 calcium-binding protein A6</i>
SAMe	<i>S-adenosylmethionine</i>

SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SLC38	<i>Solute carrier family 38</i>
SNARE	<i>SNAP [soluble NSF Attachment Protein] Receptor</i>
SOCE	<i>Store-operated calcium entry</i>
SOCS-3	<i>Suppressor of cytokine signaling-3</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STIM1	<i>Stromal interacting molecule 1</i>
TAGs	<i>Triglycerids</i>
TCA	<i>Tricarboxylic acid cycle</i>
TGF $\alpha$	<i>Tumor growth factor <math>\alpha</math></i>
TGF $\beta$	<i>Tumor growth factor <math>\beta</math></i>
TGN	<i>trans-Golgi network</i>
TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
TORC1	<i>Target of rapamycin Complex 1</i>
TORC2	<i>Target of rapamycin complex 2</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNF $\alpha$	<i>TNF<math>\alpha</math> knockout</i>
TPC1	<i>Two pore calcium channel protein 1</i>
TPC2	<i>Two pore calcium channel protein 2</i>
TPI	<i>Triosephosphate isomerase</i>
UTP	<i>Uridine triphosphate</i>
UDP	<i>Uridine diphosphate</i>
uPA	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i>

Resumen



## RESUMEN

El hígado es un órgano capaz de regenerarse. La regeneración hepática precisa de una activación organizada y secuencial de sucesos que conllevan a la recuperación de la masa hepática. Durante este proceso el hígado debe de mantener sus funciones vitales, como el mantenimiento de la homeostasis de glucosa en sangre mediante la glucogenólisis y la gluconeogénesis. En situaciones de estrés, el aminoácido L-alanina es el principal sustrato gluconeogénico captado por el hígado. Este aminoácido se internaliza mediante los transportadores del Sistema A. Estudios previos han demostrado que la proteína Anexina A6 regula el tráfico de membranas en las vías de endocitosis y exocitosis. Esta proteína representa un 0.25% de la proteína hepática total, pero su función en la fisiología de este órgano permanece desconocida. Para determinar su función, se realizó un estudio de regeneración hepática en ratones control (wt) y en ratones que presentan la proteína Anexina A6 deplecionada (AnxA6ko).

Los resultados del laboratorio mostraron una baja supervivencia a las 72 horas post-cirugía de los ratones AnxA6ko ( $18.5 \pm 7.5\%$ ) en comparación con los ratones wt ( $90 \pm 6.4\%$ ) debido a una severa y progresiva hipoglucemia. La administración de glucosa o la expresión de Anexina A6 restrictivamente en el hígado, rescata la supervivencia de los ratones AnxA6ko post hepatectomía parcial. Los hepatocitos aislados de los ratones AnxA6ko mostraron una incapacidad de producir glucosa a partir de L-alanina, debido a que el transportador SNAT4 no puede reciclarse a la membrana plasmática sinusoidal post hepatectomía parcial.

Se concluye que la proteína Anexina A6 es esencial para realizar la gluconeogénesis a partir de L-alanina y para una correcta regeneración hepática.



## SUMMARY

The liver is an organ that can regenerate. Liver regeneration requires an organized and sequential activation of events that leads to the recovery of liver mass. During this process, the liver must maintain its vital functions, such as the maintenance of blood glucose homeostasis through glycogenolysis and gluconeogenesis. In stressful situations, the amino acid L-alanine is the main gluconeogenic substrate captured by the liver. This amino acid is internalized by System A transporters. Previous studies have shown that Annexin A6 protein regulates membrane traffic in the endocytic and exocytic pathways. This protein represents 0.25% of total liver protein, but its function in hepatic physiology remains unknown. To determine its function, a liver regeneration study was carried out in control mice (wt) and in mice with Annexin A6 protein depletion (AnxA6ko).

Laboratory results showed a low survival at 72 hours post-surgery of AnxA6ko mice ( $18.5 \pm 7.5\%$ ) compared to wt mice ( $90 \pm 6.4\%$ ) due to severe and progressive hypoglycemia. Both the administration of glucose and the restrictive restoration of Annexin A6 expression in the liver, rescue the survival of AnxA6ko mice after partial hepatectomy. Hepatocytes isolated from AnxA6ko mice showed an inability to produce glucose from L-alanine, because the SNAT4 transporter cannot be recycled to the sinusoidal plasma membrane following partial hepatectomy.

In conclusion, the Annexin A6 protein is essential for gluconeogenesis from L-alanine and for proper liver regeneration.





# Introducción

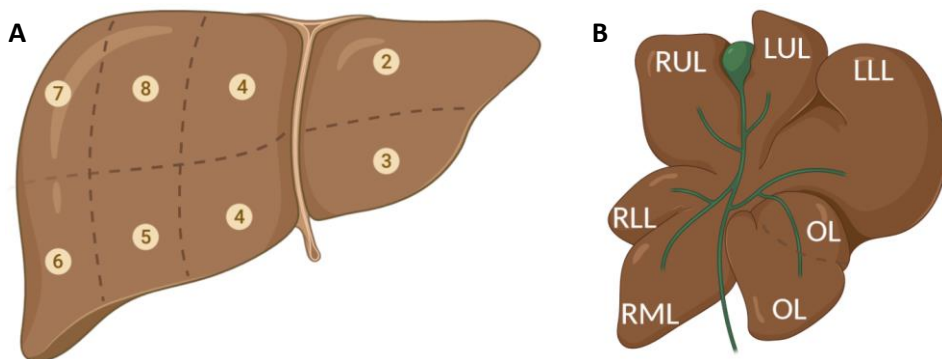


## 1. El hígado.

El hígado es el órgano más importante en la detoxificación del cuerpo humano y presenta un papel clave en la homeostasis metabólica. Es el órgano encargado de la síntesis de moléculas esenciales, de extraer y metabolizar una gran variedad de nutrientes, de almacenar y excretar los productos metabólicos, de neutralizar determinados antígenos y microbios procedentes del intestino, así como de la redistribución de los hidratos de carbono, proteínas, lípidos y vitaminas.<sup>1,2</sup>

### 1.1 Estructura del hígado.

La gran variedad de funciones que presenta el hígado requiere de una compleja estructura con un tejido multicelular.<sup>2</sup> El hígado humano posee una arquitectura que difiere del hígado de los roedores (Figura 1). En términos anatómicos se divide en dos lóbulos, el lóbulo derecho y el lóbulo izquierdo mediante el ligamento falciforme, aunque funcionalmente se clasifica en ocho unidades.<sup>3</sup> Sin embargo, el hígado de ratón se divide en siete lóbulos independientes y contiene vesícula biliar a diferencia del hígado de otros roedores como las ratas.<sup>4</sup> Los siete lóbulos que forman el hígado de ratón son: el inferior derecho (*right lower lobe*, RLL), superior derecho (*right upper lobe*, RUL), medial derecho (*right middle lobe*, RML), inferior izquierdo (*left lower lobe*, LLL), superior izquierdo (*left upper lobe*, LUL) y lóbulo omental (*omental lobe*, OL).<sup>5</sup>



**Figura 1.** A) Esquema del hígado humano que muestra el lóbulo izquierdo con la división funcional 2 y 3, y el lóbulo derecho con las divisiones funcionales 4, 5, 6, 7, y 8, separados por el ligamento falciforme.<sup>3</sup> B) Esquema del hígado de ratón con la clasificación de los siete lóbulos independientes que lo componen.<sup>5</sup>

## **1.2 Las células del hígado.**

El tejido funcional o parénquima hepático se compone de siete tipos celulares diferentes entre los que encontramos a los hepatocitos o células parenquimáticas y las células no parenquimáticas, las células endoteliales, células de Kupffer, células estrelladas, linfocitos, colangiocitos y células dendríticas.<sup>6</sup> Este conjunto de células confiere al hígado la capacidad de sintetizar, metabolizar y eliminar una gran variedad de moléculas.<sup>2</sup>

### **1.2.1 Hepatocitos.**

Los hepatocitos son las células predominantes del parénquima del hígado en cuanto al volumen y área de superficie de membrana ocupando el 78% del volumen celular.<sup>6</sup> Aunque no son capaces de realizar todas las funciones esenciales del hígado son las células responsables de la mayoría de la síntesis y de las funciones metabólicas hepáticas.<sup>2</sup> Presentan un tamaño entre 25-30  $\mu\text{m}$ , con un 35% de espacios sinusoidales en la superficie total del hepatocito.<sup>7</sup> En los espacios sinusoidales se realiza la captación de numerosas moléculas que circulan por la sangre y la secreción simultánea de compuestos sintetizados por los hepatocitos mientras que en la membrana canalicular se realiza la secreción biliar.<sup>2</sup>

### **1.2.2 Células endoteliales.**

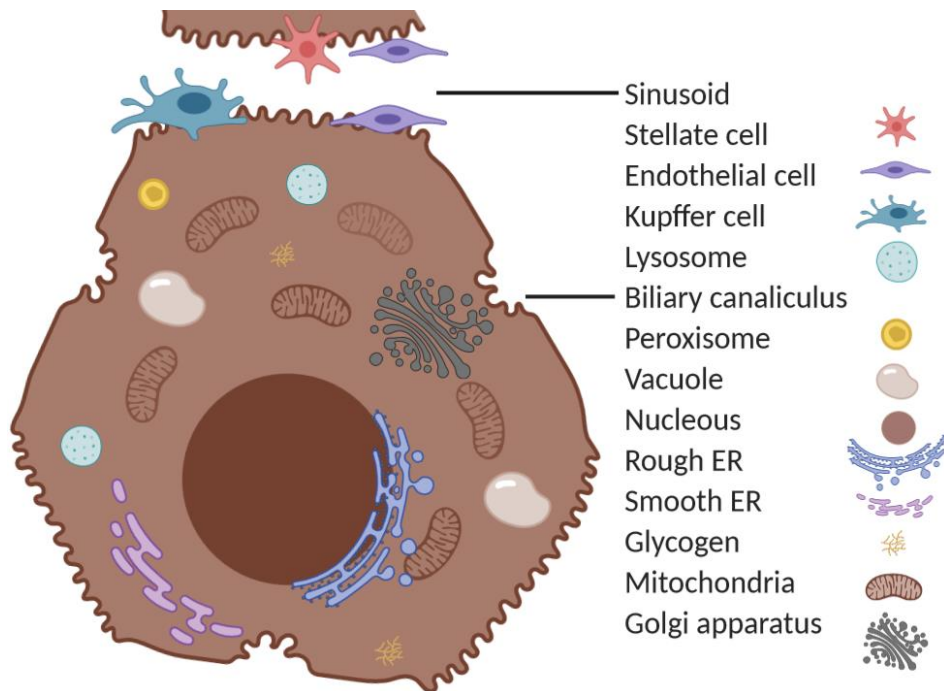
Las células endoteliales representan el 3% de la composición hepática total<sup>6</sup> y recubren el sinusoides del hígado (Figura 2), lugar donde se lleva a cabo la absorción de nutrientes.<sup>8</sup> El sinusoides carece de membrana basal pero está recubierto de diversas moléculas que permiten el intercambio de nutrientes con la sangre circulante.<sup>2</sup>

### **1.2.3 Células de Kupffer.**

Las células de Kupffer son el 2% de la composición hepática total. Presentan diferentes lugares de localización como el lumen sinusoidal, entre células endoteliales y en el espacio de Disse.<sup>6</sup> Estas células desempeñan diversas funciones como la fagocitosis y la producción de citoquinas,<sup>8</sup> las cuales, son determinantes en la coordinación de la respuesta al daño celular.<sup>2</sup>

### 1.2.4 Células estrelladas.

Las células estrelladas son las células encargadas de almacenar la vitamina A y de producir la matriz extracelular.<sup>8</sup> Componen el 1.5% de las células hepáticas y se encuentran en el espacio de Disse.<sup>6</sup> Son células esenciales en la amplificación y diferenciación de las células progenitoras del hígado.<sup>9</sup>



**Figura 2.** Representación esquemática de la localización de las células del hígado y distribución de los orgánulos celulares en el interior del hepatocito.<sup>3</sup>

### 1.2.5 Linfocitos y células dendríticas.

El hígado presenta un gran número de funciones tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa,<sup>10</sup> mediante diversas células del sistema inmune que residen en dicho órgano. Las células que regulan la respuesta inmune en el hígado son las células NK (*natural killer*), NKT (*natural killer T*), linfocitos T y las células dendríticas.<sup>2</sup> Estas células se localizan en el sinusoides y en los tractos portaes,<sup>10</sup> presentando un papel regulador determinante en la reparación del hígado ante una lesión o una pérdida celular.<sup>2</sup>

### **1.2.6 Colangiocitos.**

Las células denominadas colangiocitos componen menos del 1% del número total de las células en el hígado y la mayoría de estas células se encuentran localizadas en los conductos biliares y en el tracto portal. Su localización en el conducto biliar constituye una unidad metabólica que interviene en la secreción de bilis, líquidos y electrolitos en el canalículo biliar.<sup>2</sup>

## **1.3 La fisiología del hígado.**

El hígado desempeña múltiples y diversas funciones por lo que es un órgano central en el funcionamiento del organismo. Entre sus funciones principales se encuentra el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y lípidos.

### **1.3.1 Metabolismo de aminoácidos.**

Todos los aminoácidos presentes en el organismo comparten tres principios básicos. (1) El cuerpo humano no tiene un almacén de aminoácidos, por lo que los aminoácidos captados en la dieta son rápidamente metabolizados para la síntesis de proteínas. (2) El metabolismo de los aminoácidos no aumenta los niveles de amonio en la sangre. La mayor parte de la metabolización se lleva a cabo en el hígado que contiene además el ciclo de la urea y en el intestino, el cual, envía los productos nitrogenados rápidamente al hígado a través de la vena porta. (3) Muchos aminoácidos son gluconeogénicos por lo que se dirigen hacia órganos donde se realiza la síntesis de glucosa como el hígado y el riñón.<sup>11,12</sup> El hígado es el único órgano que dispone de todas las enzimas necesarias para metabolizar todos los aminoácidos.<sup>11</sup>

Los aminoácidos se clasifican en esenciales y no esenciales. Los aminoácidos esenciales se sintetizan en cantidades adecuadas por el organismo, pero deben de aportarse mediante la dieta para satisfacer las necesidades óptimas, en las cuales, el consumo es mayor que la síntesis. En este grupo se clasifican los aminoácidos arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina.<sup>13</sup> Los aminoácidos no esenciales se sintetizan en niveles óptimos por el organismo. En este grupo se encuentran

los aminoácidos alanina, aspargina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina, taurina y tirosina.<sup>13</sup>

De los 300 aminoácidos existentes, sólo 20 se utilizan en la síntesis de proteínas, pero muchos de ellos también presentan un papel determinante en el metabolismo celular. Cada aminoácido tiene su propia vía metabólica, aunque comparten características comunes.

La síntesis de los aminoácidos se lleva a cabo en diferentes tejidos. En cuanto a la degradación, la oxidación completa del esqueleto carbonado se realiza mediante la conversión a acetil-CoA que se oxida a dióxido de carbono y agua en el ciclo de Krebs y en el sistema de transporte de electrones mitocondrial.<sup>13</sup>

Singularmente, el aminoácido glutamina se sintetiza a partir de aminoácidos de cadena ramificada y  $\alpha$ -cetoglutarato en el músculo esquelético, tejido adiposo<sup>14</sup> y placenta.<sup>15</sup> En lo referente a su degradación, la glutamina se convierte en glutamato mediante la enzima glutaminasa y el glutamato generado se transforma en  $\alpha$ -cetoglutarato catalizado por la enzima glutamato deshidrogenasa. A diferencia de la glutamina, determinados aminoácidos como la metionina, fenilalanina, lisina, treonina e histidina se metabolizan en el intestino delgado.<sup>16</sup>

La síntesis y degradación de aminoácidos se encuentra estrechamente relacionada puesto que la degradación de algunos aminoácidos da lugar a la formación de otros actuando como precursores. El aminoácido glicina se convierte en serina mediante la catálisis de la enzima hidroximetiltransferasa. El aminoácido arginina forma citrulina a través de su hidroxilación por la enzima óxido nítrico sintasa o proporciona ornitina mediante su hidrólisis. De igual manera, el aminoácido prolina se puede oxidar a pirrolina-5-carboxilato<sup>13</sup> o también puede formar ornitina, citrulina y arginina mediante su degradación por la enzima prolina oxidasa en los enterocitos.<sup>17</sup> Esta citrulina secretada por el intestino delgado se convierte en arginina en el riñón, aunque su conversión puede llevarse a cabo en otros tipos celulares.<sup>18</sup>



Además de la síntesis y la degradación, el transporte de aminoácidos es activo y regula el proceso que proporciona aminoácidos para la síntesis de proteínas.<sup>11</sup>

Los transportadores de aminoácidos son proteínas que se encuentran en la membrana plasmática y transfieren los aminoácidos del exterior celular hacia el interior celular.<sup>19</sup> Se encuentran clasificados en diferentes sistemas de transporte y presentan diversas funciones que engloban desde la neurotransmisión, el balance ácido-base y el metabolismo energético intracelular hasta las reacciones anabólicas y catabólicas.<sup>19</sup> Estos transportadores se clasifican atendiendo al tipo de transporte que realizan y a las similitudes estructurales entre los aminoácidos que transportan. Los aminoácidos se agrupan en neutros, catiónicos y aniónicos y el transporte puede ser dependiente o independiente de sodio.<sup>20</sup> En la tabla 1 se muestra un esquema de los diferentes sistemas de transporte de aminoácidos.<sup>20-29</sup>

**Tabla 1.** Clasificación de los diferentes sistemas de transporte de aminoácidos.

Sistema	Gen	Proteína	Aminoácidos	Transporte	Expresión
A	SLC38A1	SNAT1	Neutros	Co/Na <sup>+</sup>	Ubicua
A	SLC38A2	SNAT2	Neutros	Co/Na <sup>+</sup>	Ubicua
A	SLC38A4	SNAT4	Neutros	Co/Na <sup>+</sup>	Hígado
ASC	SLC1A4	ASCT1	Neutros	Co/Na <sup>+</sup>	Cerebro, glándula adrenal y endometrio
ASC	SLC1A5	ASCT2	Neutros	Co/Na <sup>+</sup>	Cerebro, glándula urinaria, próstata, colon y médula ósea
N	SLC38A3	SNAT3	Neutros	Co/Na <sup>+</sup> y A/H <sup>+</sup>	Hígado, cerebro y páncreas
N	SLC38A5	SNAT5	Neutros	Co/Na <sup>+</sup> y A/H <sup>+</sup>	Cérvix, hígado, vejiga, esófago, intestino, riñón, hueso y pulmón
N	SLC38A7	SNAT7	Neutros	Co/Na <sup>+</sup>	Ubicua
L	SLC7A8	LAT2	Neutros	I/Na <sup>+</sup>	Intestino, placenta, riñón y músculo esquelético
B <sup>0,+</sup>	SLC6A14	Atb0+	Catiónicos	Co/Na <sup>+</sup>	Apéndice,

$y^+$	SLC7A1	Cat1	Catiónicos	I/Na <sup>+</sup>	colon, pulmón, estómago y vejiga Ovario, glándula adrenal e intestino
$b^{o,+}$	SLC3A1	rBAT	Catiónicos	I/Na <sup>+</sup>	Cerebro, duodeno, riñón e intestino
$y^+L$	SLC3A2	4F2hc	Catiónicos	I/Na <sup>+</sup>	Médula ósea, placenta, testículos, cerebro y riñón
$X_{AG}^-$	SLC1A1	EAAC1	Aniónicos	Co/Na <sup>+</sup>	Cerebro, hígado, vesícula biliar intestino delgado, glándula tiroidea, riñón y páncreas
$X_c^-$	SLC7A11	CCBR1	Aniónicos	Co/Na <sup>+</sup>	Cerebro, vejiga, estómago y glándula tiroidea
$X_c^-$	SLC17A1	NPT1	Aniónicos	Co/Na <sup>+</sup>	Hígado, riñón y testículos

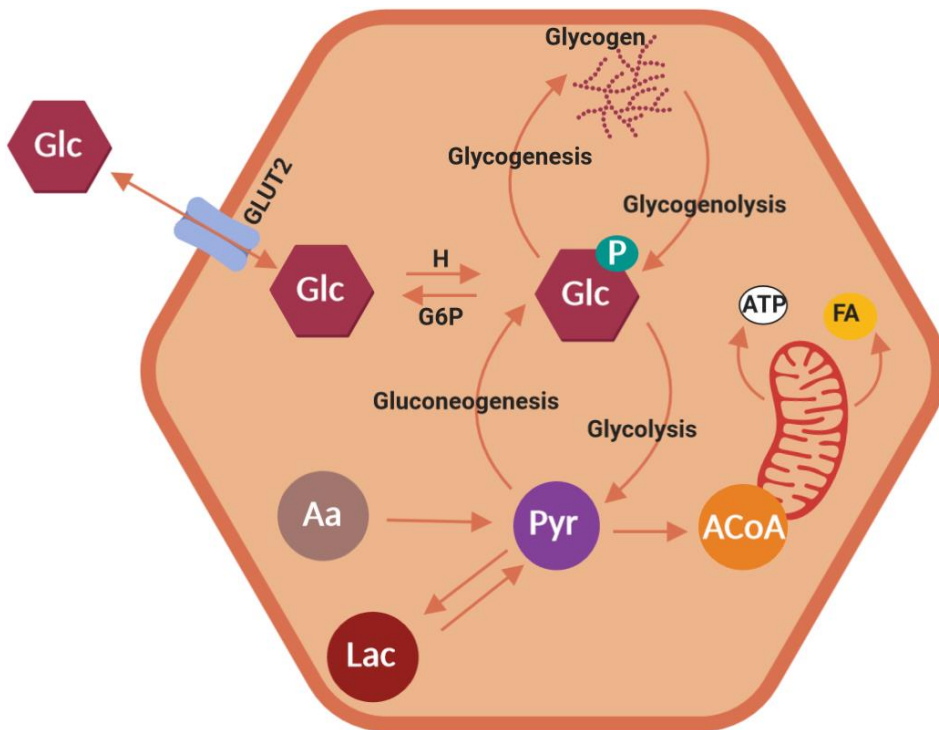
**Nota:** Co-transporte (Co), Sodio (Na<sup>+</sup>), antiportador (A), protón (H<sup>+</sup>), independiente de (I).

Mediante transporte activo los aminoácidos neutros que poseen una cadena lateral pequeña son transportados por los Sistemas A y ASC al interior celular junto a un átomo de sodio, mientras que los aminoácidos neutros con una cadena lateral voluminosa son transportados por el Sistema L mediante transporte activo independiente de sodio. Los principales sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos son los que transportan aminoácidos neutros como L-alanina, serina, cisteína y glutamina.<sup>20</sup>

En ayuno los aminoácidos que proceden de la proteólisis muscular son el principal sustrato captado por el hígado. Los aminoácidos L-alanina y prolina se metabolizan en el hígado.<sup>11</sup> Una vez en el hígado, los esqueletos de carbón de estos aminoácidos no pueden ser oxidados en su totalidad debido al exceso de adenosín trifosfato (*adenosine triphosphate*, ATP) que se produce en el hígado, por lo que los aminoácidos se oxidan para formar glucosa.<sup>30</sup>

### 1.3.2 Metabolismo de carbohidratos.

La función principal del hígado en relación con el metabolismo de los carbohidratos es el mantenimiento de la homeostasis de glucosa en sangre.<sup>3</sup> El mantenimiento de los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo viene determinado por varios procesos metabólicos hepáticos como son: la captación de glucosa, la glucólisis, la glucogénesis, la glucogenólisis y la gluconeogénesis (Figura 3).<sup>3</sup>



**Figura 3.** Representación esquemática de los mecanismos encargados del mantenimiento de la homeostasis de glucosa en sangre.<sup>3</sup> Glucosa (*glucose*, Glc), hexoquinasa (*hexokinase*, H), glucosa-6-fosfatasa (*glucose-6-phosphatase*, G6P), aminoácidos (*amino acids*, Aa), piruvato (*piruvate*, Pyr), lactato (*lactate*, Lac), acetil coenzima A (*acetyl coenzyme A*, ACoA), adenosín trifosfato (*adenosine triphosphate*, ATP) y ácidos grasos (*fatty acids*, FA).

#### 1.3.2.1 Captación de glucosa por los hepatocitos.

El transportador de glucosa 2 (GLUT2) presente en el hepatocito es el encargado de captar la glucosa que circula por el torrente sanguíneo en estado postprandial.<sup>1</sup> GLUT2 realiza un transporte pasivo bidireccional de glucosa

gracias a su elevada capacidad de transporte y su baja afinidad por la glucosa.<sup>31</sup> Una vez la glucosa se encuentra localizada en el hepatocito se fosforila por la enzima hexoquinasa para dar lugar a glucosa-6-fosfato. El aumento de los niveles de glucosa-6-fosfato en el interior del hepatocito promueve la activación de la enzima glucógeno sintasa mediante su desfosforilación para la síntesis del polisacárido de reserva de la glucosa, el glucógeno.<sup>32</sup>

En ayuno la enzima hexoquinasa se encuentra inactiva e interacciona con su proteína reguladora dentro del núcleo. Sin embargo, al incrementar los niveles de glucosa en el plasma sanguíneo, la acción de la insulina provoca una rápida separación de la hexoquinasa de su receptor y cambia su localización desde el núcleo hacia el citoplasma.<sup>33</sup>

#### 1.3.2.2 Glucólisis y glucogénesis.

La glucólisis es un proceso de diez reacciones enzimáticas en el cual la glucosa se degrada a dos moléculas de piruvato por cada molécula de glucosa oxidada mediante un proceso catabólico que consta de dos fases, una primera fase de gasto de energía mediante el consumo de dos moléculas de dinucleótido de nicotinamida y adenina (*nicotine adenine dinucleotide*,  $\text{NAD}^+$ ) en su forma oxidada y dos moléculas de adenosín difosfato (*adenosine diphosphate*, ADP), y una segunda fase en la que se obtiene energía con la ganancia de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH en su forma reducida.<sup>1</sup>

La glucólisis se regula enzimáticamente por tres pasos irreversibles de la ruta. La primera reacción que corresponde con el primer paso es la reacción de formación de glucosa-6-fosfato a partir de glucosa catalizada por la enzima hexoquinasa. En el segundo paso de la vía que coincide con la tercera reacción de la ruta, la enzima fosfofructoquinasa-1 cataliza la conversión de la fructosa-6-fosfato para obtener fructosa-1,6-bifosfato. El último paso de la vía de la glucólisis, el cual, corresponde a la tercera reacción irreversible es la obtención de piruvato a partir del sustrato intermedio fosfoenolpiruvato, reacción catalizada por la enzima piruvato quinasa.<sup>1</sup>

El glucógeno es el polisacárido de reserva de la glucosa frente a elevados niveles de glucosa en sangre. Se encuentra almacenado en el hígado y en el músculo de los mamíferos. La enzima glucógeno sintasa se encarga de catalizar la síntesis de glucógeno en varios pasos. El primer paso es la formación de glucosa-6-fosfato a partir de glucosa catalizada por la enzima hexoquinasa.<sup>1</sup> El segundo paso de la vía es la transformación de la glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato mediante la enzima fosfoglucomutasa.<sup>34</sup> Posteriormente, la enzima UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa cataliza la reacción de glucosa-1-fosfato y el gasto de una molécula de uridina trifosfato (*uridine triphosphate*, UTP) para la obtención de UDP-glucosa. Por último, la enzima glucógeno sintasa une moléculas de UDP-glucosa mediante enlaces  $\alpha$ -1,4 y la liberación de una molécula de uridina difosfato (*uridine diphosphate*, UDP).<sup>34</sup>

#### 1.3.2.3 Glucogenólisis y gluconeogénesis.

El hígado es el órgano encargado de proporcionar energía al organismo. En situaciones de ayuno aporta energía mediante la glucogenólisis o la gluconeogénesis.<sup>1</sup> La glucogenólisis consiste en la ruptura del polímero de glucógeno para la obtención de glucosa-6-fosfato. En el primer paso la enzima glucógeno fosforilasa cataliza la ruptura de los enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos para obtener glucosa-1-fosfato. En el siguiente paso, la enzima fosfoglucomutasa transforma la glucosa-1-fosfato a glucosa-6-fosfato.<sup>34</sup> La acción de la enzima glucógeno fosforilasa se determina por la activación alostérica de adenosín monofosfato (*adenosine monophosphate*, AMP) y mediante la proteína quinasa A (*protein kinase A*, PKA).<sup>1</sup> La glucosa-6-fosfato sintetizada tiene tres destinos diferentes posibles como son la glucólisis, la vía de las pentosas y la gluconeogénesis.<sup>35</sup>

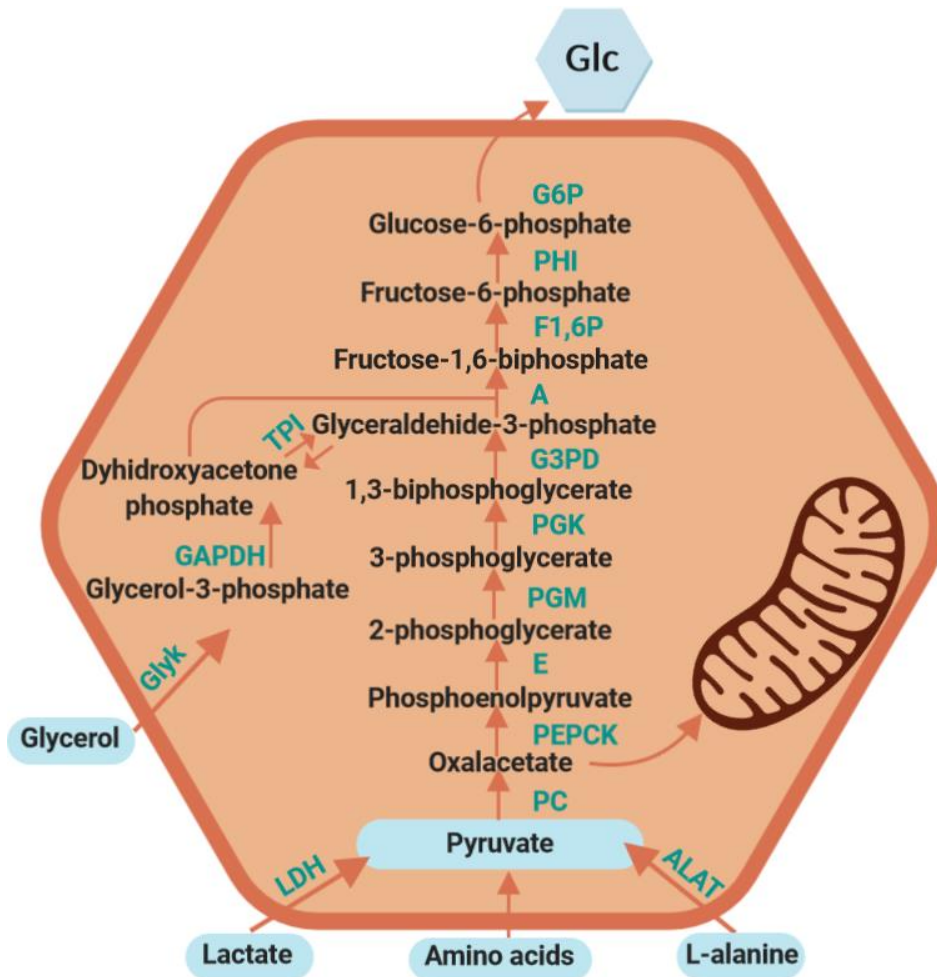
La gluconeogénesis tiene lugar mayoritariamente en el hígado en largos periodos de ayuno. Es una ruta metabólica anabólica de síntesis de glucosa a partir de aminoácidos precursores de piruvato y/o a partir de intermedios metabólicos del ciclo de Krebs.<sup>36</sup> Las principales enzimas de la vía son las enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la fructosa-1,6-bifosfatasa y la glucosa-6-fosfatasa.<sup>1</sup> Los sustratos gluconeogénicos pueden ser sintetizados en el hígado o captados en la circulación procedentes de otros tejidos.

El lactato se oxida por la enzima lactato deshidrogenasa para formar piruvato en los primeros pasos de la vía<sup>36</sup> y el aminoácido L-alanina se convierte en piruvato mediante la desaminación llevada a cabo por la enzima alanina aminotransferasa (Figura 4).<sup>37</sup> En la mitocondria el piruvato se convierte en oxalacetato por la enzima piruvato carboxilasa.<sup>36</sup> El oxalacetato obtenido se reduce a malato por la enzima mitocondrial malato deshidrogenasa para su posterior exportación y oxidación a oxalacetato en el citoplasma celular por la enzima citoplasmática malato deshidrogenasa. El oxalacetato citoplasmático se convierte en fosfoenolpiruvato mediante la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.<sup>36</sup> El intermediario fosfoenolpiruvato se hidrata a través de la enzima enolasa para dar lugar a glicerato-2-fosfato, el cual, es catalizado por la enzima fosfoglicerato mutasa formando glicerato-3-fosfato. Este producto se transforma en glicerato-1,3-bifosfato mediante la enzima fosfoglicerato quinasa y el consumo de una molécula de AMP. La enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa cataliza la reacción de formación de gliceraldehído-3-fosfato a partir de glicerato-1,3-bifosfato. El producto final de esta fase de la vía es la formación de fructosa-1,6-bifosfato a partir de los sustratos intermediarios gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato mediante la enzima aldolasa.<sup>37</sup> La enzima fructosa-1,6-bifosfatasa se encarga de la conversión de fructosa-1,6-bifosfato a fructosa-6-fosfato, la cual, se convierte en glucosa-6-fosfato por la enzima fosfohexosa isomerasa. En el retículo endoplasmático la glucosa-6-fosfato sintetizada se desfosforila a través de la enzima glucosa-6-fosfatasa para dar lugar a la molécula de glucosa (Figura 4).<sup>36</sup>

#### 1.3.2.4 Regulación de la gluconeogénesis.

La velocidad de la gluconeogénesis depende de la disponibilidad de sustrato, de la acción de los efectores alostéricos y de las hormonas. Se estimula en presencia de elevadas concentraciones de aminoácidos, lactato y glicerol.<sup>37</sup> Las hormonas como la insulina, el glucagón o los glucocorticoides contralan la transcripción génica de las principales enzimas reguladoras de la gluconeogénesis: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, fructosa-1,6-bifosfatasa y glucosa-6-fosfatasa.<sup>36,37</sup> El glucagón y los corticoides son las hormonas

encargadas de estimular la producción de la glucosa en el hígado, mientras que la insulina y la fructosa-2,6-bifosfato inhiben la gluconeogénesis.<sup>37,38</sup>

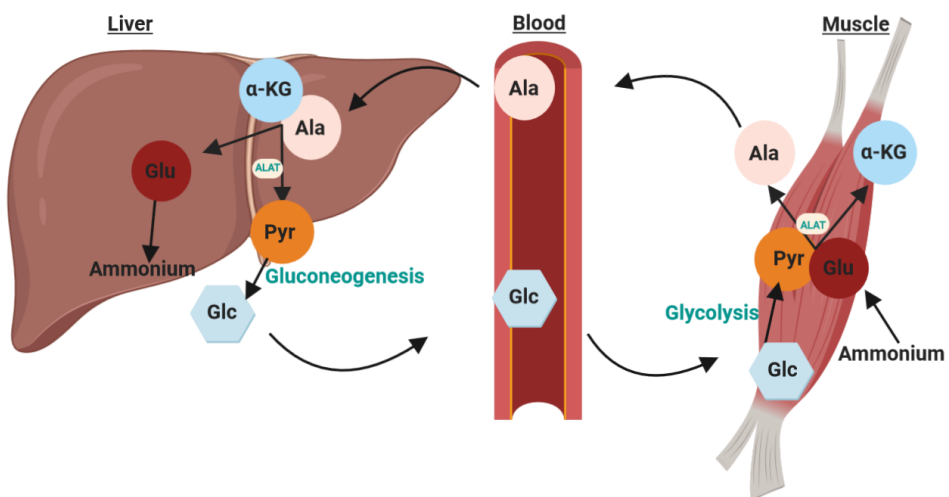


**Figura 4.** Representación esquemática de la síntesis de glucosa en el hepatocito.<sup>37</sup> La figura muestra los sustratos gluconeogénicos, los intermediarios de la vía y las enzimas que componen la gluconeogénesis. Lactato deshidrogenasa (*Lactate dehydrogenase*, LDH), alanina aminotransferasa (*alanine transaminase*, ALAT), piruvato carboxilasa (*pyruvate carboxylase*, PC), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*, PEPCK), enolasa (*enolase*, E), fosfoglicerato mutasa (*phosphoglycerate mutase*, PGM), fosfoglicerato quinasa (*phosphoglycerate kinase*, PGK), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, G3PD), aldolasa (*aldolase*, A), fructosa-1,6-bifosfatasa (*fructose-1,6-biphosphatase*, F1,6P), fosfohexosa isomerasa (*phosphohexose isomerase*, PHI), glucosa-6-fosfatasa (*glucose-6-phosphatase*, G6P), glicerol quinasa (*glycerol kinase*, GlyK), gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde phosphate dehydrogenase*, GAPDH) y triosofosfato isomerasa (*triosephosphate isomerase*, TPI).

### 1.3.2.5 Ciclo glucosa-alanina.

En ejercicio prolongado el músculo degrada aminoácidos ramificados, que proceden de la proteólisis, para la obtención de piruvato. Los grupos amino en el músculo forman glutamato mediante una reacción de transaminación.

La enzima alanina aminotransferasa cataliza la cesión del grupo  $\alpha$ -amino del glutamato al piruvato para dar lugar a  $\alpha$ -cetoglutarato y L-alanina, la cual, se secreta al torrente sanguíneo donde viaja hasta el hígado.<sup>37</sup> Una vez en el hígado, el aminoácido L-alanina se convierte en piruvato mediante su desaminación llevada a cabo por la enzima alanina aminotransferasa para ser utilizado en la gluconeogénesis y el grupo amino se incorpora al ciclo de la urea. En el músculo no se puede realizar el ciclo de la urea a partir del nitrógeno que poseen los aminoácidos por lo que se utiliza el ciclo glucosa-alanina para transferir el nitrógeno amino al hígado. El ciclo de glucosa-alanina o Ciclo de Cahill también es necesario para el reciclaje de los cetoácidos  $\alpha$  entre el músculo y el hígado (Figura 5).<sup>37</sup>



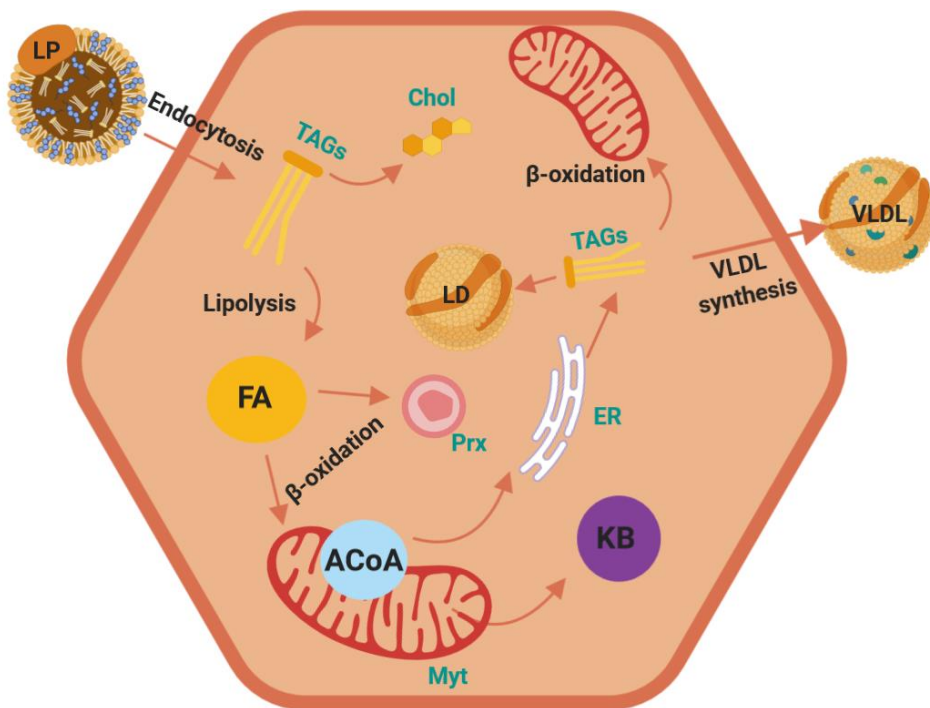
**Figura 5.** Representación esquemática del ciclo de la glucosa-alanina o Ciclo de Cahill.<sup>37</sup> En el músculo se lleva a cabo la degradación de glucosa en piruvato y mediante la cesión del grupo  $\alpha$ -amino del glutamato al piruvato se forma  $\alpha$ -cetoglutarato y L-alanina, la cual, se secreta al torrente sanguíneo y es captada por los hepatocitos en el hígado para realizar la gluconeogénesis y liberar glucosa al torrente sanguíneo. Alanina aminotransferasa (*alanine transaminase*, ALAT) glucosa (*glucosa*, Glc), piruvato (*pyruvate*, Pyr), glutamato (*glutamate*, Glu), L-alanina (*L-alanine*, Ala) y  $\alpha$ -cetoglutarato ( *$\alpha$ -ketoglutarate*,  $\alpha$ -KG).



### 1.3.3 Metabolismo de lípidos.

El metabolismo hepático lipídico requiere de una coordinación precisa de hormonas, receptores nucleares, vías de señalización intracelulares y factores de transcripción.<sup>1</sup> Las vías catabólicas y metabólicas pueden estar separadas, aunque comparten metabolitos intermedios y receptores de señalización.<sup>1</sup>

El hígado está presente en el metabolismo de los lípidos en todo el organismo, regulando la captación y metabolización de lípidos extrahepáticos, la lipogénesis hepática, la captación de ácidos grasos y su posterior oxidación. En la figura 6 se esquematizan los diferentes ciclos del metabolismo de los lípidos en el hígado.



**Figura 6.** Representación esquemática del metabolismo lipídico en el hepatocito. Lipoproteínas (*lipoproteins*, LP), triglicéridos, (*triglycerids*, TAGs), cuerpos cetónicos (*ketone bodies*, KB), colesterol (*cholesterol*, chol), retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum*, ER), mitocondria (*mitochondria*, M), peroxisoma (*peroxisome*, Prx), cuerpos lipídicos (*lipid droplets*, LD), ácidos grasos (*fatty acids*, FA), lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoproteins*, VLDL) y acetil coenzima A (*acetyl coenzyme A*, ACoA).

#### 1.3.3.1 Metabolismo de lípidos extrahepático.

Las grasas procedentes de los alimentos se absorben en el intestino por los enterocitos y se convierten en triglicéridos. Dentro del enterocito los triglicéridos se unen a fosfolípidos, apoproteínas y colesterol constituyendo agregados proteicos denominados quilomicrones.<sup>1</sup> Los quilomicrones se secretan al torrente sanguíneo y reemplazan sus apolipoproteínas (Apo) Apo-A1 y Apo-A4 por las apolipoproteínas Apo-E y Apo-C2.<sup>1</sup> En este proceso la apolipoproteína Apo-C2 induce la activación de la lipoproteína lipasa, la cual, se encarga de regular los niveles de triglicéridos y lipoproteínas de alta densidad en el plasma,<sup>39</sup> convirtiendo los triglicéridos presentes en los quilomicrones a ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos obtenidos son captados y almacenados en los adipocitos.<sup>1</sup>

#### 1.3.3.2 Lipogénesis hepática.

La lipogénesis hepática se caracteriza por la síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir de acetil coenzima A (*acetyl coenzyme A*, acetil-CoA) o malonil coenzima A (*malonil coenzyme A*, malonil-CoA) y su posterior conversión a triglicéridos.<sup>1</sup> Acetil-CoA se sintetiza en la mitocondria a partir de piruvato, reacción catalizada por el complejo mitocondrial piruvato deshidrogenasa. La acetil-CoA sintetizada junto con el oxalacetato presente en la mitocondria da lugar a citrato mediante la reacción enzimática catalizada por la enzima citrato sintasa. El citrato formado se exporta al citoplasma y se separa en sus componentes previos acetil-CoA y oxalacetato mediante la enzima ATP-citrato liasa. En el citosol la acetil-CoA da lugar a malonil-CoA mediante su carboxilación llevada a cabo por la enzima acetil-CoA carboxilasa. Malonil-coA y NADPH son catalizados por la enzima sintasa de ácidos grasos formando ácido palmítico. En el retículo endoplasmático el ácido palmítico genera ácidos grasos de cadena larga mediante la enzima elongasa.<sup>36</sup> Los ácidos grasos de cadena larga sintetizados se activan a través de la conversión a sus ésteres por la enzima acil-CoA sintetasa.<sup>40</sup> Posteriormente se produce una acilación sucesiva del esqueleto de glicerol-3-fosfato catalizada por las enzimas glicerol-3-fosfato-aciltransferasa que genera ácido fosfatídico, fosfatasa del ácido fosfatídico, las cuales, desfosforilan el diacilglicerol y la enzima diacilglicerol-

acil-transferasa que cataliza la acilación del diacilglicerol.<sup>40</sup> Los triglicéridos sintetizados pueden almacenarse como cuerpos lipídicos en los hepatocitos, pueden ser secretados al torrente sanguíneo como lipoproteínas de muy baja densidad o pueden ser hidrolizados mediante la  $\beta$ -oxidación para la posterior obtención de ácidos grasos.<sup>41</sup>

#### 1.3.3.3 Captación de ácidos grasos.

Los ácidos grasos libres que circulan en el plasma sanguíneo pueden ser captados por los hepatocitos mediante las proteínas transportadoras de ácidos grasos (*fatty acids transport protein*, FATP) y las proteínas de unión a ácidos grasos (*fatty acids binding protein*, FABP).<sup>36</sup> Las proteínas FATP presentan diferentes isoformas que se expresan en el hígado.<sup>42</sup> La isoforma FATP2 realiza la captación de los ácidos grasos no esterificados y de los ácidos grasos de cadena larga mediando su transporte hacia compartimentos subcelulares.<sup>43</sup> La isoforma FATP5 presenta una expresión restrictiva de hígado, se encuentra localizada en la membrana plasmática basal del hepatocito y realiza la captación de ácidos grasos de cadena larga y de triglicéridos.<sup>44</sup> Las proteínas FABP se unen a ácidos grasos de cadena larga actuando como chaperonas y transportadores intracelulares de ácidos grasos.<sup>36</sup>

#### 1.3.3.4 Oxidación de ácidos grasos.

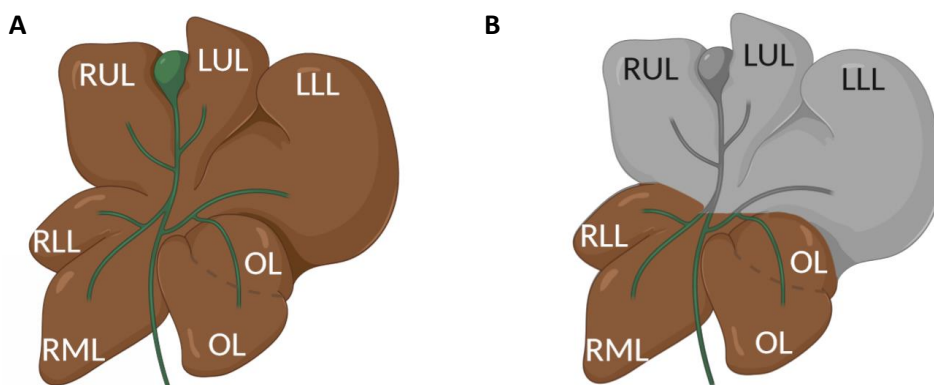
En ayuno se lleva a cabo un incremento de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos proporcionando energía y generando cuerpos cetónicos que se exportan al torrente sanguíneo como fuente de energía para el resto de tejidos.<sup>36</sup> La  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena corta y mediana se produce en la matriz mitocondrial y en los peroxisomas ya que estos ácidos grasos pueden atravesar la membrana mitocondrial,<sup>1</sup> sin embargo, los ácidos grasos de cadena larga necesitan ser activados y transportados a la membrana mitocondrial mediante la enzima carnitina palmitotransferasa-1.<sup>45</sup> El producto obtenido en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos es acetil-CoA. Los electrones se transfieren tanto al nucleótido de flavina y adenina como a la forma oxidada de  $\text{NAD}^+$  dando lugar a las formas reducidas de las coenzimas para proporcionar electrones a la cadena de transporte de electrones y llevar a cabo la síntesis de

ATP. El acetil-CoA formado puede oxidarse completamente hasta la obtención de dióxido de carbono en el ciclo del ácido tricarboxílico (*tricarboxylic acid cycle*, TCA).<sup>46</sup>

#### 1.4 Regeneración hepática.

El proceso de regeneración hepática en humanos y roedores presenta similitudes. Los resultados obtenidos de los roedores se pueden aplicar al hígado humano. En humanos el proceso de regeneración sucede rápidamente. La velocidad de la regeneración del hígado es proporcional a la cantidad del tejido hepático extraído.<sup>47</sup> La regeneración hepática es un proceso compensatorio que finaliza al reestablecerse la masa original del hígado por hiperplasia.<sup>8</sup>

Uno de los modelos de estudio utilizados en la investigación quirúrgica del hígado son los roedores. La técnica de hepatectomía parcial (*partial hepatectomy*, PHx) en el hígado de roedores se realiza para estudiar la regeneración del hígado, insuficiencias hepáticas agudas, la función hepática y la respuesta al estrés y trauma.<sup>4</sup> El modelo clásico de PHx realizado en rata se basa en el descrito por Higgins y Anderson de 1931 que consiste en la resección de 2/3 de la masa hepática.<sup>48</sup> Para obtener una extracción del 68% en ratones, Greene y Puder describieron la extirpación de los dos lóbulos superiores y del lóbulo inferior izquierdo (Figura 7).<sup>5</sup>



**Figura 7.** A) Representación esquemática del hígado de ratón. B) Representación esquemática del hígado de ratón post PHx. Resección de los lóbulos RUL (18%), LUL (15%) y LLL (35%) que corresponden a 2/3 de la masa hepática total. Hígado remanente, el cual, se regenera por hiperplasia: RLL (13%), RML (13%), OL (3%) y OL (3%).

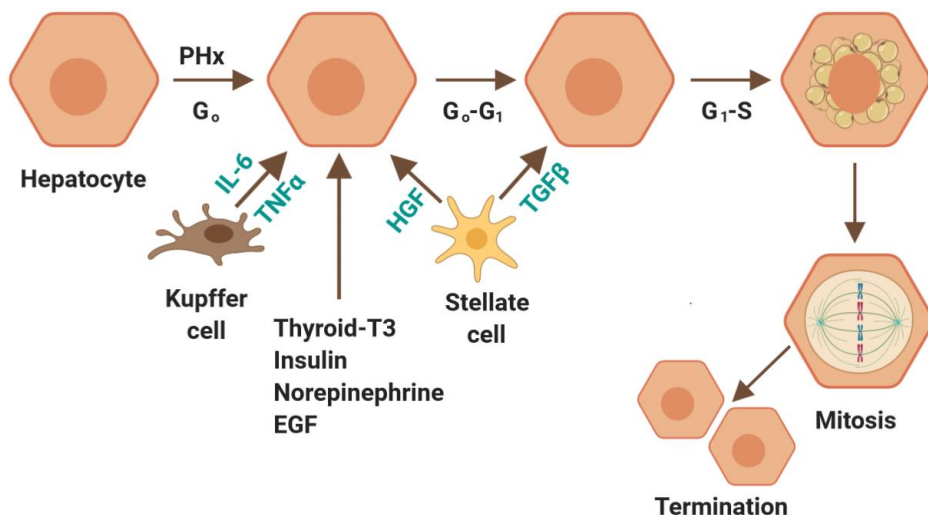
### 1.4.1 Fases de la regeneración hepática.

La regeneración del hígado tras una PHx presenta una enorme complejidad en cuanto a las vías de señalización de iniciación y terminación que siguen siendo un paradigma en la medicina regenerativa. El proceso de regeneración hepática compromete tanto a los hepatocitos como a las células estrelladas, células de Kupffer, células de los conductos biliares y a las células endoteliales del sinusoides.<sup>49</sup>

La regeneración hepática se estructura en tres fases características. La primera fase o fase de activación pre-replicativa inicia una cascada de señalización llevada a cabo por citoquinas que activan los factores de transcripción necesarios en la regeneración del hígado. En la segunda fase se lleva a cabo la síntesis de ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, ADN) y la mitosis siguiendo el proceso de regeneración hepática mediante la proliferación celular. La tercera y última fase es la fase de terminación, en la cual, se recupera la masa inicial del hígado por hiperplasia y se da por finalizado el proceso de regeneración hepática.<sup>8</sup>

#### 1.4.1.1 Fase de activación.

El proceso de regeneración hepática presenta una relevante implicación de citoquinas como las responsables de la transición del estado de quiescencia de los hepatocitos y de la entrada en el ciclo celular ( $G_0$ - $G_1$ ) y de factores de crecimiento que regulan la progresión en el ciclo celular (Figura 8). Las citoquinas implicadas son el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*tumor necrosis factor*, TNF $\alpha$ ) y la interleuquina 6 (*interleukin*, IL-6). Entre los factores de crecimiento se encuentran el factor de crecimiento de hepatocito (*hepatocyte growth factor*, HGF), el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF) y el factor de crecimiento tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (*tumor growth factor*, TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ ).<sup>8</sup>



**Figura 8.** Representación esquemática del proceso de regeneración hepática en los hepatocitos post PHx. El hepatocito se encuentra en estado quiescente ( $G_0$ ). Las células de Kupffer aumentan la producción de TNF $\alpha$  y de IL-6. Las células estrelladas incrementan la producción de HGF y TGF $\beta$ . Las células  $\beta$  del páncreas sintetizan y segregan insulina, el duodeno secreta EGF, la glándula adrenal secreta norepinefrina, la glándula tiroidea triyodotironina T3 y las células estrelladas HGF. Estas señales permiten a los hepatocitos entrar en el ciclo celular desde la fase  $G_0$  a las fases  $G_1$  y S. La fase  $G_1$  engloba tanto la fase de activación (1-12h) como la esteatosis (12-36h), mientras que en la fase S se produce la síntesis de ADN. Después de la mitosis celular (40-48h) se produce la fase de terminación y la regeneración hepática por hiperplasia.<sup>8</sup>

#### 1.4.1.1.1 Citoquinas.

Las citoquinas se unen a sus receptores dando lugar a señales intracelulares que permiten la activación de los factores de transcripción<sup>8</sup> como el factor NF- $\kappa\beta$  (*nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (*signal transducer and activator of transcription, STAT3*), los cuales, se activan a través de citoquinas post PHx.<sup>50</sup>

La citoquina IL-6 presenta un papel determinante en la fisiología hepática incluyendo la protección del hígado, la respuesta a la fase aguda y la mitosis.<sup>8</sup> Se ha descrito como la genoanulación de IL-6 en ratones altera la síntesis de ADN en los hepatocitos.<sup>51</sup> La unión de IL-6 a su receptor (*interleukin-6 receptor, IL-6R*) estimula la actividad tirosina quinasa de Janus 1 (*Janus kinase 1, JAK1*).<sup>52</sup> La activación de JAK1 induce la fosforilación de la glicoproteína 130 (*glycoprotein 130, gp130*) y de STAT3. La fosforilación de STAT3 produce su

dimerización y como consecuencia el posterior cambio de localización del dímero formado hacia el núcleo celular donde induce la activación de la transcripción de genes diana.<sup>8</sup> Por otro lado, la fosforilación de gp130 activa la cascada de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (*mitogen activated protein kinase*, MAPK) mediante un mecanismo desconocido.<sup>8</sup> Esta cascada de señalización es esencial para la proliferación celular regulando la progresión de la fase G1.<sup>53</sup> Las células de Kupffer regulan la capacidad regenerativa de los hepatocitos mediante la expresión de IL-6 en el hígado de ratón<sup>54</sup> junto con TNF $\alpha$ , el cual, aumenta la regulación de NF- $\kappa$ B, activando la transcripción de IL-6. Alrededor del 36% de los genes de expresión temprana que se activan durante el proceso de regeneración hepática en el hígado se regulan en mayor medida por IL-6.<sup>8</sup>

#### 1.4.1.1.2 Factores de crecimiento.

Además de las vías dependientes de citoquinas mencionadas anteriormente, determinados factores de crecimiento promueven la replicación celular durante la regeneración hepática.<sup>8</sup> El factor de crecimiento HGF y su receptor Met regulan varios procesos en el hígado como la proliferación celular del hepatocito<sup>55</sup> y es un inductor relevante en la síntesis de ADN.<sup>8</sup> Estudios *in vivo* llevados a cabo en ratas mostraron que el factor de crecimiento HGF presenta un papel clave en la regeneración del hígado tras un daño hepático.<sup>56</sup> El precursor de HGF se activa post PHx por proteasas como el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (*urokinase-type plasminogen activator*, uPA). El bloqueo del uPA retrasa la aparición de HGF y como consecuencia ralentiza el proceso de regeneración hepática. Sin embargo, al bloquear el inhibidor del uPA se produce una aceleración de la regeneración del hígado.<sup>57</sup>

La utilización de un modelo *in vivo* que presenta la proteína HGF deplecionada ha mostrado un fenotipo letal en estado embrionario<sup>55</sup> por lo que se ha utilizado un modelo *knockout* específico de hígado para estudiar las vías que regulan HGF/c-Met. La depleción de HGF/c-Met en el hígado de ratón afectó a la supervivencia del hepatocito y a la remodelación tisular en la regeneración hepática.<sup>58</sup>

La actividad mitogénica de HGF depende de la actividad endógena de TGF $\alpha$ .<sup>59</sup> El factor tumoral TGF $\alpha$  es un ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR). Se ha descrito que la depleción de EGFR en ratones conlleva a una muerte prematura<sup>60</sup> por lo que se creó un ratón que presentaba EGFR deplecionado en el hígado adulto. La realización de una PHx reveló un incremento en la mortalidad como consecuencia de un defecto de la proliferación de los hepatocitos, mostrando que EGFR es un regulador relevante en la proliferación celular en las fases iniciales de la regeneración hepática.<sup>61</sup>

#### 1.4.1.2 Fase de proliferación.

Los hepatocitos son células que permanecen en un estado quiescente ( $G_0$ ) en el que no realizan una división celular pero mantienen su capacidad de división en respuesta a un daño tóxico o a una infección.<sup>8</sup> Mientras que el 15% de los hepatocitos existentes previos a la cirugía no se dividen post PHx, el 11% se dividirá al menos 3 veces.<sup>62</sup>

Al realizar una PHx comienza la fase pre-replicativa con la transición de los hepatocitos quiescentes ( $G_0$ ) y la activación de los genes tempranos ( $G_1$ ), que finaliza con la síntesis de ADN (S).<sup>49</sup>

Los hepatocitos de ratón presentan un pico de síntesis de ADN a las 32 horas alcanzando un máximo en la síntesis de ADN a las 40 horas y desciende progresivamente hasta las 48 horas donde se mantiene a los mismos niveles de síntesis que a las 32 horas.<sup>63</sup> La síntesis de ADN es un proceso sincronizado que comienza en las células que rodean la vena porta y continúa en las células que rodean la vena central.<sup>8</sup>

#### 1.4.1.3 Fase de terminación.

El proceso de regeneración hepática finaliza al reestablecerse la masa hepática inicial.<sup>8</sup> La velocidad de regeneración es proporcional a la cantidad de tejido hepático extraído.<sup>47</sup> El mecanismo por el cual se regula el tamaño hepático se desconoce. En esta fase de terminación también se encuentran implicados los factores de crecimiento y las citoquinas regulando el tamaño del hígado.<sup>8</sup>



La interleuquina IL-6 es el principal regulador de los niveles de expresión del ácido ribonucleico mensajero (*messenger ribonucleic acid*, ARNm) de la proteína supresora de la señalización de citoquinas-3 (*suppressor of cytokine signaling-3*, SOCS-3) post PHx. A su vez, SOCS-3 disminuye la regulación de la señalización de STAT-3 mediante la interacción con las quinasas de Janus (*Janus kinases*, JAK).<sup>64</sup> La regulación positiva de IL-6, de SOCS y de algunos inhibidores de citoquinas podría bloquear su señalización y la de otras citoquinas.<sup>8</sup>

El factor de crecimiento TGF $\beta$  es el factor anti proliferativo más conocido en los hepatocitos. Se sintetiza en las células estrelladas y presenta unos niveles de expresión más elevados durante la regeneración hepática, sin embargo, se ha descrito que los hepatocitos se vuelven resistentes a TGF $\beta$  y pueden proliferar en su presencia durante la regeneración hepática.<sup>8</sup>

Las proteínas SMAD son los efectores intracelulares de la señalización de TGF $\beta$ . Estas proteínas se activan por receptores y una vez activas cambian su localización hacia el núcleo celular donde activan la transcripción de determinados genes.<sup>65</sup> Las proteínas SMAD se encuentran ligeramente activadas en los hepatocitos quiescentes pero su activación aumenta en la regeneración hepática. Los inhibidores de la vía TGF $\beta$ /Smad, SnoN y Ski, presentan un incremento de los niveles de expresión durante la regeneración del hígado. SnoN y Ski son represores de la transcripción y podrían provocar que las células sean resistentes a TGF $\beta$  mediante la unión a las proteínas SMAD ya que participan en el regreso de los hepatocitos al estado quiescente.<sup>66</sup> Este hecho explicaría la resistencia de los hepatocitos a TGF $\beta$  durante la fase de proliferación.<sup>8</sup>

#### **1.4.2 Metabolismo en la regeneración hepática.**

El hígado presenta una gran capacidad de regeneración hepática que requiere de señales intracelulares y extracelulares, sin embargo, los procesos que estimulan la regeneración hepática siguen siendo desconocidos. Estudios recientes sugieren que la respuesta metabólica a la insuficiencia hepática podría ser la señal que inicie la regeneración del hígado.<sup>67</sup>

Durante la regeneración hepática, el hígado debe mantener sus funciones metabólicas.<sup>67</sup> Los roedores expuestos a sustancias tóxicas para el hígado o que se les ha realizado una PHx desarrollan alteraciones en el metabolismo sistémico y hepático,<sup>68</sup> en los niveles de glucosa y en los niveles de metabolitos hepáticos que circulan por el torrente sanguíneo.<sup>67</sup>

En este bloque se resumirá el modelo metabólico durante la regeneración hepática donde se producen modificaciones metabólicas como respuesta al daño hepático afectando tanto al metabolismo de los aminoácidos, de los carbohidratos y de los lípidos.

#### 1.4.2.1 Metabolismo de aminoácidos.

Durante la regeneración hepática se produce un aumento del flujo de aminoácidos en el hígado.<sup>69,70</sup> El transporte y metabolismo de aminoácidos como nutrientes es necesario para una adecuada respuesta mitótica de los hepatocitos durante la regeneración hepática.<sup>70-72</sup> Estudios de expresión de genes relacionados con el metabolismo y el transporte de aminoácidos han revelado cambios de expresión significativos post-cirugía durante la regeneración del hígado en ratas.<sup>71</sup>

El transporte de aminoácidos en los hepatocitos se realiza mediante proteínas transportadoras de la membrana plasmática.<sup>73</sup> El Sistema A es el principal sistema de transporte de aminoácidos alifáticos<sup>74</sup> y aumenta su velocidad de captación de aminoácidos en hepatocitos post PHx<sup>75</sup> alcanzando su pico máximo de actividad a las 32 horas post-cirugía.<sup>70</sup> La captación de un análogo no metabolizable del aminoácido L-alanina reveló un aumento en la actividad del Sistema A<sup>76</sup> tras una PHx en ratas. Por otro lado, la actividad del Sistema N y del Sistema ASC no aumento durante la regeneración hepática.<sup>70</sup> La insulina induce un rápido cambio de localización del transportador del Sistema A, SNAT2, desde compartimentos vesiculares hacia la superficie celular.<sup>77</sup> La administración del análogo de L-alanina también mostró una disminución en la incorporación de timidina durante la síntesis de ADN y en la recuperación de la masa hepática. Los estudios realizados en hepatocitos aislados mostraron una disminución en la proliferación de estas células.<sup>75</sup>

Los aminoácidos de cadena ramificada como son la leucina y la isoleucina presentan una disminución en el torrente sanguíneo frente a un daño hepático como la cirrosis. La presencia de estos aminoácidos favorece la regeneración hepática, la síntesis de proteínas, la secreción de HGF y la inhibición de la proteólisis.<sup>78</sup> Estas evidencias muestran una alteración en el metabolismo de los aminoácidos en respuesta a una insuficiencia hepática.<sup>67</sup>

En los hígados que presentan daño hepático se produce una modificación en el metabolismo de la metionina. En respuesta a este daño se produce un aumento de la síntesis de S-adenosilmetionina (*S-adenosylmethionine*, SAMe) a partir de metionina mediante la enzima metionina adenosiltransferasa (*methionine adenosyltransferase*, MAT).<sup>79</sup> Los ratones que presentan la enzima MAT deplecionada muestran alteraciones en el proceso de regeneración hepática.<sup>80</sup> Por otro lado, el catabolismo de la metionina da lugar a 2-oxobutirato que mediante una transaminación forma el ácido  $\alpha$ -aminobutírico.<sup>67</sup> En ratones hepatectomizados se ha descrito un aumento en los niveles del ácido  $\alpha$ -aminobutírico en el hígado y en plasma.<sup>81</sup>

Además, los aminoácidos son indispensables como precursores en la formación de nucleótidos esenciales para la síntesis de ADN durante la regeneración hepática. Los nucleótidos se sintetizan mediante dos vías principales: la vía de recuperación o la síntesis *de novo* a partir de 5-fosforibosil-1-pirofosfato (*5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate*, PRPP) utilizando dióxido de carbono, aminoácidos y tetrahidrofolato.<sup>82</sup> Del mismo modo, la familia de transportadores de nucleótidos azucarados, SLC35, es esencial para la captación de nucleótidos<sup>83</sup> que serán utilizados en la síntesis de ADN durante la regeneración hepática.

#### 1.4.2.2 Metabolismo de carbohidratos.

Tras la realización de una PHx en ratones se observa una importante hipoglucemia al compararlos con los ratones sin operación,<sup>84</sup> aunque esta hipoglucemia es necesaria para la activación del proceso regenerativo.<sup>68</sup>

Durante la regeneración hepática el hígado debe de adaptarse frente a la severa hipoglucemia mediante la realización de la gluconeogénesis y la

inhibición de la glucólisis. Esta adaptación permite que se lleve a cabo la regeneración hepática y sintetizar la glucosa necesaria para cumplir con las necesidades del organismo.<sup>85</sup>

La resección del 2/3 del hígado disminuye el número de reservas de glucógeno y la capacidad de mantener la homeostasis de glucosa de los hepatocitos.<sup>86</sup> Los estudios realizados en rata han mostrado una drástica disminución de las reservas de glucógeno a las pocas horas post PHx<sup>87</sup> y la caída de los niveles de glucosa provoca un aumento de los niveles de glucagón.<sup>88</sup> El agotamiento de las reservas de glucógeno induce la disminución de la actividad glucolítica de la enzima piruvato quinasa post PHx. A su vez, la enzima hexoquinasa disminuye un 30% su actividad y depende de la glucosa disponible.<sup>85,89</sup>

El glucagón y los corticoides activan la expresión de las enzimas de la gluconeogénesis fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y glucosa-6-fosfatasa.<sup>90</sup> Los niveles de expresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa incrementan rápidamente tras la resección del hígado y permanecen aumentados durante todo el proceso de regeneración hepática.<sup>85</sup> La enzima glucosa-6-fosfatasa presenta un incremento significativo de su expresión a los 30 minutos y entre las 36 y las 48 horas post PHx. Estos picos de expresión corresponden con la primera y la segunda división celular, indicando su importancia como enzima reguladora en el mantenimiento de los niveles de glucosa.<sup>91</sup>

Los ratones que presentan la proteína Caveolina 1 deplecionada no pueden acumular cuerpos lipídicos en el hígado y tienen una baja supervivencia post PHx en comparación con los ratones control. Sin embargo, al suplementar el agua de bebida con 10% de glucosa se produce un aumento en la supervivencia de estos ratones.<sup>92</sup> En contraposición, se ha descrito el efecto nocivo que produce la suplementación del agua de bebida con 10% de dextrosa en ratones post PHx. Esta suplementación induce un incremento significativo en la expresión de los factores que inhiben la mitosis como C/EBP $\alpha$ , p21<sup>Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>.<sup>93</sup> Concretamente, la isoforma C/EBP $\alpha$  es anti-proliferativa y disminuye la regeneración hepática. La presencia de dextrosa en el agua de bebida también provoca la inhibición de la expresión de FoxM1

(*forkhead box M1*), el cual, es un factor de transcripción necesario en la regeneración del hígado.<sup>93</sup> Sin embargo, el mecanismo por el cual la suplementación del agua de bebida con el 10% de dextrosa influye en la expresión de estos factores anti-proliferativos en la regeneración hepática sigue siendo desconocido.<sup>67</sup>

#### 1.4.2.3 Metabolismo de lípidos.

En la regeneración hepática se produce una alteración del metabolismo lipídico. La realización de una PHx provoca una insuficiencia hepática, la cual, desencadena una respuesta catabólica sistémica que conlleva a una acumulación de grasas en el hígado necesaria para la regeneración. Esta respuesta catabólica sistémica produce una disminución del peso corporal y de la masa de tejido adiposo en ratones a las 12 horas post PHx. El pico máximo de esta pérdida sucede a las 24 horas post PHx, punto metabólico en el cual el peso corporal disminuye un 10% y la masa de tejido adiposo se reduce un 20%.<sup>84</sup> La disminución del peso corporal también se ha observado en modelos de regeneración hepática provocados por el tratamiento con insecticidas en ratas.<sup>94</sup> Esto indica que el tejido adiposo es la fuente principal de lípidos durante la regeneración hepática.<sup>68</sup>

El incremento de grasa en el hígado se relaciona con el aumento de ácidos grasos libres y triglicéridos en el plasma sanguíneo.<sup>95</sup> Las células hepáticas activan la transcripción de los genes implicados en la lipogénesis para acumular triglicéridos en los cuerpos lipídicos. Estos cuerpos lipídicos son esenciales para la síntesis de lipoproteínas y ácidos biliares durante la regeneración hepática<sup>1</sup> y para la proliferación hepatocelular del hígado.<sup>96</sup> Estudios de regeneración hepática tras una PHx realizados en ratones con distrofia de hígado graso que presentan lipodistrofia y una disminución del tejido adiposo periférico mostraron una disminución de los niveles de las hormonas adiponectina y leptina, las cuales, son reguladoras de la regeneración del hígado, una menor acumulación de grasa hepática y como consecuencia una regeneración hepática impedida.<sup>84</sup>

Los ratones que presentan la proteína Caveolina 1 deplecionada no pueden regenerar el hígado tras una PHx debido a que no acumulan cuerpos lipídicos en el hígado y no pueden realizar la división celular.<sup>92</sup> En discrepancia con lo mencionado anteriormente, también se ha observado que un exceso de acumulación de grasas en el hígado en modelos murinos *db/db* conlleva a una elevada mortalidad post PHx y una regeneración del hígado defectuosa en los ratones que sobreviven.<sup>97</sup> Aunque estudios de regeneración hepática post PHx realizados en hígados de ratones y ratas con esteatohepatitis inducida mediante una dieta rica en grasas no mostraron alteraciones durante el proceso de la regeneración hepática sugiriendo que la inducción de una leve esteatosis puede ser beneficiosa durante el proceso de regeneración del hígado.<sup>98,99</sup> También, se ha descrito que elevados niveles de ácidos grasos aceleran la regeneración del hígado mediante la activación del receptor farnesoide X (*Farnesoid X receptor*, FXR).<sup>100</sup>

En la etapa de esteatosis durante la regeneración hepática la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos es la principal fuente de ATP<sup>68</sup> y de cuerpos cetónicos, el sustrato alternativo a la glucosa en el cerebro en situaciones en las que el metabolismo de la glucosa se encuentra comprometido.<sup>36,46</sup>

### **1.5 El hígado en estado postprandial y en ayuno.**

El hígado es un órgano metabólico esencial cuya actividad se regula por una amplia variedad de hormonas. El metabolismo en estados postprandial y en ayuno se controla mediante el sistema hormonal y neuronal. En estado postprandial el metabolismo glucídico, lipídico y aminoacídico se encuentran interconectados. Los productos glucolíticos se utilizan en la lipogénesis para el almacenamiento de lípidos y su posterior uso como reserva energética en largos periodos de ayuno. En las primeras horas de ayuno la primera fuente de energía es la glucogenólisis seguida de la gluconeogénesis hepática en largos periodos de ayuno junto con la síntesis de cuerpos cetónicos, que constituyen la fuente de energía utilizada por los tejidos extrahepáticos.<sup>36</sup>

### 1.5.1 El hígado en estado postprandial.

El estado postprandial es un estado fisiológico que se produce por la ingesta de alimentos. Los sustratos metabólicos obtenidos de manera endógena se disgregan en el aparato digestivo y son transportados en el torrente sanguíneo mediante la vena porta hasta llegar al hígado. En el hígado la glucosa presenta diferentes finalidades metabólicas como la síntesis de glucógeno, la glucólisis hasta piruvato como sustrato metabólico para el ciclo de Krebs o hasta la conversión a aminoácidos.<sup>36</sup> En las células hepáticas los ácidos grasos libres se metabolizan a triglicéridos y se almacenan en los cuerpos lipídicos para su posterior secreción al torrente sanguíneo formando lipoproteínas de muy baja densidad (*very low-density lipoprotein*, VLDL). Por otro lado, los aminoácidos se metabolizan para sintetizar proteínas, glucosa y otras biomoléculas como fuentes energéticas.<sup>36</sup>

En estado postprandial se produce un incremento de la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos en sangre.<sup>36</sup> La conversión de glucosa en glucógeno en el hígado es la vía determinante para la eliminación de la glucosa en el torrente sanguíneo.<sup>32</sup> En respuesta al aumento de los niveles de glucosa en sangre, las células  $\beta$  del páncreas secretan insulina, la cual, estimula la enzima glucógeno sintasa incrementando la síntesis de glucógeno<sup>36</sup> y promoviendo la expresión de la enzima hexoquinasa, por lo que se produce un aumento de la captación de glucosa en los hepatocitos.<sup>32</sup> La presencia de insulina estimula el complejo diana de rapamicina 2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*, mTORC2).<sup>36</sup> La activación de mTORC2 induce la fosforilación de la proteína Akt. La fosforilación de Akt conlleva a su activación y por tanto fosforila e inactiva la proteína hepática FoxO1 (*forkhead box O1*, FoxO1),<sup>101</sup> produciendo una supresión de la síntesis de glucosa.<sup>102</sup>

La insulina se une a su receptor y esta unión provoca la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (*Insulin receptor substrate*, IRS1 y IRS2) activando la vía fosfoinositol 3-quinasa (*phosphoinositide 3-kinase*, PI3K).<sup>103</sup> Esta activación produce la fosforilación de Akt inhibiendo la actividad de la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (*glycogen synthase kinase-3*, GSK3) mediante su fosforilación, regulando la síntesis de glucógeno.<sup>104</sup> Akt activo

induce la fosforilación de PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1 alpha*). La fosforilación de PGC-1 $\alpha$  disminuye su capacidad de promover la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos en estado postprandial.<sup>105</sup>

### 1.5.2 El hígado en ayuno.

En ayuno el hígado segrega al torrente sanguíneo sustratos metabólicos que se metabolizan en el músculo, tejido adiposo u otros tejidos extrahepáticos para actuar como fuente energética. La reserva de lípidos se cataboliza mediante la lipólisis dando lugar a glicerol y ácidos grasos no esterificados (*nonesterified fatty acids*, NEFAs) para cubrir las necesidades energéticas del metabolismo.

En las mitocondrias de los hepatocitos se realiza la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos para dar lugar a los cuerpos cetónicos<sup>36</sup> y en el músculo se produce la degradación de glucógeno y de proteínas para formar lactato y L-alanina que son secretados al torrente sanguíneo para su posterior captación por el hígado junto con el glicerol liberado en la lipólisis. Estos sustratos metabólicos se utilizarán para sintetizar glucosa *de novo*.<sup>36</sup>

En ayuno la secreción de insulina se encuentra disminuída por lo que se produce una caída de la actividad de la enzima glucógeno sintasa y una activación de la enzima glucógeno fosforilasa.<sup>36</sup> Las células  $\alpha$  del páncreas secretan glucagón lo que conlleva a una inhibición de la enzima glucógeno fosforilasa. La disminución de la actividad de esta enzima es el paso limitante en el catabolismo del glucógeno y presenta un papel determinante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa tanto a nivel celular como del organismo.<sup>106</sup> El requerimiento hepático masivo de glucosa puede inducir la degradación del glucógeno a través de la autofagia.<sup>107</sup> En periodos cortos de ayuno el hígado produce y secreta la glucosa mediante la degradación de glucógeno. Sin embargo, en largos periodos de ayuno, las reservas de glucógeno se han agotado y los hepatocitos sintetizan glucosa *de novo* a partir de diferentes sustratos metabólicos generados en el hígado o que circulan en el torrente sanguíneo.<sup>36</sup> La síntesis de glucosa se realiza dependiendo de la



disponibilidad de los sustratos gluconeogénicos y de la regulación de las enzimas de la gluconeogénesis que controlan los pasos determinantes.<sup>36</sup>

FoxO1 regula varios aspectos del metabolismo hepático de la glucosa, proporcionando capacidad de respuesta hormonal a la producción de glucosa hepática.<sup>102</sup> FoxO1 es el sustrato de la proteína MPK fosfatasa-3 (*mitogen-activated protein kinase phosphatase-3*, MKP-3). MKP-3 desfosforila a FoxO1, induciendo un cambio de localización de FoxO1 hacia el núcleo y dando lugar a la activación de genes gluconeogénicos.<sup>108</sup> Además, la interacción de FoxO1 con la proteína C/EBP $\alpha$  (*CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$* , C/EBP $\alpha$ ) promueve la gluconeogénesis.<sup>109</sup>

El glucagón es la hormona encargada de promover la salida de la glucosa hepática incrementando la glucogenólisis y la gluconeogénesis para aumentar los niveles de glucosa en sangre y a su vez inhibe la glucólisis y la glucogénesis.<sup>110</sup> El glucagón y sus receptores son la primera fuente de control frente a elevados niveles de glucosa en sangre.<sup>111</sup> La unión del glucagón a su receptor produce la activación de las proteínas G triméricas asociadas. La activación de esta familia de proteínas induce la activación de la enzima adenil ciclasa<sup>110</sup> la cual incrementa la concentración intracelular de adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico (*adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate cycle*, cAMP) y como consecuencia la activación de la proteína PKA.<sup>111</sup>

La activación de PKA produce la estimulación de la enzima glucógeno fosforilasa quinasa, la cual, fosforila a la enzima glucógeno fosforilasa en el residuo serina-14. La enzima glucógeno fosforilasa activa induce la fosforilación del glucógeno incrementando su degradación en glucosa. Al mismo tiempo, la activación de PKA provoca la fosforilación y la activación del factor de transcripción CREB (*CAMP responsive element binding protein*, CREB).<sup>110</sup> La proteína CREB fosforilada se une a un elemento sensible a cAMP en la región promotora del gen PGC-1 aumentando su transcripción.<sup>112</sup> PGC-1 junto con el factor de transcripción nuclear del hepatocito 4 (*hepatocyte nuclear factor-4*, HNF-4) incrementan la transcripción del gen de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa estimulando la gluconeogénesis hepática.<sup>110</sup>

## 2. Familia transportadora de solutos 38.

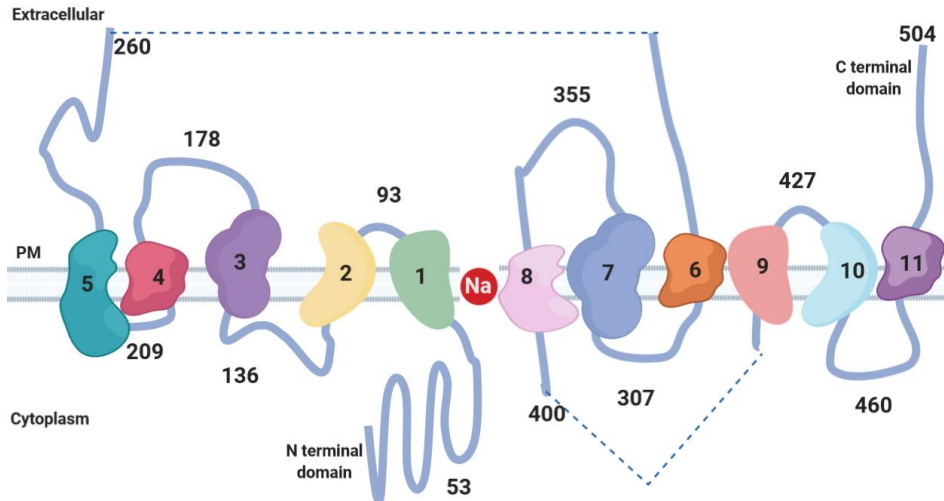
La familia transportadora de solutos 38 (*solute carrier family 38, SLC38*) se encuentra presente en todos los tipos celulares del cuerpo humano y se constituye por 11 miembros en el genoma. Los genes se engloban bajo la nomenclatura *Slc38aX* mientras que las proteínas se denotan como SNATX, siendo la X un número del 1 al 11. Todos los miembros de esta familia co-transportan cationes y aminoácidos neutros seleccionados de una gran variedad de aminoácidos que podrían alterar el equilibrio intracelular y extracelular.<sup>21</sup> Los miembros más estudiados de dicha familia presentan un porcentaje de homología en sus secuencias (Tabla 2).<sup>74</sup>

**Tabla 2.** Porcentaje de homología en las secuencias de la familia de transportadores SLC38 de las proteínas SNAT1, SNAT2, SNAT3, SNAT4 y SNAT5.<sup>74</sup>

		SNAT4		SNAT5
			56	51
		SNAT3	56	62
		SNAT2	56	51
SNAT1	52	55	48	53

### 2.1 Estructura de la familia SLC38.

Hay discrepancia en cuanto a la topología descrita de la familia SLC38. En 2011 Zhang y colaboradores describieron una estructura formada por 11 dominios transmembrana hidrofóbicos con un dominio N terminal intracelular retenido en el citoplasma y un dominio C extracelular que es determinante en la actividad de los transportadores.<sup>113</sup> Por otro lado, Shi y colaboradores observaron la orientación del dominio N terminal hacia el exterior celular en el transportador SNAT4 y por lo tanto una topología de 10 dominios transmembrana.<sup>114</sup> La estructura presenta una región de glicosilación extracelular entre los dominios 5 y 6.<sup>74</sup> Las hélices 3-5 y 8-10 forman una estructura rígida, mientras que las hélices 1, 2 y 6, 7 constituyen una estructura que se somete a cambios conformacionales durante el co-transporte de cationes y aminoácidos. Las hélices 1 y 8 se encuentran en el centro de la estructura exponiendo a donantes y receptores de enlaces de hidrógeno para unirse a los sustratos y a sodio en la membrana (Figura 9).<sup>21</sup>



**Figura 9.** Topología del transportador SNAT3 en rata a partir del modelo de homología con la hidantoina permeasa de *M. liquefaciens*<sup>21</sup> donde se representan los 11 dominios en la membrana plasmática y las posiciones de determinados aminoácidos constituyendo un total de 504. Membrana plasmática (*plasma membrane*, PM).

## 2.2 Expresión de la familia SLC38.

Las proteínas que constituyen la familia SLC38 presentan una expresión en órganos y/o tejidos muy diferente entre los miembros que la forman. Mientras que las proteínas SNAT1, SNAT2, SNAT7 y SNAT10 tienen una expresión ubicua, el resto de los transportadores de la familia muestran expresiones restrictivas en determinados órganos y/o tejidos. La proteína SNAT1 codificada por el gen *Slc38a1*, tiene diferentes alias como GlnT, SAT1, ATA1, SA2 y NAT2 y una longitud de 486 aminoácidos. El transportador SNAT2 (*Slc38a2*) se conocía anteriormente como SAT2, ATA2, SA1 y se compone de 505 aminoácidos. La proteína SNAT7 presenta una longitud de 461 aminoácidos y el transportador SNAT10 de 1118 aminoácidos.<sup>21</sup>

La expresión de la proteína SNAT3 codificada por el gen *Slc38a3* e inicialmente conocida como SN1 o NAT se compone de 504 aminoácidos.<sup>21</sup> Presenta una expresión abundante en astrocitos<sup>115</sup> con una expresión mayoritaria en neocórtex, cerebelo, bulbo raquídeo y cerebro.<sup>116</sup> También se ha descrito su expresión en retina,<sup>117,118</sup> placenta,<sup>119</sup> riñón,<sup>120</sup> hígado,<sup>121</sup> páncreas y tejido adiposo.<sup>21</sup>

La proteína SNAT4 (*Slc38a4*) conocida anteriormente como ATA3, NAT3, SAT3 o PAAT se compone de 546 aminoácidos.<sup>21</sup> Está descrito que la expresión de SNAT4 es mayoritaria en el hígado<sup>122</sup> y se encuentra aumentada durante el desarrollo hepático mediada por el factor de transcripción HNFα.<sup>21</sup> Recientes estudios han descrito la expresión de SNAT4 en placenta.<sup>123-125</sup>

El transportador SNAT5 se codifica por el gen *Slc38a5*, conocido anteriormente como SN2 y con una longitud de 471 aminoácidos. Se encuentra ampliamente expresado en diferentes tejidos como cervix, vejiga, hueso, intestino,<sup>126</sup> riñón, esófago, pulmón,<sup>21</sup> cerebro,<sup>127</sup> colon, bazo, hígado<sup>128</sup> y estómago<sup>129</sup> con una localización característica en el núcleo estriado, la médula espinal y el neocórtex.<sup>127</sup>

La proteína SNAT6 (*Slc38a*) se compone de 520 aminoácidos y presenta diferentes tejidos de expresión como esófago, cervix, pulmón, riñón y músculo. Por otro lado, el miembro SNAT8 codificado por el gen *Slc38a8* se expresa en los testículos y su estructura se compone de 434 aminoácidos. La proteína SNAT9 (*Slc38a9*) presenta un papel característico en el sistema endocrino por su expresión restrictiva en las glándulas suprarrenales, en la glándula tiroides, en las glándulas paratiroides y en los testículos a diferencia del resto de transportadores de la familia. Su estructura se compone de 560 aminoácidos. Por último, el transportador SNAT11 (*Slc38a11*) formado por 405 aminoácidos, se expresa en bazo, médula ósea y faringe.<sup>21</sup>

### **2.3 Localización de la familia SLC38.**

Algunos transportadores de la familia SLC38 se localizan en vesículas cercanas a la membrana plasmática y frente a diferentes estímulos se produce un cambio de localización desde compartimentos subcelulares hacia la membrana plasmática celular.<sup>21</sup> Se ha caracterizado la presencia de SNAT1 acumulada en el interior de células de hepatocarcinoma humano<sup>130</sup> y en membranas luminales en cerebro de ratón.<sup>131</sup> La localización de SNAT2 se ha descrito en *trans*-Golgi y su posterior direccionamiento hacia la membrana plasmática inducido por insulina.<sup>77,132</sup> La proteína SNAT3 se ha observado en membranas luminales<sup>131</sup> y en la membrana plasmática.<sup>121</sup>

Se ha descrito la presencia de SNAT4 en el sinusoide de los hepatocitos.<sup>133,134</sup> SNAT6 se ha observado en la membrana sináptica de las neuronas.<sup>135</sup> La proteína SNAT7 se ha observado recientemente en los lisosomas<sup>136</sup> del mismo modo que SNAT9.<sup>137,138</sup> Por último, el transportador SNAT10 se ha descrito en el retículo endoplasmático y en compartimentos de Golgi.<sup>139</sup>

## **2.4 Funciones de la familia SLC38.**

Todos los transportadores de la familia SLC38 descritos presentan la misma función de captación e internalización de aminoácidos en diferentes tejidos.<sup>21</sup> Sin embargo, estas proteínas difieren en el aminoácido que captan debido a su elevada especificidad. Atendiendo al mecanismo de transporte y a la especificidad del sustrato los transportadores de la familia SLC38 se clasifican en dos grupos. El Sistema A y el Sistema N. La actividad de los miembros de la familia SLC38 es dependiente de pH. En un entorno alcalino se produce un aumento de la actividad de los transportadores. La actividad de estas proteínas también incrementa dependiendo de determinados estímulos produciendo un cambio de su localización intracelular.<sup>21</sup>

### **2.4.1 El Sistema A.**

El Sistema A es el principal sistema de co-transporte de sodio y aminoácidos al interior celular. Se encarga de transportar aminoácidos alifáticos pequeños con una mayor especificidad por L-alanina.<sup>74</sup> La actividad del Sistema A se modifica por la presencia de glicoproteínas<sup>140</sup> y es sensible a pH por lo que se encuentra profundamente inhibida a pH ácido.<sup>74</sup> El Sistema A se considera una diana para la acción oncogénica ya que el aumento de aminoácidos es característico de las neoplasias.<sup>141,142</sup> Los miembros que componen dicho sistema se caracterizan por transportar mayoritariamente L-alanina y son SNAT1, SNAT2 y SNAT4.<sup>21</sup>

### **2.4.2 El Sistema N.**

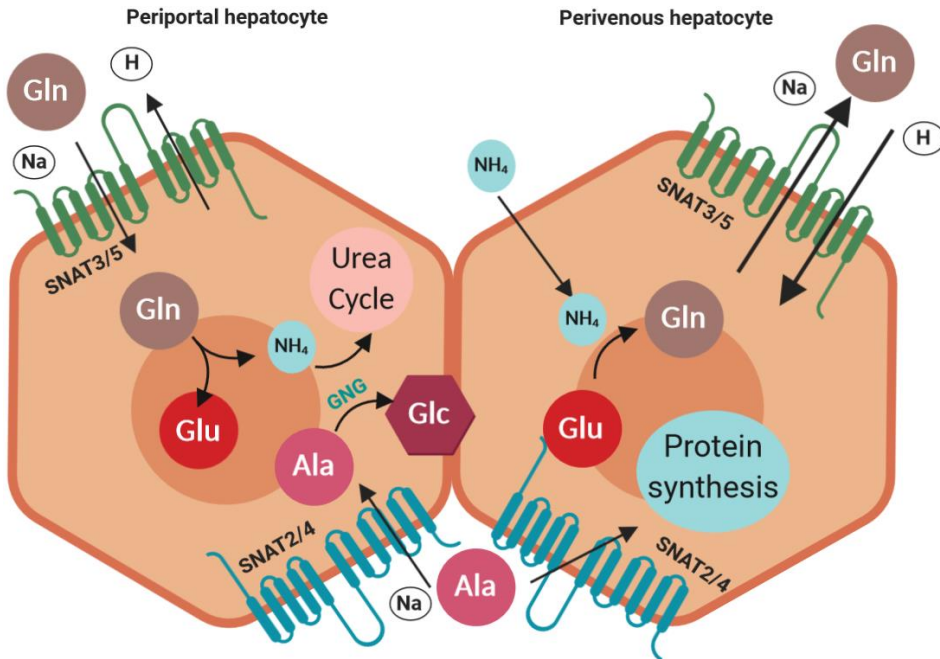
El Sistema N es el principal transportador glutamina además de asparagina e histidina al interior celular.<sup>21</sup> A diferencia del Sistema A, el transporte que realiza es más complejo ya que puede co-transportar aminoácidos y sodio o

litio con un gradiente en contra de protones.<sup>143</sup> Los miembros que componen el Sistema N son: SNAT3, SNAT5 y SNAT7.<sup>21</sup> La proteína SNAT5 a diferencia del resto de componentes del Sistema N, también presenta una gran afinidad por el sustrato serina y en menor medida por glicina y cisteína.<sup>144</sup> Junto con el transportador SNAT3 son los mediadores más importantes en la captación de glutamina en astrocitos.<sup>145</sup>

### **2.4.3 Papel de la familia SLC38 en las funciones hepáticas.**

En el hígado adulto los transportadores de la familia SLC38 presentan un papel central en el metabolismo. Los aminoácidos y en concreto, L-alanina y glutamina, son los mayores precursores de la gluconeogénesis en ayuno. Estos aminoácidos se secretan principalmente por el tejido muscular y se utilizan para realizar la gluconeogénesis en el hígado. El balance de la glucosa con el aminoácido L-alanina se determina por el ciclo glucosa-alanina o ciclo de Cahill.<sup>146</sup> La mayoría de la captación de los aminoácidos L-alanina y glutamina se realiza mediante los transportadores SNAT2, SNAT3 y SNAT4.<sup>134</sup>

La proteína SNAT2 presenta una rápida regulación adaptativa en respuesta a una ausencia de aminoácidos en diferentes líneas celulares<sup>147</sup> y se redistribuye de un compartimento intracelular a la membrana plasmática.<sup>77</sup> Su expresión en el hígado se puede estimular mediante glucagón,<sup>148</sup> sugiriendo un papel de SNAT2 en la provisión de aminoácidos en la gluconeogénesis.<sup>74</sup> La proteína SNAT4 se encuentra altamente expresada en el hígado y presenta una función clave en el crecimiento celular durante el desarrollo hepático.<sup>134</sup> El tratamiento con glucagón y con estreptozocina induce un aumento de su expresión relativa de ARNm en el hígado.<sup>148</sup> SNAT4 es una proteína determinante en la captación de aminoácidos necesarios en la biosíntesis de proteínas y en procesos metabólicos.<sup>21</sup> Los transportadores SNAT2 y SNAT4 se encuentran implicados en la gluconeogénesis y en la síntesis local de proteínas mediante la captación de L-alanina (Figura 10).<sup>21</sup> La principal función de la proteína SNAT3 en el hígado es la detoxificación del amonio hepático. Se encarga de proporcionar glutamina como donante de amoniaco en los hepatocitos periportales al ciclo de la urea y de liberar glutamina después de ser sintetizada en los hepatocitos perivenosos a partir de glutamato y amonio (Figura 10).<sup>21,74</sup>



**Figura 10.** Representación esquemática del papel de los transportadores SNAT2, SNAT3, SNAT4 y SNAT5 en el hígado.<sup>21</sup> Glutamina (*glutamine*, Gln), catión sodio (Na), protón (H), amonio ( $\text{NH}_4$ ), glutamato (*glutamate*, Glu), glucosa (*glucose*, Glc), L-alanina (Ala), gluconeogénesis (*gluconeogenesis*, GNG).

#### 2.4.4 Papel de la familia SLC38 en la fisiología del cerebro.

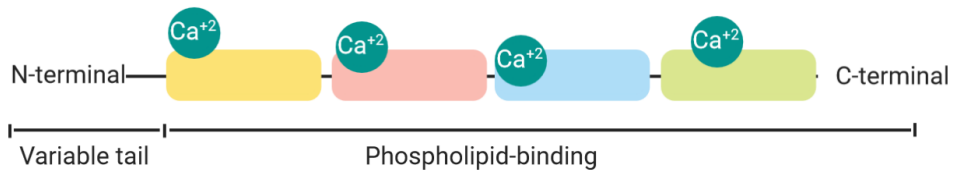
El glutamato es el principal activador de los neurotransmisores en el cerebro. Se sintetiza a partir de intermediarios del ciclo de Krebs o mediante glutamina. El glutamato se convierte en glutamina y se libera de los astrocitos para ser captado por las neuronas.<sup>21,144</sup> La disminución de glutamato se compensa por la captación de glutamina, la cual, se convierte a glutamato por la pérdida del grupo amonio dando lugar al ciclo intracelular de glutamato-glutamina.<sup>144</sup> La proteína SNAT1 se ha caracterizado ampliamente en cerebro,<sup>149</sup> concretamente en neuronas glutamatérgicas, gabaérgicas<sup>150</sup> y neuronas dopaminérgicas,<sup>151</sup> aunque es esencial para el desarrollo de las dendritas y la síntesis de proteínas locales.<sup>152</sup> A pesar de que los transportadores SNAT3 y SNAT5 son los mediadores más importantes de glutamina en astrocitos,<sup>145</sup> la proteína SNAT1 realiza la captación de glutamina en neuronas.<sup>149</sup>

### 3. Anexinas.

Las anexinas son una familia de proteínas de unión a fosfolípidos cargados negativamente de manera dependiente de calcio. Presentan una estructura conservada de cuatro repeticiones anexina en tándem. Se encuentran codificadas desde hongos y protistas hasta plantas y vertebrados.<sup>153-155</sup> Aunque se sintetizan como proteínas citosólicas están ampliamente asociadas a la unión de membranas celulares de manera reversible y regulada.<sup>156,157</sup>

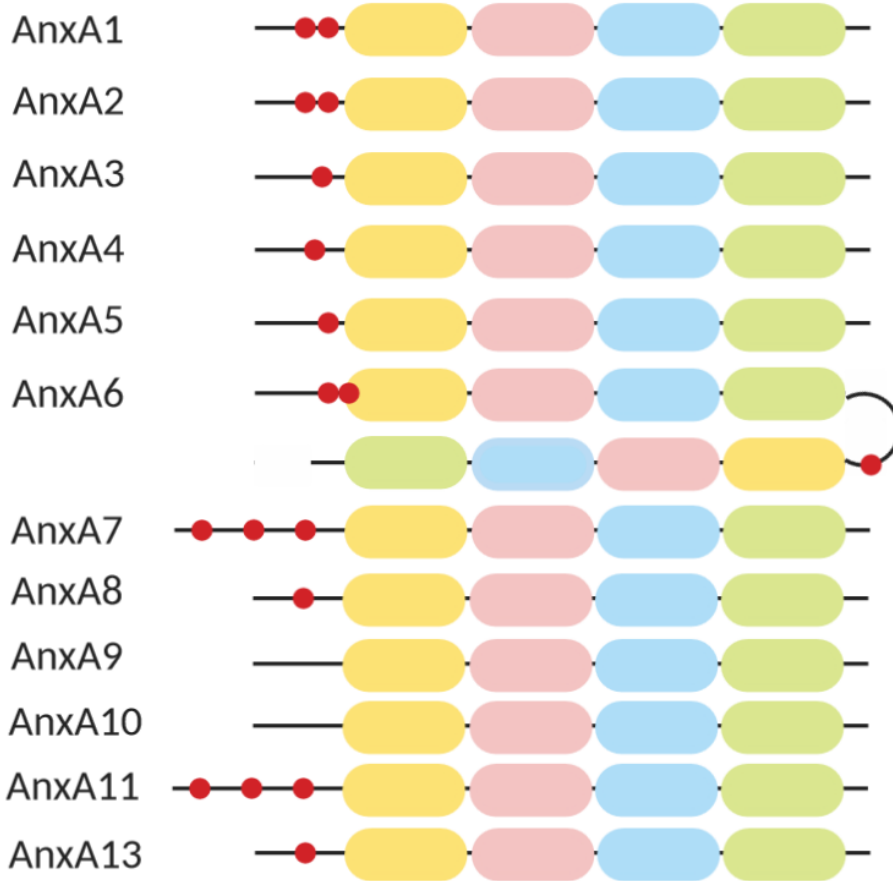
#### 3.1 Estructura de las anexinas.

Las anexinas se clasifican acorde a su característica estructural del dominio N terminal. El núcleo de la proteína se compone de 4 repeticiones en tándem de unos 70 aminoácidos denominado tétrada y es el lugar de unión a calcio y fosfolípidos (Figura 11). Las anexinas constan de dos dominios principales. El extremo N-terminal que otorga variabilidad regulando la interacción de las anexinas con otros ligandos y el núcleo de la proteína con el dominio C-terminal muy conservado.<sup>158</sup> La variabilidad que presenta el dominio N-terminal (Figura 12) les confiere a las anexinas la capacidad de actuar como puntos de unión entre membranas<sup>159</sup> por lo que regulan la exocitosis y determinados procesos de endocitosis.<sup>160</sup>



**Figura 11.** Representación esquemática de la topología de las anexinas. La estructura presenta una región N-terminal variable, cuatro dominios anexina donde se produce la unión a calcio y fosfolípidos y una región C-terminal conservada.<sup>161</sup>





**Figura 12.** Representación esquemática de la organización estructural de las anexinas. Todas estas proteínas presentan 4 dominios anexina, una región C-terminal y una región N-terminal variable con diferentes lugares de fosforilación.<sup>153,162</sup> *Annexin A1* (AnxA1), *Annexin A2* (AnxA2), *Annexin A3* (AnxA3), *Annexin A4* (AnxA4), *Annexin A5* (AnxA5), *Annexin A6* (AnxA6), *Annexin A7* (AnxA7), *Annexin A8* (AnxA8), *Annexin A9* (AnxA9), *Annexin A10* (AnxA10), *Annexin A11* (AnxA11), *Annexin A13* (AnxA13).

### 3.2 Expresión de las anexinas.

Las anexinas presentan patrones diferentes de expresión. Los miembros AnxA1, AnxA2 y AnxA6 se encuentran expresados en una gran variedad de tipos celulares mientras que otros miembros estudiados como AnxA8 y AnxA13 se han descrito en muy pocos tipos celulares.<sup>163</sup> Concretamente, se ha demostrado la presencia de AnxA3 en neutrófilos, AnxA8 en placenta y piel, AnxA9 en la lengua, AnxA10 en el estómago y AnxA13 en el intestino delgado.<sup>161</sup>

### 3.3 Localización de las anexinas.

Las anexinas son una familia de proteínas generalmente citosólicas. Se pueden localizar asociadas de manera reversible a componentes del citoesqueleto o con proteínas que median la interacción entre la célula y la matriz extracelular.<sup>161</sup> Sin embargo, se ha descrito la localización de AnxA1 en la superficie celular en presencia de análogos de glucocorticoides,<sup>164</sup> la traslocación de AnxA2 hacia el núcleo junto con su ligando p11 para su posterior activación<sup>165</sup> y la co-localización nuclear de AnxA11 junto con la proteína de unión a calcio A6 (S100 *calcium-binding protein* A6, S100A6) frente a elevados niveles de calcio intracelular o debido a la progresión del ciclo celular.<sup>166</sup> Por otro lado, AnxA13 se localiza en *trans*-Golgi, en vesículas transportadoras y en la superficie celular apical.<sup>167</sup>

### 3.4 Funciones de las anexinas.

La singular arquitectura de esta familia de proteínas junto con su habilidad de unirse a fosfolípidos y a calcio, les otorga a las anexinas una amplia gama de funciones. Entre las funciones más características e importantes destaca su actuación como proteínas de unión entre diferentes membranas o entre membranas y el citoesqueleto, la implicación en eventos de exocitosis de manera dependiente de calcio, endocitosis y la organización de la membrana plasmática.<sup>159</sup>

#### 3.4.1 Anexinas como proteínas andamio.

Los lugares de anclaje de actina en las membranas celulares han sido identificados como lugares de reclutamiento de las anexinas en diferentes sistemas celulares.<sup>159</sup> Las proteínas AnxA2 y AnxA6 regulan la formación de microdominios de balsas lipídicas en la membrana plasmática. En concreto, AnxA2 se une a microdominios de balsas lipídicas formados en la membrana plasmática de manera dependiente de calcio<sup>168</sup> y se encuentra en los dominios de membrana que actúan como plataformas de anclaje de F-actina,<sup>159</sup> mientras que AnxA6 forma un complejo reversible entre la membrana y el citoesqueleto.<sup>169</sup> AnxA6 también actúa como proteína andamio en las vías de PKC $\alpha$ <sup>170,171</sup> e inhibiendo la señalización de Ras en células cancerosas.<sup>172</sup>

### 3.4.2 Anexinas como proteínas de transporte.

La primera evidencia que relaciona las anexinas con el tráfico vesicular tuvo lugar con AnxA7 participando en la exocitosis granular de cromafina regulada por calcio.<sup>159</sup> De igual modo, se ha descrito la función de AnxA6 como proteína de transporte ya que su depleción reduce la internalización y el transporte de lipoproteínas de baja densidad.<sup>173</sup> De manera similar, la depleción de la proteína AnxA2 altera la vía de reciclaje de transferrina y la sobreexpresión del dominante negativo de esta proteína provoca la inhibición de la formación de pinosomas.<sup>159</sup>

La proteína AnxA13 presenta dos variantes de *splicing*, la variante AnxA13a y la variante AnxA13b. Ambas presentan diferentes roles específicos. AnxA13a se une a balsas lipídicas en la membrana apical de manera independiente de calcio y a balsas lipídicas de la membrana basolateral dependiente de calcio,<sup>174</sup> mientras que AnxA13b regula el transporte apical.<sup>167</sup> Ambas isoformas realizan el transporte apical de la hemaglutinina del virus influenza. Sin embargo, sólo la isoforma AnxA13a inhibe el transporte basolateral de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular.<sup>174</sup>

### 3.4.3 Otras funciones de las anexinas.

Además de la gran variedad de funciones descritas de las diferentes proteínas que componen la familia de las anexinas, también se ha evidenciado la ubicación de algunas anexinas en fluidos extracelulares desempeñando diversas actividades y funciones extracelulares.<sup>159</sup>

Singularmente, se ha descrito la presencia de AnxA1 como efector en procesos antiinflamatorios, se ha observado la traslocación de AnxA2 a la superficie celular en células endoteliales actuando como receptor y activador de plasminógeno y se ha detallado el papel de AnxA5 como anticoagulante.<sup>159</sup>

Los estudios realizados han mostrado la gran variedad de funciones biológicas de esta familia de proteínas. Las funciones de estas proteínas se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Resumen de las funciones de las anexinas.

<b>Anexinas</b>	<b>Funciones</b>
<b>Anexina A1</b>	Interacción con F-actina <sup>153</sup> Efecto pro-apoptótico en neutrófilos <sup>175</sup> Tráfico y formación de cuerpos multivesiculares que contienen EGFR <sup>176</sup> Efecto para la resolución de procesos inflamatorios <sup>177</sup> Marcador tumoral en cáncer epitelial de ovario <sup>178</sup>
<b>Anexina A2</b>	Interviene en la unión de los filamentos de F-actina a vesículas que contienen fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato en la membrana <sup>179</sup> Mantenimiento del equilibrio fibrinolítico en las superficies de los vasos sanguíneos <sup>180, 181</sup> Interacción con mRNA <sup>182</sup> Modulador de canales iónicos de la membrana <sup>157</sup> Reordenamiento de dominios lipídicos en la membrana plasmática <sup>183</sup> Marcador tumoral en cáncer epitelial de ovario <sup>184</sup>
<b>Anexina A3</b>	Desarrollo de tumores, metástasis y resistencia a antitumorales <sup>185</sup> Cascada de señalización en la regeneración hepática de rata <sup>186</sup> Alineamiento de los vasos sanguíneos de la retina en ratones <sup>187</sup>
<b>Anexina A4</b>	Modulador de canales iónicos en la membrana plasmática <sup>157</sup> Reparación de la membrana celular y oclusión de agujeros micrométricos en la membrana <sup>188</sup> Migración de las células epiteliales progenitoras en las vías respiratorias <sup>189</sup>
<b>Anexina A5</b>	Anticoagulante <sup>190</sup> Estabiliza los defectos de membrana <sup>191</sup> Regulación de la integrina $\alpha\beta 5$ <sup>192</sup>
<b>Anexina A6</b>	Modulador de canales iónicos en la membrana plasmática <sup>157</sup> Interacción con el citoesqueleto de actina <sup>193</sup> Endocitosis y tráfico de VLDL <sup>194</sup> Receptor de cadenas de sulfato de condroitina en la superficie celular <sup>195</sup> Reparación de la membrana celular <sup>188</sup> Modulador del complejo TBC1D15/Rab7/StARD3 en la salida de colesterol de endosomas <sup>196</sup> Señalización <sup>197</sup>
<b>Anexina A7</b>	Biomarcador de ciertos tumores <sup>198</sup> Protección frente a apoptosis en células gástricas <sup>199</sup> Reparación de la membrana plasmática <sup>200</sup>
<b>Anexina A8</b>	Interacción con F-actina asociada a dominios de membrana enriquecidos en fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato <sup>201</sup> Regulación de la organización, función, morfología y distribución de endosomas tardíos <sup>202</sup>
<b>Anexina A9</b>	Unión irreversible a liposomas cargados de fosfatidilserina <sup>203</sup> Marcador tumoral en cáncer colorectal <sup>204</sup>
<b>Anexina A10</b>	División celular, apoptosis y tráfico celular <sup>205</sup> Supresor tumoral en cáncer gástrico <sup>206</sup>
<b>Anexina A11</b>	Fase terminal de la citoquinesis <sup>207</sup>
<b>Anexina A13</b>	Regulación del transporte apical <sup>174</sup>

### 3.5 Patologías asociadas a las anexinas.

En la actualidad, no se ha descrito la implicación de un miembro de la familia de las anexinas como causante de una enfermedad humana. Sin embargo, hay evidencias de determinadas condiciones clínicas como cambios en los niveles de expresión de las proteínas o cambios en su localización que podrían contribuir a consecuencias patológicas. Alteraciones en la expresión de las proteínas AnxA2 y AnxA5, las cuales, presentan un papel en el control fisiológico de coagulación sanguínea, se podrían asociar con una enfermedad clínica.<sup>208</sup> En concreto, AnxA2 se encuentra sobreexpresada en células leucémicas de pacientes con leucemia promielocítica. Esta sobreexpresión induce un aumento en la producción de plasmina, una proteína fibrinolítica que disuelve los coágulos sanguíneos.<sup>209</sup> Por otro lado, la disminución de la expresión de AnxA5 en los trofoblastos de la placenta, se asocia con pérdidas de embarazo y trombosis.<sup>210</sup>

### 3.6 Ratones genoanulados de las anexinas.

La presencia de anexinas desde los protistas a los vertebrados<sup>161</sup> muestra el papel fundamental que desempeñan en biología celular. El desarrollo de los ratones genoanulados para las diferentes anexinas proporciona más información acerca de la relevancia de dicha familia de proteínas. Exceptuando el ratón AnxA7 *knockout* que presenta una muerte embrionaria por hemorragia cerebral,<sup>211</sup> los ratones genoanulados de un miembro de la familia de las anexinas manifiestan un desarrollo y viabilidad normales. Sin embargo, cuando dichos ratones se someten a condiciones de estrés, revelan diferentes fenotipos que permiten identificar los mecanismos específicos en los que están envueltos las anexinas.<sup>212</sup>

La creación del ratón AnxA1 *knockout* tuvo como objetivo evidenciar el papel de AnxA1 en la activación de glucocorticoides de las células de inmunidad innata en la respuesta proinflamatoria.<sup>213</sup> Sin embargo, estos ratones no presentaron diferencias respecto a los ratones control. La proteína AnxA2 está implicada en la fibrinólisis vascular de las células endoteliales, por lo que se generó el ratón AnxA2 *knockout* para analizar la homeostasis vascular, pero

este ratón presentó un desarrollo normal con la excepción de un aumento de fibrina en los tejidos.<sup>214</sup> La depleción de AnxA4 en el ratón sólo se produjo en determinados tejidos.<sup>212</sup> Debido a su función en la regulación de cAMP,<sup>215</sup> se analizaron los niveles de cAMP en los cardiomiocitos de este ratón y se observó un incremento de los niveles de cAMP debido a la pérdida de la acción inhibitoria de adenilil ciclasa 5, la cual, controla el cambio de ATP a cAMP.<sup>212</sup>

La proteína AnxA5 se encuentra altamente expresada en hueso por lo que se generó el ratón AnxA5 *knockout* para analizar los procesos de calcificación durante el desarrollo esquelético.<sup>216</sup> Estos ratones no presentaron ningún defecto en las funciones regulares de los órganos,<sup>212</sup> pero sí un tamaño reducido de los fetos y una mayor pérdida fetal.<sup>217</sup>

En contra posición con el resto de los ratones genoanulados de la familia de las anexinas,<sup>212</sup> el ratón genoanulado para la proteína AnxA7 presenta una muerte embrionaria al décimo día debido a una hemorragia cerebral, por lo que los estudios posteriores se realizaron en ratones en heterocigosis. Los ratones heterocigotos para la proteína AnxA7 son viables y fértiles, pero presentan una alteración en la función del receptor de inositol-1,4,5-trifosfato en los islotes pancreáticos afectando la salida de calcio celular.<sup>211</sup>

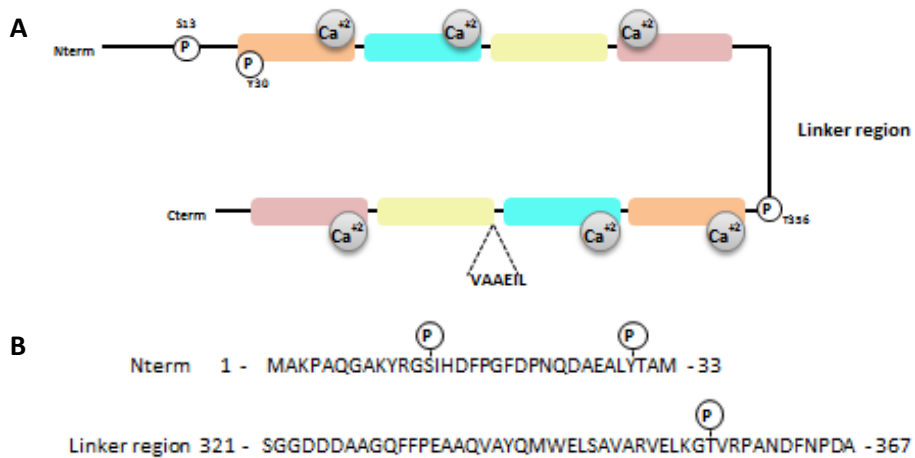


## 4. Anexina A6.

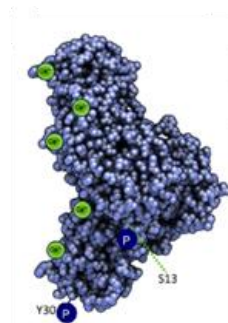
La proteína AnxA6 es el único miembro de la familia de las anexinas que presenta ocho dominios anexina conservados debido a la duplicación y fusión de los genes que codifican por la proteína AnxA5 y AnxA10.<sup>161</sup> Es la proteína más larga de la familia y presenta un peso molecular de 70 kD.<sup>160</sup>

### 4.1 Estructura de la proteína Anexina A6.

La proteína AnxA6 se compone de un doble núcleo con dos tétradas de cuatro repeticiones del dominio anexina en tándem orientados perpendicularmente y separados por una región de unión entre el dominio VI y V.<sup>218</sup> AnxA6 presenta seis lugares de unión a calcio en las repeticiones 1, 2, 4, 5, 6 y 8<sup>219</sup> y tres lugares de fosforilación en los aminoácidos S13, Y30 y T356 además de una variante de *splicing*.<sup>220</sup>



**Figura 13.** A) Topología de la proteína AnxA6. B) Secuencia de aminoácidos en la región de unión y en el dominio N terminal donde se representan los diferentes lugares de fosforilación (P) S13, Y30 y T356.<sup>160</sup> C) Representación esquemática de la estructura cristalográfica de la proteína AnxA6.<sup>221</sup>





## **4.2 Expresión y localización de Anexina A6.**

AnxA6 presenta una expresión ubicua en mamífero, aunque es abundante en bazo, nodos linfáticos, músculo esquelético, corazón<sup>222</sup> y en el hígado, representando un 0.25% de la proteína hepática total.<sup>223</sup>

Principalmente la localización de la proteína AnxA6 es citosólica, pero puede cambiar de localización a la membrana plasmática y a diferentes orgánulos subcelulares en respuesta a cambios en los niveles de colesterol y calcio intracelulares.<sup>224</sup> Al realizar el cambio de localización se convierte en una de las proteínas mayoritarias en los endosomas tempranos, endosomas tardíos y en los endosomas de reciclaje.<sup>225</sup> Dependiendo de la localización intracelular de la proteína AnxA6 realiza diversas funciones.

## **4.3 Funciones de Anexina A6.**

Están ampliamente descritas las diversas e importantes funciones que realiza AnxA6 en el interior celular dependiendo su localización y distribución.

### **4.3.1 Anexina A6 en la homeostasis de colesterol.**

El colesterol es un componente esencial en las membranas celulares eucariotas y es el encargado de modular su rigidez, fluidez y permeabilidad. Las células de mamífero sintetizan su propio colesterol y reciben colesterol exógeno mediante la captación de lipoproteínas.<sup>226</sup> Sin embargo, el colesterol no se distribuye de manera uniforme en las membranas, afectando a la unión de las anexinas y de otras proteínas a las membranas y a la localización intracelular de estas proteínas.<sup>160</sup>

En respuesta a un cambio en los niveles de colesterol intracelulares, AnxA6 aumenta su unión a las membranas de manera dependiente de calcio.<sup>224</sup> Mientras que la mayoría de la proteína endógena AnxA6 se une a membranas de manera dependiente de calcio, una parte remanente también puede unirse a membranas de endosomas de manera independiente de calcio. Este hecho se encuentra influenciado por la cantidad y distribución del colesterol intracelular.<sup>160</sup>

La sobreexpresión de AnxA6 tiene como consecuencia una acumulación de colesterol en los endosomas tardíos provocando una disminución de éste en el resto de los compartimentos celulares, concretamente en el aparato de Golgi y en la membrana plasmática, modificando la distribución intracelular del colesterol. En este escenario se produce una acumulación de Caveolina 1 en el aparato de Golgi y una disminución de caveolas en la superficie celular.<sup>227</sup> La acumulación de colesterol en los endosomas tardíos incrementa la localización de AnxA6 en estos compartimentos.<sup>173</sup> El cambio de localización de AnxA6 a los endosomas tardíos provoca la inactivación de Rab7 mediante la interacción de AnxA6 con TBC1D15, una proteína GAP de Rab7.<sup>196</sup>

Por otro lado, la presencia de AnxA6 en la membrana plasmática se encuentra asociada a la formación de dominios ricos en fosfatidilserina, afectando la actividad de proteínas residentes en dominios cercanos ricos en colesterol que controlan su transporte.<sup>160</sup>

#### **4.3.2 Anexina A6 en el tráfico y la estructura de membrana.**

La salida de colesterol de los endosomas tardíos determina en parte la disponibilidad del colesterol celular en otros compartimentos. El colesterol se encuentra implicado en la formación de vesículas en el aparato de Golgi y regula la localización y actividad de las proteínas SNARE (*SNAP [soluble NSF Attachment Protein] Receptor*).<sup>160</sup> Las proteínas SNARE regulan el transporte, el acoplamiento y la fusión vesicular en el tráfico de membranas y la exocitosis.<sup>228</sup> Las syntaxinas son una familia de proteínas SNARE que poseen un dominio carboxilo terminal hidrofóbico por el cual se anclan a la superficie citoplasmática de las membranas celulares y se encuentran localizadas en diferentes compartimentos subcelulares.<sup>229</sup> La sobreexpresión de AnxA6 en células de ovario de hámster chino (*chinese hamster ovary*, CHO) induce el cambio de localización de la proteína syntaxina 6 ubicada en TGN y de las proteínas SNAP23 y syntaxina 4 situadas en la membrana plasmática<sup>230</sup> hacia vesículas endosomales.<sup>160</sup> La localización de syntaxina 6 en endosomas inducida por AnxA6, inhibe el reciclaje de determinadas integrinas y reduce la migración celular y la invasión,<sup>231</sup> evidenciando que AnxA6 altera la localización de syntaxina 6 y el tráfico de membranas.<sup>160</sup>

En estado basal la proteína AnxA6 se encuentra asociada a invaginaciones recubiertas de clatrina en procesos endocíticos de la membrana plasmática.<sup>232</sup> Sin embargo, las células que presentan elevados niveles de AnxA6 muestran una disminución en la formación de los dominios lipídicos de membrana,<sup>233</sup> evidenciando como la proteína AnxA6 produce alteraciones en la estructura de membrana.<sup>160</sup>

### **4.3.3 Anexina A6 en la señalización celular.**

La proteína AnxA6 interacciona con la isoforma  $\alpha$  de la proteína quinasa C (*protein kinase C*, PKC) en presencia de fosfatidilserina y con la isoforma PKC $\beta$  en el citosol del músculo esquelético.<sup>234</sup> Se ha descrito que elevados niveles de AnxA6 producen un aumento de la unión de PKC $\alpha$  a la membrana plasmática.<sup>160,170</sup> Esta unión de PKC $\alpha$  a la membrana plasmática es necesaria para que realice la fosforilación de EGFR provocando su inactivación.<sup>235</sup> EGFR es un efector de la vía Ras/MAPK una de las cascadas más importantes en el control de la proliferación celular y la diferenciación.<sup>236</sup>

AnxA6 citosólica interacciona con la proteína p120GAP (*guanosine triphosphatase activating protein p120*),<sup>237</sup> la única guanosina trifosfatasa que se une a EGFR, mediante el dominio C2 de la proteína p120GAP.<sup>238</sup> Esta interacción produce el reclutamiento de la proteína p120GAP hacia la membrana plasmática<sup>197</sup> de manera dependiente de calcio donde interacciona con H-Ras (*Retrovirus associated protein*) inhibiendo su señalización.<sup>160, 239</sup>

### **4.3.4 Anexina A6 y el citoesqueleto de actina.**

Se ha descrito la interacción de determinados miembros de la familia de las anexinas con el citoesqueleto de actina. Esta interacción tiene lugar en las proximidades de las membranas celulares, por lo que las anexinas participan en la endocitosis y la migración celular.<sup>160</sup>

AnxA6 tiene la capacidad de unirse a los filamentos de actina de manera dependiente de calcio<sup>193</sup> y el aumento de expresión de AnxA6 en la membrana plasmática produce un reordenamiento de F-actina y una estabilización del citoesqueleto cortical.<sup>240</sup>

La presencia de AnxA6 en la membrana plasmática disminuye la entrada de calcio al interior celular regulada por SOCE (*Store-operated calcium entry*) por lo que la proteína AnxA6 es clave en la relación del citoesqueleto de actina y SOCE. La interacción de AnxA6 con la membrana plasmática seguido de la estabilización de la actina cortical contribuye a la atenuación de la entrada de calcio en la célula.<sup>240</sup>

#### **4.4 Ratón genoanulado para la proteína Anexina A6.**

Para determinar nuevas funciones biológicas de la proteína AnxA6 en un modelo de estudio *in vivo* se utiliza un modelo de ratón que presentaba la proteína AnxA6 deplecionada mediante la disrupción de este gen.<sup>241</sup>

El gen AnxA6 no resulta ser esencial para la viabilidad del ratón. La depleción de AnxA6 no presenta ningún efecto obvio en la estructura de los adultos ni en el desarrollo de sus tejidos. La morfología de los principales órganos es la esperada y los estudios histológicos no muestran diferencias con respecto a los ratones control. Además, no se observan compensaciones de otras anexinas como AnxA1, AnxA2 y AnxA5.<sup>241</sup>

En 1996 Guntjeski-Hamblin y colaboradores describieron una función relevante de la AnxA6 en el sistema cardiovascular mediante la sobreexpresión de AnxA6 en el corazón. En este modelo se observó miocarditis difusa, infiltración linfocítica, fibrosis en el corazón y en las venas pulmonares.<sup>242</sup> Sin embargo, el ratón AnxA6ko tiene un ritmo cardíaco, presión sanguínea y respuesta cardiovascular a un shock séptico similar a los ratones control.<sup>212</sup>

Respecto al sistema inmunitario, la expresión de AnxA6 se encuentra aumentada durante la diferenciación de los linfocitos B y T,<sup>222</sup> aunque el ratón AnxA6ko presenta un desarrollo normal de los linfocitos B y T sin un fenotipo inmunológico. En cambio, se ha observado que los ratones AnxA6ko presentan una disminución en la señalización de interleuquina 2, la cual, es necesaria para la proliferación de las células T. Por otro lado, los nodos linfáticos de los ratones AnxA6ko tienen niveles significativamente más bajos de proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, aunque no muestran diferencias en la proliferación de los linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>).<sup>243</sup>

Recientes estudios han descrito el papel de AnxA6 en el metabolismo de lípidos y carbohidratos en ratones AnxA6ko estabulados con una dieta rica en grasas. En estas condiciones los ratones muestran un hígado graso, resistencia a insulina, incapacidad de regular la gluconeogénesis y como consecuencia los niveles de glucosa en sangre.<sup>244</sup>

## 5. Homeostasis de calcio celular.

El calcio regula una amplia gama de procesos celulares desde la movilidad celular y la fusión de vesículas hasta el metabolismo celular.<sup>245</sup> La homeostasis de calcio intracelular se lleva a cabo mediante la entrada de calcio a través de la membrana plasmática por canales de calcio o por medio de la salida de calcio del retículo endoplasmático, lugar de almacenamiento del calcio intracelular. Ambos mecanismos se encuentran interconectados ya que la salida de calcio del retículo endoplasmático activa los canales permeables de entrada de calcio en la membrana plasmática celular.<sup>246</sup>

### 5.1 Canales de calcio celulares.

En 1992 Hoth y Penner descubrieron los canales de calcio activados por la liberación interna de calcio (*inward calcium release-activated calcium*, ICRA). Estos canales se encuentran ubicados en la membrana plasmática celular y es el mecanismo por el cual las células no excitables eléctricamente mantienen los niveles de calcio intracelulares y reponen sus reservas de calcio vaciadas tras la estimulación de la salida de calcio de estas reservas impulsada por un receptor.<sup>247</sup> Recientes hallazgos en relación con la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  dependiente de depósito, SOCE,<sup>248</sup> han evidenciado la actuación de SOCE través de canales ICRA.<sup>249</sup>

Estudios llevados a cabo en *Drosophila*<sup>250</sup> y en células de mamífero<sup>251</sup> han identificado la proteína STIM1 (*stromal interacting molecule 1*) formando parte de SOCE. STIM1 es una proteína transmembrana del retículo endoplasmático con un motivo EF de unión a calcio en el dominio N terminal ubicado en el lumen del retículo endoplasmático.<sup>251</sup> Un descenso en los niveles de calcio en el retículo endoplasmático induce una rápida traslocación de STIM1 hacia la membrana plasmática junto con un cambio de conformación que expone determinadas secuencias que interaccionan con la proteína 1 del canal de calcio activo por la liberación de calcio (*calcium release-activated calcium channel protein 1*, Orai1).<sup>252</sup>

## 5.2 Molécula de interacción estromal 1, STIM1.

La proteína STIM1 actúa como un sensor de los almacenes de calcio intracelulares en el retículo endoplasmático conectando la salida de calcio del reservorio con la entrada de calcio a la célula.<sup>246</sup> STIM1 se ha descrito como un componente esencial en la función de los canales ICRAC en células *Drosophila* S2 y en linfocitos T humanos.<sup>250</sup> En *Drosophila* sólo existe STIM1, sin embargo, las células de mamífero expresan dos variantes STIM1 y STIM2,<sup>248</sup> aunque STIM2 no regula la entrada de calcio en células humanas.

La actividad de STIM1 se ve alterada debido a mutaciones o alteraciones en su oligomerización aumentando la actividad de SOCE.<sup>253</sup> Se ha descrito una variante de *splicing*, STIM1L, que co-localiza con Orai1 y actina formando agrupaciones permanentes permitiendo una activación inmediata de SOCE. STIM1L posee un dominio de unión a actina que ancla la proteína al citoesqueleto de actina concentrando a STIM1L en los sitios de contacto entre la membrana plasmática y el retículo endoplasmático con una rápida activación de Orai1.<sup>254</sup>

## 5.3 Proteína 1 del canal de calcio activo por la liberación de calcio, Orai1.

En mamíferos podemos encontrar tres genes diferentes de la familia Orai, Orai1, Orai2, y Orai3,<sup>252</sup> aunque el miembro más importante es Orai1.<sup>248</sup> La proteína Orai1 se compone de 4 segmentos transmembrana, reside en la membrana plasmática celular e interviene en la función de los canales ICRAC como una subunidad porosa y esencial de estos canales.<sup>252,255</sup>

En humanos Orai1 presenta dos isoformas coexistentes y de cantidad similares. La isoforma Orai1 $\alpha$  con un peso molecular de 33 kDa correspondiente al tamaño molecular predicho en base a su secuencia y la isoforma Orai1 $\beta$  con tamaño de 23 kDa. La pérdida del dominio de unión a fosfolípidos en la isoforma Orai1 $\beta$  induce un aumento en la movilidad en la membrana plasmática celular en comparación con la movilidad de Orai1 $\alpha$ .<sup>256</sup>

#### 5.4 Entrada de calcio mediada por SOCE y metabolismo celular.

La entrada de calcio mediada por SOCE es un mecanismo relevante para un balance de calcio idóneo en los hepatocitos y un adecuado control del sistema metabólico. Los hepatocitos de ratones obesos disminuyen significativamente la actividad de SOCE debido a un defecto en la translocación de STIM1. Por otro lado, los hepatocitos primarios deficientes en STIM1 presentan un elevado estrés celular, un aumento en la producción de glucosa y una acumulación de cuerpos lipídicos.<sup>257</sup>

Los ratones que presentan las proteínas Orai1 y STIM1 deplecionadas muestran una acumulación patológica de cuerpos lipídicos en el hígado, corazón y músculo esquelético. Las células humanas que presentan una ausencia de la función de las proteínas STIM1 y Orai1 debido a mutaciones, acumulan cuerpos lipídicos, evidenciando el papel relevante de SOCE en la regulación del metabolismo de los lípidos. SOCE es determinante en la movilización de ácidos grasos a cuerpos lipídicos, en la lipólisis y en la oxidación de ácidos grasos mitocondrial.<sup>258</sup>

Los hepatocitos con esteatosis presentan la homeostasis de calcio intracelular alterada debido a la inhibición de SOCE por la acumulación lipídica. Los niveles de calcio en el retículo endoplasmático disminuyen provocando estrés en el retículo endoplasmático, un regulador determinante en la progresión del hígado con esteatosis en diferentes enfermedades hepáticas como la insensibilidad a insulina y el carcinoma hepatocelular.<sup>259</sup>

Alteraciones en los dominios asociados a balsas lipídicas en la membrana plasmática reducen la interacción entre Orai1 y STIM1. Este hecho produce la disminución de la entrada de calcio, evidenciando que la interacción entre ambas proteínas ocurre en lugares asociados a balsas lipídicas en la membrana plasmática celular.<sup>260</sup> Sin embargo, las balsas lipídicas en la membrana plasmática regulan la activación de SOCE pero no su mantenimiento.<sup>261</sup>





Objetivos



## OBJETIVOS

Anexina A6 es una proteína miembro de la familia de las anexinas que se encuentra implicada en diversos aspectos del tráfico intracelular en las vías endo- y exocíticas. Además, es una de las proteínas más abundantes en el hígado (0.25% de la proteína hepática total), aunque su función en la fisiología del hígado permanece desconocida.

En esta tesis se ha estudiado el papel *in vivo* de la Anexina A6 hepática utilizando un modelo de ratón que presenta la proteína Anexina A6 deplecionada en todos los tejidos y dos condiciones fisiológicas de estrés: la regeneración hepática y el ayuno.

Los objetivos presentes en esta tesis doctoral son:

- [1] Determinar la función de Anexina A6 en el metabolismo de la glucosa durante la regeneración hepática en hígado de ratón.
- [2] Estudiar el papel de Anexina A6 en el metabolismo de la glucosa en ayuno.



## OBJECTIVES

Annexin A6 is member protein of the annexin family that is involved in various aspects of intracellular traffic in the endo- and exocytic pathways. In addition, it is the one of the most abundant proteins in the liver (0.25% of total liver protein), although its role in liver physiology remains unknown.

In this thesis, the *in vivo* role of hepatic Annexin A6 has been studied using a mouse model that presents the Annexin A6 protein depleted in all tissues and two physiological stress conditions: hepatic regeneration and fasting.

The objectives set out in this doctoral thesis are:

[1] To determine the role of Annexin A6 in glucose metabolism during liver regeneration in mouse liver.

[2] To study the role of Annexin A6 in fasting glucose metabolism.



Resultados

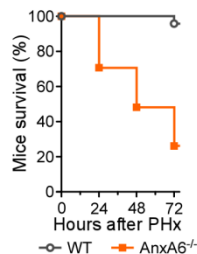




## 1. Antecedentes.

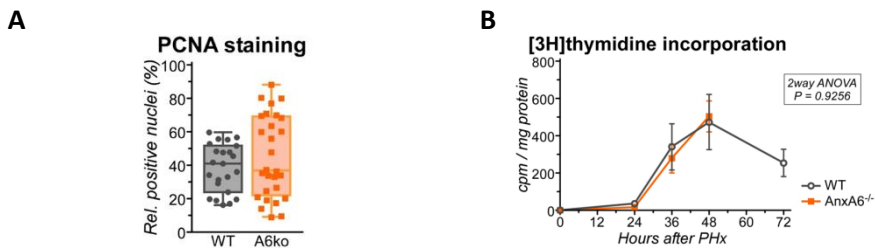
En 1999 Hawkins y colaboradores diseñaron el ratón AnxA6ko con la inserción de un gen de resistencia a Neomicina en el exón 3 de AnxA6 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. El objetivo de su estudio era determinar la función de AnxA6 en cardiomiocitos ya que es una proteína altamente expresada en corazón. Los análisis realizados en cardiomiocitos aislados revelaron una disminución de los niveles de calcio basal y alteraciones en las funciones contráctiles. Los autores concluyeron que la depleción del gen AnxA6 no es esencial para la viabilidad del ratón y para la función regular de sus órganos ya que los ratones AnxA6ko presentan un desarrollo inmunológico y una función cardiovascular normales.<sup>241</sup> Sin embargo, existen muchos aspectos de este ratón que aún no han sido estudiados, por ejemplo, un estudio más reciente reveló una disminución de los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en ratones AnxA6ko en comparación con los ratones control.<sup>243</sup>

AnxA6 representa un 0.25% de la proteína hepática total y se encuentra altamente expresada en el hígado de ratón y rata,<sup>223</sup> pero su función en la fisiología de este órgano es desconocida. Para determinar su función en el hígado de ratón, se realizó un estudio de regeneración hepática mediante el modelo de PHx<sup>48</sup> en ratones salvajes (wt) y en ratones AnxA6ko. Se eligió este modelo de estudio ya que la regeneración hepática conlleva a un estrés agudo proliferativo y metabólico. Resultados preliminares muestran una baja supervivencia a las 72 horas post-cirugía de los ratones AnxA6ko (18.5±7.5%) en comparación con los ratones wt (90±6.4%) sugiriendo la implicación de esta proteína en la regeneración hepática (Figura 14).



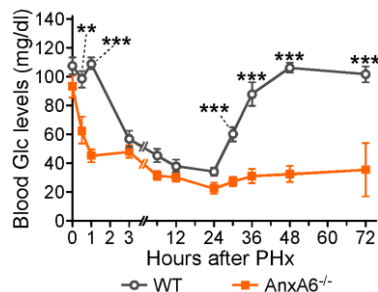
**Figura 14.** Porcentaje de supervivencia según Mantel-Cox<sup>262</sup> de los ratones wt y AnxA6ko a diferentes horas post PHx (n=23 ratones wt y n=27 ratones AnxA6ko).

Tras estos resultados se analizó la respuesta de la fase de activación, la progresión del ciclo celular y la respuesta metabólica del hígado como los procesos clave en la regeneración hepática.<sup>62,263</sup> Los ensayos realizados para la caracterización de la activación engloban la tinción del antígeno nuclear de proliferación celular (*proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) (Figura 15A) y la incorporación de timidina radiactiva al ADN (Figura 15B), que no mostraron diferencias entre ratones wt y AnxA6ko post PHx.



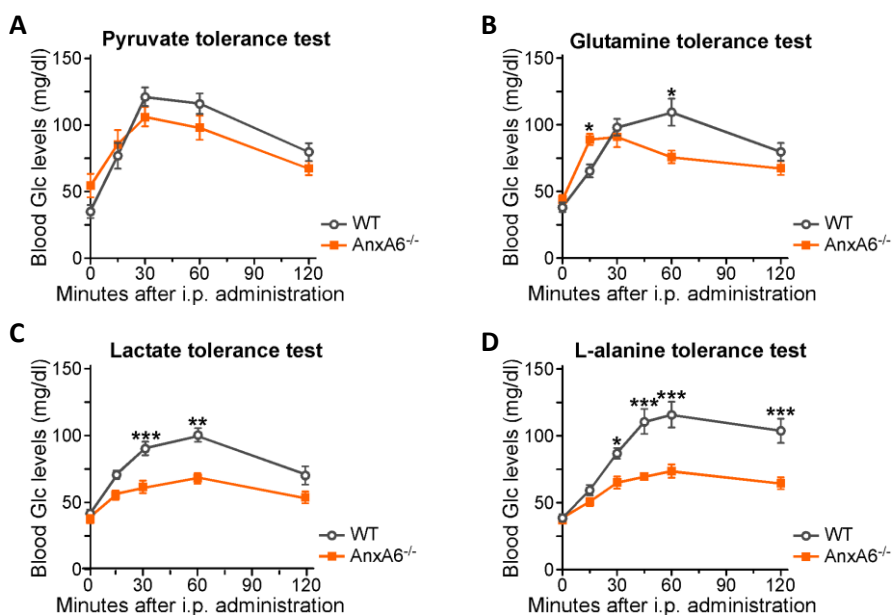
**Figura 15.** A) Porcentaje de núcleos marcados positivamente mediante inmunohistoquímica de PCNA en hígados de ratones wt y AnxA6ko en parafina a las 48 horas post PHx. B) Internalización al ADN de [<sup>3</sup>H]-timidina en ratones wt y AnxA6ko a diferentes horas post PHx.

Este conjunto de resultados sugirió descartar la hipótesis de que la muerte de los ratones AnxA6ko post PHx fuera consecuencia de un fallo en la fase pre-replicative de la regeneración hepática. Este escenario planteó el análisis y caracterización del metabolismo de los ratones, ya que durante el proceso de regeneración hepática el hígado debe mantener sus funciones metabólicas. Para determinar si la baja supervivencia de los ratones AnxA6ko post PHx se debe a un estrés agudo metabólico, se analizaron los niveles de glucosa en sangre en ratones wt y AnxA6ko post PHx (Figura 16). Los resultados muestran que la homeostasis de glucosa está alterada en los ratones AnxA6ko post PHx.



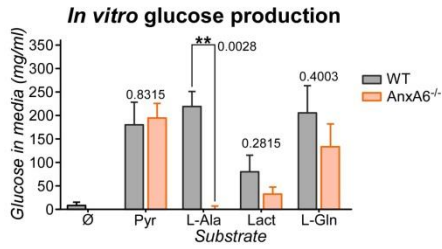
**Figura 16.** Niveles de glucosa en sangre en ratones wt y AnxA6ko a diferentes horas post PHx (n=10 ratones wt y n=12 ratones AnxA6ko).

Para caracterizar la vía de la gluconeogénesis, se realizaron test de tolerancia a piruvato, glutamina, lactato y L-alanina (Figura 17A,B,C,D). Los test de tolerancia a piruvato y glutamina revelaron un correcto funcionamiento de la vía de la gluconeogénesis a partir de estos sustratos. Sin embargo, los test de tolerancia a lactato y L-alanina evidenciaron que los ratones AnxA6ko presentan una menor capacidad de sintetizar glucosa a partir de estos sustratos metabólicos en comparación con los ratones wt.



**Figura 17.** A) Niveles de glucosa en sangre producidos a los 0, 30, 60 y 120 minutos desde la inyección intraperitoneal de (A) piruvato (n=6 por genotipo), (B) glutamina (n=12 por genotipo), (C) lactato (n=22 por genotipo) y (D) L-alanina (n=13 por genotipo) en ratones wt y AnxA6ko.

La síntesis de glucosa tiene lugar principalmente en el hígado, pero también puede llevarse a cabo en menor medida en el riñón.<sup>11,12</sup> Para confirmar que el defecto gluconeogénico tiene lugar en el hígado, se aislaron hepatocitos primarios de hígado de ratones wt y AnxA6ko y se midió su capacidad de producir glucosa a partir de diferentes sustratos gluconeogénicos. Los resultados muestran que los hepatocitos aislados de los ratones AnxA6ko son incapaces de producir glucosa a partir de L-alanina, y sí a partir de piruvato, glutamina o lactato (Figura 18).



**Figura 18.** Niveles de glucosa secretados al medio obtenidos a partir de la suplementación con diferentes sustratos gluconeogénicos de los hepatocitos aislados de ratones wt y AnxA6ko (n=4 por genotipo). Piruvato (*piruvate*, Pyr), L-alanina (*L-alanine*, L-Ala), lactato (*lactate*, Lact) y L-glutamina (*L-glutamine*, L-Gln).

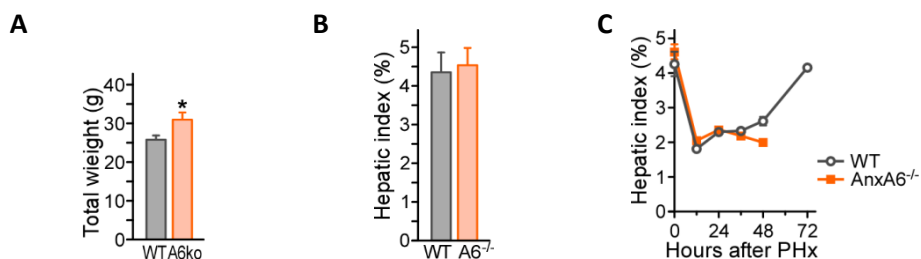
En base a estos antecedentes, la realización de esta tesis doctoral se ha centrado en el papel determinante de AnxA6 en el proceso de regeneración hepática, en la captación de L-alanina en hígado y su implicación en la gluconeogénesis.

## 2. Caracterizar la función de Anexina A6 en la regeneración hepática.

El hígado es el único órgano que puede regular por sí mismo su tamaño y puede regenerarse mediante hiperplasia compensatoria.<sup>72</sup> En el estudio de la regeneración hepática, los modelos experimentales más utilizados son los ratones y las ratas.<sup>4</sup> En base a los antecedentes y a los resultados previos obtenidos en el laboratorio, se procedió a determinar el papel que desempeña AnxA6 en la regeneración hepática.

### 2.1 Índice hepático.

El hígado constituye el 5% de la masa total del individuo y durante la regeneración hepática debe mantener sus diversas funciones. Para determinar la recuperación de la masa hepática se pesó el hígado a diferentes tiempos post PHx en ratones wt y AnxA6ko. En la figura 19A podemos observar como los ratones AnxA6ko presentan un peso corporal significativamente superior con respecto a los ratones wt. Sin embargo, al analizar el índice hepático a 0 horas no hay diferencias entre ambos genotipos (Figura 19B), por lo que presentan una proporción igual en cuanto a la relación de la masa corporal y el peso del hígado. A diferentes horas post PHx el índice hepático de los ratones AnxA6ko no muestra diferencias con respecto a los ratones wt (Figura 19C). A partir de 48 horas post PHx no se puede determinar el índice hepático de los ratones AnxA6ko debido a la baja supervivencia que presentan (Figura 14).

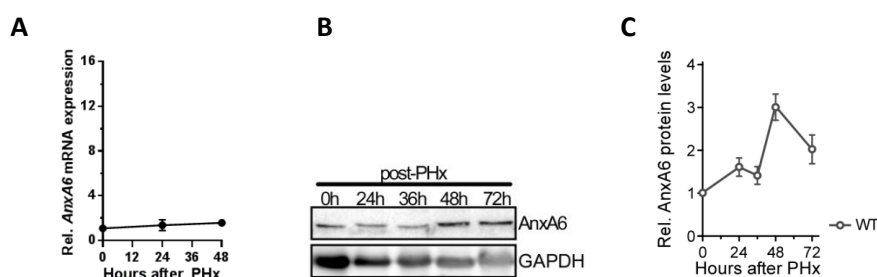


**Figura 19.** A) Peso corporal de ratones wt y AnxA6ko de 12 semanas de edad (n=5 por genotipo). B) Índice hepático de ratones wt y AnxA6ko de 12 semanas de edad (n=5 por genotipo). C) Índice hepático de ratones wt y AnxA6ko de 12 semanas de edad a diferentes horas post PHx (n=6 por genotipo).

## 2.2 Expresión y localización de Anexina A6 en el hígado de ratón post PHx.

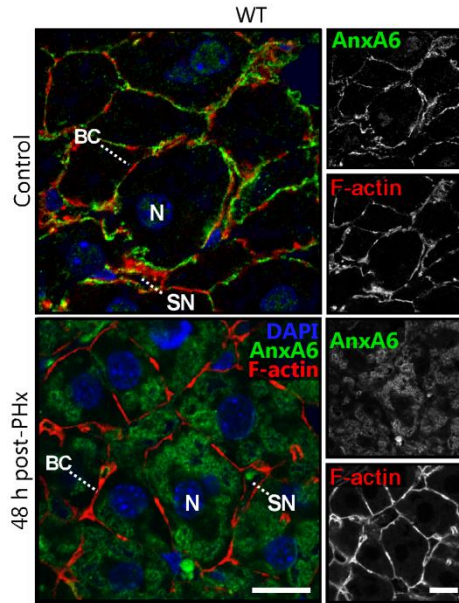
Dada la evidente importancia de la proteína AnxA6 en los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis, se procedió a realizar una caracterización más detallada de la proteína AnxA6. Se analizaron los niveles relativos de ARNm y la cantidad de proteína en ratones wt a diferentes horas post PHx. También, se realizaron estudios inmunohistoquímicos para determinar la localización de AnxA6 en el hígado de ratón wt en estado basal y a diferentes horas post PHx.

En la figura 20A no se observan diferencias en la expresión relativa de ARNm de la proteína AnxA6 a 24 y 48 horas en ratones wt post PHx. La figura 20B, muestra un aumento significativo de la cantidad de proteína a 48 y 72 horas post PHx con respecto al estado basal (Figura 20C).



**Figura 20.** A) Expresión relativa de ARNm de la proteína AnxA6 en ratones wt en estado basal y a diferentes horas post PHx (n=5 por genotipo). B) *Western Blot* de las proteínas AnxA6 y GAPDH en hígados wt en estado basal y a diferentes horas post PHx (n=3 por genotipo). C) Cuantificación de los niveles de las proteínas AnxA6 y GAPDH de la figura 20B.

Los análisis inmunohistoquímicos de cortes histológicos hepáticos a diferentes tiempos post PHx muestran que la proteína AnxA6 se encuentra mayoritariamente en la membrana plasmática sinusoidal del hepatocito en estado basal, mientras que a 48 horas post PHx cambia su localización predominantemente en estructuras vesiculares en el interior de los hepatocitos (Figura 21).



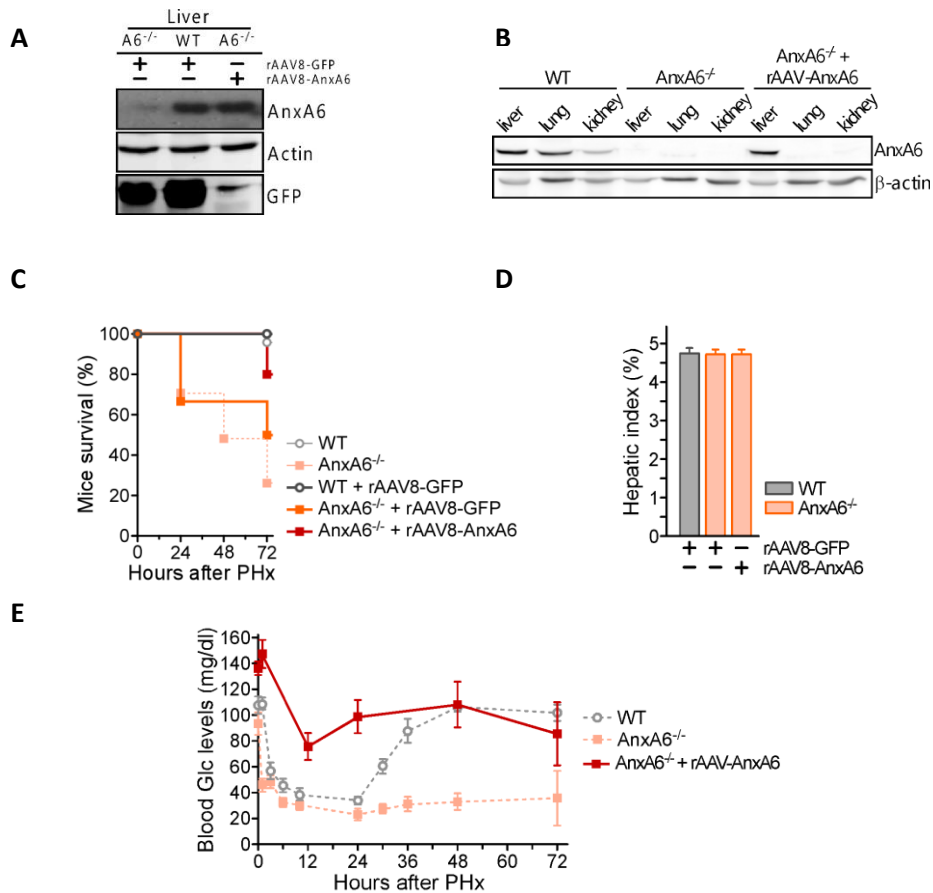
**Figura 21.** Inmunohistoquímica de cortes histológicos de hígado de ratón wt a 0 horas y 48 horas PHx de la proteína AnxA6 (verde), DAPI (azul) y F-actina (rojo). Núcleo (N), sinusoide (SN) y canalículo biliar (BC). Barra 10  $\mu\text{m}$ .

### 2.3 Rescate del genotipo Anexina A6 en hígado de ratón.

La baja supervivencia de los ratones AnxA6ko a las 72 horas post PHx (Figura 14) junto con el aumento de los niveles de la proteína AnxA6 post PHx (Figura 20B), pone de manifiesto la importancia de AnxA6 en el hígado de ratón durante la regeneración hepática. Para determinar si la baja supervivencia de los ratones AnxA6ko se debe exclusivamente a la presencia de dicha proteína en el hígado, se procedió a infectar los hepatocitos de ratones AnxA6ko con adenovirus asociados rAAV8-GFP y rAAV8-AnxA6 que sobreexpresan las proteínas GFP (*Green fluorescence protein*) y AnxA6 respectivamente bajo el promotor de la albúmina de manera restrictiva en el hígado. El procedimiento se realizó mediante la inyección vía intravenosa de  $10^{11}$ gc/ratón de dichos virus utilizando como vehículo suero salino. La expresión de la proteína AnxA6 (Figura 22A) restrictivamente en el hígado (Figura 22B) de ratones AnxA6ko infectados con el virus adenoasociado rAAV8-AnxA6 rescata la supervivencia en el 80% de los ratones operados a las 72 horas post PHx (Figura 22C).



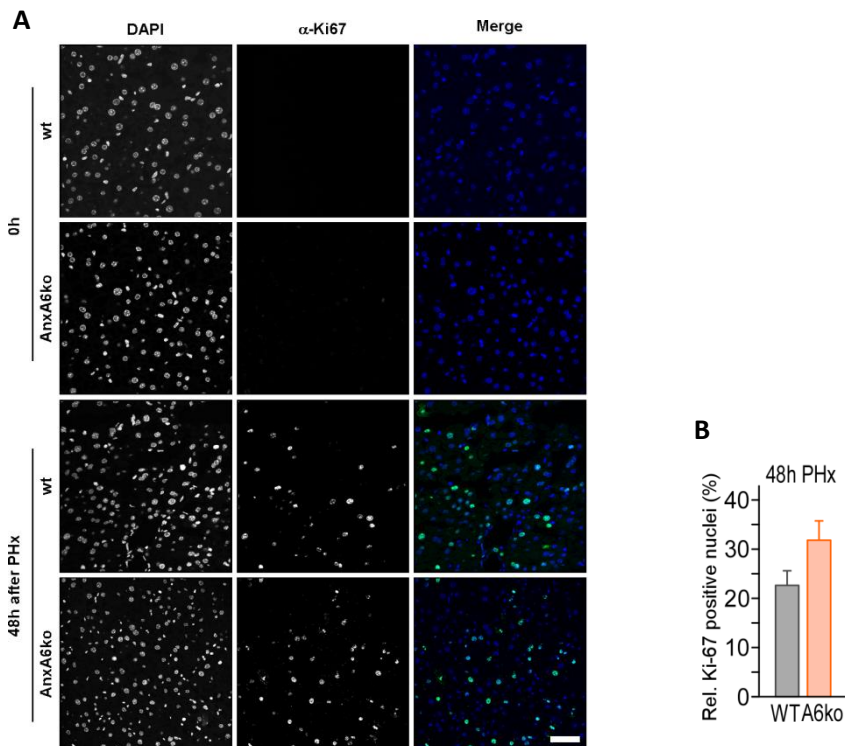
También se analizó el índice de regeneración hepática (Figura 22D) y podemos observar cómo tanto los pocos ratones que sobreviven con el virus rAAV8-GFP o los ratones que sobreexpresan el virus rAAV8-AnxA6 presentan un índice de regeneración hepática similar a los ratones control con el virus rAAV8-GFP a las 72 horas post PHx. La figura 22E muestra como el rescate de la proteína AnxA6 en el hígado de los ratones AnxA6ko recupera los niveles de glucosa a diferentes horas post PHx.



**Figura 22.** A) *Western Blot* de lisados de hígado de ratón a los 15 días de infectar con el virus rAAV8-GFP y con el virus rAAV8-AnxA6. B) *Western Blot* de lisados de hígado, pulmón y riñón de ratón wt, AnxA6ko y AnxA6ko infectados con el virus rAAV8-AnxA6 a los 7 días de infección. C) Porcentaje de supervivencia de los ratones infectados con virus rAAV8-GFP y con el virus rAAV8-AnxA6 post PHx (n=10 por genotipo). D) Índice de regeneración hepática post PHx en ratones wt y AnxA6ko infectados con adenovirus asociados rAAV8-GFP y con el virus rAAV8-AnxA6 (n=5 por genotipo). E) Niveles de glucosa en ratones wt, AnxA6ko y AnxA6ko infectados con el virus rAAV8-AnxA6 a diferentes horas post PHx (n=5 AnxA6ko con el virus rAAV8-AnxA6).

## 2.4 Caracterización de la proliferación celular.

La proteína Ki67 es un marcador de proliferación celular que se presenta activo durante todas las fases del ciclo celular en el núcleo, pero se encuentra ausente en las células quiescentes ( $G_0$ ).<sup>264</sup> Para descartar un fallo en la entrada ( $G_0 \rightarrow G1$ ) al ciclo celular de los hepatocitos AnxA6ko post PHx, se realizó una inmunohistoquímica en cortes histológicos de hígados wt y AnxA6ko a 0 y 48 horas post PHx utilizando como marcador ki67. En la figura 23A podemos observar que en estado basal cuando los hepatocitos son quiescentes, la proteína ki67 no se expresa. Sin embargo, a 48 horas post PHx el 20% de los núcleos wt y el 30% de los núcleos AnxA6ko que se encuentran en proliferación están marcados por ki67. Tras realizar el análisis estadístico se observó que no había diferencias en el número de núcleos teñidos entre ambos genotipos (Figura 23B) descartando un fallo proliferativo en los hepatocitos de los ratones AnxA6ko post PHx.

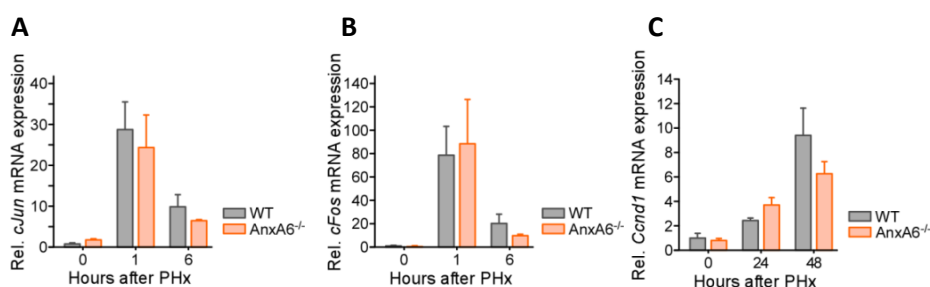


**Figura 23.** A) Inmunohistoquímica de hígado de ratón wt y AnxA6ko a 0 y 48 horas post PHx. Núcleos teñidos con el anticuerpo Ki67 (verde) y DAPI (azul). B) Cuantificación del número de núcleos teñidos por ki67a las 48 horas post PHx para ambos genotipos (n=3 por genotipo). Barra 60  $\mu$ m.

## 2.5 Análisis de la fase de activación y transición G1/S del ciclo celular.

Posterior a la PHx comienza la fase pre-replicativa con la transición de los hepatocitos quiescentes ( $G_0$ ) y activación de los genes tempranos ( $G_1$ ), que finaliza con la síntesis de ADN (fase S).<sup>72</sup> En la activación de genes tempranos, el factor de transcripción AP-1 se compone de las familias de proteínas cJun, cFos, ATF y JDP. Estas proteínas regulan determinados procesos como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular.<sup>265</sup> Por otro lado, la proteína ciclina D1 es necesaria para la transición G1/S del ciclo celular.<sup>266</sup> Para caracterizar la proliferación celular se analizó la expresión de los genes tempranos *cJun* y *cFos* mediante PCR cuantitativa en estado basal y a diferentes tiempos post PHx en hígados de ratones wt y AnxA6ko. Para determinar la transición G1/S del ciclo celular, se analizó la expresión del gen ciclina D1 (*Ccnd1*) mediante PCR cuantitativa en estado basal y a diferentes tiempos post PHx en hígados de ratones wt y AnxA6ko.

La figura 24A muestra un aumento en la expresión relativa de ARNm del gen *cJun* tras 1 hora post PHx. Sin embargo, no hay diferencias significativas en los niveles de expresión entre ratones wt y AnxA6ko. Por otro lado, la expresión relativa de ARNm del gen *cFos* también presenta su máxima expresión tras 1 hora post PHx, aunque no haya diferencias en la expresión entre ambos genotipos (figura 24B). La figura 24C muestra un aumento progresivo de la expresión relativa de ARNm del gen *Ccnd1* a las 24 y 48 horas post PHx. Los ratones AnxA6ko presentan una ligera caída de la expresión de *Ccnd1* a las 48 horas post PHx pero no presenta significación estadística entre ambos genotipos.

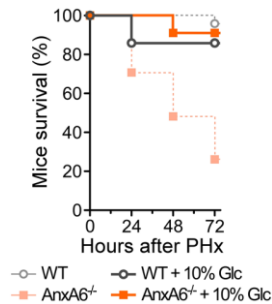


**Figura 24.** A) Niveles de expresión relativa de ARNm del gen *cJun*, B) *cFos* y C) *Ccnd1* a diferentes horas post PHx en ratones wt y AnxA6ko (n=5 por genotipo).

### 3. Determinar la función de Anexina A6 en el metabolismo de la glucosa en hígado de ratón post PHx.

Los resultados obtenidos en el primer bloque de esta tesis doctoral refuerzan aún más que la baja supervivencia de los ratones AnxA6ko post PHx (Figura 14) no es consecuencia de un fallo de la activación proliferativa ni en la capacidad de los hepatocitos de entrar en el ciclo celular. Teniendo en cuenta la incapacidad de mantener los niveles de glucosa post PHx de los ratones AnxA6ko (Figura 16), se plantea el escenario de una severa hipoglucemia como consecuencia de la muerte de los ratones AnxA6ko post PHx.

Para determinar si la muerte de los ratones AnxA6ko se debe a una grave hipoglucemia se realizó un estudio de supervivencia post PHx en ratones wt y AnxA6ko suplementando el agua de bebida con 10% (p/v) de glucosa. La figura 25 muestra como la suplementación con 10% de glucosa en el agua de bebida restaura la supervivencia de los ratones AnxA6ko post PHx al mismo nivel que los ratones wt. Este resultado sugiere un papel determinante de la proteína AnxA6 en el metabolismo de la glucosa.



**Figura 25.** Porcentaje de supervivencia de los ratones wt y AnxA6ko a diferentes horas post PHx con una suplementación en el agua de bebida del 10% de glucosa (p/v) (n=10 ratones wt y n=12 ratones AnxA6ko).

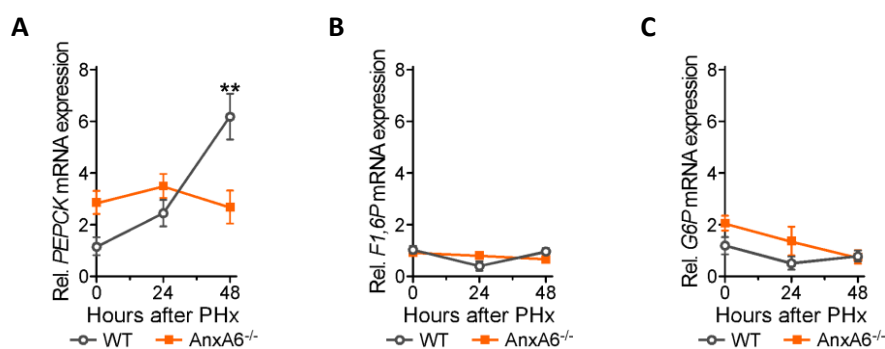
En base a los antecedentes y a los resultados obtenidos en el primer bloque de la realización de la tesis doctoral, este segundo bloque de resultados se focaliza en determinar cuál es la función de AnxA6 en el metabolismo de la glucosa durante el proceso de regeneración hepática.

### 3.1 Caracterización de la expresión génica de las enzimas principales en la vía gluconeogénica en la regeneración hepática.

La vía de la gluconeogénesis o formación de la glucosa en el hígado presenta tres enzimas principales para el correcto funcionamiento de la vía. La enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PEPCK) cataliza la formación de fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato en uno de los primeros pasos de la vía. La enzima fructosa bifosfatasa (F1,6P) cataliza la degradación de fructosa-1,6-bifosfato a fructosa-6-fosfato y en último lugar la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6P) desfosforila la glucosa-6-fosfato al producto final de la gluconeogénesis, la glucosa.<sup>36</sup>

Para caracterizar la expresión de las enzimas principales de la vía de la gluconeogénesis se analizaron los niveles de expresión relativa de ARNm mediante PCR cuantitativa en ratones wt y AnxA6ko a 0, 24 y 48 horas post PHx.

La figura 26A muestra que los niveles de expresión relativa de ARNm de PEPCK se mantienen a diferentes horas post PHx en ratones AnxA6ko presentando una disminución significativa a las 48 horas post PHx en comparación con los ratones wt. Por otro lado, F1,6P y G6P (Figura 26B y 26C) no presentan diferencias de expresión relativa de ARNm entre ambos genotipos.



**Figura 26.** A) Niveles de expresión de ARNm del gen *PEPCK*, B) *F1,6P*, C) *G6P* a diferentes horas post PHx (n=5 por genotipo).

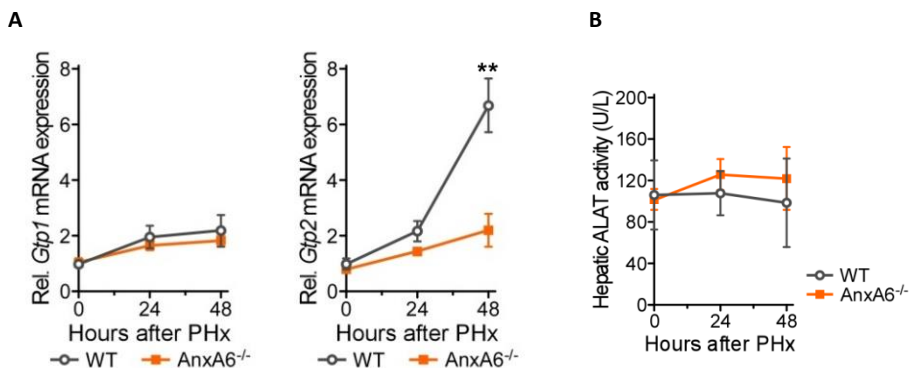
### 3.2 Niveles de expresión y actividad de la enzima ALAT post PHx.

La enzima ALAT o transaminasa glutámico-pirúvica (*glutamine pyruvate transaminase*, Gtp) es la encargada de la obtención de piruvato a partir de L-alanina. Dicha enzima presenta dos isoformas codificadas *Gtp1* y *Gtp2*.<sup>267</sup>

Para caracterizar la vía gluconeogénica en los pasos previos a la obtención de piruvato, se procedió a analizar si el aminoácido L-alanina podía ser metabolizado una vez captado en el interior del hepatocito. Se analizaron los niveles de expresión relativos de ARNm de los genes *Gtp1* y *Gtp2* además de la actividad de ALAT en ratones wt y AnxA6ko a diferentes horas post PHx.

Los niveles de expresión relativa de ARNm del gen *Gtp1* aumentan ligeramente a las 48 horas post PHx en comparación con el estado basal, pero no presenta diferencias de expresión entre ambos genotipos (Figura 27A). Por otro lado, la expresión relativa de ARNm del gen *Gtp2* no muestra diferencias a las 24 horas post PHx entre ambos genotipos. Sin embargo, a las 48 horas post PHx los ratones wt presentan un aumento significativo de expresión de *Gtp2* en comparación con los ratones AnxA6ko (Figura 27A).

En la figura 27B se puede observar que no hay diferencias en los niveles de actividad de la enzima ALAT en ratones wt y AnxA6ko a 0, 24 y 48 horas post PHx.



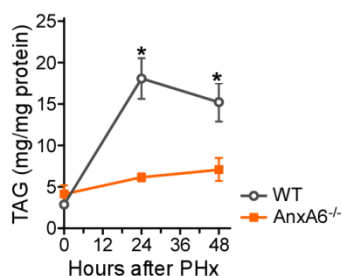
**Figura 27.** A) Expresión relativa de ARNm de los genes *Gtp1* y *Gtp2* post PHx en ratones wt y AnxA6ko (n=5 por genotipo). B) Actividad de ALAT a diferentes horas post PHx en ratones wt y AnxA6ko (n=5 por genotipo).

### 3.3 Niveles de triglicéridos en hígado de ratón post PHx.

Los triglicéridos son la reserva lipídica energética y pueden ser almacenados en forma de cuerpos lipídicos en los hepatocitos o pueden estar en el torrente sanguíneo como lipoproteínas de muy baja densidad.<sup>41</sup> Las primeras horas tras una PHx se produce una esteatosis hepática<sup>268</sup> necesaria para cubrir eficazmente la demanda energética y estructural de lípidos. El hígado es el órgano encargado de metabolizar tanto glúcidos como lípidos<sup>36</sup> y el metabolismo de ambos está interconectado.<sup>1</sup> Resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral mostraron que los hepatocitos aislados de los ratones AnxA6ko no pueden sintetizar glucosa *de novo* como fuente de energía a partir de L-alanina (Figura 18).

Para determinar cuantitativamente si los hepatocitos de los ratones AnxA6ko utilizan lípidos como sustrato metabólico post PHx como compensación por el defecto que presentan en la homeostasis de glucosa, se analizaron los niveles de triglicéridos en hígado de ratones wt y AnxA6ko a 0, 24 y 48 horas post PHx.

La figura 28 muestra como en estado basal no hay diferencia en la concentración de triglicéridos en el hígado entre ambos genotipos. A las 24 horas post PHx se produce un aumento tres veces superior en la concentración de triglicéridos en ratones wt en comparación con su estado basal, el cual, no se observa en los ratones AnxA6ko. A las 48 horas post PHx los niveles de triglicéridos en ratones wt continúan siendo significativamente superiores en comparación con los ratones AnxA6ko.



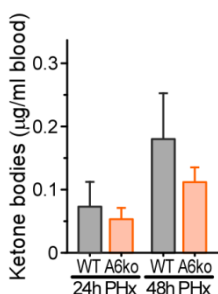
**Figura 28.** Concentración de triglicéridos en hígado de ratones wt y AnxA6ko a 0, 24 y 48 horas post PHx (n=5 por genotipo).

### 3.4 Cuerpos cetónicos en plasma de ratón post PHx.

El sustrato alternativo a la glucosa en el cerebro son los cuerpos cetónicos, los cuales se sintetizan a través de la beta-oxidación de los ácidos grasos en las células hepáticas. Los cuerpos cetónicos se producen por cetogénesis en la matriz de las mitocondrias de las células de hígado y se forman en situaciones en las que el metabolismo de la glucosa está comprometido.<sup>36,46</sup> Por otro lado, una acumulación de cuerpos cetónicos en los tejidos y el plasma podría dar lugar a una cetoacidosis metabólica.<sup>46</sup>

Para determinar si los ratones AnxA6ko realizan una correcta  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y descartar que estos ratones presenten cetoacidosis metabólica, se analizaron los niveles de cuerpos cetónicos presentes en el plasma sanguíneo de los ratones wt y AnxA6ko a 24 y 48 horas post PHx.

En la figura 29 podemos observar que los niveles de cuerpos cetónicos en plasma a 24 y 48 horas post PHx son inferiores en ratones AnxA6ko en comparación con los ratones wt aunque no hay diferencias significativas en estos niveles de cuerpos cetónicos. Este resultado muestra que los ratones AnxA6ko no presentan un defecto en la síntesis de cuerpos cetónicos a partir de la beta-oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria.



**Figura 29.** Niveles de cuerpos cetónicos presentes en el plasma a 24 y 48 horas post PHx en ratones wt y AnxA6ko (n=5 por genotipo).

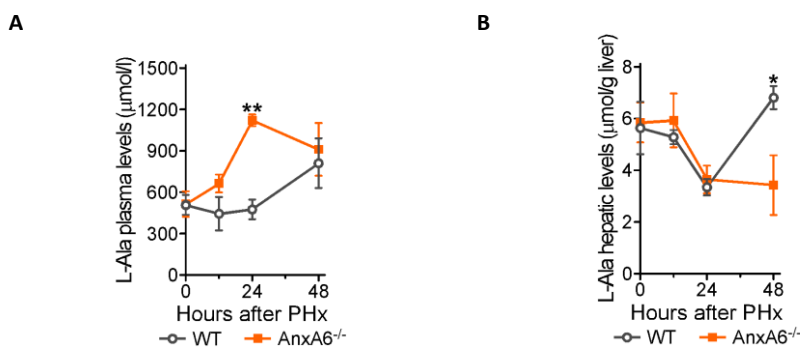


### 3.5 Niveles de L-alanina en plasma e hígado de ratón post PHx.

El hecho de que los ratones AnxA6ko no puedan mantener los niveles de glucosa post PHx (Figura 16), presenten unos niveles inferiores de glucosa en sangre al realizar el test de tolerancia a L-alanina (Figura 17D), sumado a la incapacidad de los hepatocitos aislados de los ratones AnxA6ko para sintetizar glucosa a partir de L-alanina (Figura 18) plantea el posible escenario de que el aminoácido L-alanina no esté siendo captado por los hepatocitos de los ratones AnxA6ko.

Para determinar si los hepatocitos de ratones AnxA6ko pueden captar el principal aminoácido gluconeogénico L-alanina se analizaron los niveles de L-alanina en plasma y en hígado en estado basal y a diferentes horas post PHx en ratones wt y AnxA6ko.

En la figura 30A podemos observar que los ratones AnxA6ko presentan unos niveles de L-alanina en plasma significativamente superiores a las 24 horas post PHx en comparación con los ratones control. Por otro lado, los niveles de L-alanina en hígado disminuyen significativamente en los ratones AnxA6ko al compararlos con los niveles de L-alanina en el hígado en ratones wt a las 48 horas post PHx (Figura 30B). Estos resultados sugieren que el aminoácido L-alanina no está siendo captado en su totalidad por los hepatocitos AnxA6ko evidenciando una vez más el fallo en la gluconeogénesis que presentan los ratones AnxA6ko.



**Figura 30.** A) Niveles de L-alanina en plasma de ratones wt y AnxA6ko en estado basal y a diferentes horas post PHx (n=5 por genotipo). B) Niveles de L-alanina en hígado de ratones wt y AnxA6ko en estado basal y a diferentes horas post PHx (n=5 por genotipo).

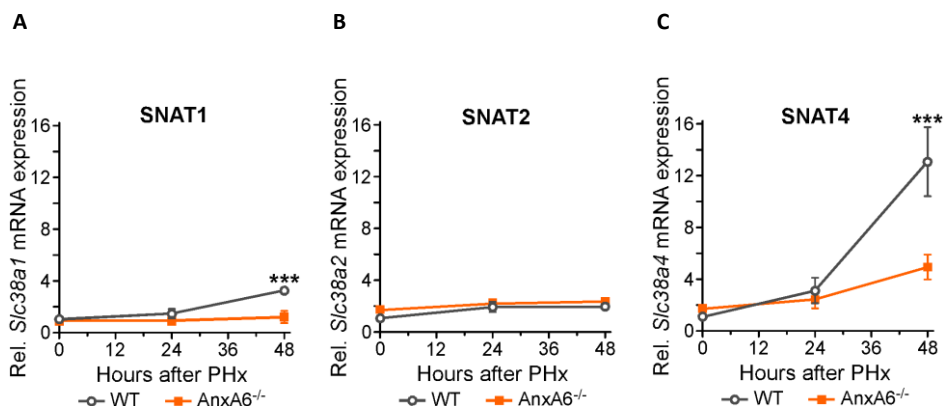
### 3.6 Niveles de expresión de los transportadores de L-alanina en hígado de ratón post PHx.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran un fallo evidente en la síntesis de glucosa *de novo* a partir de L-alanina en hepatocitos aislados AnxA6ko (Figura 18). Además, se ha observado una acumulación de L-alanina en el plasma de los ratones AnxA6ko a las 24 horas post PHx (Figura 30A) y una disminución de los niveles de L-alanina en el hígado de los ratones AnxA6ko a las 48 horas post PHx al compararlos con los ratones control (Figura 30B).

En el hígado, los aminoácidos L-alanina y glutamina son los principales precursores de la gluconeogénesis.<sup>21</sup> Los transportadores del Sistema A, SNAT1, SNAT2 y SNAT4, se encargan del transporte del aminoácido L-alanina al interior del hepatocito.<sup>74</sup>

Para determinar si el fallo en la captación de L-alanina por parte de los transportadores del Sistema A se debe a que la proteína AnxA6 modifica los niveles de expresión de estos transportadores, se analizaron los niveles de expresión relativa de ARNm mediante PCR cuantitativa de los genes *Slc38a1*, *Slc38a2* y *Slc38a4* que corresponden a las proteínas SNAT1, SNAT2 y SNAT4 respectivamente en hígado de ratón wt y AnxA6ko a 0, 24 y 48 horas post PHx.

En la figura 31 podemos observar que las gráficas A y C que corresponden a los genes *Slc38a1* y *Slc38a4* respectivamente presentan un aumento en los niveles de expresión relativa de ARNm en hígado de ratones wt a las 48 horas post PHx en comparación con su estado basal. Los niveles de expresión de estos genes en los hígados AnxA6ko a las 48 horas post PHx son significativamente inferiores al compararlos con los ratones control. Por otro lado, el gen *Slc38a2* (Figura 31B) no aumenta su expresión a diferentes horas post PHx y no presenta diferencias en la expresión relativa de ARNm entre ambos genotipos.



**Figura 31.** Expresión relativa de ARNm en ratones wt y AnxA6ko de los genes A) *Slc38a1*, B) *Slc38a2* y C) *Slc38a4* a 0, 24 y 48 horas post PHx (n=5 por genotipo).

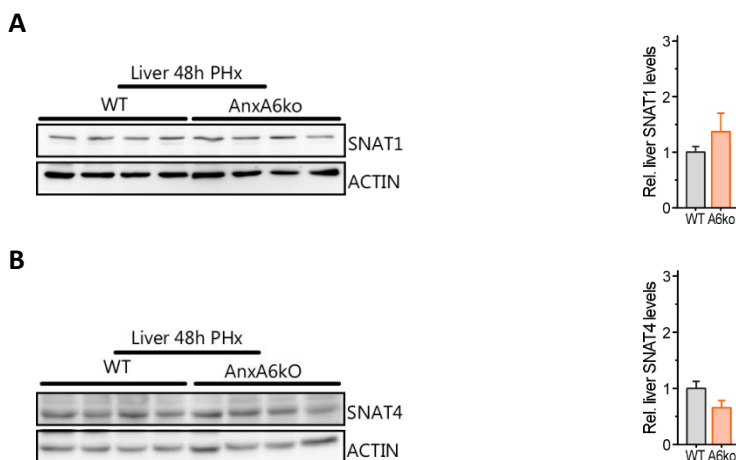
### 3.7 Cuantificación de los niveles de proteína de SNAT1 Y SNAT4 en el hígado de ratón post PHx.

En 2001, Gazzola y colaboradores describieron que la expresión de los transportadores del Sistema A aumenta en el hígado en situación de ayuno cuando la gluconeogénesis está activada y la necesidad de sustrato es elevada.<sup>269</sup>

Los ratones AnxA6ko presentan niveles significativamente inferiores en la expresión relativa de ARNm en hígado para los genes *Slc38a1* y *Slc38a4* en comparación con los ratones wt a las 48 horas post PHx (Figura 31A y 31C). La disminución en los niveles de expresión relativa de ARNm podría producir una disminución en la cantidad de proteína endógena y por lo tanto una menor captación de L-alanina por parte de los hepatocitos AnxA6ko.

En base a estos resultados, se decidió determinar la cantidad de proteína endógena en ambos genotipos a partir de homogeneizados de hígado de ratón a 0 y 48 horas post PHx. Se generan anticuerpos policlonales de conejo de las proteínas SNAT2-GST y SNAT4-GST purificadas de bacteria, mediante la inyección intramuscular y la posterior exanguinación del conejo para la obtención del sérum con los anticuerpos generados presentes de estas proteínas (apartado 16 de los métodos).

En la figura 32A podemos observar que no hay diferencias en la cantidad de proteína endógena de la proteína SNAT1 presente en los homogeneizados de hígado de ratones wt y AnxA6ko a 0 y 48 horas post PHx entre ambos genotipos. Por otro lado, la figura 32B muestra que no hay diferencias en la cantidad de proteína endógena hepática con respecto al transportador SNAT4 al comparar los ratones wt y AnxA6ko.

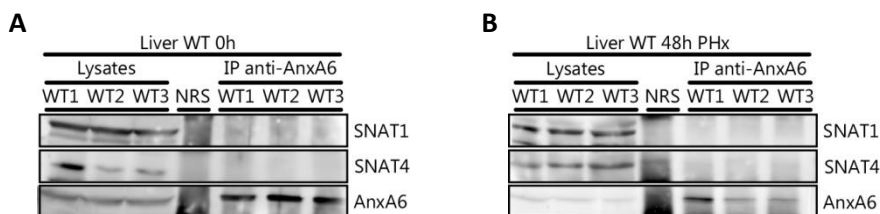


**Figura 32.** A) *Western Blot* de las proteínas SNAT1 y actina en homogeneizados de hígados wt y AnxA6ko a las 48 horas post PHx. B) *Western Blot* de las proteínas SNAT4 y actina en homogeneizados de hígados wt y AnxA6ko a las 48 horas post PHx.

### 3.8 Análisis de la interacción entre Anexina A6 y las proteínas SNAT1 y SNAT4 en hígado de ratón.

La proteína AnxA6 presenta una localización citosólica y cambia su localización a la membrana plasmática y al compartimento endocítico en respuesta a cambios en la concentración de colesterol y calcio intracelulares.<sup>224</sup> Para determinar si la incapacidad de captar L-alanina por parte de hepatocitos de los ratones AnxA6ko se debe a que la ausencia de AnxA6 altera los mecanismos de transporte a través de la interacción entre la proteína AnxA6 y los transportadores de L-alanina, se llevó a cabo el análisis de la interacción de la proteína AnxA6 con las proteínas SNAT1 y SNAT4 mediante inmunoprecipitaciones en hígado de ratón wt en estado basal y a 48 horas post PHx.

En la figura 33 se puede observar que a tiempo 0 y a 48 horas post PHx la proteína AnxA6 no interacciona con los transportadores de L-alanina, SNAT1 y SNAT4 en las condiciones de estudio analizadas. Aunque no podemos descartar interacciones indirectas a través de otra proteína. Este resultado muestra que AnxA6 no altera la función de SNAT1 y SNAT4 mediante una interacción directa y prolongada con estas proteínas.



**Figura 33.** A) Inmunoprecipitación de la proteína AnxA6 con las proteínas SNAT1 y SNAT4 en hígado de ratón wt. B) Inmunoprecipitación de la proteína AnxA6 con las proteínas SNAT1 y SNAT4 en hígado de ratón wt a 48 horas post PHx.

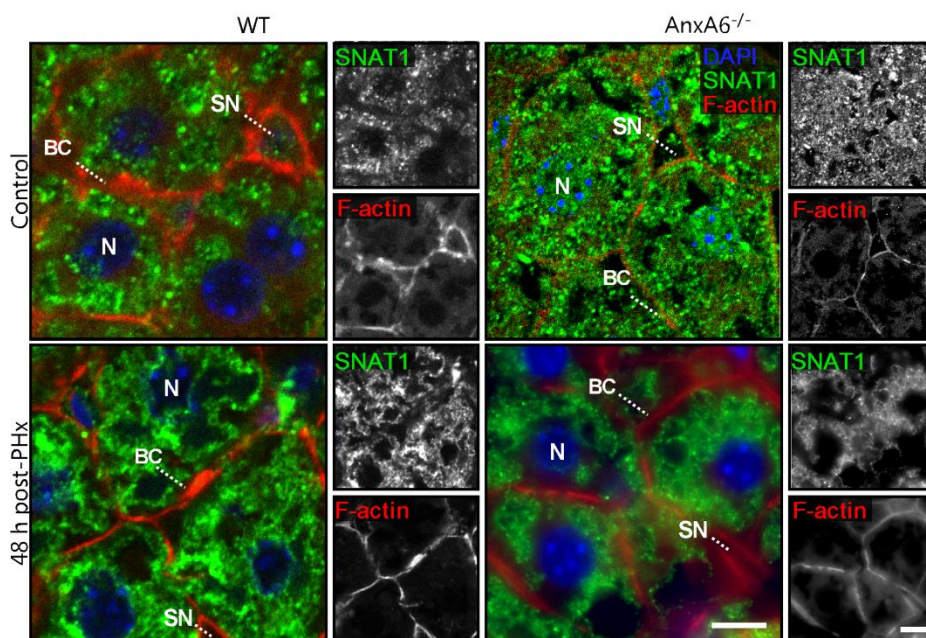
### 3.9 Determinación de la localización de las proteínas SNAT1 y SNAT4 en hígado de ratón.

La captación de L-alanina por parte de los transportadores del Sistema A se lleva a cabo en la membrana plasmática sinusoidal de los hepatocitos, dominio basal del hepatocito en contacto con la sangre donde se produce el intercambio de sustrato. Se ha descrito la acumulación de la proteína SNAT1 en el interior de las células hepáticas humanas,<sup>130</sup> mientras que se ha detallado la localización de la proteína SNAT4 en la región sinusoidal<sup>134</sup> de los hepatocitos perivenosos en el hígado de ratón.<sup>133</sup> Para determinar si las proteínas SNAT1 y SNAT4 cambian su localización en el interior del hepatocito post PHx para realizar la captación de L-alanina, se analizó mediante inmunohistoquímica la localización celular de las proteínas SNAT1 y SNAT4 en cortes histológicos de hígado de ratón a diferentes horas post PHx.

En la figura 34 se puede observar que la proteína SNAT1 en estado basal presenta una localización en estructuras vesiculares en el interior del hepatocito en ambos genotipos y que a las 48 horas post PHx la localización intracelular de SNAT1 no se modifica.

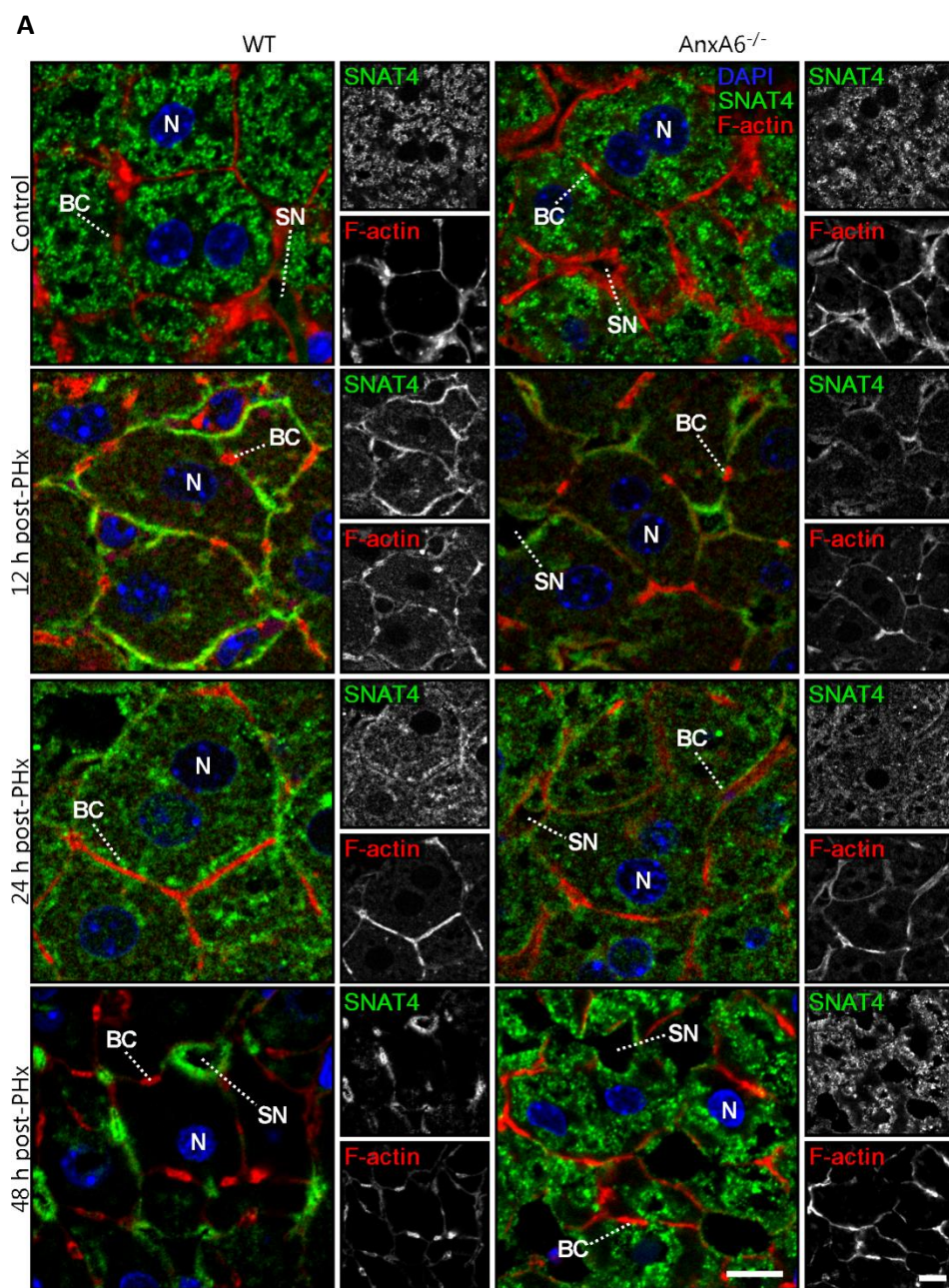
Por otro lado, la figura 35A muestra la localización intracelular de la proteína SNAT4 en estado basal, la cual, se encuentra en el interior del hepatocito en ambos genotipos. A las 12 horas post PHx se produce un cambio de localización de la proteína SNAT4 a la membrana plasmática sinusoidal para realizar la captación de L-alanina. A las 24 horas post PHx se observa que la proteína SNAT4 se encuentra localizada tanto en estructuras vesiculares como en la membrana plasmática sinusoidal. A las 48 horas post PHx la proteína SNAT4 cambia de localización hacia la membrana plasmática sinusoidal en los hepatocitos de los ratones wt. Sin embargo, en los hepatocitos AnxA6ko podemos observar que la proteína SNAT4 permanece retenida en el interior del hepatocito en estructuras de apariencia vesicular a las 48 horas post PHx.

La intensidad de la proteína SNAT4 en la membrana plasmática sinusoidal en los hepatocitos wt es significativamente superior a la intensidad presente en los hepatocitos AnxA6ko a las 48 horas post PHx (Figura 35B).



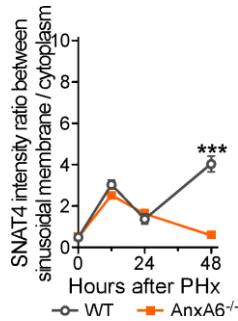
**Figura 34.** Inmunohistoquímica de la proteína SNAT1 (verde), DAPI (azul) y F-actina (rojo) en hígados de ratones wt y AnxA6ko a 0 y 48 horas post PHx. Núcleo (N), sinusoides (SN) y canalículo biliar (BC). Barra 10  $\mu$ m.





**Figura 35.** A) Inmunohistoquímica de la proteína SNAT4 (verde), DAPI (azul) y F-actina (rojo) en hígados de ratones wt y AnxA6Ko a 0, 12, 24 y 48 horas post PHx. Núcleo (N), sinusoide (SN) y canalículo biliar (BC). Barra 10  $\mu$ m.

**B**



**Figura 35.** B) Cuantificación de la intensidad de la proteína SNAT4 presente en la membrana plasmática sinusoidal y en el interior del hepatocito de la figura 35A.

### 3.10 Determinación de la localización de la proteína SNAT4 en el hígado de ratón AnxA6ko infectado con el virus rAAV8-AnxA6.

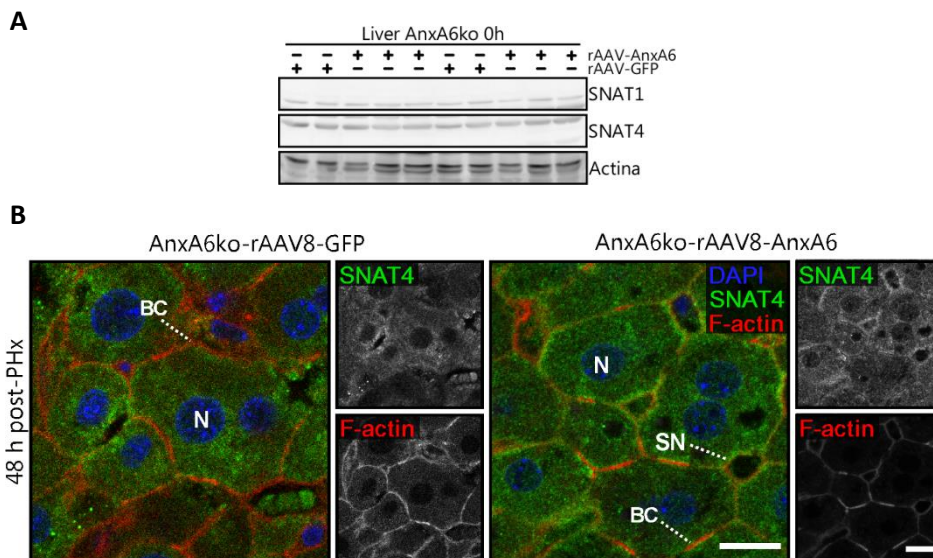
Tanto los antecedentes como los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la baja supervivencia de los ratones AnxA6ko post PHx (Figura 14) se puede rescatar mediante la sobreexpresión restrictiva en el hígado del virus adenoasociado rAAV8-AnxA6 (Figura 22B y 22C). Esta baja supervivencia se debe a una severa hipoglucemia como consecuencia de la incapacidad por parte de los hepatocitos AnxA6ko de captar L-alanina a las 48 horas post PHx (Figura 35A), principal aminoácido captado por el hígado en la gluconeogénesis.<sup>270</sup>

Para determinar si el rescate de la supervivencia de los ratones AnxA6ko a las 48 horas post PHx al sobreexpresar la proteína AnxA6 en el hígado mediante la infección con el virus rAAV8-AnxA6 se debe a un cambio en la localización de la proteína SNAT4 hacia la membrana plasmática sinusoidal del hepatocito, se realizó un estudio de localización en cortes histológicos de hígado de los ratones AnxA6ko con el virus rAAV8-GFP y con el virus rAAV8-AnxA6 a las 48 horas post PHx.

En la figura 36A se puede observar que la expresión de los virus rAAV8-GFP y rAAV8-AnxA6 no afecta a la cantidad de proteína endógena de SNAT1 y SNAT4 presente en los hígados de los ratones AnxA6ko en estado basal.



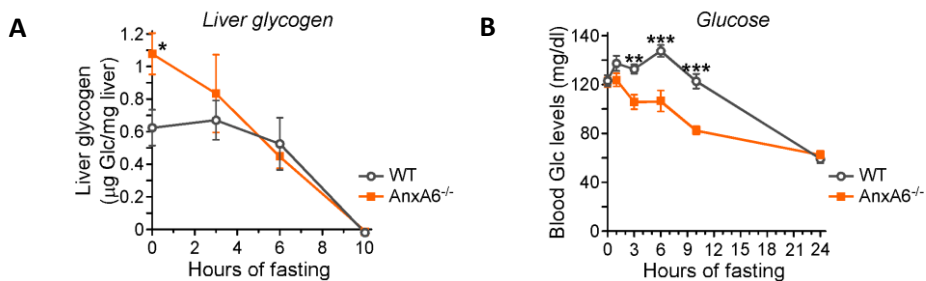
Teniendo en cuenta que los virus no afectan a la cantidad de proteína endógena de los transportadores de L-alanina, SNAT1 y SNAT4, se realizó el análisis de la localización de la proteína SNAT4 en los cortes histológicos de los hígados AnxA6ko infectados con los virus rAAV8-GFP y rAAV8-AnxA6 a las 48 horas post PHx. La figura 36B muestra como la proteína SNAT4 en el hígado de ratones AnxA6ko infectados con el virus rAAV8-GFP se encuentra localizada en el interior del hepatocito a las 48 horas post PHx. Sin embargo, al infectar el hígado de los ratones AnxA6ko con el virus rAAV8-AnxA6 gran parte de la proteína SNAT4 cambia su localización a la membrana plasmática sinusoidal.



**Figura 36.** A) *Western Blot* de las proteínas SNAT1 y SNAT4 de hígados de ratón AnxA6ko infectados con el virus rAAV8-GFP y el virus rAAV8-AnxA6 en estado basal. B) Inmunohistoquímica de la proteína SNAT4 (verde), DAPI (azul) y F-actina (rojo) en hígados AnxA6ko infectados con el virus rAAV8-GFP y rAAV8-AnxA6 a las 48 horas post PHx. Núcleo (N), sinusoide (SN) y canalículo biliar (BC). Barra 10  $\mu$ m.

#### 4. Determinar la función de la proteína Anexina A6 en el metabolismo de la glucosa durante el ayuno.

La producción de glucosa en el hígado se realiza inicialmente mediante la degradación de las reservas de glucógeno y posteriormente a partir de la síntesis de glucosa *de novo*.<sup>36</sup> Resultados preliminares del grupo mostraron que los ratones AnxA6ko presentan unos niveles de glucógeno en estado basal significativamente superiores en comparación con los ratones wt. Sin embargo, a diferentes horas de ayuno los ratones AnxA6ko presentan una correcta degradación y unos mismos niveles de glucógeno que los ratones wt (Figura 37A). Al analizar los niveles de glucosa en sangre en ratones wt y AnxA6ko a diferentes horas de ayuno, observamos que los ratones AnxA6ko presentan una disminución significativa de los niveles de glucosa en comparación con los ratones wt (Figura 37B).



**Figura 37.** A) Niveles de glucógeno en hígado de ratones wt y AnxA6ko a 0, 3, 6 y 10 horas de ayuno. B) Niveles de glucosa en ratones wt y AnxA6ko a 1, 3, 6, 10 y 24 horas de ayuno.

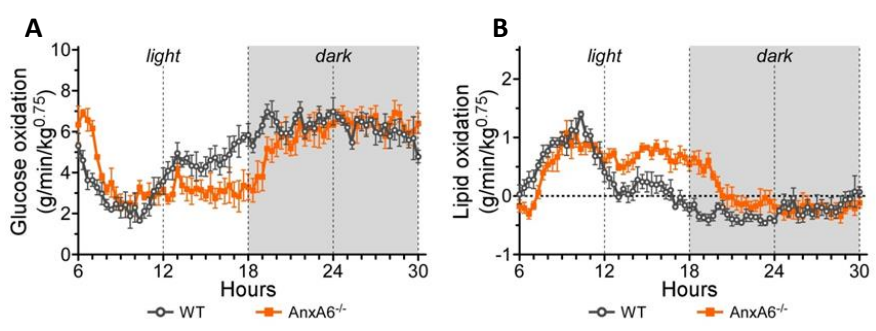
Estos resultados refuerzan la implicación de AnxA6 en el metabolismo de la glucosa por lo que nos propusimos estudiar y caracterizar en paralelo al modelo de regeneración hepática, el ayuno como modelo de estudio.

##### 4.1 Metabolismo energético mediante calorimetría indirecta en ayuno.

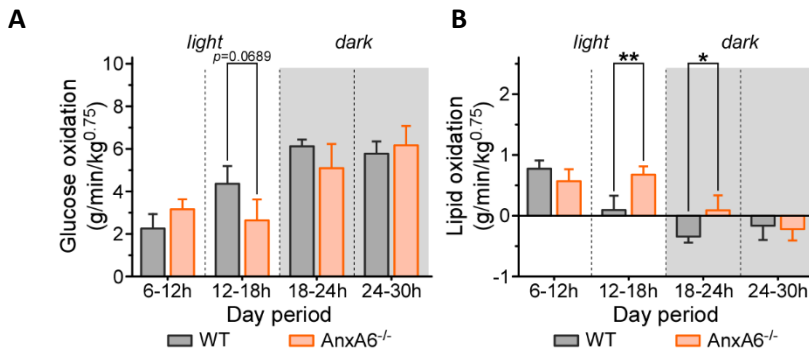
Para caracterizar más ampliamente el metabolismo energético de los ratones AnxA6ko, se planteó realizar un estudio mediante calorimetría indirecta en estado basal y a diferentes horas de ayuno para determinar el sustrato metabólico utilizado por los ratones AnxA6ko.

La técnica de calorimetría indirecta permite determinar la utilización de glúcidos y/o lípidos como sustrato metabólico por los ratones mediante su estabulación en cámaras metabólicas. Para determinar el sustrato metabólico utilizado preferentemente por los ratones AnxA6ko, se analizó en una cámara metabólica tanto el consumo de oxígeno como la producción de dióxido de carbono de los ratones wt y AnxA6ko cada 20 minutos durante 24 horas y mediante dos fórmulas se calcula la oxidación de glucosa ( $Glc_{ox}=4.55V_{CO_2}-3.2V_{O_2}-2.87N$ ) y la oxidación de lípidos ( $Lip_{ox}=1.67V_{CO_2}-V_{O_2}-1.92N$ ).

En las primeras 6 horas de luz que corresponden con el inicio del ciclo nocturno de los ratones se produce la degradación de las reservas de glucógeno. En la figura 38A se puede observar que durante este periodo inicial los ratones AnxA6ko presentan unos niveles de oxidación de glucosa ligeramente superiores en comparación con los ratones wt, aunque no presentan diferencias en la oxidación de lípidos (Figura 38B). Una vez transcurridas las primeras 6 horas se inicia la fase de ayuno voluntario, en la cual, se han agotado las reservas de glucógeno. En este punto metabólico y durante las siguientes 9 horas, los ratones wt presentan unos niveles de oxidación de glucosa significativamente superiores (Figura 38A y 39A) a los ratones AnxA6ko. Por el contrario, los ratones AnxA6ko muestran unos niveles de oxidación de lípidos significativamente superiores (Figura 38B y 39B) en comparación con los ratones wt al comienzo de la fase de ayuno voluntario y se prolonga durante las siguientes 9 horas hasta el comienzo del ciclo diurno.



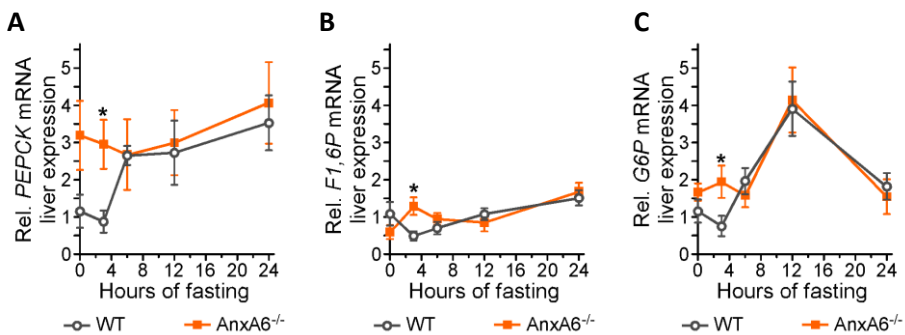
**Figura 38.** A) Niveles de oxidación de glucosa en ratones wt y AnxA6ko cada 20 minutos durante 24 horas. B) Niveles de oxidación de lípidos en ratones wt y AnxA6ko cada 20 minutos durante 24 horas.



**Figura 39.** A) Cuantificación de los niveles de glucosa en ratones wt y AnxA6ko cada 20 minutos durante 24 horas. B) Cuantificación de los niveles oxidación de lípidos en ratones wt y AnxA6ko cada 20 minutos durante 24 horas.

#### 4.2 Caracterización de las enzimas implicadas en la vía gluconeogénica en ayuno.

Los ratones AnxA6ko presentan una progresiva disminución de los niveles de glucosa a diferentes horas después de un periodo de ayuno (Figura 37B). Para caracterizar las principales enzimas de la vía gluconeogénica, PEPCK, F1,6P y G6P,<sup>36</sup> se analizaron los niveles de expresión relativa de ARNm mediante PCR cuantitativa en hígado de ratones wt y AnxA6ko en estado basal y a diferentes horas de ayuno. En la figura 40 se observa que los niveles de expresión de las enzimas PEPCK, F1,6P y G6P son significativamente superiores a las 4 horas de ayuno en ratones AnxA6ko en comparación con los ratones wt. Sin embargo, a partir de las 6 horas hasta las 24 horas de ayuno no se observan diferencias entre ambos genotipos.



**Figura 40.** A) Niveles de expresión de ARNm del gen *PEPCK*, B) *F1,6P*, C) *G6P* a diferentes horas de ayuno en ratones wt y AnxA6ko (n=5 por genotipo).

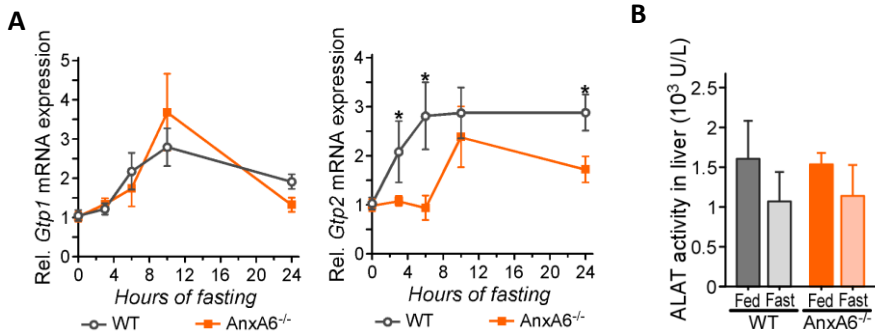
### 4.3 Niveles de expresión y actividad de la enzima ALAT en ayuno.

Los test de tolerancia realizados en el laboratorio para los sustratos metabólicos piruvato y glutamina (Figura 17A y 17B) y el análisis de la síntesis de glucosa *de novo* por parte de los hepatocitos aislados suplementados con piruvato y glutamina (Figura 18) no mostraron diferencias significativas entre ambos genotipos.

Sin embargo, el test de tolerancia a L-alanina (Figura 17D) mostró que los ratones AnxA6ko presentaban niveles de glucosa en sangre inferiores en comparación con los ratones wt. A su vez, los hepatocitos aislados de los ratones AnxA6ko no podían sintetizar glucosa *de novo* a partir de L-alanina (Figura 18). La enzima ALAT es la encargada de la conversión de L-alanina a piruvato mediante su desaminación y se encuentra codificada por los genes *Gtp1* y *Gtp2*.<sup>267</sup>

Para determinar si el aminoácido L-alanina podía ser metabolizado una vez captado en el interior del hepatocito, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de los genes *Gtp1* y *Gtp2* y la actividad de la enzima ALAT en ratones wt y AnxA6ko a diferentes horas de ayuno. La figura 41A muestra que no hay diferencias en la expresión relativa de ARNm en el hígado para el gen *Gtp1* entre ambos genotipos.

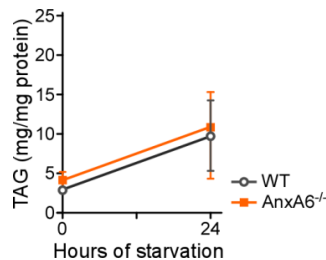
En la figura 41A se puede observar una disminución significativa en los niveles de expresión relativa de ARNm del gen *Gtp2* a las 3, 6 y 24 horas de ayuno en hígado de ratones AnxA6ko en comparación con los ratones wt. Por otro lado, la figura 41B muestra que la enzima ALAT no presenta diferencias en los niveles de actividad entre ambos genotipos. Estos resultados sugieren que los niveles de expresión relativa de ARNm para el gen *Gtp2* en los ratones AnxA6ko no alteran la actividad de la enzima ALAT, descartando que el aminoácido L-alanina no pueda ser metabolizado hasta su posterior conversión a piruvato en el interior del hepatocito.



**Figura 41.** A) Expresión relativa de ARNm de los genes *Gtp1* y *Gtp2* a diferentes horas de ayuno en hígados de ratones wt y AnxA6ko (n=5 por genotipo). B) Actividad de ALAT en lisados de hígado en estado postprandial y a las 24 horas de ayuno en ratones wt y AnxA6ko (n=5 por genotipo).

#### 4.4 Niveles de triglicéridos en el hígado de ratón en ayuno.

Los triglicéridos son la reserva energética lipídica y se almacenan en los cuerpos lipídicos de los hepatocitos o se encuentra en el torrente sanguíneo en VLDL.<sup>41</sup> El hígado es el principal órgano encargado de metabolizar tanto glúcidos como lípidos<sup>36</sup> y el metabolismo de ambos está interconectado.<sup>1</sup> Resultados obtenidos durante la realización de la tesis mostraron que los ratones AnxA6ko presentan niveles significativamente inferiores de triglicéridos post PHx en comparación con los ratones wt (Figura 28). Para determinar los niveles de triglicéridos en el hígado de ratones, se analizaron los niveles de triglicéridos en ratones wt y AnxA6ko a 0 y 24 horas de ayuno. La figura 42 muestra como no hay diferencias en los niveles de triglicéridos en hígado tanto en estados basal como a las 24 horas de ayuno entre ambos genotipos.

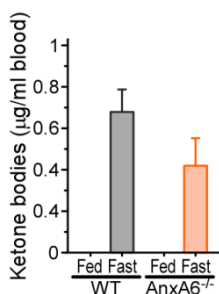


**Figura 42.** Niveles de triglicéridos en hígado de ratones wt y AnxA6ko en estado basal y a las 24 horas de ayuno (n=5 por genotipo).

#### 4.5 Niveles de cuerpos cetónicos en plasma en ayuno.

El sustrato alternativo a la glucosa en el cerebro son los cuerpos cetónicos. Los cuerpos cetónicos se sintetizan por cetogénesis en la matriz de las mitocondrias mediante la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en situaciones en las que el metabolismo de la glucosa está comprometido.<sup>36,46</sup> Nuestros resultados mostraron una correcta  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y por tanto una correcta síntesis de cuerpos cetónicos en los ratones AnxA6ko en comparación con los ratones wt post PHx (Figura 29). Para caracterizar los cuerpos cetónicos producidos en ratones AnxA6ko durante el ayuno, se cuantificaron los niveles de cuerpos cetónicos presentes en el plasma sanguíneo de los ratones wt y AnxA6ko a las 24 horas de ayuno.

La figura 43 muestra que no hay diferencias significativas en la concentración de cuerpos cetónicos en plasma a las 24 horas de ayuno al comparar ambos genotipos. Este resultado muestra la capacidad de las mitocondrias de los hepatocitos AnxA6ko para realizar la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y por la tanto la síntesis de cuerpos cetónicos.

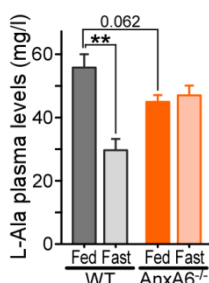


**Figura 43.** Niveles de cuerpos cetónicos en plasma a las 24 horas de ayuno en ratones wt y AnxA6ko (n=5 por genotipo).

#### 4.6 Niveles de L-alanina en plasma en ayuno.

Los ratones AnxA6ko no pueden mantener los niveles de glucosa en ayuno (Figura 37B) y junto con la incapacidad de los hepatocitos aislados de los ratones AnxA6ko de sintetizar glucosa a partir de L-alanina (Figura 18), plantea el posible escenario de que el aminoácido L-alanina no esté siendo captado por los hepatocitos de los ratones AnxA6ko.

Para determinar si los hepatocitos de los ratones AnxA6ko pueden captar el aminoácido L-alanina, se analizaron los niveles de L-alanina en plasma sanguíneo en ratones wt y AnxA6ko a 0 y 24 horas de ayuno. En la figura 44 se puede observar que los niveles de L-alanina en plasma en los ratones wt disminuye significativamente a las 24 horas de ayuno con respecto a su estado basal ya que la necesidad de sustrato metabólico es elevada. Sin embargo, los niveles de L-alanina en plasma en los ratones AnxA6ko no disminuyen a las 24 horas de ayuno en comparación con su estado basal. Al comparar los niveles de L-alanina en plasma a las 24 horas de ayuno entre los ratones wt y AnxA6ko se observa que los niveles de L-alanina en el plasma de los ratones AnxA6ko aumentan significativamente en comparación con los ratones control.



**Figura 44.** Niveles de L-alanina en plasma de ratones wt y AnxA6ko en estado basal y 24 horas de ayuno (n=5 por genotipo).

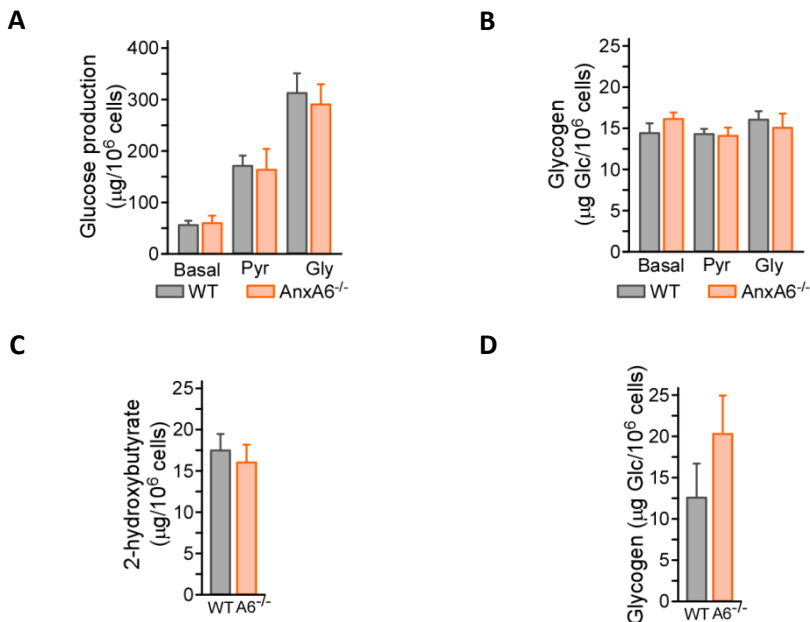
#### **4.7 Análisis de la síntesis de glucógeno y cuerpos cetónicos en hepatocitos aislados de ratones.**

El glucógeno es el polisacárido de reserva energética sintetizado por el hígado cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados. En ayuno, este polisacárido es degradado en glucosa. Es el primer paso de obtención de glucosa por parte del hígado hasta agotar todas las reservas y proceder a realizar la gluconeogénesis.<sup>32</sup> Los ratones AnxA6ko mostraron una correcta degradación de las reservas de glucógeno en comparación con los ratones wt a diferentes horas de ayuno (Figura 37A). Para determinar la capacidad de síntesis y los niveles de glucógeno en hepatocitos aislados de ambos genotipos, se suplementó el medio de cultivo con piruvato, glicerol y ácido oleico durante 24 horas.



La figura 45A muestra como los hepatocitos aislados no presentan diferencias en los niveles de glucosa entre ambos genotipos. En la figura 45B se observa que los niveles de glucógeno sintetizados por los hepatocitos aislados de ratones wt y AnxA6ko no muestran diferencias significativas al suplementar el medio con piruvato o glicerol.

En la figura 45C se puede observar que no hay diferencias en la síntesis de cuerpos cetónicos llevada a cabo por los hepatocitos aislados de ambos genotipos tras la suplementación con ácido oleico durante 24 horas. En la figura 45D se observa que los hepatocitos aislados en cultivo suplementados con ácido oleico durante 24 horas, no muestran diferencias en la síntesis de glucógeno.



**Figura 45.** A) Niveles de glucosa sintetizada por los hepatocitos aislados wt y AnxA6ko suplementados con piruvato y glicerol (n=3 por genotipo). B) Niveles de glucógeno almacenados en los hepatocitos aislados wt y AnxA6ko suplementados con piruvato y glicerol (n=3 por genotipo). C) Niveles de cuerpos cetónicos (2-hydroxybutyrate) secretados en el medio por los hepatocitos aislados wt y AnxA6ko suplementados con ácido oleico (n=3 por genotipo). D) Niveles de glucógeno almacenados en los hepatocitos aislados wt y AnxA6ko suplementados con ácido oleico (n=3 por genotipo).

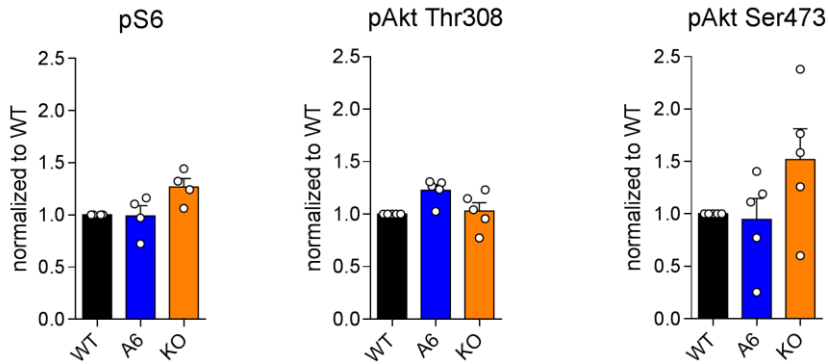
#### **4.8 Caracterización de la actividad de las proteínas implicadas en la vía de señalización de mTOR.**

La serina/treonina proteína quinasa TOR (*Target of Rapamycin*) forma dos complejos que difieren en función y estructura conocidos como TORC1 (*TOR Complex 1*) y TORC2 (*TOR complex 2*). En mamíferos TORC1 se denomina mTORC1.<sup>271</sup> La actividad de mTORC1 puede estar modulada por múltiples factores como factores de crecimiento, el estado energético, la presencia de aminoácidos<sup>272</sup> y el estado metabólico celular.<sup>273</sup> Está descrito que los aminoácidos activan dicha proteína y como consecuencia el resto de la vía.<sup>272</sup> En ayuno mTORC1 controla la cetogénesis<sup>274</sup> por lo que se pretende determinar cómo afecta la depleción de la proteína AnxA6 a la activación de mTORC1.

Para determinar la actividad de las proteínas implicadas en la vía de mTORC1 en función del estado metabólico, se cultivaron células de fibroblastos de embrión de ratón (*mouse embryonic fibroblast*, MEF) wt, MEF con el gen AnxA6 deplecionado (A6ko) y células MEF que presentan la proteína AnxA6 sobreexpresada (A6oe) en diferentes condiciones metabólicas durante 24 horas y se analizó mediante citometría de flujo la fosforilación de las proteínas S6, Akt Thr308 y Akt Ser473.

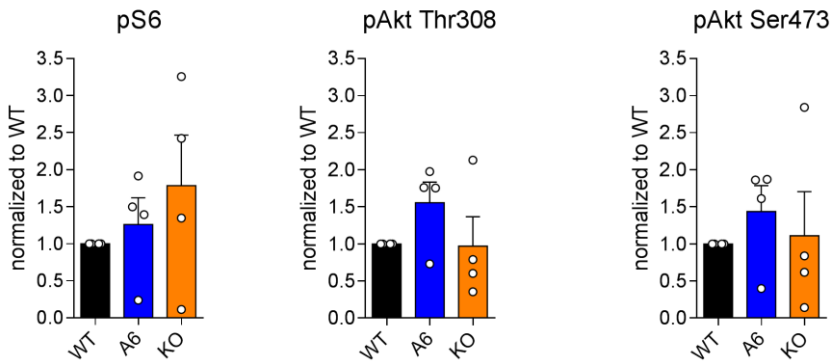
En las figuras 46 y 47 se observa como las proteínas S6, Akt Thr308 y Akt Ser473 no muestran diferencias de fosforilación en estado basal y al incubar las células con glucosa durante 24 horas en función de la presencia de la proteína AnxA6. En la figura 48 se puede observar que al cultivar las células con ácido oleico, las proteínas S6 y Akt Ser473 no presentan diferencias en la fosforilación al comparar las tres líneas celulares. Sin embargo, la proteína Akt Th308 evidencia un aumento significativo de la fosforilación en las células MEF A6oe. Al eliminar los aminoácidos (Figura 49) del medio de cultivo y en ayuno durante 24 horas (Figura 50), la proteína S6 muestra un aumento significativo de los niveles de fosforilación en las células MEF A6ko. Por el contrario, en estas condiciones metabólicas las proteínas Akt Thr208 y Akt Ser473 no presentan diferencias en los niveles de fosforilación en función de la proteína AnxA6.

### Estado basal



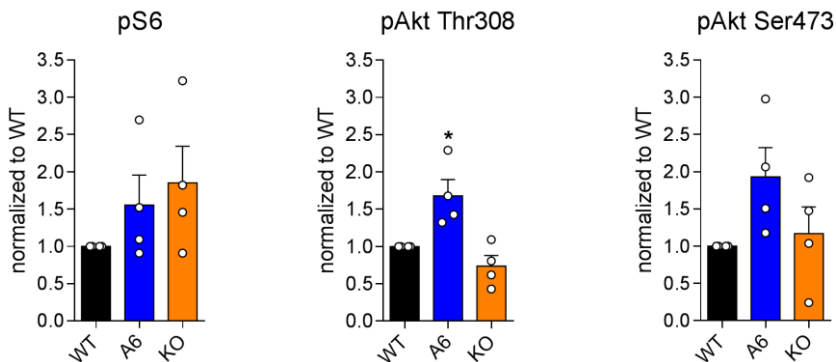
**Figura 46.** Niveles de fosforilación normalizados con respecto al wt de las proteínas S6, Akt Thr308 y Akt Ser473 en células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko.

### Glucosa



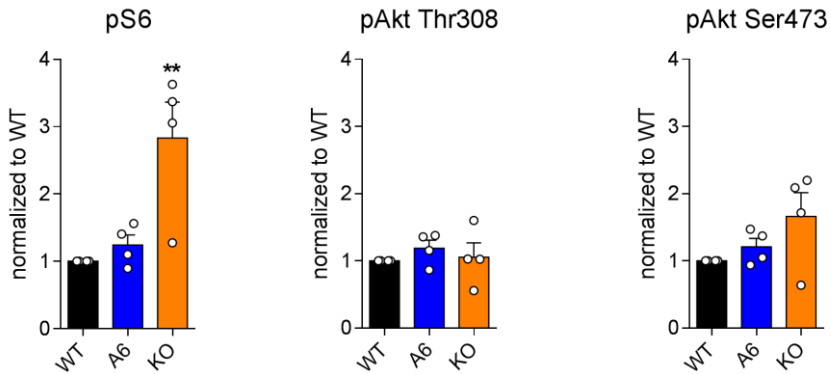
**Figura 47.** Niveles de fosforilación normalizados con respecto al wt de las proteínas S6, Akt Thr308 y Akt Ser473 en células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko incubadas durante 24 horas con 50 mM de glucosa.

### Ácido oleico



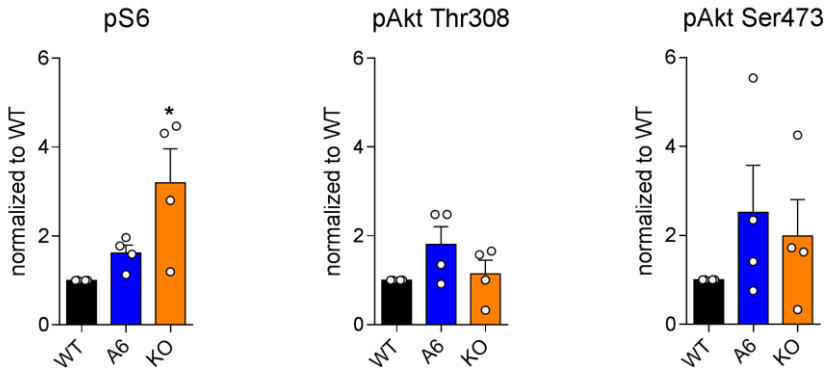
**Figura 48.** Niveles de fosforilación normalizados con respecto al wt de las proteínas S6, Akt Thr308 y Akt Ser473 en células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko incubadas durante 24 horas con 500  $\mu$ M de ácido oleico.

### Eliminación de aminoácidos



**Figura 49.** Niveles de fosforilación normalizados con respecto al wt de las proteínas S6, Akt Thr308 y Akt Ser473 en células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko incubadas durante 24 horas sin aminoácidos esenciales.

### Ayuno



**Figura 50.** Niveles de fosforilación normalizados con respecto al wt de las proteínas S6, Akt Thr308 y Akt Ser473 en células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko incubadas durante 24 horas de ayuno.

Para determinar si los resultados obtenidos en los que se observa un aumento de la fosforilación de la proteína S6 en células AnxA6ko al eliminar los aminoácidos del medio y en ayuno sólo es consecuencia de la depleción de AnxA6 y no del estado metabólico celular, se cuantificaron los niveles de expresión de las proteínas S6, Akt Thr308 y Akt Ser473 en cada línea celular comparando las diferentes condiciones metabólicas con el estado basal.

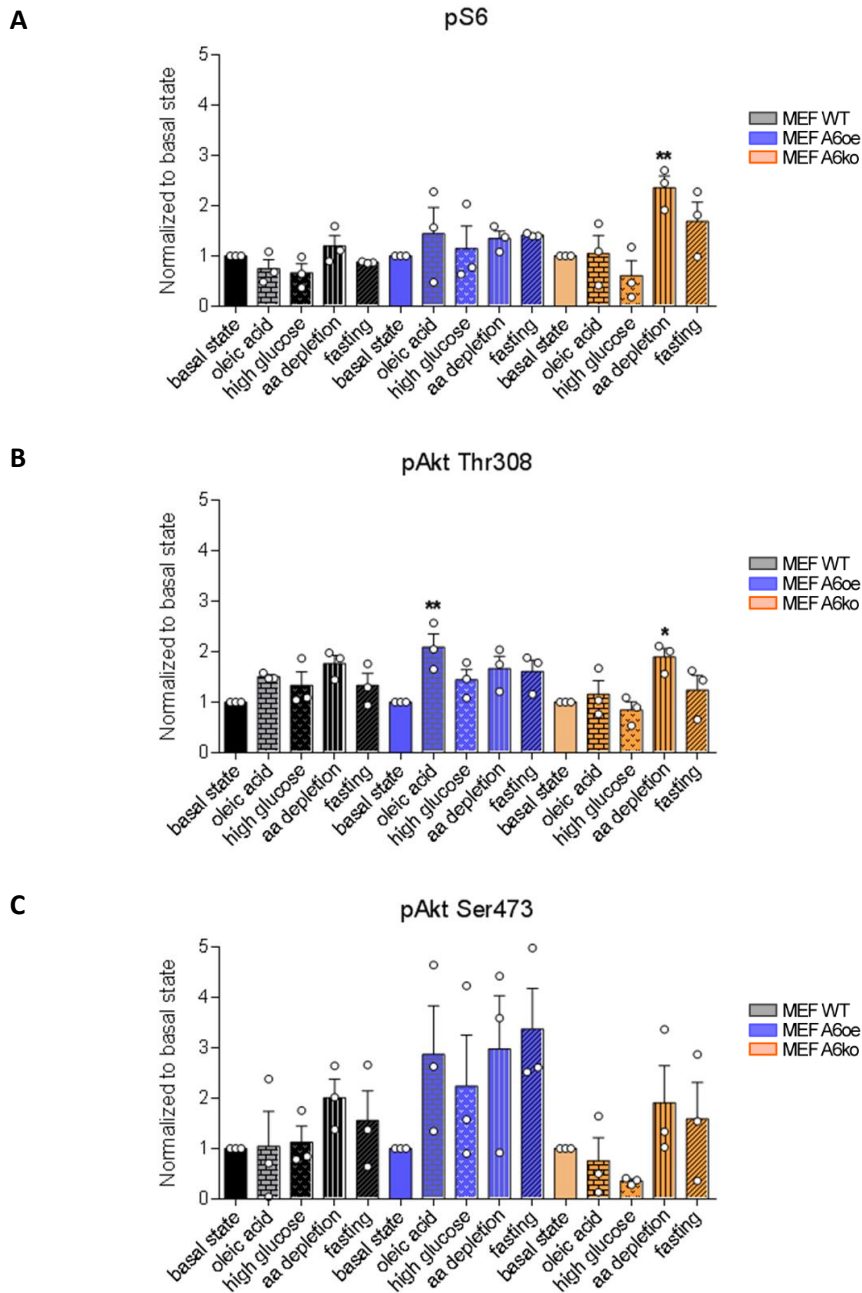
En la figura 51A podemos observar que no se producen cambios en los niveles de fosforilación de la proteína S6 en función del estado metabólico con respecto al estado basal en las células MEF wt.

De igual manera, en las células MEF A6oe no se observan cambios en la actividad de la proteína S6 en función del estado metabólico en el que se encuentren las células. Sin embargo, las células MEF A6ko muestran un aumento significativo en la actividad de la proteína S6 al cultivar las células en un medio que presenta los aminoácidos eliminados y en ayuno durante 24 horas.

La figura 51B muestra que no se producen cambios de la actividad de la proteína Akt Thr308 en función del estado metabólico en comparación con el estado basal en las células MEF wt. Curiosamente, en las células MEF A6oe se observa un aumento significativo de la actividad de la proteína Akt Thr308 al cultivarlas con ácido oleico durante 24 horas. Por otro lado, las células MEF A6ko muestran un incremento significativo en la actividad de la proteína Akt Thr308 al cultivar las células en un medio sin aminoácidos durante 24 horas. En el estudio de la actividad de la proteína Akt Ser473 (Figura 51C) los resultados obtenidos no muestran diferencias en la actividad de dicha proteína al incubar las células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko con diferentes condiciones metabólicas.

Los resultados obtenidos en el análisis de la actividad de las proteínas S6, Akt Thr308 y Akt Ser473 frente a diferentes condiciones metabólicas en las células MEF muestran que no hay cambios en los niveles de fosforilación de estas proteínas en función del estado metabólico. En cambio la sobreexpresión de AnxA6 en esta línea celular y la incubación con ácido oleico durante 24 horas, ha mostrado un aumento significativo en la actividad de la proteína Akt Th308 en comparación con el estado basal. Además, la depleción de AnxA6 y la eliminación de los aminoácidos del medio de cultivo junto con el ayuno, ha evidenciado un incremento significativo en la actividad de la proteína S6.

A pesar de los cambios de actividad observados en función de la presencia o ausencia de AnxA6, las células MEF wt no presentan modificaciones en la fosforilación de estas proteínas dependiendo del estado metabólico, por lo que no se puede afirmar que los resultados obtenidos dependan exclusivamente de AnxA6.



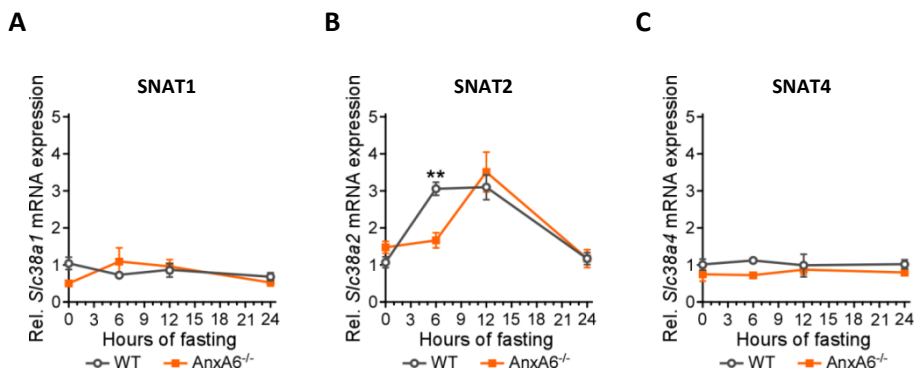
**Figura 51.** A) Niveles de fosforilación de la proteína S6 en las células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko tratadas durante 24 horas con diferentes condiciones metabólicas. B) Niveles de fosforilación de la proteína Akt Thr308 en las células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko tratadas durante 24 horas con diferentes condiciones metabólicas. C) Niveles de fosforilación de la proteína Akt Thr473 en las células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko tratadas durante 24 horas con diferentes condiciones metabólicas.

#### 4.9 Niveles de expresión de los transportadores de L-alanina en ayuno.

Las proteínas que componen el Sistema A son los principales co-transportadores de sodio y aminoácidos alifáticos pequeños presentando una mayor afinidad por L-alanina.<sup>74</sup> Los aminoácidos y en concreto, L-alanina y glutamina, son los precursores esenciales de la gluconeogénesis.<sup>21</sup> En ayuno los ratones AnxA6ko presentan una adecuada degradación de las reservas de glucógeno (Figura 37A), sin embargo, una vez agotadas estas reservas los ratones AnxA6ko no pueden mantener los niveles de glucosa (Figura 37B). El test de tolerancia a piruvato (Figura 17A) y la actividad de la enzima ALAT en ayuno (Figura 41B) no mostraron diferencias entre los ratones wt y AnxA6ko sugiriendo que las alteraciones en la síntesis de glucosa se deben a un fallo en la captación de L-alanina. Este planteamiento se refuerza con el resultado obtenido de los niveles de L-alanina en plasma donde los ratones AnxA6ko presentan niveles más altos a las 24 horas de ayuno, ya que el hígado no está captando dicho aminoácido en su totalidad (Figura 44).

Para determinar si la incapacidad de los ratones AnxA6ko de captar L-alanina se debe a una alteración en la expresión relativa de los niveles de ARNm de los transportadores de L-alanina, se analizó la expresión de los genes *Slc38a1*, *Slc38a2* y *Slc38a4* mediante PCR cuantitativa en hígado de ratón wt y AnxA6ko a diferentes horas de ayuno.

Las figuras 52A y 52C muestran los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes *Slc38a1* y *Slc38a4*, en la cual, no se observan diferencias entre ratones wt y AnxA6ko a diferentes horas de ayuno. En la figura 52B se observa que los niveles de expresión relativa de ARNm del gen *Slc38a2* no aumentan a las 6 horas de ayuno en el hígado de ratones AnxA6ko en comparación con los ratones wt. Este punto metabólico coincide la degradación completa de las reservas de glucógeno, sin embargo, a partir de las 12 horas de ayuno no se observan diferencias entre ambos genotipos.

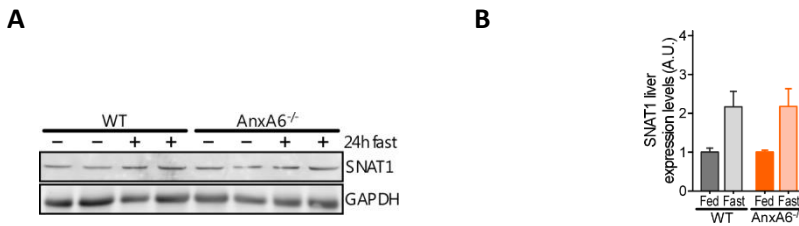


**Figura 52.** Expresión relativa de ARNm a diferentes horas de ayuno en el hígado de ratones wt y AnxA6ko para los genes A) *Slc38a1*, B) *Slc38a2* Y C) *Slc38a4* (n=5 por genotipo).

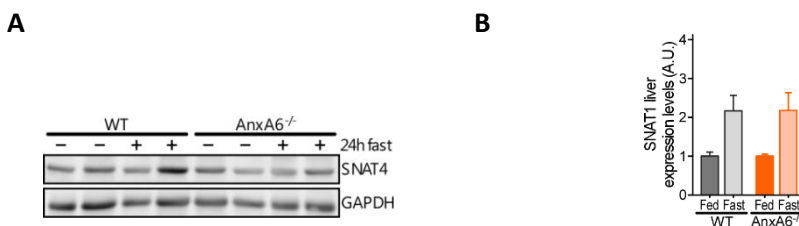
#### 4.10 Cuantificación de los niveles de proteína endógena de las proteínas SNAT1 y SNAT4 en ayuno.

Los ARNm de los genes *Slc38a1*, *Slc38a2* y *Slc38a4* codifican por las proteínas SNAT1, SNAT2 y SNAT4. Está descrito que la expresión de los transportadores de L-alanina aumenta en el hígado en ayuno.<sup>269</sup> Sin embargo, en la figura 52A y 52C se observa que no se produce un aumento de la expresión relativa de ARNm de los transportadores SNAT1 y SNAT4 a diferentes horas de ayuno tanto en ratones wt como en ratones AnxA6ko. En base a este resultado, se decidió determinar la cantidad de proteína endógena de las proteínas SNAT1, SNAT2 y SNAT4 en el hígado de ratón para ambos genotipos en estado basal y a las 24 horas de ayuno mediante la técnica de *Western Blot*. No obstante, no se ha podido analizar la proteína hepática endógena SNAT2 debido a que los anticuerpos comerciales y producidos en el laboratorio no han funcionado en nuestras muestras. La figura 53 muestra un aumento en la cantidad de proteína de SNAT1 a las 24 horas de ayuno en comparación con el estado basal tanto en ratones wt como en ratones AnxA6ko. Sin embargo, no hay diferencias en la cantidad de proteína en estado basal y a las 24 horas de ayuno al comparar ambos genotipos. En la figura 54 se observa un incremento en los niveles de la proteína SNAT4 a las 24 horas de ayuno con respecto al estado basal en ratones wt y AnxA6ko. Por otro lado, al comparar los niveles de proteína de SNAT4 entre ambos genotipos no hay diferencias significativas.





**Figura 53.** A) *Western Blot* de las proteínas SNAT1 y GAPDH de homogeneizados de hígados de ratón wt y AnxA6ko a 0 y 24 horas de ayuno. B) Cuantificación de los niveles de proteína SNAT1 a 0 y 24 horas de ayuno comparados con el control de carga, la proteína GAPDH.



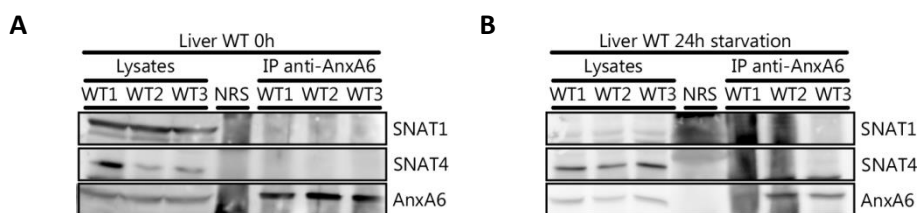
**Figura 54.** A) *Western Blot* de las proteínas SNAT4 y GAPDH de homogeneizados de hígados de ratón wt y AnxA6ko a 0 y 24 horas de ayuno. B) Cuantificación de los niveles de proteína SNAT4 a 0 y 24 horas de ayuno comparados con el control de carga, la proteína GAPDH.

#### 4.11 Análisis de la interacción entre Anexina A6 y las proteínas SNAT1 y SNAT4 en hígado de ratón.

Al analizar los niveles de expresión relativa de ARNm (Figura 52) y los niveles de proteína endógena (Figura 53 y 54) de los transportadores de L-alanina SNAT1 y SNAT4 en ayuno no se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos que pudiera explicar la incapacidad de captar el aminoácido L-alanina por parte de los hepatocitos aislados de los ratones AnxA6ko (Figura 18) y los bajos niveles en la síntesis de glucosa a partir de dicho aminoácido (Figura 17D). Este escenario plantea la posibilidad de que el mecanismo de acción de AnxA6 con respecto a los transportadores de L-alanina sea mediante la interacción y posterior traslocación a la membrana plasmática sinusoidal, ya que AnxA6 cambia su localización en respuesta a cambios de los niveles de colesterol y calcio intracelulares.<sup>173</sup>

Para determinar si la incapacidad de los ratones AnxA6ko de captar el aminoácido L-alanina es consecuencia de la interacción de la proteína AnxA6 con los transportadores de L-alanina, SNAT1 y SNAT4, se realizaron inmunoprecipitaciones en hígado de ratón wt en estado basal y a 24 horas de ayuno.

La figura 55A muestra que en estado basal la proteína AnxA6 no interacciona con los transportadores del Sistema A, SNAT1 y SNAT4, en el hígado de ratón wt. Por otro lado, en la figura 55B podemos observar que a las 24 horas de ayuno la proteína AnxA6 no interacciona con los transportadores de L-alanina, SNAT1 y SNAT4 en el hígado de ratón wt. Estos resultados sugieren que la proteína AnxA6 no altera la función de captación de los transportadores de L-alanina SNAT1 y SNAT4 mediante su interacción en las condiciones experimentales de estudio utilizadas.

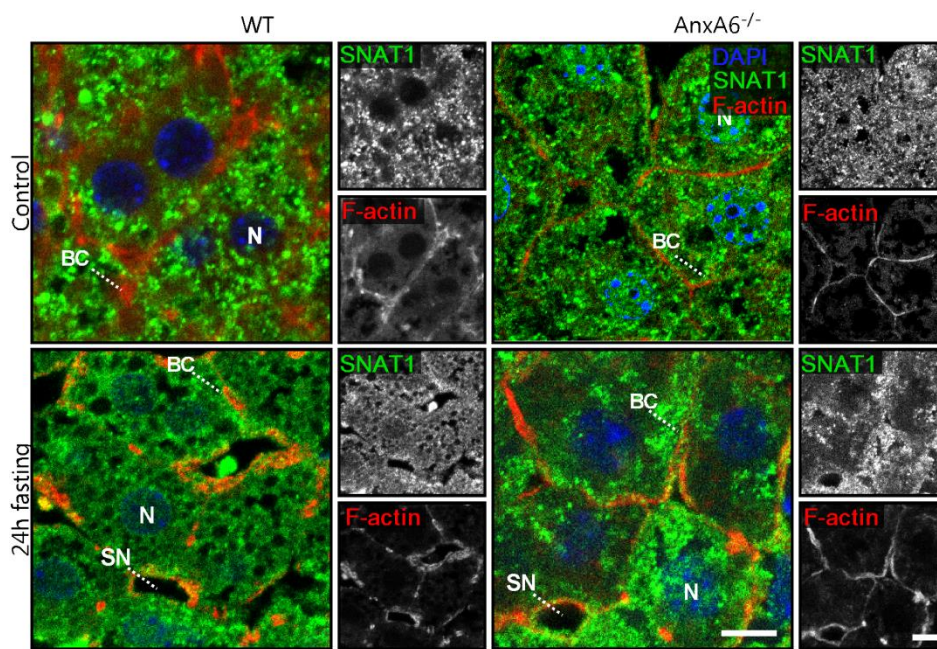


**Figura 55.** A) Inmunoprecipitación en hígado wt en estado basal entre la proteína AnxA6 y las proteínas SNAT1 y SNAT4. B) Inmunoprecipitación en hígado wt a 24 horas de ayuno entre la proteína AnxA6 y las proteínas SNAT1 y SNAT4.

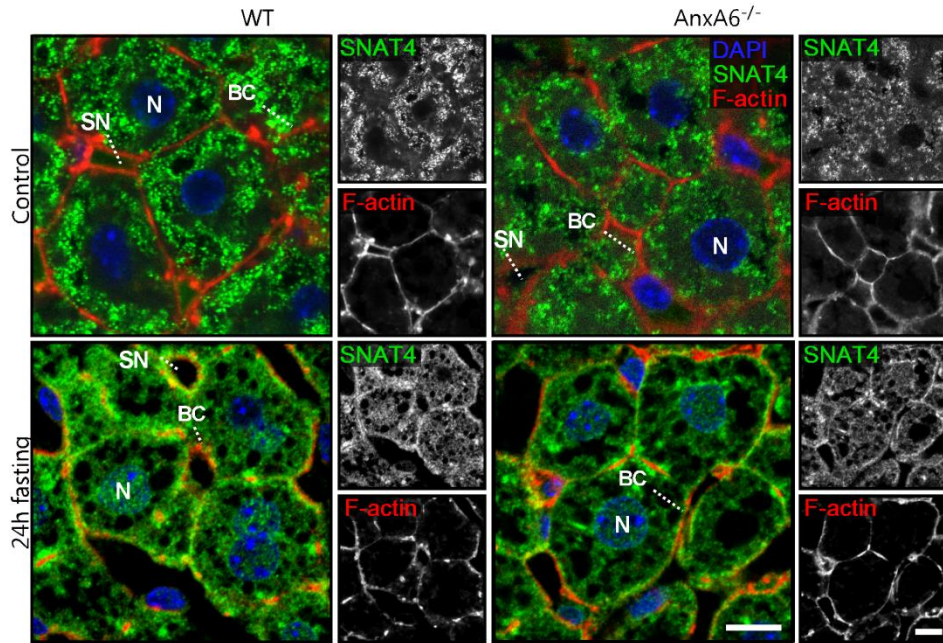
#### 4.12 Determinación de la localización de las proteínas SNAT1 y SNAT4 en hígado de ratón.

Una vez descartado que la alteración de la captación de L-alanina por parte de los transportadores del Sistema A como consecuencia de la depleción de AnxA6 se deba a la afectación de los niveles de expresión relativa de ARNm (Figura 52), a la síntesis de proteína (Figura 53 y 54) y a la interacción entre AnxA6 y los transportadores de L-alanina (Figura 55), se estudia la posibilidad de que la falta AnxA6 esté alterando la localización de los transportadores de L-alanina.

La captación de L-alanina por parte de los transportadores del Sistema A se realiza en la membrana plasmática sinusoidal de los hepatocitos, lugar de intercambio de los sustratos que llegan de la circulación sanguínea.<sup>2</sup> Para determinar si la depleción de la proteína AnxA6 altera la localización de los transportadores de L-alanina en el hígado de ratón, se realizaron inmunohistoquímicas de cortes histológicos de hígado de ratón en estado basal y a las 24 horas de ayuno en ratones wt y AnxA6ko. La figura 56 muestra que la proteína SNAT1 se encuentra en estructuras de apariencia vesicular en el interior del hepatocito tanto en estado basal como a las 24 horas de ayuno en ratones wt y AnxA6ko. Por otro lado, la figura 57 muestra que en estado basal la proteína SNAT4 se encuentra en vesículas en el interior del hepatocito y a las 24 horas de ayuno realiza un cambio de localización a la membrana plasmática sinusoidal en ambos genotipos.



**Figura 56.** Inmunohistoquímica de hígados wt y AnxA6ko a 0 y 24 horas de ayuno de la proteína SNAT1 (verde), F-actina (rojo) y DAPI (azul). Núcleo (N), sinusoide (SN) y canalículo biliar (BC). Barra 10  $\mu$ m.



**Figura 57.** Inmunohistoquímica de hígados wt y AnxA6ko a 0 y 24 horas de ayuno de la proteína SNAT4 (verde), F-actina (rojo) y DAPI (azul). Núcleo (N), sinusoide (SN) y canalículo biliar (BC). Barra 10  $\mu$ m.



## 5. Caracterizar la localización y topología *in vitro* de SNAT1, SNAT2 y SNAT4.

La incapacidad de la proteína SNAT4 de cambiar su localización a la membrana plasmática sinusoidal de los hepatocitos AnxA6ko a las 48 horas post PHx (Figura 35) y su posterior cambio de localización con el virus rAAV8-AnxA6 (Figura 36), sugiere un papel de AnxA6 en el tráfico de SNAT4 y como consecuencia a la captación de L-alanina, el principal aminoácido gluconeogénico captado por el hígado en la regeneración hepática.<sup>270</sup>

La proteína SNAT1 se ha descrito funcionalmente en cerebro como proteína esencial en el desarrollo de las dendritas y la síntesis de proteínas locales.<sup>152</sup> Los experimentos realizados en esta tesis han mostrado la localización de SNAT1 en vesículas en el interior del hepatocito (Figura 34 y 56). Por otro lado, SNAT2 se encuentra localizada en la red TGN cambiando su localización a la membrana plasmática en respuesta a estímulos de insulina.<sup>132</sup> Se ha descrito que la proteína SNAT4 se expresa restrictivamente en el hígado de ratón y de rata en los hepatocitos perivenosos<sup>133</sup> y se localiza en el sinusoide.<sup>134</sup> En el análisis de la localización de la proteína SNAT4, se ha demostrado una localización citoplasmática de aspecto vesicular en el interior del hepatocito en estado basal (Figura 35 y 57) y un cambio de localización hacia la membrana plasmática sinusoidal en ratones wt post PHx (Figura 35) y en ayuno en ambos genotipos (Figura 57). En cuanto a la topología descrita, toda la familia comparte una estructura de 11 dominios transmembrana que presenta cambios conformacionales al realizar el co-transporte de aminoácidos y sodio<sup>21</sup> con un dominio intracelular N y un dominio extracelular C clave en la actividad de los transportadores.<sup>113</sup> Sin embargo, también se ha descrito otra topología con los dominios N y C orientados hacia el exterior celular y una estructura de 10 dominios transmembrana.<sup>114</sup>

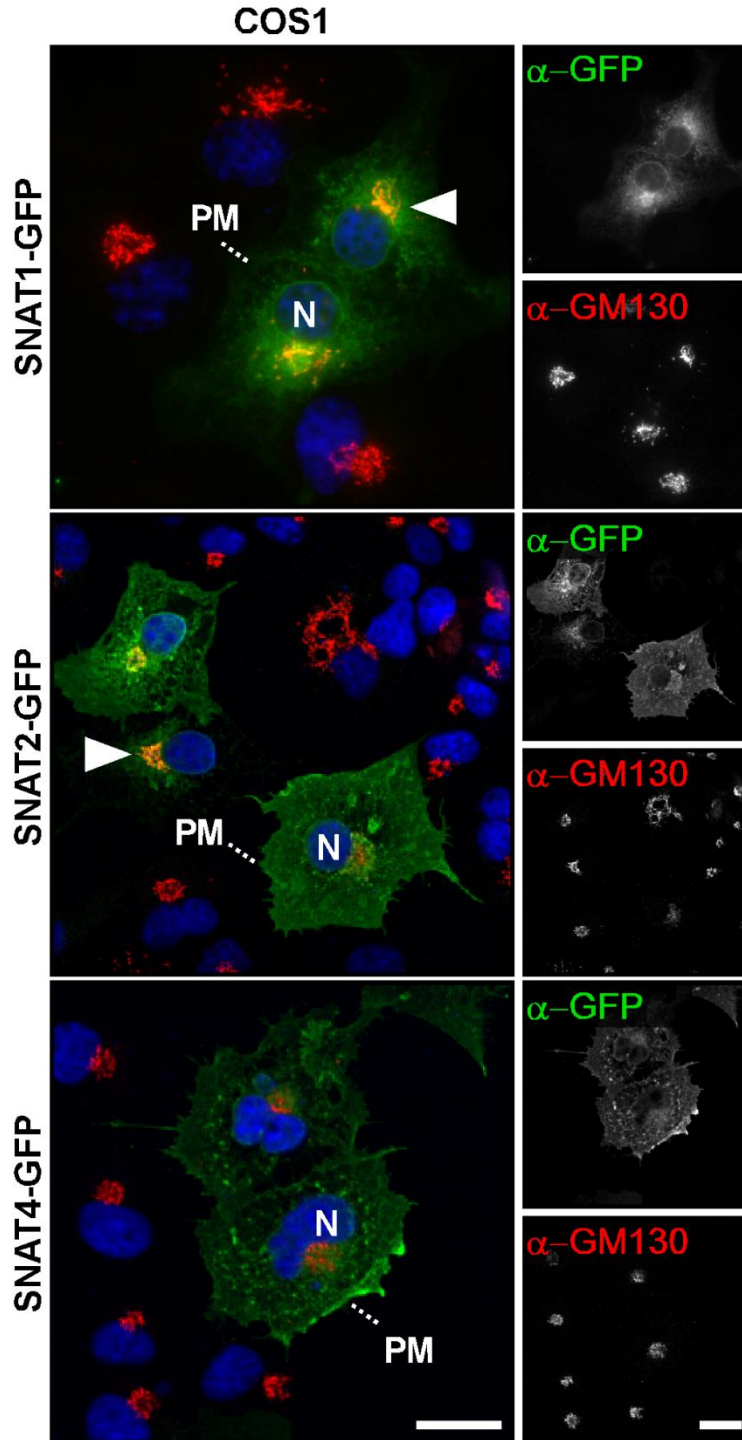
Para caracterizar de una forma más rápida y sencilla los transportadores de L-alanina, se diseña un modelo de estudio *in vitro* en células no polarizadas COS1 (fibroblastos de riñón de mono) transfectadas con las proteínas SNAT1, SNAT2 y SNAT4 con una cola de GFP o HA.

## 5.1 Localización intracelular de los transportadores de L-alanina.

La proteína SNAT1 se ha observado acumulada en el interior de células hepáticas humanas.<sup>130</sup> En la figura 34 se puede observar la localización de SNAT1 en vesículas en el interior del hepatocito de ratón y como mantiene su localización tras la realización de una PHx y un ayuno de 24 horas (Figura 56). En 2006 Hatanaka y colaboradores describieron que la estimulación con insulina de adipocitos 3T3-L1 aumenta la captación de glucosa. Dicha estimulación hace que la proteína SNAT2, acumulada en TGN, se dirija hacia la membrana plasmática y realice la captación de aminoácidos.<sup>132</sup> La proteína SNAT4 se describe con una expresión específica de hígado<sup>122</sup> en los hepatocitos perivenosos<sup>133</sup> en el sinusoides.<sup>134</sup> En la figura 35 se observa como la proteína SNAT4 se encuentra en vesículas en el interior del hepatocito en estado basal y cambia su localización a la membrana plasmática sinusoidal a las 12, 24 y 48 horas post PHx y a las 24 horas de ayuno (Figura 57).

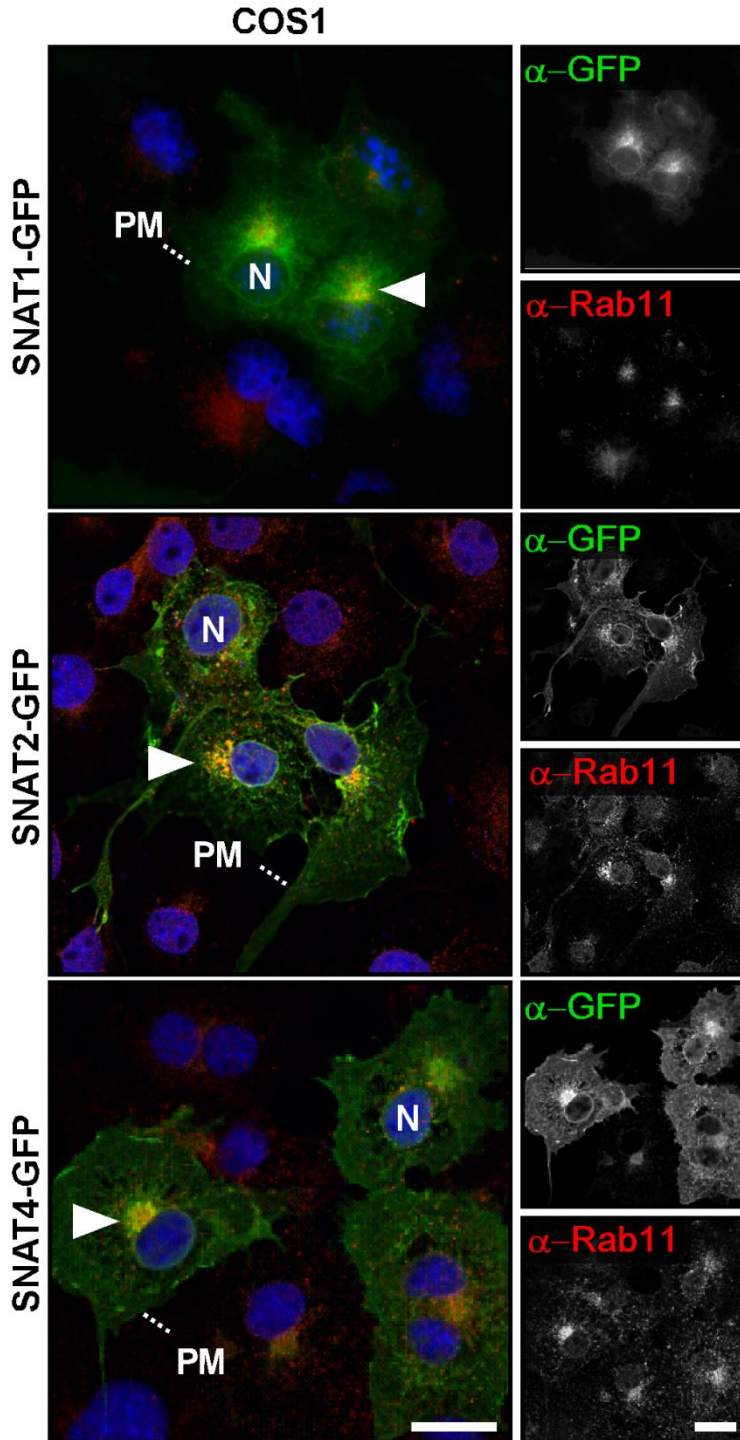
Para determinar la localización intracelular de los transportadores de L-alanina en un modelo *in vitro*, se transfectaron los plásmidos SNAT1-GFP, SNAT2-GFP, SNAT4-GFP en células COS1 y se realizaron inmunocitoquímicas una con anticuerpos que reconocen diferentes orgánulos celulares.

En la figura 58 podemos observar que las proteínas SNAT1-GFP y SNAT2-GFP se localizan tanto en el compartimento de Golgi como en la membrana plasmática respectivamente. En cambio, SNAT4-GFP se observa en la membrana plasmática pero no en Golgi. Por otro lado, en la figura 59 se observa la localización de las proteínas SNAT1-GFP, SNAT2-GFP y SNAT4-GFP en el compartimento de reciclaje y en la membrana plasmática. El hecho de que los transportadores de L-alanina se encuentren localizados en compartimentos endocíticos y de reciclaje sugiere la posible implicación de estas proteínas en rutas endocíticas durante la captación de aminoácidos.



**Figura 58.** Células COS1 transfectadas con SNAT1-GFP, SNAT2-GFP y SNAT4-GFP. Inmunocitoquímica realizada con DAPI (azul),  $\alpha$ -GFP (verde) y  $\alpha$ -GM130 (rojo). Núcleo (N) y membrana plasmática (PM). Barra 20  $\mu$ m.





**Figura 59.** Células COS1 transfectadas con SNAT1-GFP, SNAT2-GFP y SNAT4-GFP. Inmuncitoquímica realizada con DAPI (azul),  $\alpha$ -GFP (verde) y  $\alpha$ -Rab11 (rojo). Núcleo (N) y membrana plasmática (PM). Barra 20  $\mu$ m.

## 5.2 Localización de las proteínas SNAT1 y SNAT4 en fracciones subcelulares de hígados de rata.

El análisis inmunohistoquímico en tejidos hepáticos de ratón de las proteínas SNAT1 y SNAT4 ha mostrado una localización en el interior del hepatocito (Figuras 34, 35, 56 y 57) y en la membrana plasmática sinusoidal (Figura 35 y 57). Los experimentos realizados en células no polarizadas COS1 mostraron la localización de SNAT1 y SNAT4 en Golgi (Figura 58) y en vesículas de reciclaje (Figura 59). Para confirmar la localización de SNAT1 y SNAT4 endógena en compartimentos subcelulares de hígado, se aislaron fracciones subcelulares de hígados de rata wt en estado basal.

La figura 60 muestra que la proteína SNAT1 se encuentra localizada en el homogeneizado total del hígado de rata y en la fracción de las membranas más pesadas (*heavy membranes*, HM) y nucleares. La proteína SNAT4 se localiza en el homogeneizado total, en las membranas pesadas, en la fracción de endosomas total, en los endosomas tardíos (*multivesicular bodies*, MVB), en los endosomas tempranos (*compartment of uncoupling of receptor and ligand*, CURL) y en los compartimentos de reciclaje (*receptor recycling compartment*, RRL) en el hígado de rata. Este resultado sugiere la presencia de la proteína SNAT4 en una ruta endocítica y de reciclaje desde la membrana plasmática.



**Figura 60.** Localización subcelular de las proteínas SNAT1 y SNAT4 en hígado de rata. Homogeneizado total (Hom), membranas pesadas (HM), primera purificación (P1), segunda purificación (P2), tercera purificación (P3), endosomas totales (E), endosomas tardíos (MVB), endosomas tempranos (CURL) y compartimentos de reciclaje (RRL) (n=2).

## 5.3 Orientación de los dominios terminales de los transportadores de L-alanina.

La topología descrita de la familia de transportadores SLC38 es de 11 dominios transmembrana hidrofóbicos con un dominio N terminal intracelular y un

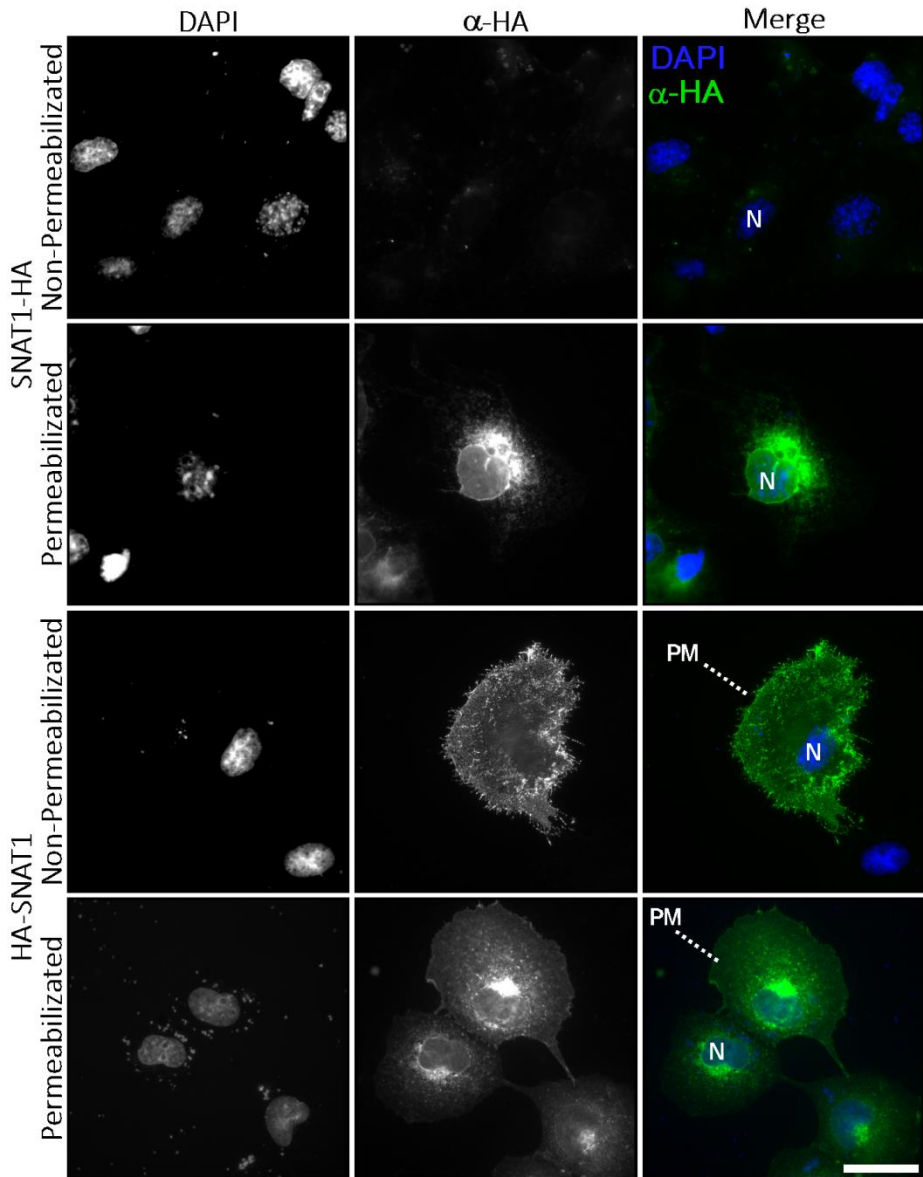
dominio C extracelular encargado de regular la captación de los aminoácidos por los transportadores de L-alanina.<sup>113</sup>

En cambio, otros autores han descrito la orientación del dominio N terminal hacia el exterior celular y una topología de 10 dominios transmembrana en el transportador SNAT4.<sup>114</sup> Para determinar si los transportadores del Sistema A presentan un dominio N terminal intracelular y un dominio C terminal extracelular se transfectaron en células COS1 los ADN correspondientes a SNAT1, SNAT2 y SNAT4 unidos a un epítipo HA en los dominios terminales N o C de cada proteína y se realizaron inmunocitoquímicas permeabilizando y sin permeabilizar la membrana plasmática celular.

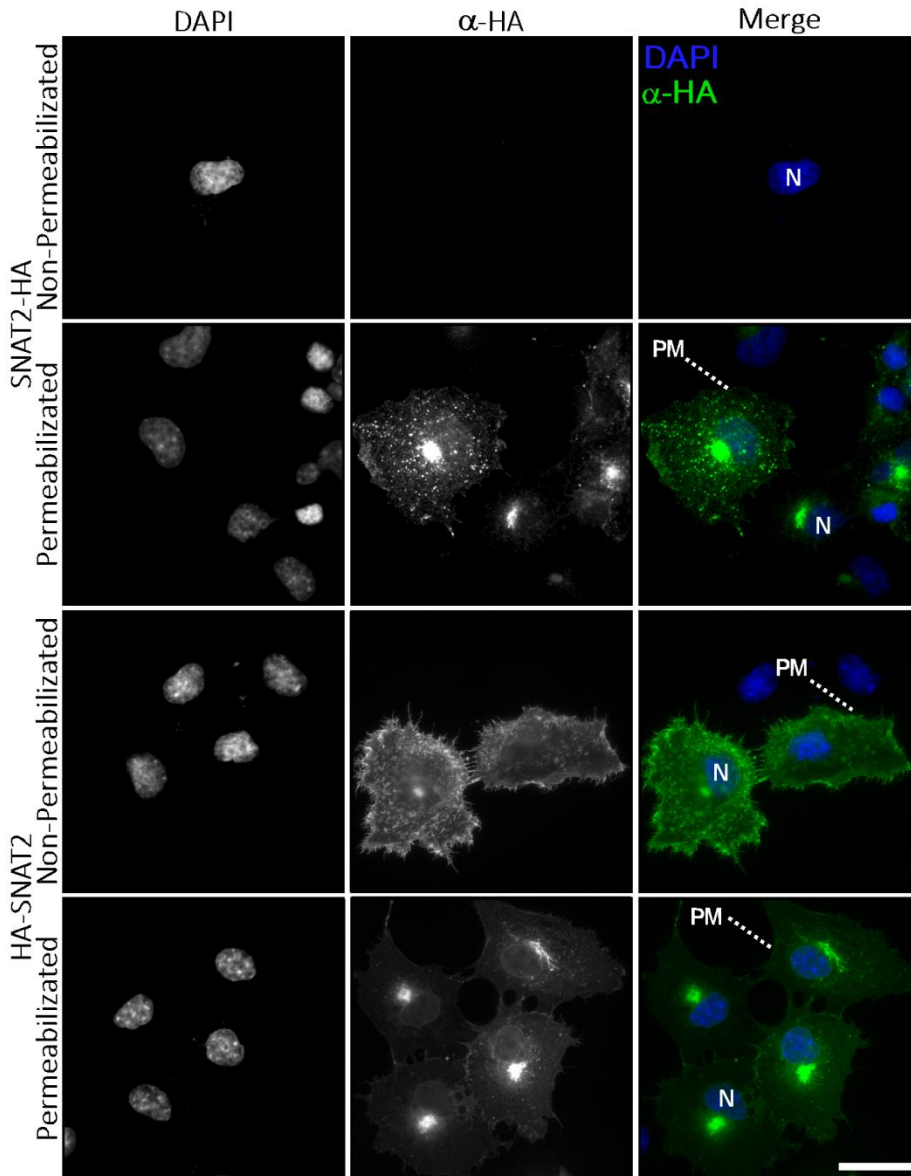
En la figura 61 podemos observar que la proteína SNAT1 unida a una cola HA en el dominio N terminal sólo puede detectarse cuando se permeabiliza la membrana, indicando que dicho dominio se encuentra en el interior celular. Sin embargo, cuando la cola de HA se encuentra unida al dominio C terminal, la proteína se puede observarse sin permeabilizar la célula lo que indica que el dominio C terminal se encuentra localizado en el exterior celular.

La figura 62 muestra como la proteína SNAT2 presenta una analogía estructural similar a la proteína SNAT1. Cuando presenta el epítipo HA unido al dominio N terminal no se puede detectar dicho dominio sin permeabilizar las células. Sin embargo, con la presencia del epítipo en el dominio C terminal podemos observar la proteína sin necesidad de permeabilizar la célula.

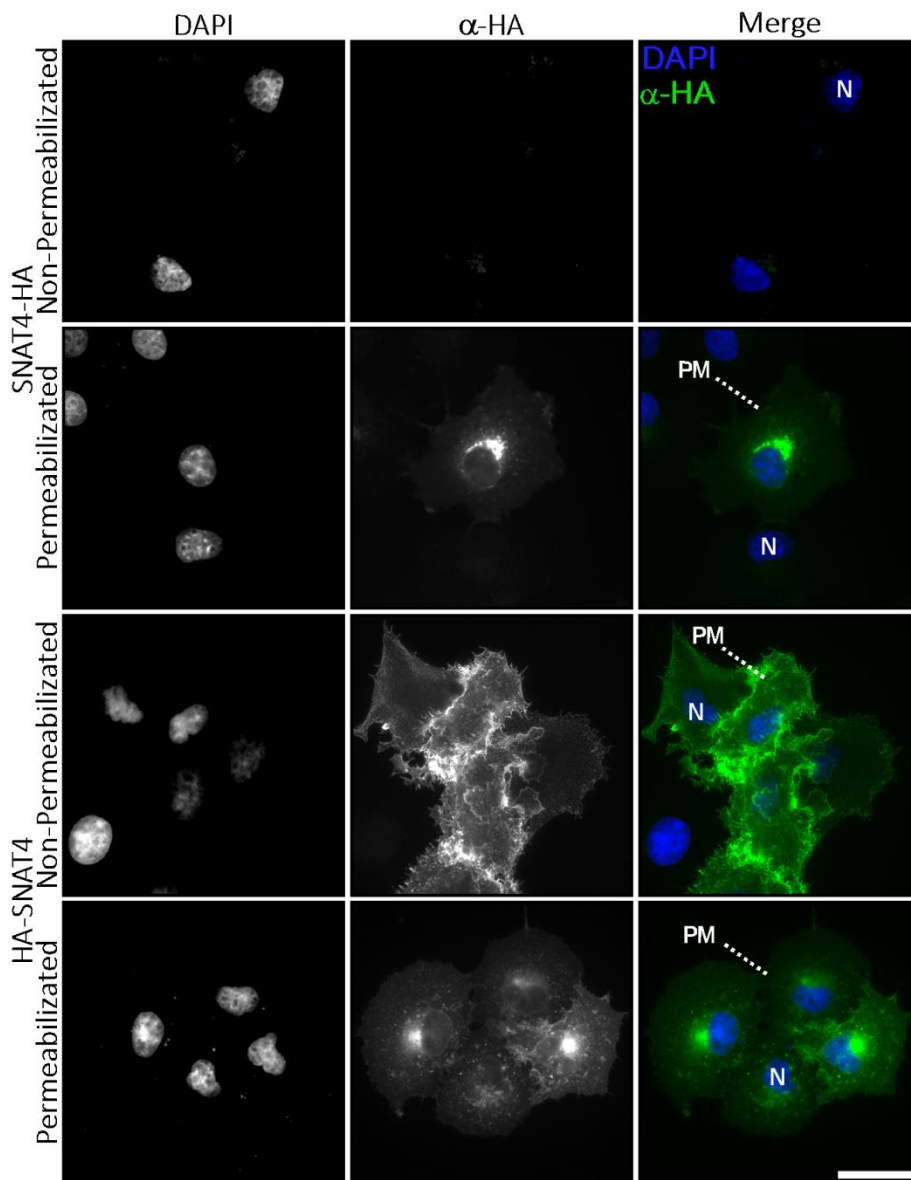
En la figura 63, la proteína SNAT4 muestra la misma topología estructural que el resto de la familia del Sistema A. Esta estructura revela la importancia de la localización del dominio C terminal en el exterior celular para regular la captación de los aminoácidos ya que los mutantes de la proteína sin dicho dominio presentan una actividad significativamente reducida<sup>113</sup> y como consecuencia una disminución en la captación de aminoácidos al interior celular.



**Figura 61.** Células COS1 transfectadas con los plásmidos SNAT1-HA y HA-SNAT1. Inmunocitoquímica realizada en las células COS1 utilizando como anticuerpo primario  $\alpha$ -HA (verde) y DAPI (azul). Núcleo (N) y membrana plasmática (PM). Barra 20  $\mu$ m.



**Figura 62.** Células COS1 transfectadas con los plásmidos SNAT2-HA y HA-SNAT2. Inmunocitoquímica realizada en las células COS1 utilizando como anticuerpo primario  $\alpha$ -HA (verde) y DAPI (azul). Núcleo (N) y membrana plasmática (PM). Barra 20  $\mu$ m.



**Figura 63.** Células COS1 transfectadas con los plásmidos SNAT4-HA y HA-SNAT4. Inmunocitoquímica realizada en las células COS1 utilizando como anticuerpo primario  $\alpha$ -HA (verde) y DAPI (azul). Núcleo (N) y membrana plasmática (PM). Barra 20  $\mu$ m.



## 6. Analizar los niveles de calcio intracelulares en función de la ausencia o presencia de Anxina A6.

El calcio es una molécula de señalización que regula una gran variedad de procesos celulares como la movilidad celular, la fusión de vesículas y el metabolismo celular.<sup>245</sup> AnxA6 es una proteína de unión a fosfolípidos de manera dependiente de calcio y cambia su localización a la membrana plasmática para actuar como proteína de andamio regulando la formación de complejos de señalización, la distribución del colesterol celular y vías endocíticas y exocíticas.<sup>160</sup> La localización de AnxA6 es mayoritariamente citosólica, pero se encuentra asociada a membranas intracelulares en respuesta a cambios de calcio<sup>275</sup> y colesterol,<sup>173</sup> y a los cuerpos lipídicos en el hígado de rata y en células hepáticas humanas.<sup>276</sup> En células de hígado suplementadas con ácido oleico se ha observado la unión de AnxA6 a los cuerpos lipídicos de manera dependiente de calcio.<sup>277</sup> Estudios recientes han demostrado que la acumulación de cuerpos lipídicos en los hepatocitos produce una disminución en la entrada de calcio mediada por SOCE.<sup>278</sup>

También se ha descrito que las células endoteliales A431, las cuales no expresan AnxA6, presentan un aumento en la entrada de calcio posterior a la adición de EGF.<sup>279</sup> Al sobreexpresar AnxA6 en esta línea celular se produce una atenuación de la entrada de calcio estimulada por EGF.<sup>171</sup> Además, estudios llevados a cabo en cardiomiocitos aislados muestran que la sobreexpresión de AnxA6 disminuye los niveles de calcio citosólico<sup>242</sup> y la entrada de calcio al interior celular mediada por SOCE.<sup>240</sup>

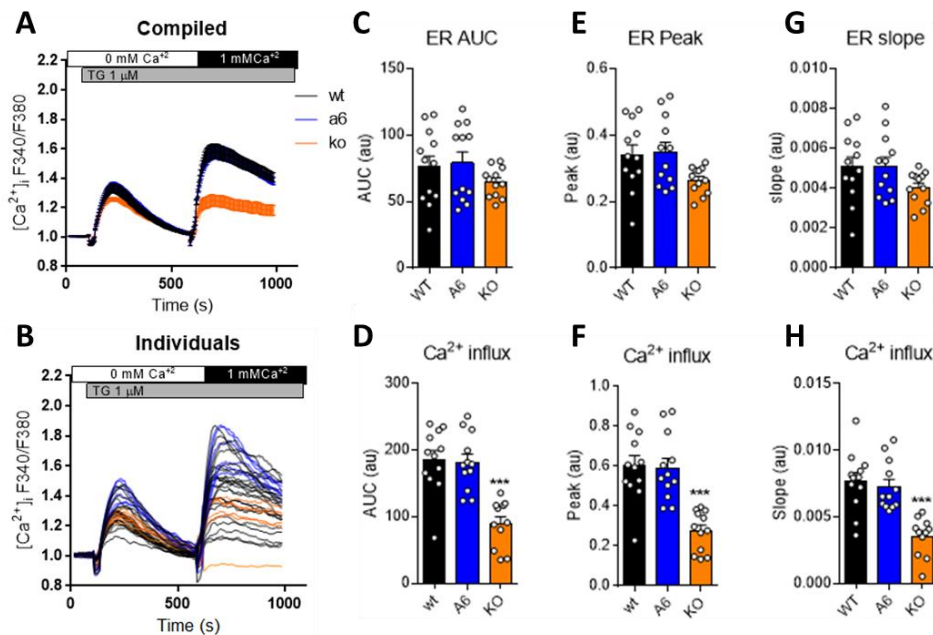
En este bloque de resultados se pretende determinar si la depleción de AnxA6 en las células MEF, altera la homeostasis de calcio mediada por SOCE en la célula.



## 6.1 Determinación de los niveles de calcio intracelulares en función de la ausencia o presencia de Anexina A6 a través de SOCE.

Para determinar si la depleción de AnxA6 altera la homeostasis de calcio mediada por SOCE, se realizaron análisis de la salida de calcio del retículo endoplasmático y de la entrada de calcio en células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko en diferentes condiciones metabólicas. En la figura 64 se puede observar que no hay diferencias en la salida de calcio del retículo endoplasmático mediada por STIM1 comparando las líneas celulares MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko. Al añadir 1 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  para inducir la entrada de calcio al interior celular mediada por Orai1, las células MEF A6ko presentan una disminución significativa en los niveles de calcio que entran a la célula en comparación con las líneas celulares MEF wt y MEF A6oe.

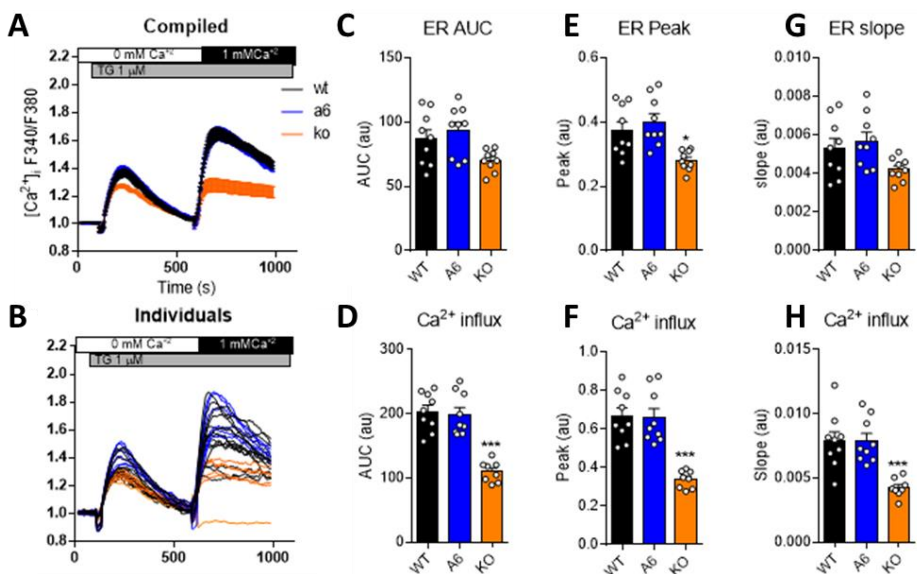
### Estado basal



**Figura 64.** Cuantificación de los niveles de calcio en células MEF wt (negro), MEF A6oe (azul) y MEFA6ko (naranja) en estado basal mediante el análisis de la fluorescencia de Fura-2 con FlexStation. A) Conjunto de cuatro experimentos realizados por triplicado. B) Conjunto de las réplicas del experimento individualizadas. Cuantificación del área bajo la curva (C), del pico de la curva (E) y de la pendiente de la curva (G) de la salida de calcio del retículo endoplasmático. Cuantificación del área bajo la curva (D), del pico de la curva (E) y de la pendiente de la curva (H) de la entrada de calcio a la célula.

La figura 65 muestra que no hay diferencias en la salida de calcio del retículo endoplasmático mediada por STIM1 comparando las líneas celulares MEF wt y MEF A6oe suplementadas con ácido oleico. En cambio, en las células MEF A6ko se puede observar una disminución significativa en el pico de la curva de la salida de calcio del retículo endoplasmático. Esta disminución indica que las células MEF A6ko presentan una concentración menor en los niveles de calcio que salen del retículo endoplasmático en comparación con las otras líneas celulares. Por otro lado, al añadir 1 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  para inducir la entrada de calcio al interior celular mediada por Orai1, las células MEF A6ko evidencian una disminución significativa en los niveles de calcio que entran a la célula en comparación con las líneas celulares MEF wt y MEF A6oe.

### Ácido oleico

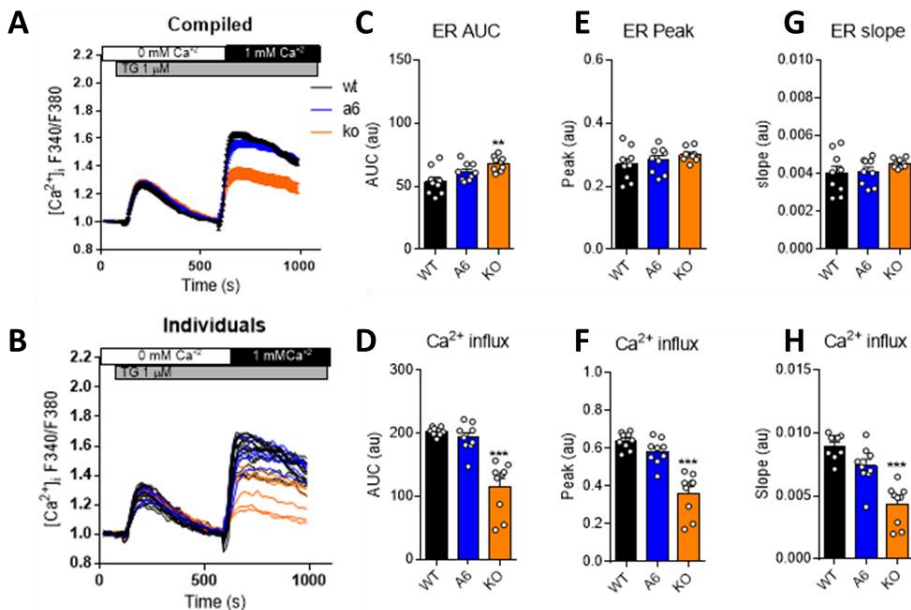


**Figura 65.** Cuantificación de los niveles de calcio en células MEF wt, MEF A6oe y MEFA6ko cultivadas con ácido oleico durante 24 horas. Ver detalles en la figura 64.

En la figura 66 se puede observar que no hay diferencias en la salida de calcio del retículo endoplasmático mediada por STIM1 comparando las líneas celulares MEF wt y MEF A6oe al suplementar el medio con glucosa. Sin embargo, en las células MEF A6ko se observa un aumento significativo en el área bajo la curva de la salida de calcio del retículo endoplasmático. Este

aumento indica que las células MEF A6ko presentan una concentración mayor en los niveles de calcio que salen del retículo endoplasmático en un intervalo de tiempo determinado en comparación con las otras líneas celulares. Al añadir 1 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  para inducir la entrada de calcio al interior celular mediada por Orai1, las células MEF A6ko presentan una disminución significativa en los niveles de calcio que entran a la célula en comparación con las líneas celulares MEF wt y MEF A6oe.

### Glucosa

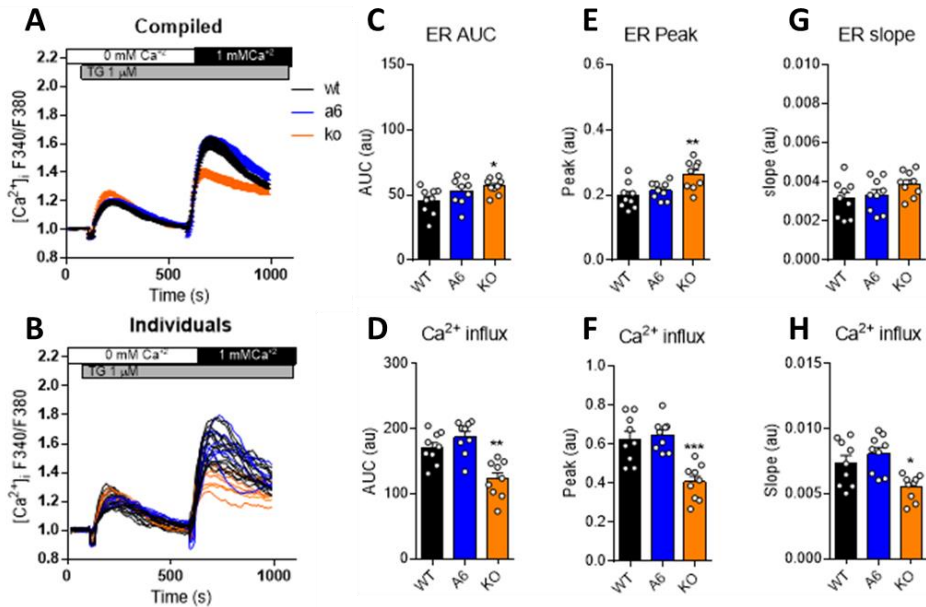


**Figura 66.** Cuantificación de los niveles de calcio en células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko cultivadas con glucosa durante 24 horas. Ver detalles en la figura 64.

La figura 67 muestra que no hay diferencias en la salida de calcio del retículo endoplasmático mediada por STIM1 comparando las líneas celulares MEF wt y MEF A6oe cultivadas en un medio sin aminoácidos. No obstante, en las células MEF A6ko se puede observar un incremento significativo en el área bajo la curva y en el pico de la curva de la salida de calcio del retículo endoplasmático. Este incremento indica que las células MEF A6ko presentan una concentración mayor en los niveles de calcio que salen del retículo endoplasmático en comparación con las otras líneas celulares. Al añadir 1 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  para inducir

la entrada de calcio al interior celular mediada por Orai1, las células MEF A6ko presentan una disminución significativa en los niveles de calcio que entran a la célula en comparación con las líneas celulares MEF wt y MEF A6oe.

### Eliminación de aminoácidos

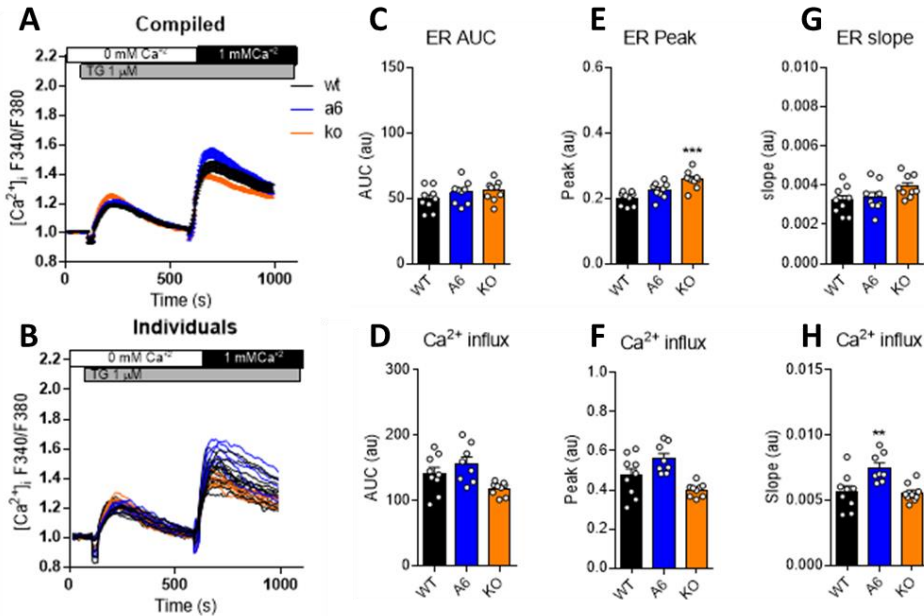


**Figura 67.** Cuantificación de los niveles de calcio en células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko cultivadas sin aminoácidos durante 24 horas. Ver detalles en la figura 64.

En la figura 68 se puede observar que no hay diferencias en la salida de calcio del retículo endoplasmático mediada por STIM1 comparando las líneas celulares MEF wt y MEF A6oe en ayuno. Por otro lado, en las células MEF se observa un aumento significativo en el pico de la curva de la salida de calcio del retículo endoplasmático. Este aumento indica que las células MEF A6ko presentan una concentración mayor en los niveles de calcio que salen del retículo endoplasmático en comparación con las otras líneas celulares. La adición de 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  para inducir la entrada de calcio al interior celular mediada por Orai1, muestra un incremento significativo en la pendiente de la curva de los niveles de calcio que entran a la célula en las células MEF A6oe en comparación con las líneas celulares MEF wt y MEF A6ko. Este incremento

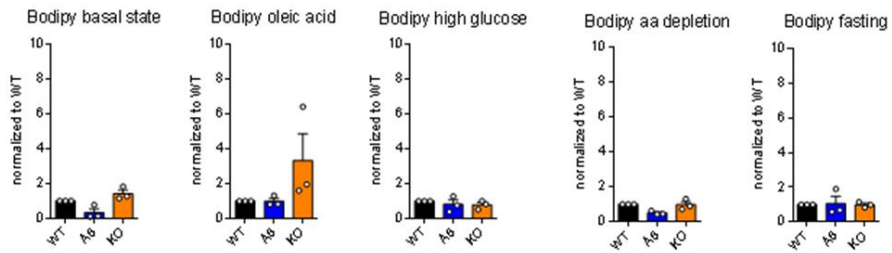
indica una velocidad mayor en el inicio de la entrada de calcio en las células MEF A6oe.

### Ayuno



**Figura 68.** Cuantificación de los niveles de calcio en células MEF wt, MEF A6oe y MEF A6ko en ayuno durante 24 horas. Ver detalles en la figura 64.

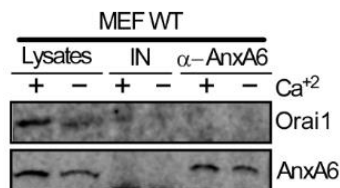
Para determinar si la disminución en los niveles de calcio que entran en las células MEF A6ko en comparación con las células MEF wt y MEF A6oe se debe a una acumulación de cuerpos lipídicos, se analizaron los niveles de cuerpos lipídicos producidos durante 24 horas al cultivar las células en diferentes condiciones metabólicas mediante la tinción con Bodipy y su posterior análisis por citometría de flujo. La figura 69 muestra como las células MEF A6ko presentan una ligera acumulación de cuerpos lipídicos en comparación con las células MEF wt y MEF A6oe en estado basal y al suplementar el medio con ácido oleico. Sin embargo, no hay diferencias significativas en la acumulación de cuerpos lipídicos entre las diferentes líneas celulares (Figura 69). Estos resultados sugieren que la disminución de la entrada de calcio al interior de la célula mediada por SOCE en células MEF A6ko es independiente de la acumulación de cuerpos lipídicos intracelulares.



**Figura 69.** Cuantificación de los niveles de cuerpos lipídicos en células MEF (wt), MEF A6oe (azul) y MEF A6ko (naranja) cultivadas durante 24 horas con diferentes condiciones metabólicas. A) Estado basal B) 500  $\mu$ M de ácido oleico C) 50 mM de glucosa D) eliminación de aminoácidos y E) ayuno.

## 6.2 Análisis de la interacción entre Anexina A6 y Orai1.

Resultados obtenidos en la realización de la tesis mostraron que las células MEF A6ko presentan una disminución en la entrada de calcio mediada por SOCE (Figuras 64, 65, 66, 67) independiente de la acumulación de cuerpos lipídicos en la célula (Figura 69). Está descrito que la proteína AnxA6 interacciona con los canales de calcio TPC1 (*Two pore calcium channel protein 1*) y TPC2 (*Two pore calcium channel protein 2*)<sup>280</sup> localizados en los endosomas tardíos y en los lisosomas. Para determinar si AnxA6 interacciona con la proteína Orai1, encargada de la entrada de calcio celular en la membrana plasmática a través de SOCE, se realizó una inmunoprecipitación en las células MEF wt transfectadas con Orai1-myc con dos tampones diferentes de lisado celular. En el primer tampón se adiciona 1 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  y en el segundo tampón 2 mM de EGTA. En la figura 70 se puede observar que tanto en las células MEF wt tratadas con 1 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  o tratadas con 2 mM de EGTA las proteínas AnxA6 y Orai1-myc no interaccionan en las condiciones de estudio realizadas.



**Figura 70.** Inmunoprecipitación entre las proteínas AnxA6 y Orai1-myc en presencia de 1 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  o 2 mM de EGTA en células MEF wt.









Discusión



## DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo el estudio de la función biológica de la proteína AnxA6 *in vivo*. La proteína AnxA6 presenta una amplia gama de funciones, sin embargo, no se ha caracterizado el papel que desempeña en la fisiología del hígado. Durante la realización de este estudio se ha demostrado la implicación de AnxA6 a nivel fisiológico en un sistema complejo como es la homeostasis de la glucosa.

En el primer bloque de la discusión se analiza la caracterización funcional de AnxA6 como proteína clave en el metabolismo de la glucosa. Por otro lado, en el segundo bloque se discute el estudio de localización celular de los transportadores de L-alanina junto con el análisis de la orientación de los dominios terminales de estas proteínas en la membrana plasmática celular. Finalmente, en el tercer bloque se discute la implicación de AnxA6 como proteína reguladora en la salida de calcio de los reservorios intracelulares y en la entrada de calcio al interior celular mediada por SOCE.



# 1. Regulación del metabolismo de la glucosa por Anexina A6: papel en la regeneración hepática y en el ayuno.

## 1.1 Caracterización del ratón AnxA6ko.

Los modelos celulares de estudio *in vitro* han evidenciado una amplia gama de funciones de la proteína AnxA6 en múltiples procesos biológicos. Entre sus principales funciones destaca la regulación del tráfico de membranas<sup>230</sup> y de la señalización celular,<sup>281</sup> la homeostasis de colesterol,<sup>282</sup> el reordenamiento de microdominios en la membrana plasmática<sup>233</sup> y la reorganización del citoesqueleto cortical de actina.<sup>240</sup> El hecho de que AnxA6 constituya el 0.25% de la proteína hepática total<sup>223</sup> y que se haya descrito su localización en el compartimento endocítico de los hepatocitos de rata,<sup>225,283</sup> revela un posible papel de la proteína AnxA6 en la fisiología del hígado.

La utilización del ratón como modelo de estudio ha favorecido la investigación de determinadas enfermedades humanas en términos genéticos, fisiológicos y bioquímicos.<sup>284</sup> La publicación de la secuencia del genoma del ratón<sup>285</sup> y el desarrollo de técnicas de manipulación genética, aumenta la importancia de éste modelo de estudio como una herramienta para precisar la función de determinados genes y su papel en biología celular.

La importancia del *background* genético de los ratones utilizados en investigación se describió por primera vez por Coleman y Hummel en 1973.<sup>286</sup> Estudios recientes han mostrado que el *background* genético de los ratones determina el fenotipo metabólico y es importante para entender la variabilidad de los resultados fenotípicos.<sup>287</sup> En concreto, estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que los ratones que presentan la proteína Caveolina 1 deplecionada muestran un porcentaje diferente de supervivencia post PHx dependiendo de la cepa donde se haya generado el ratón mutante.<sup>92,288</sup>

La depleción del gen AnxA6 se llevó a cabo en ratones C57BL/6J, aunque se ha observado que la proteína AnxA6 no es esencial para el desarrollo de los

tejidos, para una función regular de los órganos y para la viabilidad del ratón.<sup>241</sup> Los estudios realizados en ratones *knockout* de otras anexinas demostraron una viabilidad y un desarrollo normal de sus tejidos,<sup>212</sup> exceptuando los ratones que presentan la proteína AnxA7 deplecionada, los cuales, mueren en estado embrionario debido a una hemorragia cerebral.<sup>211</sup>

A pesar de las similitudes de los ratones AnxA6ko con los ratones control,<sup>241</sup> se han observado diferencias al analizar el peso corporal de ambos genotipos. Nuestros datos muestran que los ratones AnxA6ko presentan un peso corporal significativamente superior al compararlos con los ratones control. Teniendo en cuenta que el órgano de estudio utilizado es el hígado, también se caracterizó el peso del órgano en condiciones basales. Los ratones AnxA6ko no mostraron diferencias en la relación del peso del hígado con el peso corporal en comparación con los ratones control. El hígado es el único órgano que puede amoldar su tamaño al peso corporal para adaptarse a los cambios en los requerimientos metabólicos.<sup>263</sup> De modo que el aumento del peso corporal de los ratones AnxA6ko se corresponde con un hígado proporcional al peso del ratón.

## **1.2 Importancia de la proteína AnxA6 durante la regeneración hepática.**

Para determinar el papel de AnxA6 en la fisiología hepática *in vivo* se utilizó como modelo experimental la PHx descrita en roedores<sup>48</sup> para inducir un estrés agudo proliferativo y metabólico. Los ratones AnxA6ko mostraron una baja supervivencia a las 72 horas post-cirugía ( $18.5 \pm 7.5\%$ ) en comparación con los ratones wt ( $90 \pm 6.4\%$ ). La regeneración hepática en respuesta a la resección de 2/3 del hígado tras una PHx es un proceso sincronizado que restaura la masa hepática inicial mediante hiperplasia compensatoria de los lóbulos remanentes en 7 días en el ratón.<sup>8</sup> Por lo tanto, la baja supervivencia de los ratones AnxA6ko post PHx evidencia la implicación de la proteína AnxA6 en la regeneración del hígado.

La fase inicial de la regeneración hepática requiere de la acción coordinada de factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y diferentes tipos celulares en

una secuencia sincronizada.<sup>8</sup> A causa de la singularidad de este proceso, la regeneración del hígado se ha estudiado durante años y se ha descrito una amplia variedad de genes que al deplecionarlos alteran el proceso regenerativo. En otros modelos de estudio *in vivo* de la función biológica de determinadas proteínas implicadas en la proliferación de los hepatocitos se ha observado que la depleción de EGFR<sup>60</sup> y HGF<sup>55</sup> en ratones provoca la muerte de los fetos en estado embrionario. La depleción de estos factores de crecimiento restrictivamente en el hígado de ratón evidenció alteraciones en el proceso de regeneración hepática tras la realización de una PHx.<sup>58,61</sup> Los ratones que presentan el factor TNF $\alpha$  deplecionado no mueren tras la realización de una PHx, no presentan diferencias en la proliferación de los hepatocitos o en la regeneración hepática en comparación con los ratones control,<sup>289</sup> siendo una citoquina necesaria para la transición del estado de quiescencia de los hepatocitos y de la entrada del ciclo celular (G<sub>0</sub>-G1).<sup>8</sup> Ninguno de los genes o proteínas deplecionados en ratones en los que se ha estudiado el proceso de regeneración hepática ha impedido la regeneración del hígado en el 100% de los casos, sugiriendo que no hay un único gen responsable del proceso, por lo que podría haber una compensación entre diferentes genes.

EGFR es un efector de la vía Ras/MAPK una de las cascadas de señalización más importantes en el control de la proliferación celular y la diferenciación.<sup>236</sup> Elevados niveles de AnxA6 aumentan la unión de PKC $\alpha$  a la membrana plasmática,<sup>160,170</sup> paso necesario para que se lleve a cabo la fosforilación de EGFR.<sup>235</sup> La muerte de los ratones AnxA6ko post PHx podría deberse a un defecto proliferativo, sin embargo, los estudios realizados de proliferación celular mediante la proteína nuclear Ki67,<sup>264</sup> la entrada a la fase G1 a través de la cuantificación de la expresión de los genes tempranos y la transición de la fase G1-S para síntesis de ADN<sup>72</sup> no mostraron diferencias entre los ratones de ambos genotipos. Por lo tanto, los hepatocitos AnxA6ko presentan una capacidad de activación proliferativa intacta y una progresión normal en el ciclo celular a las primeras horas post PHx.



AnxA6 constituye el 0.25% de la masa hepática total,<sup>223</sup> pero se ha observado un aumento en la cantidad de proteína a las 48 y 72 horas post PHx. Este aumento de la cantidad de proteína podría deberse al aumento de la demanda de lípidos para suplir el requerimiento energético post PHx,<sup>268</sup> puesto que se ha observado la asociación de AnxA6 a cuerpos lipídicos en células hepáticas.<sup>277</sup> Además, el hecho de que los ratones AnxA6ko presenten una baja supervivencia post PHx, demuestra que la función de AnxA6 en la regeneración hepática no puede ser sustituida por otra proteína.

Recientes estudios de regeneración hepática en ratones utilizando el modelo de PHx y la genoanulación de determinados genes han descrito procesos metabólicos clave durante la regeneración del hígado. Concretamente, los ratones que presentan la proteína Caveolina 1 deplecionada no pueden regenerar el hígado tras una PHx debido a que los hepatocitos no pueden acumular cuerpos lipídicos en el hígado<sup>92</sup> necesarios para cubrir la demanda energética tras una PHx.<sup>268</sup> Estos ratones mostraron una baja supervivencias post-cirugía. Sin embargo, al suplementar el agua de bebida con 10% de glucosa los hepatocitos Caveolina 1 *knockout* (Cav1ko) pueden progresar en el ciclo celular y por lo tanto los ratones mutantes sobreviven a la cirugía.<sup>92</sup> La regeneración hepática de los ratones Cav1ko es dependiente del metabolismo de los carbohidratos debido a la ausencia de lípidos en el hígado.<sup>288</sup> Del mismo modo que los ratones Cav1ko pueden restaurar la supervivencia mediante el aporte de carbohidratos,<sup>92,288</sup> los ratones AnxA6ko muestran un fenotipo similar al suplementar el agua de bebida con 10% de carbohidrato, indicando que la baja supervivencia de los ratones AnxA6ko post PHx podría deberse a un coma hipoglucémico puesto que en la regeneración hepática es necesario tanto la reserva de lípidos hepática<sup>268</sup> como que el hígado remanente produzca suficiente glucosa para abastecer la demanda energética de todo el organismo.<sup>8,85,91</sup>

Al rescatar la expresión de AnxA6 restrictivamente en el hígado de los ratones AnxA6ko se ha observado la recuperación de los niveles de glucosa y el aumento de la supervivencia en un 80% post PHx. Estos sucesos sugieren que los ratones AnxA6ko presentan un defecto en el metabolismo energético.

El papel de AnxA6 en la proliferación celular se ha descrito en varios estudios,<sup>170,236,237</sup> algunos centrados en células cancerosas.<sup>172</sup> En cambio, los ratones AnxA6ko carecen de alteraciones en la proliferación de los hepatocitos durante la regeneración hepática. Este escenario sugiere que la depleción de AnxA6 altera el metabolismo del hígado durante la regeneración hepática con una consecuente baja supervivencia post PHx. Estudios recientes han demostrado que AnxA6 está implicada en el metabolismo de la glucosa en el hígado.<sup>244</sup>

### **1.3 Papel de AnxA6 en el metabolismo hepático.**

Es remarcable que, la regeneración hepática sucede al mismo tiempo que el hígado remanente realiza sus funciones metabólicas.<sup>8,68</sup> Este proceso genera una presión extra en el hígado. La eliminación de 2/3 de la masa hepática conlleva a una disminución del contenido de glucógeno hepático y a una menor capacidad gluconeogénica produciendo una pronunciada hipoglucemia post PHx.<sup>84,100</sup> La hipoglucemia requiere de la activación de la gluconeogénesis para restaurar los niveles de glucosa en sangre.<sup>8</sup> La ausencia de un defecto de proliferación en los hepatocitos AnxA6ko y la determinación de un fallo energético como consecuencia de la baja supervivencia de los ratones AnxA6ko durante la regeneración hepática, plantea el estudio del ayuno como modelo fisiológico de estrés metabólico en el hígado.

Se ha observado que los ratones AnxA6ko presentan una disminución significativa de los niveles de glucosa a diferentes horas de ayuno al compararlos con los ratones control, no obstante, los ratones AnxA6ko pueden sintetizar glucosa *de novo* a partir de piruvato, glutamina y glicerol. En este escenario, la vía de la gluconeogénesis podría estar alterada en la captación de aminoácidos precursores de piruvato en el hepatocito o en la conversión de estos aminoácidos a piruvato mediante sus enzimas correspondientes.

Estudios de supervivencia y de regeneración hepática realizados en ratones que presentan la citoquina TNF $\alpha$  deplecionada han mostrado una supervivencia normal post cirugía. La caracterización de la función metabólica

del ratón TNF $\alpha$  *knockout* (TNF $\alpha$ ko) evidenció una disminución de la actividad de la enzima ALAT post PHx.<sup>289</sup> Esta enzima metaboliza la síntesis de piruvato a partir de L-alanina en la vía gluconeogénica mediante su desaminación.<sup>267</sup> Los niveles de actividad de la enzima ALAT en ratones AnxA6ko, tanto en la regeneración hepática como a diferentes horas de ayuno, no han mostrado diferencias al compararlos con los ratones control. Al contrario que los ratones TNF $\alpha$ ko, la depleción de AnxA6 y la cirugía no han alterado la actividad de la enzima ALAT post PHx. Por lo tanto, se plantea que el aminoácido L-alanina no pueda ser metabolizado a piruvato en el interior del hepatocito AnxA6ko, sugiriendo un posible defecto en la captación de L-alanina.

En el modelo fisiológico de estrés inducido por un ayuno prolongado de 24 horas se ha observado un aumento significativo de los niveles del aminoácido L-alanina en plasma en ratones AnxA6ko al compararlos con los ratones control. Los niveles de L-alanina en plasma a las 24 horas post PHx son significativamente superiores en ratones AnxA6ko en comparación con los ratones wt. Además, a las 48 horas post PHx se observa una acumulación significativa de L-alanina en el hígado de los ratones AnxA6ko al compararlos con los ratones control. Estos resultados señalan que el fallo en la vía de la gluconeogénesis en ratones AnxA6ko se produce en la incapacidad de los hepatocitos de captar el principal aminoácido gluconeogénico del hígado en la regeneración hepática.<sup>270</sup>

Durante la regeneración hepática los ácidos grasos se  $\beta$ -oxidan en la mitocondria y los peroxisomas para la obtención de energía o se secretan en el interior de VLDL.<sup>36, 290</sup> En situaciones en las que el metabolismo de la glucosa se encuentra comprometido se produce un aumento de los cuerpos cetónicos en el hígado.<sup>36</sup> En cambio, una acumulación de cuerpos cetónicos en el plasma podría dar lugar a una cetoacidosis y por lo tanto a un posterior fallo hepático.<sup>46</sup> Los niveles de cuerpos cetónicos en el plasma sanguíneo no mostraron diferencias entre los ratones wt y AnxA6ko en los dos modelos de estudio. Esto sugiere que las mitocondrias y los peroxisomas de los ratones AnxA6ko pueden realizar una adecuada  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y se descarta que las alteraciones observadas previamente en las mitocondrias<sup>291</sup>

de células que no tienen AnxA6 puedan afectar a la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, aunque pueden alterar otras funciones que difieren de la síntesis de cuerpos cetónicos. Estudios realizados en nuestro grupo en ratones que presentan genes deplecionados se ha analizado la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y se ha observado que los ratones *knockout* para la proteína ACSL3 (*Acyl-CoA synthetase long-chain*) presentan una baja supervivencia post PHx, similar al fenotipo observado en los ratones AnxA6ko. En cambio, al analizar la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos se ha mostrado una inhibición de la  $\beta$ -oxidación junto con la pérdida de la función mitocondrial y una baja viabilidad celular.<sup>292</sup> Por otro lado, los ratones que presentan el transportador de ácidos grasos de cadena larga CD36 deplecionado evidenciaron un aumento en el consumo de cuerpos cetónicos en ayuno. Este aumento se debe a una compensación en la falta de otros sustratos,<sup>293</sup> lo que podría indicar que el sustrato metabólico en los ratones AnxA6ko no son los cuerpos cetónicos.

Las primeras horas tras una PHx se produce una esteatosis hepática<sup>268</sup> necesaria para cubrir eficazmente la demanda energética y estructural de lípidos, junto con una aguda hipoglucemia que actúa como una señal reguladora necesaria para inducir la lipólisis en el tejido adiposo blanco.<sup>67</sup> Este suceso facilita la secreción de ácidos grasos y colesterol al torrente sanguíneo para ser captados y acumulados por los hepatocitos. Posteriormente, los hepatocitos los utilizarán como sustrato energético para la proliferación.<sup>92</sup> La medición de los niveles de triglicéridos hepáticos en los ratones AnxA6ko post PHx mostraron valores significativamente inferiores en comparación con los ratones control, aunque no se han observado diferencias en ayuno. La disminución de triglicéridos durante la regeneración hepática podría ser resultado de un consumo de triglicéridos como sustrato alternativo a la glucosa, una disminución en la captación de ácidos grasos por los hepatocitos, una disminución de la lipogénesis o un aumento en la síntesis de proteínas encargadas de transportar los triglicéridos<sup>294</sup> en los ratones AnxA6ko. Esta disminución de triglicéridos también podría ser consecuencia de la depleción de AnxA6. Se ha descrito que los cambios en los niveles de AnxA6 influyen en el modo en el que las células hepáticas almacenan los triglicéridos.<sup>277</sup>

#### **1.4 Implicación de AnxA6 en la regulación de los transportadores de L-alanina.**

La gluconeogénesis hepática se encuentra alterada en los ratones AnxA6ko debido a un fallo en la captación de L-alanina por los hepatocitos. La disponibilidad de los sustratos gluconeogénicos en el hígado determinan la gluconeogénesis.<sup>36</sup> Los transportadores del Sistema A son críticos para la captación de aminoácidos neutros en el hígado, mayoritariamente L-alanina.<sup>75</sup> Se ha descrito que la expresión de estos transportadores se encuentra aumentada en situaciones de carencia de aminoácidos extracelulares.<sup>295</sup>

Los niveles de expresión de SNAT2 no aumentaron a diferentes horas post PHx y no presentaron diferencias entre ambos genotipos. Este resultado concuerda con el estudio publicado por Freeman y Mailliard en el año 2000, en cual, describen que tras la realización de una PHx en rata se produce un incremento de la actividad del transportador SNAT2, pero no aumenta su expresión.<sup>296</sup> Además, se han descrito cambios de localización de la proteína SNAT2 desde endosomas hacia la membrana plasmática para realizar la captación de aminoácidos durante la regeneración hepática.<sup>297</sup> En esta tesis, no se ha podido estudiar con más detalle el transportador SNAT2 debido a que los anticuerpos comerciales y los producidos en el laboratorio no han funcionado en nuestras muestras, por lo que no podemos descartar su posible implicación en los modelos fisiológicos hepáticos de estudio.

Por otra parte, los transportadores de L-alanina, SNAT1 y SNAT4, evidenciaron un aumento de expresión significativa en los ratones control a las 48 horas post PHx, pero este incremento de expresión no se observa en los ratones AnxA6ko. Sin embargo, la depleción de AnxA6 no afecta a la cantidad de proteína endógena hepática de las proteínas SNAT1 y SNAT4. La caracterización de estos transportadores a diferentes horas de ayuno no mostró cambios de expresión ni en la cantidad de proteína endógena hepática en los ratones wt y al compararlos con los ratones AnxA6ko. Aunque estas proteínas pertenecen al mismo sistema de captación de aminoácidos,<sup>74</sup> estudios recientes de los transportadores que componen el Sistema A realizados en células hepáticas, han mostrado diferencias de expresión entre

estas proteínas dependiendo del tejido de expresión<sup>123</sup> y frente a un estímulo.<sup>298,299</sup> Se ha descrito que HNF $\alpha$  regula la expresión de SNAT4 durante el desarrollo del hígado, pero no altera los niveles de expresión de los transportadores SNAT1 y SNAT2.<sup>134</sup>

La implicación de AnxA6 en determinadas rutas exocíticas<sup>230</sup> y su interacción con una amplia gama de proteínas como TBC1D15, relacionada con el tráfico de colesterol intracelular<sup>196</sup> y con la regulación de la localización de GLUT4,<sup>300</sup> sugiere que AnxA6 podría interactuar con los transportadores de L-alanina. No obstante, no se ha observado la interacción de AnxA6 con las proteínas SNAT1 y SNAT4 en las condiciones de interacción que se han estudiado. Estos resultados plantean la posibilidad de que la alteración producida en los transportadores de L-alanina no es consecuencia de una interacción directa y prolongada con la proteína AnxA6, sino que podría alterar la ruta que utilizan las proteínas del Sistema A hacia la membrana plasmática<sup>77,132,297</sup> como ya se ha descrito anteriormente para las proteínas SNARE.<sup>230</sup>

Las necesidades metabólicas energéticas producen un cambio de localización de los transportadores de L-alanina hacia la membrana plasmática para realizar la captación aminoácidos.<sup>21</sup> Estudios previos han mostrado la localización de SNAT2 en la membrana plasmática del hepatocito tras una PHx,<sup>297</sup> el cambio de localización de la proteína SNAT2 ubicada en compartimentos endosomales hacia la membrana plasmática en respuesta a estímulos de insulina<sup>77,132</sup> y la presencia de SNAT4 en vesículas próximas a la membrana plasmática en la región subsinusoidal.<sup>124</sup> En este marco se plantea la posibilidad de que la proteína AnxA6 pueda afectar la localización subcelular de los transportadores de L-alanina regulando las rutas endocíticas de transporte de estas proteínas. Por lo tanto, se caracterizó la localización intracelular hepática de los transportadores SNAT1 y SNAT4.

Se observa que el transportador SNAT1 presenta una localización en estructuras de apariencia vesicular en el interior del hepatocito en estado basal, a las 48 horas post PHx y tras 24 horas de ayuno en ambos genotipos. Estudios realizados en células de hepatocarcinoma mostraron una localización intracelular de la proteína SNAT1.<sup>130</sup>

Este transportador se ha caracterizado ampliamente en cerebro pudiendo encontrarse en el hígado en un segundo plano y actuar como compensación de función frente a la depleción de las proteínas SNAT2 y SNAT4 en la célula. Este fenotipo ya se ha observado anteriormente en células cancerosas. La depleción del transportador ASCT2 (*alanine serine and cysteine transporter system 2*) induce una disminución de aminoácidos y como consecuencia un aumento de la regulación de SNAT1 para remplazar funcionalmente ASCT2 y mantener la degradación de glutamina.<sup>301</sup>

Sin embargo, el transportador SNAT4 muestra cambios de localización en respuesta a la necesidad de sustrato gluconeogénico inducida por la regeneración hepática.<sup>8</sup> En los ratones control, SNAT4 se ha observado en estructuras de apariencia vesicular en el interior del hepatocito en estado basal. A las 12 horas tras una PHx se produce un cambio de localización desde las estructuras vesiculares hacia la membrana plasmática donde permanece hasta las 48 horas post PHx para realizar la captación de L-alanina. Este fenotipo se había descrito en un estudio previo para el transportador SNAT2 en el hígado de rata.<sup>297</sup> En los ratones AnxA6ko la proteína SNAT4 cambia de localización desde las estructuras vesiculares hacia la membrana plasmática tras las 12 y 24 horas post PHx. Sin embargo, a las 48 horas post PHx la proteína SNAT4 permanece retenida en estructuras vesiculares en el interior celular, evidenciando un fallo en el reciclaje de esta proteína hacia la membrana plasmática sinusoidal.

Estudios de internalización con análogos lipídicos fluorescentes han revelado la presencia de esfingolípidos en el aparato de Golgi a los 30 minutos de su internalización, mostrando que la internalización se lleva a cabo por endocitosis hacia compartimentos endo- y lisosomales.<sup>302</sup> En las células epiteliales polarizadas algunos receptores como las integrinas<sup>303,304</sup> utilizan un reciclaje periférico a través de endosomas y estructuras de reciclaje en la región basolateral y un reciclaje más profundo hacia la región perinuclear como el receptor de transferrina.<sup>305-307</sup> Los receptores que se encuentran en el compartimento de reciclaje se desvían hacia los lisosomas para su posterior degradación como GLUT2, el transportador de glucosa específico de hígado,<sup>308</sup>

o pueden utilizar una ruta retrógrada hacia Golgi para reparar los carbohidratos dañados y posteriormente regresar a rutas de reciclaje constitutivas.<sup>309,310</sup>

La localización observada de SNAT4 en el hepatocito se podría explicar mediante la participación de la proteína AnxA6 en la regulación del tráfico exocítico y de reciclaje. Estudios de localización del transportador SNAT2 han evidenciado la ubicación de este transportador en vesícula perinucleares y en vesículas cercanas a la membrana plasmática. Además, se ha observado que SNAT2 co-localiza con la proteína syntaxina 6 en TGN y con el transportador de glucosa GLUT4 en la región perinuclear.<sup>132</sup> En nuestro laboratorio se ha descrito que la proteína AnxA6 modula el reciclaje de syntaxina 6 en la superficie celular determinando su anclaje en TGN y su funcionamiento mediante la regulación del colesterol intracelular.<sup>282</sup> Syntaxina 6 se ha asociado ampliamente con el transporte de colesterol desde los endosomas tardíos hacia el retículo endoplasmático vía TGN.<sup>311</sup>

Debido al papel que desempeña AnxA6 como proteína reguladora de la homeostasis de colesterol intracelular, los cambios en los niveles de esta proteína provocan alteraciones en el balance de colesterol en el interior celular modificando el reciclaje de integrinas.<sup>282</sup> En concreto, la eliminación del colesterol en la membrana plasmática aumenta la localización de las proteínas SNARE, SNAP23 y syntaxina 4, en el aparato de Golgi<sup>230</sup> y la inhibición de la formación del complejo Syntaxina 6/VAMP4 en TGN induce el cambio de localización de syntaxina 6 hacia en endosomas de reciclaje y su posterior acumulación en este orgánulo.<sup>282</sup> Además, se ha descrito que AnxA6 modula la formación del complejo TBC1D15/Rab7/AnxA6 localizado en los endosomas tardíos controlando la salida de colesterol de este orgánulo. AnxA6 también realiza funciones de andamio en determinadas vías de señalización.<sup>281</sup> Se ha descrito el papel de andamio que presenta la proteína AnxA6 con p120GAP y PKC, reguladores de la vía EGFR/Ras/MAPK.<sup>171</sup> Incluso, se ha demostrado que AnxA6 inhibe EGFR en células A431<sup>171,194</sup> reduciendo el reciclaje de integrinas.<sup>282</sup>



Además, AnxA6 reorganiza el citoesqueleto de actina en la membrana plasmática<sup>240</sup> y las células que sobreexpresan AnxA6 presentan una mejor organización de los microdominios de membrana.<sup>236,312</sup>

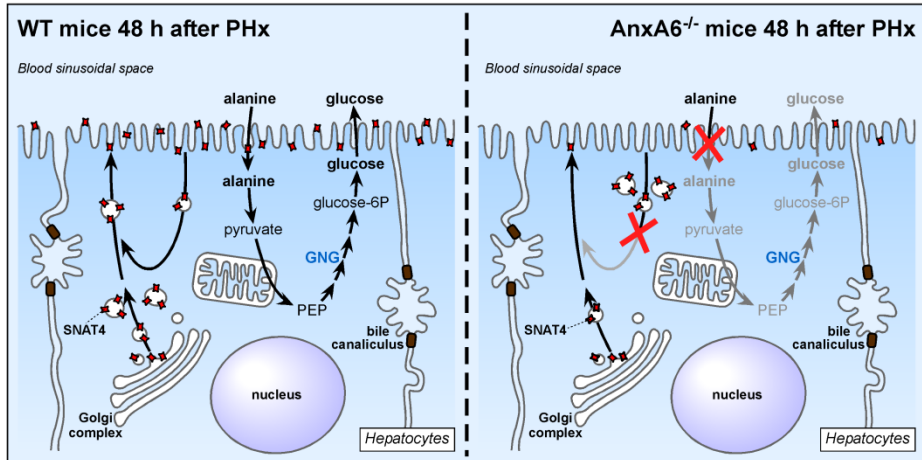
La amplia gama de funciones que desempeña AnxA6 junto con los resultados obtenidos en la realización de esta tesis sugieren que los transportadores SNAT2 y SNAT4 podrían presentar similitudes en las vías de tráfico exocítico y de reciclaje un lugar de almacenamiento próximo o similar, además de presentar cambios de localización en respuesta a estímulos regulados por AnxA6.

### **1.5 Consideraciones finales y modelo propuesto.**

El modelo propuesto en esta sección engloba los datos obtenidos durante la realización del primer bloque de la tesis. No obstante, no podemos descartar la existencia de alteraciones en otras vías debido a la complejidad de la regeneración hepática por el gran número de procesos implicados.

En esta tesis doctoral se demuestra que la proteína AnxA6 es esencial en la regeneración hepática tras una PHx. No es esencial para la progresión en el ciclo celular de los hepatocitos, pero si es necesaria para mantener la demanda energética en la regeneración hepática. Los resultados muestran una deficiencia hipoglucémica como la responsable de la disminución de la supervivencia de los ratones AnxA6ko post PHx.

La alteración en la homeostasis de glucosa en los ratones AnxA6ko en condiciones de estrés se debe a que la proteína AnxA6 modula el reciclaje del transportador SNAT4 hacia la membrana plasmática sinusoidal para captar L-alanina, el principal aminoácido gluconeogénico durante la regeneración hepática.<sup>270</sup> En ratones wt se ha observado un cambio de localización de SNAT4 hacia la membrana plasmática sinusoidal a las 48 horas post PHx. En cambio, en los ratones AnxA6ko, SNAT4, queda retenido en estructuras vesiculares en el interior del hepatocito presentando posiblemente una alteración en la ruta de reciclaje (Figura 71).



**Figura 71.** Localización de la proteína SNAT4 en ratones wt y AnxA6ko a las 48 horas post PHx.

Este estudio nos acerca un poco más al entendimiento de los mecanismos moleculares intracelulares que se desencadenan en la regeneración hepática que aún permanecen sin caracterizar. La identificación del aminoácido L-alanina como el aminoácido principal en la síntesis de glucosa en la regeneración hepática abre una nueva vía de investigación en el complejo proceso de coordinación que desencadena el hígado para reestablecer su arquitectura y función durante la regeneración del hígado,<sup>313</sup> ya que el éxito de determinados tratamientos en enfermedades hepáticas crónicas y del trasplante hepático radica en la eficiencia de la regeneración hepática.<sup>314</sup>

Esta tesis muestra un nuevo regulador del transporte de L-alanina y la gluconeogénesis en ratones relacionando las vías de tráfico intracelular con la regulación del metabolismo de la glucosa mediada por AnxA6.



## 2. Caracterizar la localización y topología *in vitro* de SNAT1, SNAT2 y SNAT4.

### 2.1 Localización intracelular de las proteínas SNAT1, SNAT2 y SNAT4.

En esta tesis se ha demostrado la localización de las proteínas SNAT1 y SNAT4 en estructuras vesiculares en el interior del hepatocito en cortes histológicos de hígado de ratón. Para conocer con más detalle la localización subcelular de estas proteínas y la topología de sus dominios terminales se utilizó un modelo de estudio *in vitro* en células no polarizadas. La familia SLC38A se encuentra expresada en todas las células del cuerpo humano.<sup>21</sup> Los tejidos de expresión de estos transportadores se encuentran ampliamente caracterizados, sin embargo, una localización intracelular de estas proteínas con más detalle está pendiente de determinar.

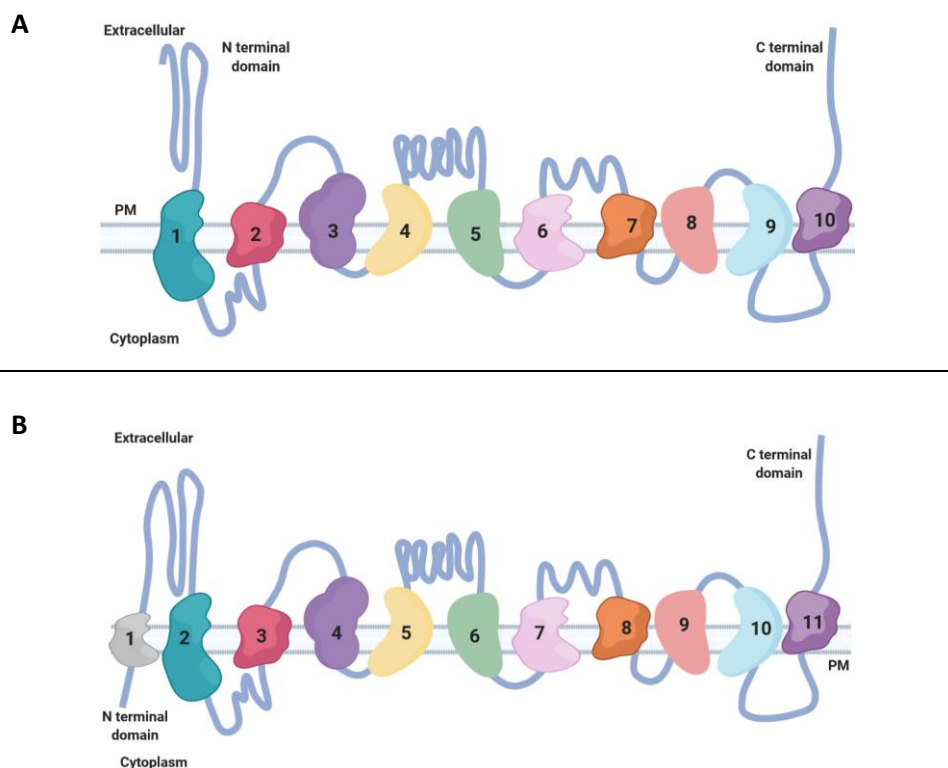
Nuestros resultados muestran una clara localización de los transportadores del Sistema A en la membrana plasmática celular y una co-localización evidente entre las proteínas SNAT1, SNAT2 y SNAT4 con la proteína Rab11 residente en vesículas de reciclaje. Esta localización sugiere que las proteínas del Sistema A se encuentran en una ruta endo- y exocítica que implica un compartimento de reciclaje. Nuestros resultados de localización presentan similitudes con estudios publicados que describen la ubicación de SNAT4 en la membrana plasmática,<sup>123</sup> el transporte de SNAT2 desde vesículas hacia la membrana plasmática<sup>77,297</sup> y la localización axonal próxima a la hendidura sináptica del transportador de L-glutamina, SNAT7, en neuronas GABAérgicas. Teniendo en cuenta el sustrato principal y su localización axonal próxima a la hendidura sináptica, SNAT7 desempeña una función de recaptación y reciclaje de glutamato, aunque esta proteína puede realizar la captación de L-histidina y L-alanina.<sup>315</sup> También, se ha demostrado la localización de SNAT1 en el soma y en las espinas dendríticas en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas realizando la captación de glutamina,<sup>151,316</sup> y la localización de SNAT2 en el soma, las espinas dendríticas y en el axón contribuyendo al flujo de aminoácidos en las neuronas.<sup>317</sup>

El estudio de la localización de los transportadores del Sistema A en el aparato de Golgi mostró que las proteínas SNAT1 y SNAT2 co-localizan con la proteína gm130, la cual, se encuentra ubicada en el compartimento *cis* del aparato de Golgi. Estudios previos han evidenciado una localización de SNAT1 acumulada en el interior de células de hepatocarcinoma<sup>130</sup> y la presencia de SNAT2 en *trans*-Golgi.<sup>132</sup> Estos resultados sugieren que los miembros de la familia SLC38 presentan una localización intracelular muy parecida, puesto que, recientes investigaciones han evidenciado la localización del transportador SNAT10 en la membrana plasmática, en el retículo endoplasmático, en compartimentos de Golgi y en orgánulos secretores realizando la captación de L-glutamina para la síntesis de proteínas.<sup>139</sup> Exceptuando a la familia de transportadores SLC35, la cual, intercambia y transporta nucleótidos en el lumen de Golgi,<sup>83</sup> no se ha establecido el posible papel de la familia SLC38 en este orgánulo. La posible función que realizarían los transportadores del Sistema A en el aparato de Golgi podría ser similar a la descrita recientemente para la proteína SNAT9, como un componente de la maquinaria de detección de aminoácidos lisosomales que controla mTORC1.<sup>137,138</sup> Al caracterizar la presencia de estas proteínas en fracciones subcelulares de hígado de rata se observó que la proteína SNAT1 se encuentra en el homogeneizado total y en las membranas más pesadas. Esto sugiere que SNAT1 y SNAT4 difieren en su localización y en su transporte, puesto que SNAT4 se observó en el homogeneizado total, en las membranas pesadas, en compartimentos vesiculares y enriquecida en los cuerpos multivesiculares. Esta observación refuerza los resultados discutidos anteriormente, en los cuales, la proteína SNAT4 podría estar regulada por AnxA6 en rutas de endo- y exocitosis vesicular mediante complejos SNARE sensibles a colesterol como syntaxina 4, SNAP23 y syntaxina 6.<sup>230,282</sup>

## **2.2 Topología de las proteínas SNAT1, SNAT2 y SNAT4.**

La topología de algunos miembros de la familia SLC38 como SNAT2, SNAT3 y SNAT4 ha sido estudiada más ampliamente.<sup>21,114,318</sup> En cambio, la orientación de los dominios terminales de la proteína SNAT1 no se han caracterizado aún.

Entre los miembros de la familia se observa un elevado porcentaje de homología en sus secuencias,<sup>74</sup> asumiendo que la topología descrita del transportador SNAT3 en rata<sup>21</sup> se repite para el resto de miembros de la familia SLC38. Los transportadores se componen de 11 dominios transmembrana hidrofóbicos con un dominio N terminal citoplasmático y un dominio C extracelular<sup>74</sup> esencial en la actividad de los transportadores.<sup>113</sup> Por el contrario, se ha descrito una topología diferente para el transportador SNAT4, el cual, se compone de 10 dominios transmembrana con el dominio N terminal hacia el exterior celular (Figura 72).<sup>114</sup> Ante esta discrepancia se analiza la orientación de los dominios terminales de las proteínas que componen el Sistema A, puesto que, los dominios terminales presentan un papel importante en cuanto a su expresión subcelular, estabilidad y señalización celular.<sup>319</sup>



**Figura 72.** A) Representación esquemática del modelo de orientación de los dominios terminales de la proteína SNAT4 propuesto por Shi y colaboradores.<sup>114</sup> B) Esquema del modelo propuesto en esta tesis de la orientación de los dominios terminales de las proteínas del Sistema A.

Nuestros resultados han mostrado una estructura similar para los tres miembros que componen el Sistema A. El dominio N terminal de la proteína se encuentra retenido en el interior celular mientras que el dominio C terminal se encuentra ubicado en el citoplasma, sugiriendo la presencia de 11 dominios transmembrana. Esta observación se encuentran en concordancia con la topología descrita de estas proteínas por Zhang y colaboradores en 2011,<sup>113</sup> con la topología descrita de la proteína SNAT2<sup>318</sup> y con la topología observada recientemente para el transportador SNAT10.<sup>320</sup> Sin embargo, difiere del estudio publicado por Shi y colaboradores en el que la orientación del dominio N terminal se encuentra hacia el exterior celular para el transportador SNAT4.<sup>114</sup>

El hecho de que los tres miembros del Sistema A, SNAT1, SNAT2 y SNAT4, presenten similitudes en su localización y en su topología, muestra la posibilidad de que las tres proteínas realicen la misma función de captación de L-alanina en el tejido celular donde se encuentre mayormente expresadas o compensando la función de captación en ausencia de los otros transportadores. La compensación de la función de una proteína por parte de los otros miembros que componen su familia, se ha observado anteriormente con los miembros ACSL. La depleción de la proteína ACSL3 produce un incremento en la expresión de la proteína ACSL4.<sup>321</sup>

La localización observada como una acumulación de vesículas en reciclaje y en el compartimento *cis* del aparato de Golgi muestra el posible mecanismo de acción de estos transportadores, los cuales, pueden estar implicados en vías de internalización de L-alanina. Estas proteínas podrían permanecer acumuladas en compartimentos vesiculares y realizar cambios hacia la membrana plasmática celular frente a un estímulo. Este planteamiento se refuerza con el estudio realizado por Freeman y colaboradores en 2002, en el cual, la proteína SNAT2 localizada en la membrana de endosomas, aumenta su actividad y localización en la membrana plasmática post PHx.<sup>297</sup> También se ha descrito la presencia de SNAT2 en *trans*-Golgi y su cambio de localización a la membrana plasmática en respuesta a estímulos de insulina.<sup>77,132</sup>

### **3. Papel de Anexina A6 en la regulación de los niveles de calcio intracelulares.**

#### **3.1 Implicación de AnxA6 en la homeostasis de calcio regulada por SOCE.**

El calcio se encuentra implicado en múltiples procesos biológicos celulares. Alteraciones en los niveles de calcio intracelulares pueden conducir a una muerte celular por necrosis o apoptosis.<sup>245</sup> El mantenimiento de la homeostasis de calcio en la célula se lleva a cabo mediante la entrada de calcio al interior celular cruzando canales de membrana y a través de la salida de calcio de reservorios intracelulares.<sup>246</sup> La entrada de calcio a la célula dependiente de la salida de calcio de los depósitos intracelulares se conoce como SOCE.<sup>248</sup> SOCE se compone de las proteínas STIM1<sup>250,251</sup> y Orai1.<sup>252</sup> STIM1 es un sensor de los reservorios de calcio intracelulares y conecta la entrada y la salida de calcio celular cambiando de localización desde el retículo endoplasmático hacia la membrana plasmática celular donde interacciona con Orai1.<sup>246</sup>

AnxA6 se describe como una proteína citosólica, pero realiza cambios de localización en respuesta a alteraciones en los niveles de calcio intracelulares<sup>224</sup> y se ha demostrado su presencia en el lumen de las vesículas de retículo sarcoplasmático<sup>322</sup> lugar de reserva del calcio intracelular.<sup>246</sup> En este escenario se plantea si la proteína AnxA6 interviene en la homeostasis de calcio intracelular mediada por SOCE. Los resultados muestran que AnxA6 no altera la salida de calcio de los reservorios intracelulares mediada por STIM1. No obstante, la depleción de AnxA6 produce una disminución significativa en la entrada de calcio a través de Orai1 tanto en estado basal como al tratar las células durante 24 horas con diferentes condiciones metabólicas. Sin embargo, al cultivar las células durante 24 horas de ayuno no se observaron diferencias en la entrada de calcio entre los genotipos. En contraposición a lo observado, algunos estudios han descrito que la depleción de AnxA6 aumenta la entrada de calcio mediada por SOCE en células HEK29,<sup>240</sup> en cardiomiocitos<sup>323</sup> y dependiente de EGF en células A431.<sup>279</sup>



La entrada de calcio se regula por múltiples proteínas y lípidos que modulan el acoplamiento entre el retículo endoplasmático y la membrana plasmática en los lugares de SOCE. Estudios previos han demostrado que la presencia de AnxA6 en lugares de la membrana plasmática con dominios ricos en fosfatidilserina altera la actividad de algunas proteínas residentes en los dominios ricos en colesterol cercanos controlando su transporte.<sup>160</sup> Además, la presencia de AnxA6 induce el remodelamiento de la membrana plasmática.<sup>312</sup> Específicamente, la interacción entre las proteínas Orai1 y STIM1 tiene lugar en regiones ricas en balsas lipídicas.<sup>260</sup> El hecho de que la depleción de AnxA6 disminuya la entrada de calcio mediada por SOCE, sugiere que la ausencia de esta proteína podría estar alterando el ordenamiento de la membrana plasmática sugiriendo que la presencia de AnxA6 en regiones ricas en lípidos es necesaria para un adecuado acoplamiento entre STIM1 y Orai1 en la membrana plasmática. Del mismo modo, AnxA6 podría ser necesaria para formar un complejo de membrana Orai1/AnxA6/STIM1 (Figura 73) y permitir una adecuada entrada de calcio al interior celular.

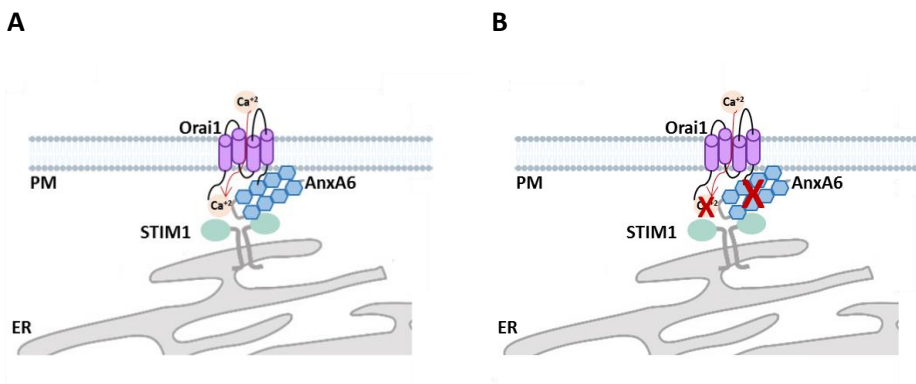
### **3.2 Complejo Orai1/AnxA6/STIM1.**

La disminución de la entrada de calcio mediada por SOCE en células que presentan la proteína AnxA6 deplecionada, sugiere la posible implicación de la proteína AnxA6 en la regulación de SOCE mediante la interacción con Orai1 en la membrana plasmática celular. Los estudios de inmunoprecipitación realizados entre las proteínas AnxA6 y Orai1, han descartado la posible interacción entre estas proteínas en las condiciones de estudio analizadas.

El estudio de Ali y colaboradores en 2017 evidenció que PKC fosforila a Orai1 disminuyendo la entrada de calcio celular mediada por SOCE.<sup>259</sup> De igual modo, en 2003 Freye-Minks y colaboradores mostraron que PKC fosforila a la proteína AnxA6 en su región de unión.<sup>324</sup> Además, está descrito que AnxA6 interacciona con PKC y ambas proteínas cambian de localización hacia balsas lipídicas en la membrana plasmática celular de manera dependiente de calcio.<sup>170,234,325</sup> En este escenario se esperaría un aumento en la entrada de

calcio al interior celular a través de Orai1 en las células que presentan la proteína AnxA6 deplecionada, debido a que la ausencia de AnxA6 altera el cambio de localización de PKC desde el citosol hacia la membrana plasmática y no puede fosforilar e inhibir a Orai1.

Una vez descartado PKC como proteína implicada en este proceso, se plantea que la alteración de la entrada de calcio se debe al colesterol presente en la membrana plasmática. Se ha observado que las células de fibroblasto de embrión de ratón AnxA6ko presentan una mayor acumulación de colesterol en la membrana plasmática en comparación con las células de fibroblasto de embrión de ratón control.<sup>233</sup> Las alteraciones de los dominios asociados a balsas lipídicas disminuyen la interacción entre Orai1 y STIM1 en la membrana plasmática,<sup>260</sup> por lo que la acumulación de colesterol presente en la membrana plasmática de las células de fibroblasto de embrión de ratón AnxA6ko podría estar inhibiendo la interacción entre las proteínas Orai1 y STIM1 y por lo tanto disminuyendo drásticamente la entrada de calcio mediada por SOCE.



**Figura 73.** A) Representación esquemática del modelo propuesto en el cual AnxA6 podría formar un complejo con Orai1 y STIM1 en la membrana plasmática celular permitiendo la entrada de calcio mediada por SOCE. B) Esquema de la posible alteración en la entrada de calcio al interior celular debido a la depleción de AnxA6 en las células de fibroblasto de embrión de ratón AnxA6ko. Membrana plasmática (*plasma membrane*, PM), retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum*, ER).



Conclusiones



## CONCLUSIONES

Así, con los resultados obtenidos podemos concluir que:

[1] El rescate de la proteína Anexina A6 restrictivamente en el hígado es esencial para la supervivencia de los ratones AnxA6ko post hepatectomía parcial.

[2] El transportador de L-alanina, SNAT4, permanece en estructuras vesiculares en el interior de los hepatocitos en los ratones AnxA6ko y no puede realizar la captación de L-alanina para la síntesis de glucosa *de novo* a las 48 horas post PHx.

[3] Los ratones AnxA6ko son incapaces de realizar la gluconeogénesis a partir del aminoácido L-alanina, presentando una rápida y progresiva hipoglucemia.

[4] Los transportadores de L-alanina, SNAT1, SNAT2 y SNAT4, se localizan en endosomas de reciclaje y en la membrana plasmática celular.

[5] La depleción de Anexina A6 en células de fibroblastos de embrión de ratón disminuye la entrada de calcio al interior celular mediada por SOCE.



## CONCLUSIONS

With the results obtained, we can conclude that:

[1] Restrictive restoration of AnxA6 protein expression in the liver is essential for the survival of AnxA6ko mice after partial hepatectomy.

[2] The L-alanine transporter, SNAT4, remains in vesicular structures within hepatocytes in AnxA6ko mice, and cannot carry out the uptake of L-alanine for *de novo* glucose synthesis 48 hours after partial hepatectomy.

[3] AnxA6ko mice are unable to perform gluconeogenesis from the amino acid L-alanine, and present rapid and progressive hypoglycemia.

[4] The System A transporters, SNAT1, SNAT2 and SNAT4, are located in recycling endosomes and in the cellular plasma membrane.

[5] Annexin A6 depletion in mouse embryonic fibroblast cells decreases calcium entry into the cell mediated by SOCE.





Métodos



## **1. Modelo animal para el estudio *in vivo* de Anexina A6.**

Los experimentos realizados en esta tesis doctoral se han llevado a cabo en ratones macho wt y AnxA6ko, que presentan la proteína AnxA6 deplecionada en todos los tejidos, de la cepa C57BL/6J entre 8 y 12 semanas de edad. Para la obtención del ratón AnxA6ko se insertó un gen de resistencia a Neomicina en el exón 3<sup>241</sup> mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR).

Los ratones se mantienen en condiciones de estabulación en ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Dieta de agua y comida *ad libitum* en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona. Todos los experimentos se realizan minimizando el daño al animal y reduciendo al máximo el número de animales por experimento. Los procedimientos experimentales han sido aprobados por el Comité Ético Local de la Universidad de Barcelona siguiendo las legislaciones europeas (2010/63/UE) y españolas (RD 53/2013) para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

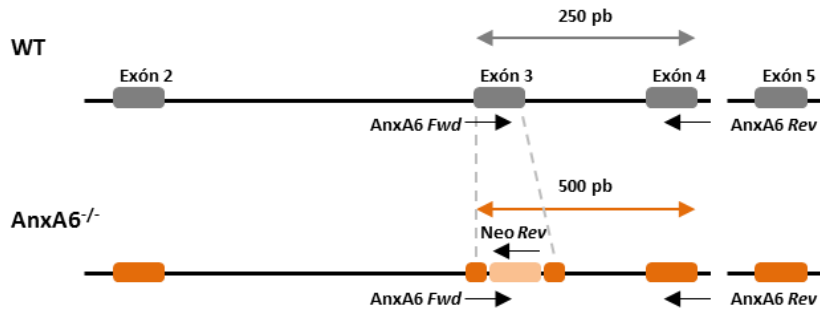
### **1.1 Genotificado de los ratones AnxA6ko.**

#### 1.1.1 Extracción de ADN genómico.

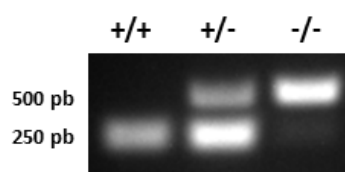
Se toma una muestra de tejido de la cola o la oreja de ratón. La extracción de ADN se realiza mediante un kit comercial Maxwell 16 Mouse Tail DNA Purification Kit (Promega, AS1120) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 1.1.2 Técnica de PCR para genotipificar.

Mediante la técnica de PCR se realiza una amplificación de los exones 3 y 4 del gen de la AnxA6 (Figura 74) a partir del ADN genómico, dando lugar a un producto de 250 pb en los ratones wt y un producto de 500 pb en los ratones AnxA6ko homocigóticos por la inserción de un casete de Neomicina que provoca la eliminación del gen. Para los ratones heterocigóticos se observan ambas bandas (Figura 75).



**Figura 74.** Disrupción del gen AnxA6. Inserción del gen de Neomicina en el exón 3. Oligonucleótidos utilizados para genotipificar Fwd (*Forward*) y Rev (*Reverse*).



**Figura 75.** ADN genómico amplificado mediante PCR, en un gel de 1% agarosa teñido con Red Safe™. Ratón wt banda de 250 pb homocigótico (+/+), ratón heterocigótico banda de 500 y 250 pb (+/-) y ratón AnxA6ko banda de 500 pb homocigótico (-/-).

Los oligonucleótidos, la mix de la PCR y el protocolo para genotipificar los animales a partir de su ADN genómico se muestran a continuación en las tablas 4, 5 y 6. Los materiales utilizados en esta técnica se detallan en la tabla 7.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados en la PCR para genotipificar los ratones wt y AnxA6ko.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
AnxA6 Forward (Fwd)	GAGGCTCTGTCCACGACTT
AnxA6 Reverse (Rev)	CCAATAAAGTCACTGGTTCATC
Neomicina Reverse (Neo Rev)	TCTGGACGAAGAGCATCA

**Tabla 5.** Composición de la mix utilizada en la técnica de PCR para el genotipificado de los ratones wt y AnxA6ko.

Producto	Concentración de trabajo
ADN	1.25 µL
Tampón PCR 1X	6.25 µL
Oligonucleótido Fwd	0.6 µM
Oligonucleótido Rev	0.6 µM
Oligonucleótido Neo Rev	0.6 µM
H <sub>2</sub> O	2.75 µL

**Tabla 6.** Protocolo de la PCR.

	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95 °C	5'	1
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	30''	35
<b><i>Annealing</i></b>	60 °C	30''	
<b>Extensión</b>	68 °C	1'	
<b>Extensión final</b>	68 °C	10'	1

El producto de PCR se separa en un gel de 1% agarosa.

### 1.1.3 Materiales utilizados en esta técnica.

**Tabla 7.** Materiales utilizados para el genotipificado de los ratones wt y AnxA6ko.

<b>Reactivo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
<b>Tampón PCR 1X</b>	QuantaBio	84228
<b>Agarosa</b>	Sigma-Aldrich	A4718-100G
<b>Red Safe™</b>	INtRON	21141

## 2. Hepatectomía parcial en ratones wt y AnxA6ko.

En esta técnica se realiza la extracción de 2/3 del hígado según el protocolo de Higgins y Anderson en el 1931.<sup>48</sup> Los animales se anestesian mediante vía inhalatoria utilizando como anestésico isoflurano a una dosis al 2% en un caudal de oxígeno de 2 L/min. El instrumental y el área quirúrgica se mantienen en condiciones estériles y asépticas durante todo el procedimiento con etanol al 70%. Los ratones son estabulados en condiciones estándar, con dieta de mantenimiento y agua *ad libitum*. Se les inyecta cada 12 horas una dosis de buprenorfina subcutánea 3 mg/kg para paliar el dolor durante 72 horas. Los materiales utilizados se detallan en la tabla 8.

### Protocolo:

-Se esteriliza el abdomen del ratón con etanol 70% y se realiza una incisión cutánea y muscular justo debajo del cartílago xifoideo.

-Para facilitar la salida de los lóbulos se ejerce una ligera presión con los dedos en el abdomen del ratón.

-Los lóbulos extraídos se sujetan con fórceps y se realiza un nudo por debajo de los lóbulos con seda trenzada. Los lóbulos se cortan con una tijera curvada y se retira el fórceps.

-La incisión se cierra con puntos de sutura en la capa muscular y la cutánea.

-Se administran subcutáneamente 500 µL de suero fisiológico para reestablecer la volemia sanguínea.

### 2.1 Materiales utilizados en la PHx.

**Tabla 8.** Materiales utilizados en la técnica de PHx en ratones.

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Isoflurano	IsoVet	125/0654
Buprenorfina	RB Pharmaceuticals	679588
Seda trenzada	Suturas Aragón	6284
Seda	Sutura Aragón	6100
Suero fisiológico	Braunm	5/0101
Etanol	Merck	1070172511

### 3. Obtención y preparación de muestras de ratón.

Los materiales utilizados en este bloque de técnicas se detallan en la tabla 10.

#### 3.1 Extracción de hígado.

-Se anestesia al ratón con 100 mg/kg de ketamina y 200 mg/kg de hidrocóloruro de xilacina en suero fisiológico vía intraperitoneal.

##### Protocolo:

-Se comprueba el reflejo podal del animal para comprobar que está anestesiado, se realiza una incisión cutánea y muscular en el abdomen y se extrae el hígado sin dañar el tejido.

-Se elimina todo el tejido conectivo, vasos sanguíneos y la vesícula biliar que queden adheridos al hígado.

-Se perfunde el hígado con suero fisiológico mediante la vena porta.

-La muestra se congela a -80 °C para su posterior uso o se sumerge en formaldehído para técnicas de inmunohistoquímica.

#### 3.2 Homogeneizado de hígado.

-Los hígados de ratón se pesan y se colocan 30 mg de tejido en tubos Rino™ Screw Cap Tubes con 1 mL de tampón de homogeneización (Tabla 9) y 10 mg de bolas de zirconio.

-Los tubos con las muestras se introducen en un homogeneizador de tejido (Bullet Blender, Next Advance) a velocidad de 12 m/s durante 2 minutos.

-El tejido de hígado homogeneizado se centrifuga a 10.000 RCF durante 6 minutos a 4 °C y finalmente se conserva a -20 °C para su posterior uso.

**Tabla 9.** Composición del tampón de homogeneización.

Tampón de homogeneización	Inhibidores
50 mM Tris	10 µg/ml aprotinina
150 mM NaCl	10 µg/ml leupeptina
5 mM EDTA	1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)
Inhibidores	10 mM de fluoruro sódico
pH 7.5	1 mM de ortovanadato de sodio



### 3.3 Fijación del hígado e inclusión del hígado en O.C.T.™

Para el análisis estructural del tejido hepático los lóbulos se sumergen en paraformaldehído durante 24 horas para su fijación y la muestra se mantiene a 4 °C. Posteriormente, se sumerge en sacarosa al 30% durante 24 horas a 4 °C. La muestra se criopreserva con O.C.T.™ a -80 °C. Se realizan cortes histológicos de 6 a 12 µm con un criótomo Leica y se conservan en portaobjetos a -20 °C.

### 3.4 Extracción de sangre intracardíaca.

-Se anestesia al ratón con 100 mg/kg de ketamina y 200 mg/kg de hidroclicloruro de xilacina en suero fisiológico vía intraperitoneal.

-Se realiza una punción cardíaca con una aguja de 25G y una jeringa estéril de 1 mL en la zona intercostal izquierda y la sangre se recoge en un tubo con heparina para evitar la coagulación sanguínea.

-Las muestras se centrifugan a 6000 RCF durante 5 minutos a 4 °C. El plasma sanguíneo se recolecta y se guarda a -80 °C para su posterior análisis.

### 3.5 Materiales utilizados en este bloque de técnicas.

**Tabla 10.** Materiales utilizados en la extracción de tejido hepático, en la homogeneización del hígado, en la fijación e inclusión en O.C.T.™ y en la extracción de sangre intracardíaca en ratón.

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Ketamina	Imalgene 100	2525
Xilacina	Bayer	1977ESP
Rino™ Screw Cap Tubes	NEXT ADVANCE	F7TUBE1R5-S
Bolas de zirconio	NEXT ADVANCE	F7ZROB10
Tris	SERVA	77-86-1
NaCl	EMSURE®	7647-14-5
EDTA	Sigma-Aldrich	E5134
Aprotinina	Sigma-Aldrich	A1153
Leupeptina	Sigma-Aldrich	L2884
PMSF	Sigma-Aldrich	P7626
NaF	Sigma-Aldrich	S6508
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	36508
Sacarosa	SERVA	57-50-1
Portaobjetos	Thermo SCIENTIFIC	J1800AMNZ
O.C.T.™	Tissue-Tek®	1200600006
Cryomold®	Tissue-Tek®	4557
Aguja 25G	ICO/plus3	N16102
Jeringa 1 mL	ICO/plus3	014360
Tubos con heparina	BD Microcontainer®	365986
Paraformaldehído	Panreac	252931
Suero fisiológico	Braunm	5/0101

#### 4. Aislamiento de hepatocitos de ratón.

Los hepatocitos de ratón se aíslan mediante perfusión con colagenasa (*Chlostridium histolyticum*) según el protocolo de Bosch y colaboradores del 2011.<sup>326</sup> Los materiales utilizados en esta técnica se detallan en la tabla 13.

##### Protocolo:

-Las placas de cultivo se tratan con 4 mg/mL de colágeno disuelto en agua toda la noche a 37 °C.

-El colágeno se retira y las placas se lavan con tampón fosfato salino.

-Se preparan los tampones Hanks I y Hanks II (Tabla 11).

**Tabla 11.** Composición del tampón de perfusión del hígado (Hanks I) y del tampón de disgregación de los hepatocitos (Hanks II).

<b>Hanks I</b>	<b>Hanks II</b>
8 g/L NaCl	8 g/L NaCl
0.4 g/L KCl	0.4 g/L KCl
0.2 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0.12 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.12 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
0.12 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.12 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Burbujear con CO <sub>2</sub> 20 minutos	Burbujear con CO <sub>2</sub> 20 minutos
0.342 g/L EGTA	0.1 g/L Colagenasa
3 g/L Hepes	0.585 g/L CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O
0.05 g/L Albúmina suero bovino (BSA)	
2.1 g/L NaHCO <sub>3</sub>	

-Se ajusta el pH a 7.4 y se filtran las soluciones bajo cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad.

-Se anestesia al ratón con 100 mg/kg de ketamina y 200 mg/kg de hidrocloruro de xilacina en suero fisiológico vía intraperitoneal.

-Se realiza una incisión cutánea y muscular en el peritoneo.

-Se inmovilizan las capas cutáneas y musculares con fórceps a cada lado del musculo superior y se estira hacia arriba la piel junto con los músculos abdominales.

-Se realiza la canulación de la vena porta con un catéter intravascular 24G.

-Se anuda la cánula a la vena porta con un nudo de seda trenzada y se corta la vena cava.

-Se perfunde el hígado a través de la vena porta con la solución Hanks I (Tabla 11) con un caudal de 8 mL/min durante 3 minutos.

-Se realiza la disgregación de los hepatocitos con la solución Hanks II (Tabla 11) con un caudal de 8 mL/min durante 3 minutos.

-Se añaden 10 mL de solución Hanks II en una placa de Petri y se disgregan los hepatocitos.

-Los hepatocitos disgregados se filtran con una gasa doble estéril humedecida en solución Hanks II.

-Las células se centrifugan a 50 RCF durante 5 minutos a 4 °C.

-Los hepatocitos se resuspenden en 5 mL de medio de estabilización Medio I (Tabla 12).

#### **4.1 Cultivo primario de hepatocitos.**

Los medios de cultivo de hepatocitos utilizados son DMEM y HAM F12 en una proporción 1:1.

##### Protocolo:

-Se tiñen los hepatocitos aislados con azul de tripano para cuantificar la viabilidad del experimento. Si el número de hepatocitos viables es menor del 70% se descarta la muestra en el experimento.

-Se siembran 200.000 células en un pozo de 1,5 cm de diámetro y 400.000 células en un pozo de 3 cm de diámetro.

-A las 2 horas se lavan las células 2 veces con tampón fosfato salino y se añade medio de mantenimiento Medio II (Tabla 12). Las células se mantienen como máximo 48 horas en cultivo (37 °C y 5% CO<sub>2</sub>) para evitar la desdiferenciación de los hepatocitos primarios.

**Tabla 12.** Medios de cultivo para la estabilización y mantenimiento de los hepatocitos aislados en cultivo primario.

<b>Medio I, Estabilización</b>	<b>Medio II, Mantenimiento</b>
50 U/mL Penicilina	50 U/mL Penicilina
50 µg/mL estreptomicina	50 µg/mL estreptomicina
2 mM L-Glutamina	2 mM L-glutamina
1.3 g/L D-Glucosa	1.3 g/L D-glucosa
3.6 g/L Hepes	3.6 g/L Hepes
10% FBS	0% FBS
0.15 g/L metionina	

## 4.2 Materiales utilizados en la técnica de aislamiento de hepatocitos.

**Tabla 13.** Materiales utilizados en el aislamiento y cultivo de hepatocitos primarios de ratón.

<b>Reactivo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
<b>Colagenasa</b>	Sigma-Aldrich	C5138
<b>Colágeno</b>	Sigma-Aldrich	C3867-1VL
<b>KCl</b>	Fluka	60128
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	Sigma-Aldrich	63140
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	Sigma-Aldrich	71645
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Sigma-Aldrich	P5655
<b>EGTA</b>	Sigma-Aldrich	E4378
<b>Hepes</b>	Sigma-Aldrich	H4034
<b>BSA libre de ácidos grasos</b>	Sigma-Aldrich	A8806
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich	S5761
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	Sigma-Aldrich	C3306
<b>NaCl</b>	EMSURE®	7647-14-5
<b>Ketamina</b>	Imalgene 100	2525
<b>Xilacina</b>	Bayer	1977ESP
<b>Suero fisiológico</b>	Braunm	5/0101
<b>Catéter 24G</b>	BD Insyte	381212
<b>Seda</b>	Suturas Aragón	06014
<b>Gasa estéril</b>	Gaspunt®	SOMA2008
<b>DMEM</b>	Biological Industries	01-055-1A
<b>HAM F12</b>	Biological Industries	01-095-1A
<b>Azul de tripano</b>	Sigma-Aldrich	T8154
<b>DMEM</b>	Biological Industries	01-055-1A
<b>Penicilina/Estreptomicina</b>	Gibco	15140-122
<b>L-glutamina</b>	Gibco	25030-024
<b>D-glucosa</b>	Sigma-Aldrich	G8270
<b>FBS</b>	Biological industries	04-001-1A
<b>L-Metionina</b>	Sigma-Aldrich	M5308
<b>Tampón fosfato salino</b>	Sigma-Aldrich	P3813
<b>Placa Petri</b>	TPP®	93060
<b>HAM F12</b>	Biological Industries	01-095-1A

## 5. Cuantificación de la expresión génica y proteica.

Los materiales utilizados en este bloque de técnicas se detallan en la tabla 25.

### 5.1 Cuantificación de la expresión génica.

#### 5.1.1 Obtención de ARN de hígado de ratón.

Para la extracción de ARN de hígado de ratón, se utilizan 30 mg de tejido y el kit comercial RNeasy® Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, 74804) según el protocolo establecido por el fabricante.

#### 5.1.2 Retrotranscripción para obtener ADN complementario.

Para la obtención del ADN complementario se realiza una transcripción reversa a partir de ARN con la enzima transcriptasa reversa. Se transcribe 1 µg de ARN utilizando el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Bioscience, 4368814) según las instrucciones del fabricante y siguiendo el protocolo de PCR de la tabla 14.

**Tabla 14.** Protocolo de PCR para la obtención de ADN complementario a partir de ARN.

	Temperatura	Tiempo
<i>Annealing</i>	25 °C	10'
Retrotranscripción	37 °C	120'
Inactivación térmica	85 °C	5'

#### 5.1.3 PCR cuantitativa.

La técnica de PCR cuantitativa se realiza mediante el kit comercial Brilliant SYBRGreen QPCR Master Mix (Agilent technologies, 600828) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante y el protocolo de PCR de la tabla 15.

**Tabla 15.** Protocolo de PCR cuantitativa.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	10'	1
Desnaturalización	95 °C	30''	45
<i>Annealing</i>	60 °C	15''	
Extensión	72 °C	30''	
Desnaturalización	95 °C	10''	1
<i>Annealing</i>	65 °C	60''	
Desnaturalización	95 °C	1''	

Se utiliza el sistema LightCycler (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. El control de referencia utilizado es TBP utilizando el método  $\Delta\Delta CT$ .<sup>327</sup> La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la PCR cuantitativa se detalla en la tabla 16.

**Tabla 16.** Oligonucleótidos utilizados para realizar la PCR cuantitativa.

<b>Gen</b>	<b>Secuencia Fwd (5'-3')</b>	<b>Secuencia Rev (3'-5')</b>
<i>cFos</i>	GGAATGGTGAAGAAGACCGTGT	GCAATCTCAGTCTGCAACGC
<i>Jun</i>	CGGACTCCGGACTTGTTCATC	TTTGCAAAAAGTTCGCTCCCG
<i>cCdn1</i>	GAGCTGCTGCAAATGGAAC	ATGGAGGGTGGGTTGGAAT
<i>PEPCK</i>	GTCTGGCTAAGGAGGAAGGG	GCCAGGAGCAATCCAAAA
<i>G6P</i>	CACGCCTTTTGCTGGACTCG	GGGGGATGGACGCACTTTTACA
<i>Gtp1</i>	TCCAGGCTTCAAGGAATGGAC	CAAGGCACGTTGCACGATG
<i>Gtp2</i>	CAGACCCAGACAACATTTACCTG	CGCGGAGTACAAGGATACTG
<i>F1,6P</i>	ACCTGCCTGCACCTTTAGTC	TTGGTTGAGCCAGCGATACC
<i>Slc38A1</i>	AGAGGACTAAGGTCTGTGG	CTTAGAGTGGTACCCAAGC
<i>Slc38A2</i>	TGAAAAGCCATTATGCCGACG	CCCACAATCGCATTGCTCAG
<i>Slc38A4</i>	CAGAAAGGCGGAAAGGGCT	TGTTTCATGGCGTCTTGTCG
<i>TBP</i>	CACCCCTTGATACCCTTAC	TTCACTCTTGGCTCCTGTGC

## 5.2 Cuantificación de la expresión proteica.

### 5.2.1 Cuantificación de proteínas mediante la técnica Bradford.

La cantidad de proteína de cada muestra se cuantifica siguiendo el método desarrollado por Bradford en 1976 utilizando el reactivo Biorad Protein Assay.<sup>328</sup>

Se mide la absorbancia de la muestra a 600 y 450 nm de longitud de onda de una recta patrón de concentración conocida de albúmina sérica bovina y de las muestras según el protocolo de Zor y Selinger en 1996.<sup>329</sup> A partir de la ecuación de la recta de la gráfica se calculan los  $\mu\text{g}$  de proteína presentes en cada muestra.

### 5.2.2 Preparación de las muestras para electroforesis.

Se calcula el volumen de muestra necesaria para cargar en el gel 40  $\mu\text{g}$  de proteína a partir de la concentración de la muestra. Se añade agua hasta un volumen final de 30  $\mu\text{L}$  y se añaden 10  $\mu\text{L}$  de tampón de carga 4X (Tabla 17) para que la concentración final de la muestra sea de 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

**Tabla 17.** Tampón de carga para muestras de electroforesis de proteínas.

**Tampón de carga 4X**

0.5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
0.5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O
30% (v/v) Glicerol
7.5% (p/v) Dodecilsulfato sódico (SDS)
0.15% (p/v) Ditioneitol (DTT)
0.05% (p/v) Azul de bromofenol

Las muestras se hierven durante 5 minutos a 100 °C y se congelan a -20 °C hasta su posterior uso.

5.2.3 Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y electroforesis.

Las proteínas de la muestra se separan en función de su peso molecular mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se utilizan geles de acrilamida discontinuos que constan de dos partes:

-Concentrador: Las muestras se concentran y todo el contenido proteico avanza a través del gel al mismo tiempo. El porcentaje de acrilamida es de 3.6% y el pH 6.8.

-Resolutivo: Las proteínas se separan en función de su peso molecular. El porcentaje de acrilamida varía entre 5-15% y el pH es 8.8.

La preparación de los geles de acrilamida se realiza mediante las siguientes soluciones detalladas en la tabla 18. La cantidad de reactivos y de soluciones utilizados se muestran en la tabla 19.

**Tabla 18.** Composición de las soluciones 1 y 3 para la realización de geles de acrilamida.

<b>Solución 1</b>	<b>Solución 3</b>
0.75 M Tris-HCl	0.25 M Tris-HCl
0.2% SDS	0.2% SDS
pH 8.8	pH 6.8

Para preparar el gel resolutivo y el concentrador de acrilamida con el sistema Mini-Protean III (Bio-Rad) y pocillos de 1.5 mm. Se utilizan los volúmenes de soluciones y reactivos detallados en la tabla 19.

**Tabla 19.** Composición de los geles de acrilamida resolutivo y concentrador para electroforesis de proteínas.

<b>Resolutivo</b>	<b>6%</b>	<b>7%</b>	<b>8%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>Concentrador</b>
<b>Solución 1 (mL)</b>	5	5	5	5	5	5	-
<b>Acrilamida (mL)</b>	2	2.4	2.8	3.4	4	5	0.36
<b>Solución 3 (mL)</b>	-	-	-	-	-	-	1.5
<b>H<sub>2</sub>O (mL)</b>	3	2.6	2.2	1.6	1	0	1.2
<b>13% APS (μL)</b>	50	50	50	50	50	50	30
<b>TEMED (μL)</b>	14	14	14	14	14	14	7.5

-Se colocan los geles en la cubeta del sistema Mini-Protean (Bio-Rad) en tampón electroforesis (Tabla 20).

**Tabla 20.** Tampón de electroforesis de proteínas.

**Tampón de electroforesis**

25 mM Tris-HCl

192 mM glicina

0.2% SDS

pH 8.3

-Las muestras se cargan en cada uno de los pocillos. En un pozo independiente un marcador de peso molecular de proteínas.

-Las proteínas se separan mediante migración al aplicar al gel de acrilamida un amperaje constante de 30 mA.

5.2.4. Transferencia de proteínas a membrana.

Una vez las proteínas se han separado en función de su peso molecular, se realiza una transferencia de estas proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante el sistema Mini-Transblot Gel (Bio-Rad).



-Se prepara el sándwich de transferencia en el siguiente orden:

1. Parte negra del soporte

2. Esponja

3. Papel *Whatman*

4. Gel de acrilamida

5. Membrana de nitrocelulosa

6. Papel *Whatman*

7. Esponja

8. Parte blanca del soporte

-Se coloca el sándwich en la cubeta con tampón de transferencia (Tabla 21) con el gel de acrilamida orientado hacia el polo negativo y la membrana en el polo positivo.

**Tabla 21.** Tampón de transferencia de proteínas.

**Tampón de transferencia**

25 mM Tris-HCl

192 mM Glicina

0.2% SDS

20% (v/v) etanol

pH 8.3

-Las proteínas se transfieren con un voltaje constante de 70 voltios a 4 °C durante 1 hora y 30 minutos.

5.2.5 Técnica de Western Blot.

Las proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa se detectan mediante la técnica de Western Blot (WB) utilizando anticuerpos específicos.

-La membrana se bloquea con 5% (p/v) de BSA en solución TBST (Tabla 22) durante 1 hora a temperatura ambiente.

-La membrana se lava en solución TBST durante 10 minutos 3 veces.

-El anticuerpo primario se incuba en TBST toda la noche a 4 °C.

-La membrana se lava en solución TBST durante 10 minutos 3 veces.

-El anticuerpo secundario-HRP se incuba diluido en TBST durante 1 hora.

-La membrana se lava en solución TBST durante 10 minutos 3 veces.

-Se añade solución TBS a la membrana y se mantiene en esta solución hasta revelar la membrana.

**Tabla 22.** Composición de las soluciones TBS y TBST.

<b>TBS</b>	<b>TBST</b>
20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl
150 mM NaCl	150 mM NaCl
	0.05% Tween 20
pH 7.5	pH 7.5

-Las proteínas presentes en la membrana se revelan añadiendo EZ-ECL (Biological Industries, 20-500-120) según las instrucciones del fabricante. La señal lumínica se detecta mediante el equipo ImageQuant LAS 4000. La intensidad de las bandas se cuantifica utilizando el programa ImageJ<sup>330</sup> y los resultados se normalizan con el control GAPDH.

Los anticuerpos primarios utilizados para WB se detallan en la tabla 23 y los anticuerpos secundarios en la tabla 24.

**Tabla 23.** Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de WB.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Actina</b>	Monoclonal/Ratón	45 kDa	1:5000	MP Biomedicals, 69.100
<b>AnxA6</b>	Policlonal/Conejo	68 kDa	1:3000	Dr. Carles Enrich
<b>GAPDH</b>	Monoclonal/Cabra	37 kDa	1:10000	Genescript. A00191
<b>GFP</b>	Policlonal/conejo	27 kDa	1:5000	Abcam. Ab290
<b>SNAT1</b>	Policlonal/Conejo	75 kDa	1:1000	Dr. Carles Enrich
<b>SNAT4</b>	Policlonal/Conejo	70 kDa	1:1000	Dr. Carles Enrich
<b>c-Myc</b>	Monoclonal/Ratón	55 kDa	1:500	9E10 Abcam ab32

**Tabla 24.** Anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de WB.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie Inmunizada</b>	<b>Dilución WB</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>α-IgG de Cabra-HRP</b>	<i>Guinea pig</i>	1:5000	Abcam. Ab6908
<b>α-IgG de Conejo-HRP</b>	Cabra	1:3000	Bio-Rad. 170-6515
<b>α-IgG de Ratón-HRP</b>	Cabra	1:3000	Bio-Rad. 170-6516

### **5.3 Análisis de la actividad de la enzima ALAT en plasma.**

Los niveles de la enzima ALAT en plasma de ratón se analizan siguiendo las instrucciones del fabricante (Adiva 1650, Bayer) en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Clínico de Barcelona.

### **5.4 Análisis de los niveles de L-alanina en hígado y en plasma sanguíneo.**

Las muestras de hígado y de plasma sanguíneo se obtienen siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2 y 3.4 del apartado de métodos. Las muestras se mezclan con una solución de estándar interno y 0.1% de ácido fórmico en metanol para precipitar las proteínas. Las muestras se centrifugan a 6000 RCF durante 10 minutos y el sobrenadante se congelan a -80 °C hasta su posterior uso. Las muestras se llevan al laboratorio del Hospital Sant Joan de Déu y se analizan por el Dr. Rafael Artuch.

Los aminoácidos se derivatizan en tampón borato a pH 8.8 utilizando el kit comercial AccQ-Tag Ultra Derivatization (Waters). Las muestras se analizan mediante un UPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tándem.<sup>331</sup> Los aminoácidos se separan mediante cromatografía Waters ACQUITY UPLC H-class y se cuantifican con un espectrómetro de masas Waters Xevo TQD triple-quadrupole utilizando un electroespray de ionización positiva en las condiciones del modo MRM.

### **5.5 Análisis de los niveles de triglicéridos en hígado.**

Se anestesia al ratón con 100 mg/kg ketamina y 200 mg/kg hidrocloreuro de xilacina. El procedimiento se realiza a 4 °C. Los hígados se extraen y se colocan en tubos Rino™ Screw Cap Tubes con tampón de homogeneización (Tabla 9). Las muestras se homogeneizan en un homogeneizador Bullet blender. Los lisados celulares se centrifugan a 10.000 RCF durante 6 minutos a 4 °C. Se mide la cantidad de proteína mediante la técnica de Bradford.<sup>328</sup> Los niveles de triglicéridos se determinan analizando 40 µg de proteína mediante el kit de triglicéridos (BioSystems, 11528) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.6 Análisis de los niveles de cuerpos cetónicos en plasma sanguíneo.**

Las muestras de plasma sanguíneo se obtienen siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4 del apartado de métodos. La detección de los niveles de

cuerpos cetónicos en plasma se realiza mediante el kit comercial Ketone Body Assay (MAK134-1KT, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante.

### 5.7 Materiales utilizados en este bloque de técnicas.

**Tabla 25.** Materiales utilizados en este bloque de técnicas.

Reactivo	Casa comercial	Referencia
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O</b>	Sigma-Aldrich	71504
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	Sigma-Aldrich	71645
<b>SDS</b>	Sigma-Aldrich	71729
<b>DTT</b>	Sigma-Aldrich	D0632
<b>Xilacina</b>	Bayer	1977ESP
<b>Acrilamida</b>	Laboratorios Condal	8532-1L
<b>Biorad Protein Assay</b>	Biorad	500-0006
<b>Albúmina sérica bovina</b>	Sigma-Aldrich	A7906
<b>Glicerol</b>	Sigma-Aldrich	G7893
<b>Azul de bromofenol</b>	Sigma-Aldrich	B8026
<b>Tris</b>	SERVA	77-86-1
<b>APS</b>	Sigma-Aldrich	215589
<b>TEMED</b>	Biorad	1610801
<b>Glicina</b>	Sigma-Aldrich	G7126
<b>Marcador DUAL color</b>	BioRad	161-03745P
<b>Membrana nitrocelulosa</b>	BioRad	162-0115
<b>Etanol</b>	Merck	1070172511
<b>Ketamina</b>	Imalgene 100	2525
<b>NaCl</b>	EMSURE®	7647-14-5
<b>Tween-20</b>	Sigma-Aldrich	P1379
<b>EZ-ECL</b>	Biological Industries	20-500-120
<b>Tubos con heparina</b>	BD Microcontainer®	365986
<b>Rino™ Screw Cap Tubes</b>	NEXT ADVANCE	F7TUBE1R5-S
<b>Bolas de zirconio</b>	NEXT ADVANCE	F7ZROB10
<b>Ácido tricloroacético</b>	Sigma-Aldrich	T6508

## 6. Técnicas para el estudio del metabolismo de la glucosa.

En este bloque de técnicas se analizan los niveles de glucosa *in vivo* y *ex vivo* en ratones wt y AnxA6ko.

### 6.1 Cuantificación de los niveles de glucosa en sangre *in vivo*.

Para determinar la concentración de los niveles de glucosa en sangre de ratón se utiliza un glucómetro comercial Glucocard G Sensor (Arkay, 37852). Se realiza un corte en la cola del ratón y las gotas de sangre se introducen en las tiras reactivas de glucosa Glucocard G Sensor (Arkay, 34565).

### 6.2 Análisis de la producción de glucosa en hepatocitos aislados.

Se realiza una medición de los niveles de glucosa secretada al medio sintetizada por los hepatocitos aislados en cultivo primario mediante el kit comercial Glucose Assay Kit (Sigma-Aldrich, GAGO-20) siguiendo las instrucciones del fabricante.

-Se siembran  $4 \times 10^5$  células de hepatocitos primarios aislados (sección 4) por pozo de 3 cm de diámetro y se mantienen durante 16 horas en medio de mantenimiento Medio II (Tabla 12).

-Los hepatocitos se ayunan 6 horas en medio DMEM 0% glucosa.

-Los hepatocitos aislados en cultivo primario se incuban con 2 mL de los sustratos gluconeogénicos (Tabla 26) diluidos en DMEM 0% glucosa durante 24 horas.

**Tabla 26.** Concentración de trabajo de los sustratos gluconeogénicos utilizados en cultivo.

Sustrato	Concentración	Referencia
Glicerol	20 mM	Sigma-Aldrich, G7893
Piruvato de sodio	2 mM	Sigma-Aldrich, P5280

-La concentración de glucosa secretada en el medio se cuantifica mediante el kit comercial Glucose Assay Kit (Sigma-Aldrich, GAGO-20) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 7. Cuantificación de los niveles de glucógeno en hepatocitos.

Para determinar la concentración de glucógeno en el interior del hepatocito, primero se procede a la extracción de glucógeno, posteriormente se purifica y finalmente se disgrega en glucosa. Los niveles de glucosa se cuantifican mediante el kit comercial Glucose Assay Kit (Sigma-Aldrich, GAGO-20) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los reactivos utilizados en el desarrollo de esta técnica se detallan en la tabla 28.

-Se añaden 200  $\mu\text{L}$  de KOH 1 M a los hepatocitos primarios cultivados en una placa de 3 cm de diámetro durante 5 minutos.

-Las células se levantan de la placa y se neutraliza la acción de KOH mediante la adición de 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  2.8 M.

-Para precipitar el glucógeno se añaden 1725  $\mu\text{L}$  de etanol 99%.

-Las células se centrifugan a 15000 RCF durante 15 minutos a 4 °C.

-Se retira el sobrenadante y la muestra se lava con 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ.

-Para precipitar el glucógeno presente en la muestra se añaden 1800  $\mu\text{L}$  de etanol 99%.

-La muestra se centrifuga a 15000 RCF durante 15 minutos a 4 °C.

-La muestra se resuspende en 1 mL de una solución que contiene 3 mg de amilogucosidasa en 10 mL de tampón acetato sódico 0.25 M (Tabla 27) a pH 4.8.

**Tabla 27.** Composición del tampón acetato sódico a una concentración de 0.25 M.

### **Tampón acetato sódico 0.25 M**

8.4 g de acetato sódico anhidro

4.6 mL de ácido acético glacial

$\text{H}_2\text{O}$  hasta 1L

pH 4.75

-La muestra se incuba durante 2 horas a 37 °C.

-Para neutralizar la acción del tampón acetato sódico se añade 1 mL de ácido sulfúrico 6 N.

-Los niveles de glucosa se cuantifican mediante el kit Glucose Assay Kit (Sigma-Aldrich, GAGO-20) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 7.1 Materiales utilizados en la extracción de glucógeno.

**Tabla 28.** Reactivos utilizados en la cuantificación de los niveles de glucógeno en hepatocitos aislados.

Reactivo	Casa comercial	Referencia
KOH	Sigma-Aldrich	P1767
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	S-6264
Etanol	Merck	1070172511
Amilogucosidasa	Sigma-Aldrich	A1602
Acetato sódico	Sigma-Aldrich	S-8625
Ácido acético glacial	Fisher Chemical	64-19-7
Ácido sulfúrico	MERCK	7664-93-9

## 8. Inmunohistoquímica en cortes histológicos de hígado de ratón.

Las muestras de hígado extraídas y criopreservadas en O.C.T.<sup>™</sup> a -80 °C se cortan en secciones histológicas de 6 µm en un criótomo Leica y se adhieren a un portaobjetos. Las secciones histológicas se conservan a -20 °C.

### Protocolo:

-Se descongelan los portaobjetos que contienen las secciones histológicas hepática a temperatura ambiente en tampón fosfato salino durante 5 minutos.

-La muestra se bloquea con 1% BSA en tampón fosfato salino 20 minutos.

-El anticuerpo primario diluido 1:100 en 0.1% BSA se incuba durante 1 hora.

-El tejido se lava con tampón fosfato salino durante 5 minutos tres veces.

-Se añade el anticuerpo secundario disuelto 1:300 en 0.1% BSA junto con Hoechst y Rodamina-Faloidina 5 µg/mL durante 1 hora.

-La muestra se lava tres veces con tampón fosfato salino durante 5 minutos y se fija toda la noche con 7 µL de mowiol.

**Tabla 29.** Anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Producto	Casa comercial	Referencia
<b>α-Ki67</b>	Abcam	ab15580
<b>α-AnxA6</b>	Laboratorio	Dr. Carles Enrich
<b>α-SNAT1</b>	Laboratorio	Dr. Carles Enrich
<b>α-SNAT4</b>	Laboratorio	Dr. Carles Enrich
<b>α-IgG de conejo-Alexa 647</b>	Life technologies	A-21244

**Tabla 30.** Materiales utilizados en la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

Reactivo	Casa comercial	Referencia
<b>Hoechst</b>	Thermo Fisher	H1399
<b>Rodamina-Faloidina</b>	Thermo Fisher	R415
<b>Portaobjeto</b>	Thermo SCIENTIFIC	J1800AMNZ
<b>Tampón fosfato salino</b>	Sigma-Aldrich	P3813
<b>Albúmina sérica bovina</b>	Sigma-Aldrich	A7906
<b>Mowiol</b>	Calbiochem	475904
<b>Cubreobjetos</b>	HIRSCHMANN®LABORGERATE	8000116



## 9. Expresión de las proteínas Anexina A6 y GFP en hígado de ratón mediante vectores víricos recombinantes adenoasociados.

Para expresar AnxA6 y GFP restrictivamente en el hígado de ratón se clonan los ADN complementarios de rata de las proteínas AnxA6 y GFP en un plásmido AAV2-EalbAAT-WPRE con un casete de expresión flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas de AAV2, el promotor de  $\alpha$ -1 antitripsina humana con secuencias reguladoras del potenciador de la albúmina humana y la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.<sup>332</sup> Los virus rAAV8 se producen en la línea celular estable de células de riñón de embrión humano (*human embryonic kidney*, HEK-293) y se purifican mediante precipitación con polietilenglicol y centrifugación con un gradiente de iodixanol.<sup>333</sup> Los virus se producen en el Centro de Biotecnología Animal y de Terapia Génica de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Como resultado se obtienen vectores víricos recombinantes adenoasociados (*recombinant adeno-associated virus*, rAAV) serotipo 8 (rAAV8) para las proteínas GFP (rAAV8-GFP) y AnxA6 (rAAV8-AnxA6). Una dosis de  $7,2 \cdot 10^{12}$  vg/m (*vector genomes/mouse*) puede transducir todos los hepatocitos del ratón sin toxicidad.<sup>334</sup>

Para la realización del experimento se administran  $10^{11}$  vg/m de los vectores rAAV8-GFP y rAAV8-AnxA6 vía intravenosa en suero salino como vehículo. A los 15 días de la infección se realizaron los experimentos.

**Tabla 31.** Concentración de trabajo utilizada en la expresión de los vectores rAAV8-GFP y rAAV8-AnxA6 vía intravenosa.

Gen	Vector	Concentración (vg/mL)	$\mu\text{L}$ ( $10^{11}$ vg/m)
GFP	rAAV8-GFP	$1.89 \times 10^{13}$	5.3 $\mu\text{L}$
AnxA6	rAAV8-AnxA6	$1.42 \times 10^{13}$	7 $\mu\text{L}$

## **10. Inmunoprecipitación en homogeneizado de hígado de ratón.**

La inmunoprecipitación es un método de análisis para identificar interacciones entre proteínas. En esta técnica se utiliza un anticuerpo de unión específica a una proteína y bolas de agarosa recubiertas de proteína A. Es uno de los métodos más utilizados para la identificación de las interacciones proteína-proteína.<sup>335</sup>

Para realizar una inmunoprecipitación en homogeneizado de hígado de ratón, se extrae el hígado del ratón según el protocolo descrito en la sección 3.1 (Extracción de hígado) del apartado de métodos y se mantiene el hígado a 4 °C durante todo el procedimiento. Se obtiene el homogeneizado de hígado siguiendo el protocolo establecido en la sección 3.2 (Homogeneizado de hígado) del apartado de métodos.

### Protocolo:

-La cantidad de proteína presente en el homogeneizado de hígado se cuantifica mediante la técnica Bradford.<sup>328</sup>

-A 500 µg de proteína del homogeneizado de hígado de ratón se le añaden 5 µL de anticuerpo de conejo que presenta unión específica a la proteína AnxA6. Se prepara una muestra control con homogeneizado de hígado y 5 µL de un anticuerpo de conejo inespecífico.

-Las muestras se incuban en un agitador rotatorio a una velocidad de 22 r.p.m. durante 2 horas a 4 °C.

-A cada muestra se le añaden 30 µL de bolas de agarosa recubiertas de proteína-A, Pierce Protein A Agarose (Thermo Scientific, 20333) y se incuban en un agitador rotario a 22 r.p.m. durante 1 hora a 4 °C.

-Para lavar las muestras se añaden 500 µL de tampón de homogeneización (Tabla 9) y se centrifugan a 500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.

-El paso anterior se repite dos veces más.

-Se descarta el sobrenadante de las bolas de agarosa y se añaden 40  $\mu\text{L}$  de tampón de muestra 1X (Tabla 17) a cada muestra.

-Las muestras se hierven durante 5 minutos a 100 °C y se resuelven en un gel de acrilamida (sección 5.2.3) para su posterior análisis mediante la técnica de WB sección (5.2.5).

## 11. Modelo celular para el estudio *in vitro* de la proteína Anexina A6 y los transportadores de L-alanina.

### 11.1 Líneas celulares.

En la tabla 32 se detallan las líneas celulares utilizadas y su origen. El medio de mantenimiento en cultivo para estas líneas celulares es medio DMEM (Life Technologies, 11995-065) suplementado con los reactivos de la tabla 33.

**Tabla 32.** Líneas celulares utilizadas en el estudio *in vitro* de la proteína AnxA6.

Línea celular	Origen
COS-1	Fibroblasto de riñón de mono africano
MEF wt	Fibroblasto de embrión de ratón
MEF A6ko	Células MEF aisladas del ratón AnxA6ko
MEF A6oe	Células MEF que presentan sobreexpresión de la proteína AnxA6.

### 11.2 Mantenimiento celular.

Las células se mantienen en condiciones estériles en un incubador a una temperatura constante de 37 °C y una presión parcial de CO<sub>2</sub> de 5%. El medio de cultivo utilizado se suplementa con los reactivos de la tabla 33.

**Tabla 33.** Reactivos utilizados para suplementar el medio de cultivo celular DMEM.

Reactivo	Casa comercial	Referencia
5% Suero bovino fetal	Biological Industries	04-001-1A
1% aminoácidos no esenciales	Biological Industries	01-340-1B
1 mM ácido pirúvico	Sigma-Aldrich	P5280
2 mM L-glutamina	Sigma-Aldrich	G6392
50 U/mL Penicilina	Gibco	15140122
50 µg/mL Estreptomicina	Gibco	15140122

Las células se refrescan cada 48 horas en recipientes de 75 cm<sup>2</sup> de superficie.

#### Protocolo:

-Se lavan las células con tampón fosfato salino dos veces.

-Se añade 1 mL de tripsina 1% (v/v) durante 5 minutos a 37 °C para romper las interacciones de la célula con la matriz extracelular.

-Para detener la acción de la tripsina se añaden 9 mL de medio de cultivo y se resuspenden las células manteniendo una dilución 1:10 en cultivo.

### **11.3 Congelación y descongelación de líneas celulares.**

Las líneas celulares se conservan en tubos de criogenización (Thermo Scientific™, 377267) en nitrógeno líquido a -195 °C siguiendo los protocolos de congelación y descongelación siguientes hasta su posterior uso.

#### Protocolo de congelación de células:

-Se lavan las células con 10 mL de tampón fosfato salino. Este paso se realiza dos veces.

-Se añade 1 mL de tripsina 1% (v/v) durante 5 minutos a 37 °C.

-Se añaden 9 mL de medio de cultivo y se resuspenden las células.

-Las células se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.

-Se aspira el medio de cultivo y se resuspenden las células en 10 mL de tampón fosfato salino.

-Las células se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.

-Se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en medio de cultivo suplementado con 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, D2650).

-Las células se congelan a -80 °C durante 4 días y se conservan en nitrógeno líquido hasta su posterior uso.

#### Protocolo de descongelación de células:

-Las células congeladas a -195 °C en nitrógeno líquido se calientan rápidamente a 37 °C, se disuelven en 10 mL de medio de cultivo DMEM suplementado (Tabla 33) y se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.

-Se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en 10 mL de medio de cultivo DMEM suplementado (Tabla 33).

-Las células se mantienen en un incubador a 37 °C y una presión parcial de CO<sub>2</sub> al 5% hasta su posterior uso.

## 11.4 Transfección.

### 11.4.1 Expresión de ADN en bacteria.

El ADN se conserva en *stock* de glicerol a -80 °C. El protocolo de expresión de ADN en bacterias se detalla a continuación.

#### Protocolo:

-Las bacterias congeladas en *stocks* de glicerol se inoculan en medio de cultivo (Sigma-Aldrich, L7533) con 60 µg/mL del antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich, A9393) o con 30 µg/mL del antibiótico kanamicina (Sigma-Aldrich, B5264).

-El medio de cultivo con las bacterias se agita toda la noche a 37 °C.

-Las bacterias se centrifugan a 11000 RCF durante 5 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y el *pellet* celular se congela a -80 °C hasta su purificación.

### 11.4.2 Purificación de ADN de bacteria.

La purificación del ADN expresado en bacteria se realiza mediante el kit comercial Nucleospin Plasmid QuickPure (Machery-Nagel, 740615.50).

### 11.4.3 Método de transfección de ADN a células en cultivo.

Los plásmidos de transfección utilizados se detallan en la tabla 34 y la técnica se lleva a cabo mediante el kit comercial de transfección GenJet Plus DNA *transfection reagent* (SignaGen Laboratories, SL100499) según las instrucciones del fabricante.

**Tabla 34.** Plásmidos utilizados para la transfección de células en cultivo.

ADN	Vector	Resistencia	Laboratorio
SNAT1-GFP	pEGFP N3	Kanamicina	Dr. Carles Enrich
SNAT1-HA C1	pCDNA C1	Kanamicina	Dr. Carles Enrich
SNAT1-HA N3	pEGFP N3	Kanamicina	Dr. Carles Enrich
SNAT2-GFP	pEGFP N3	Kanamicina	Dr. Carles Enrich
SNAT2-HA C1	pCDNA C1	Kanamicina	Dr. Carles Enrich
SNAT2-HA N3	pEGFP N3	Kanamicina	Dr. Carles Enrich

<b>SNAT4-GFP</b>	pEGFP N3	Kanamicina	Dr. Carles Enrich
<b>SNAT4-HA C1</b>	pCDNA C1	Kanamicina	Dr. Carles Enrich
<b>SNAT4-HA N3</b>	pEGFP N3	Kanamicina	Dr. Carles Enrich
<b>Orai1-myc</b>	pCDNA	Ampicilina	Dr. Stefan Feske

## 12. Inmunofluorescencia.

Las células se cultivan sobre cubreobjetos redondos de cristal con un diámetro de 10 mm y 0.17 mm de grosor. La técnica se realiza por contacto de las células con los reactivos colocando cada reactivo en una gota independiente de 40  $\mu$ L a temperatura ambiente. El protocolo utilizado se detalla a continuación. Los anticuerpos utilizados en esta técnica se muestran en la tabla 35 y los reactivos en la tabla 36.

### Protocolo de inmunofluorescencia con permeabilización celular:

-Las células se lavan con tampón fosfato salino durante 30 segundos dos veces.

-El cubreobjetos se coloca en una gota de 40  $\mu$ L de paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos.

-Las células se lavan con tampón fosfato salino durante 5 minutos tres veces.

-Se permeabilizan las células con 0.1% Tritón X-100 en tampón fosfato salino durante 5 minutos.

-Las células se lavan con tampón fosfato salino durante 5 minutos tres veces.

-Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario con otras proteínas se realiza un bloqueo con 1% (p/v) de albúmina de suero bovino en tampón fosfato salino durante 20 minutos.

-El anticuerpo primario disuelto 1:100 en 0.1% (p/v) de albúmina de suero bovino en tampón fosfato salino se incuba durante 1 hora.

-Las células se lavan con tampón fosfato salino durante 5 minutos tres veces.

-El anticuerpo secundario disuelto 1:300 en 0.1% (p/v) de albúmina de suero bovino en tampón fosfato salino se incuba durante 1 hora.

-Las células se tiñen con Hoechst y Rodamina-Faloidina 5  $\mu$ g/mL en tampón fosfato salino durante 20 minutos.

-Las células se lavan con tampón fosfato salino durante 5 minutos tres veces.



-Se sumerge el cubreobjetos en agua milliQ y se pega en un portaobjetos con 3.5  $\mu$ L de mowiol.

**Tabla 35.** Anticuerpos utilizados en la técnica de inmunofluorescencia.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Referencia</b>
<b><math>\alpha</math>-Rab11</b>	Ratón	-	BD Transduction	610656
<b><math>\alpha</math>-Gm130</b>	Ratón	-	BD Transduction	610822
<b><math>\alpha</math>-HA</b>	Conejo	-	Sigma-Aldrich	H6908
<b><math>\alpha</math>-IgG de ratón</b>	Mono	Alexa-Fluor 555	Invitrogen	A31570
<b><math>\alpha</math>-IgG de conejo</b>	Cabra	Alexa-Fluor 488	Invitrogen	A11034

### 12.1 Materiales utilizados en esta técnica.

**Tabla 36.** Reactivos utilizados en la realización de la técnica de inmunofluorescencia.

<b>Reactivo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
<b>Cubreobjetos</b>	HIRSCHMANN®LABORGERATE	8000116
<b>16% Paraformaldehído</b>	Electron Microscopy Science	15710
<b>Tritón X-100</b>	Sigma-Aldrich	T8787
<b>Albúmina suero bovino</b>	Sigma-Aldrich	A7906
<b>Hoechst</b>	Thermo Fisher	H1399
<b>Rodamina-Faloidina</b>	Thermo-Fisher	R415
<b>Mowiol</b>	Merck	475904
<b>Portaobjeto</b>	Thermo SCIENTIFIC	0221053055

### **13. Citometría de flujo.**

Los experimentos realizados con esta técnica se han llevado a cabo utilizando el citómetro BD LSRFortessa™ y el Software BD FACS Diva con el láser 488 nm y el detector 530/30-nm FITC.

Las células vivas se separan individualmente de las células muertas (*debris*) y de los acúmulos celulares utilizando el parámetro de tamaño (*forward scatter*, FSC) y el parámetro de complejidad (*side scatter*, SSC). En un diagrama de puntos se representa en el eje de ordenadas el área de FSC y en el eje de abscisas el área de SSC. En un segundo diagrama se representa en el eje de ordenadas la altura de FSC y en el eje de abscisas el área de FSC. Estos valores son proporcionales si se trata de una célula. En el caso de acúmulos celulares la muestra presenta un valor mayor de área (FSC-A) con respecto al valor de altura (FSC-H). Por lo tanto, se realiza una selección de las células que se sitúan en diagonal, las cuales, corresponden a células individuales. La intensidad de fluorescencia se mide solamente en células individuales.

#### **13.1 Análisis de la acumulación de cuerpos lipídicos.**

En una placa con pozos de 3 cm de diámetro se siembran 100.000 células de las líneas celulares MEF wt, MEF A6ko y MEF A6oe. Estas líneas celulares se incuban con diferentes medios de cultivo durante 24 horas para analizar la acumulación de cuerpos lipídicos.

Los medios de cultivos utilizados son: medio DMEM (Tabla 33), DMEM con 500 µg/mL de ácido oleico, DMEM suplementado con 50 mM de D-glucosa, DMEM sin aminoácidos esenciales y DMEM solamente con 5% (v/v) suero bovino fetal. Los niveles de cuerpos lipídicos acumulados se determinan por citometría de flujo mediante la tinción con Bodipy como marcador de cuerpos lipídicos.

#### Protocolo:

-Las células se lavan con tampón fosfato salino durante 2 minutos dos veces.

-Se añade 1 mL de tripsina 1% (v/v) durante 5 minutos a 37 °C.

-La acción de la tripsina se neutraliza mediante la adicción de 2 mL de medio de cultivo DMEM (Tabla 33).

-Las células en suspensión se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.

-El sobrenadante se descarta y se añaden 150 µL a cada muestra de tampón de fijación en una solución 1:4 de tampón de fijación concentrado y de tampón de fijación de diluido. Las células se fijan durante 30 minutos.

-Las muestras se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.

-Se descarta el sobrenadante y se añaden 150 µL a cada muestra de 1% de tampón de permeabilización durante 30 minutos.

-Las muestras se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.

-Se realiza una incubación con 3.6 µM de Bodipy en tampón de permeabilización durante 30 minutos en oscuridad.

-Las muestras se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.

-Se realiza un lavado con tampón de permeabilización y las muestras se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C. Este paso se realiza por duplicado.

-Cada muestra se resuspende en 150 µL de 2% (v/v) de suero bovino fetal en tampón fosfato salino y se analiza en el citómetro.

### **13.2 Análisis de la fosforilación de proteínas.**

En una placa con pozos de 3 cm de diámetro se cultivan 100.000 células de las líneas celulares MEF wt, MEF A6ko y MEF A6oe. Estas líneas celulares se incuban con diferentes medios de cultivo durante 24 horas para analizar los niveles de fosforilación de las proteínas S6, Akt-Th308 y Akt-Ser473 en función del estado metabólico celular.

Los reactivos utilizados en esta técnica se muestran en la tabla 37.

Los medios de cultivo utilizados son: medio DMEM (Tabla 33), DMEM con 500 µg/mL de ácido oleico, DMEM suplementado con 50 mM de D-glucosa, DMEM sin aminoácidos esenciales y DMEM solamente con 5% (v/v) de suero bovino fetal.

Los niveles de fosforilación de las proteínas S6, Akt-Thr308 y Ser-473 se determinan mediante la tinción con anticuerpos primarios específicos de estas proteínas y anticuerpos secundarios conjugados con FITC detallados en la tabla 38.

Protocolo:

- Las células se lavan con tampón fosfato salino durante 2 minutos dos veces.
- Se añade 1 mL de tripsina 1% (v/v) durante 5 minutos a 37 °C.
- La acción de la tripsina se neutraliza mediante la adición de 2 mL de medio de cultivo DMEM (Tabla 33).
- Las células en suspensión se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.
- El sobrenadante se descarta y se añaden 150 µL a cada muestra de tampón de fijación en una solución 1:4 de tampón de fijación concentrado y de tampón de fijación de diluido. Las células se fijan durante 30 minutos.
- Las muestras se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.
- Se descarta el sobrenadante y se añaden 150 µL a cada muestra de 1% de tampón de permeabilización durante 30 minutos.
- Las muestras se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C.
- Se realiza una incubación con los anticuerpos primarios disueltos 1:100 en tampón de permeabilización durante 1 hora.
- Se realizan un lavado con tampón de permeabilización y las muestras se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C. Este paso se realiza por duplicado.

-Se incubaba el anticuerpo secundario conjugado FITC disuelto 1:500 en tampón de permeabilización durante 1 hora.

-Se realizan un lavado con tampón de permeabilización y las muestras se centrifugan a 1500 RCF durante 5 minutos a 4 °C. Este paso se realiza por duplicado.

-Cada muestra se resuspende en 150 µL de 2% (v/v) de suero bovino fetal en tampón fosfato salino y analiza en el citómetro.

### 13.3 Material utilizado en el desarrollo de esta técnica.

**Tabla 37.** Reactivos utilizados en la realización de esta técnica.

Reactivo	Casa comercial	Referencia
DMEM	Corning	10-013-CV
DMEM	Gibco	A14430-01
5% Suero bovino fetal	Biological Industries	04-001-1A
1% aminoácidos no esenciales	Biological Industries	01-340-1B
1 mM ácido pirúvico	Sigma-Aldrich	P5280
2 mM L-glutamina	Sigma-Aldrich	G6392
50 U/mL Penicilina	Gibco	15140122
50 µg/mL Estreptomina	Gibco	15140122
Ácido oleico	Sigma-Aldrich	O3008-5ML
D-glucosa	Sigma-Aldrich	G8270-100G
Tampón de fijación concentrado	Invitrogen	00-5123-43
Tampón de fijación diluido	Invitrogen	00-5223-56
Tampón de permeabilización	Invitrogen	00-8333-56
Bodipy 493/503	Invitrogen	03922

**Tabla 38.** Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Referencia
α-Phospho-S6	Ratón	Invitrogen	14-9007-82
α-Phospho-Akt-Thr308	Conejo	Cell signalling	13038S
α-Phospho-Akt-Ser473	Conejo	Thermofisher	700392
α-IgG de ratón-FITC	Cabra	eBioscience	11-4010-82
α-IgG de conejo-FITC	Cabra	eBioscience	11-4839-81

## 14. Análisis de los niveles de calcio intracelulares.

Para analizar los niveles de calcio intracelulares se cultivan las líneas celulares MEF wt, MEF A6ko y MEF A6oe en placas de FlexStation® (Falcon, 353219) durante 24 horas y se incuban con en diferentes medios de cultivo para determinar la relación entre el metabolismo celular y los niveles de calcio.

Los medios de cultivo utilizados son: medio DMEM (Tabla 33), DMEM con 500 µg/mL de ácido oleico, DMEM suplementado con 50 mM de D-glucosa, DMEM sin aminoácidos esenciales y DMEM solamente con 5% (v/v) de suero bovino fetal. La preparación de los tampones se muestra en la tabla 39 y los reactivos utilizados en el desarrollo de esta técnica se detallan en la tabla 40.

### Protocolo:

-Las células se incuban con 2 µM de Fura-2-AM durante 45 minutos en oscuridad en el medio de cultivo que corresponda con la condición metabólica.

-Se retira el medio que contiene Fura-2-AM y se realizan dos lavados con 100 µL de tampón Ringer 0 mM Ca<sup>+2</sup> (Tabla 39).

-Las células se incuban durante 5 minutos en tampón Ringer 0 mM Ca<sup>+2</sup>.

-La placa se introduce en el aparato de medida FlexStation3® (Molecular Devices, FV05767) junto con puntas negras especiales (Molecular Devices, 9000-0911), además de otra placa que contiene 5 µM de tapsigargina y tampón Ringer 2 mM Ca<sup>+2</sup>.

-Se miden las longitudes de onda de 340 nm y 380 nm cada 4 segundos durante 17 minutos aproximadamente, realizando un total de 250 mediciones.

-Durante los primeros 120 segundos el equipo mide la fluorescencia de las células en 80 µL de tampón Ringer 0 mM Ca<sup>+2</sup>. Posteriormente la máquina adiciona 20 µL de tapsigargina 5 µM y para obtener una concentración final de 1 µM de tapsigargina en el medio. En este punto se mide la salida de calcio del retículo endoplasmático.

-En el segundo 600 el equipo añade 100  $\mu\text{L}$  de tampón Ringer 2 mM  $\text{Ca}^{+2}$  y se obtiene una concentración de trabajo final de 1 mM  $\text{Ca}^{+2}$ . En este punto se mide la entrada de calcio al interior celular.

#### 14.1 Materiales utilizados en la realización de esta técnica.

**Tabla 39.** Tampón Ringer.

<b>Tampón Ringer 1L</b>	<b>0 mM</b>	<b>2 mM</b>
<b>NaCl (5 M)</b>	31 mL	31 mL
<b>KCl (1 M)</b>	4.5 mL	4.5 mL
<b>CaCl<sub>2</sub> (1M)</b>	-	2 mL
<b>MgCl<sub>2</sub> (1 M)</b>	3 mL	1 mL
<b>Hepes (1 M)</b>	5 mL	5 mL
<b>D-glucosa</b>	1.8 g	1.8 g

**Tabla 40.** Reactivos utilizados en el análisis de los niveles de calcio intracelulares.

<b>Reactivo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
<b>DMEM</b>	Corning	10-013-CV
<b>DMEM</b>	Gibco	A14430-01
<b>5% Suero bovino fetal</b>	Biological Industries	04-001-1A
<b>1% aminoácidos no esenciales</b>	Biological Industries	01-340-1B
<b>1 mM ácido pirúvico</b>	Sigma-Aldrich	P5280
<b>2 mM L-glutamina</b>	Sigma-Aldrich	G6392
<b>50 U/mL Penicilina</b>	Gibco	15140122
<b>50 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> Estreptomina</b>	Gibco	15140122
<b>Ácido oleico</b>	Sigma-Aldrich	O3008-5ML
<b>D-glucosa</b>	Sigma-Aldrich	G8270-100G
<b>Fura-2-AM</b>	Life Technologies	F1221
<b>Tapsigargina</b>	Calbiochem	586005
<b>NaCl</b>	EMSURE®	7647-14-5
<b>KCl</b>	Fluka	60128
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Sigma-Aldrich	C3306
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Sigma-Aldrich	M8266
<b>Hepes</b>	Sigma-Aldrich	H4034

## 15. Inmunoprecipitación en una línea celular estable.

Para realizar una inmunoprecipitación entre las proteínas AnxA6 y Orai1-myc se cultivan 1.000.000 de células de la línea celular MEF wt en dos placas de 10 cm de diámetro en medio DMEM (Tabla 33). Se realiza una transfección del plásmido Orai1-myc siguiendo el protocolo establecido en la sección 11.4.3 del apartado de métodos. Antes de comenzar con el protocolo de inmunoprecipitación se comprueba que la eficiencia de transfección sea superior al 60%.

### Protocolo:

- Las células se lavan con 6 mL de tampón fosfato salino dos veces.
- Se añaden 500  $\mu$ L de tampón de homogeneización (Tabla 9) con 1 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  y las células se separan de la placa con un raspador. En la segunda placa se añade tampón de homogeneización con 2 mM de EGTA (Sigma-Aldrich, E4378).
- Las células se lisan con una jeringa de 1 mL y una aguja de 25 G durante 15 repeticiones.
- El sobrenadante se centrifuga a 6000 RCF durante 5 minutos a 4 °C.
- Se desecha el *pellet* y la cantidad de proteína presente en el sobrenadante se cuantifica mediante la técnica Bradford.<sup>328</sup>
- A 500  $\mu$ g de proteína del sobrenadante se le añaden 5  $\mu$ L de anticuerpo de conejo que presenta unión específica a la proteína AnxA6. Se añade una muestra control que contiene homogeneizado de hígado y 5  $\mu$ L de un anticuerpo de conejo inespecífico.
- Las muestras se incuban en un agitador rotatorio a una velocidad de 22 r.p.m. durante 2 horas a 4 °C.
- A cada muestra se le añaden 30  $\mu$ L de bolas de agarosa recubiertas de proteína-A, Pierce Protein A Agarose (Thermo Scientific, 20333) y se incuban en un agitador rotario a 22 r.p.m. durante 1 hora a 4 °C.



-Para lavar las muestras se añaden 500  $\mu\text{L}$  de tampón de homogeneización (Tabla 9) sin calcio y se centrifugan a 500 RCF durante 5 minutos a 4 °C. Este paso se repite dos veces más.

-Se descarta el sobrenadante y se añaden 40  $\mu\text{L}$  de tampón de muestra 1X (Tabla 17) a cada muestra.

-Las muestras se hierven durante 5 minutos a 100 °C y se resuelven en un gel de acrilamida (sección 5.2.3) para su posterior análisis mediante la técnica de WB sección (5.2.5).

## 16. Producción del anticuerpo policlonal de conejo.

Para la detección de las proteínas SNAT2 y SNAT4 endógenas en el hígado de ratón se genera un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce la región del dominio N-terminal que corresponde con los aminoácidos del 1 al 80 de las proteínas SNAT2 y SNAT4 de ratón unida a una cola de glutatión S transferasa (Glutathione-S-Transferase, GST) siguiendo el protocolo descrito.<sup>194</sup>

La proteína recombinante se produce en la bacteria *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Promega) y se purifica con unas bolas recubiertas de glutatión sefarosa (Glutathione-Sepharose 4B *beads*, GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizan conejos NZW hembra de calidad MDL (Minimal Disease Level) de la Granja Cunícola San Bernardo (Tulebras, Navarra) como huésped y se inyecta subcutáneamente la proteína. Se reparte 1 mL de proteína en 6 puntos diferentes. La inmunización primaria se realiza con Adyuvante Completo de Freund (ACF) y el resto de inmunizaciones se administran en Adyuvante Incompleto de Freund (AIF). Este protocolo ha sido aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona.

### Protocolo de inmunizaciones:

Día 0. Sangrado preinmune e inyección primaria de proteína (500 µg/mL de emulsión con ACF, 1:1).

Día 21. Recuerdo 1 (250 µg/mL de emulsión con AIF, 1:1).

Día 42. Recuerdo 2 (250 µg/mL de emulsión con AIF, 1:1).

Día 52. Sangrado de test (5 mL).

Día 63. Recuerdo 3 (250 µg/mL de emulsión con AIF, 1:1).

Día 73. Sangrado de test (5 mL).

Día 74. Exanguinación.

La sangre se centrifuga a 1600 RCF durante 10 minutos a 4 °C y se recoge el sérum que se congela a -20 °C. La comprobación del anticuerpo se lleva a cabo mediante la detección de la proteína endógena y recombinante de ratón en muestras de hígado y en líneas celulares en las que se induce la sobreexpresión de SNAT2-GFP y SNAT4-GFP. La validación se corrobora a través de la técnica de WB (sección 5.2) del apartado de métodos.

## 17. Aislamiento de endosomas de hígado de rata.

Las diferentes muestras de las fracciones subcelulares de hígado de rata se recolectaron por la Dr. Olivia Tort y la técnico Alba Fajardo del grupo de investigación del Dr. Albert Pol *Lipid trafficking and disease* siguiendo el protocolo descrito por el Dr. Albert Pol en 1997.<sup>336</sup>

Se utilizaron 4 hígados de rata macho Sprague-dawley de 8 semanas con un peso de 250 gramos en cada experimento. Las ratas se mantienen en condiciones de estabulación en ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Dieta de agua y comida *ad libitum* en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona. El experimento se realiza minimizando el daño al animal y reduciendo al máximo el número de animales por experimento. Los procedimientos experimentales han sido aprobados por el Comité Ético Local de la Universidad de Barcelona siguiendo las legislaciones europeas (2010/63/UE) y españolas (RD 53/2013) para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

### Protocolo:

- Se extrae el hígado y se perfunde con una disolución de 0.9% NaCl, 0.1% EDTA a 4 °C.
- Se disgrega el hígado durante 6 minutos y se homogeneizan 8.1 g con 24 mL de una disolución 0.25M de sacarosa más inhibidores de proteasas (Tabla 9) con un homogeneizador Dounce, 3 veces con el émbolo *loose* y una vez con el émbolo *tight*.
- Se centrifuga el homogeneizado a 600 RCF durante 10 minutos a 4 °C en el rotor SW28 de Beckman.
- El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 3500 RCF durante 15 minutos 4 °C en el rotor SW28 de Beckman.
- El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 12200 RCF durante 20 minutos 4 °C en el rotor *type 30* de Beckman.
- A 64 mL de sobrenadante se le añaden 30 mL de una solución de Percoll® Plus 4 °C (3 mL de 0.25M de sacarosa en 27 mL de Percoll pH 7.4).
- El sobrenadante se centrifuga a 26700 RCF durante 45 minutos a 4 °C en el rotor *type 30* de Beckman.

- El sobrenadante se disuelve en el doble de volumen de 0.9% de NaCl a 4 °C, se pone encima de 2.5 mL de sacarosa 2.5M y se centrifuga a 17800 RCF durante 45 minutos a 4 °C en el rotor SW28 de Beckman.
- Se descarta el sobrenadante, se recoge la banda de color blanquecino que queda encima de la sacarosa 2.5M y se añade sacarosa 2.5M siguiendo la relación: volumen de la banda x 0.3786.
- Se prepara un gradiente discontinuo de sacarosa con 8 mL de la muestra diluida en sacarosa 2.5M con una concentración final de 1.15M de sacarosa, 7.5 mL de sacarosa 1.06M, 0.84M, 0.56M y 0.24M.
- El gradiente se centrifuga a 104000 RCF durante 3 horas a 4 °C en el rotor SW28 de Beckman.
- Se recogen las diferentes fases: endosomas tardíos 0.24-0.56M, endosomas tempranos 0.56-0.84M y endosomas de reciclaje 0.84-1.06M.
- Las fases se centrifugan a 52000 RCF durante 30 minutos a 4 °C.
- Se descarta el sobrenadante, el *pellet* se resuspende en 30 µL de 0.9% NaCl.

**Tabla 41.** Reactivos utilizados en el aislamiento de endosomas de hígado de rata.

Reactivo	Casa comercial	Referencia
NaCl	EMSURE®	7647-14-5
EDTA	Sigma-Aldrich	E5134
Sacarosa	SERVA	57-50-1
Percoll® Plus	Sigma-Aldrich	GE17-5445-02

## **18. Microscopía.**

Los experimentos realizados en secciones histológicas hepáticas de ratón se han observado en el microscopio confocal espectral Leica TCS-SP5 mediante la cámara celular Attofluor (Invitrogen). Se ha utilizado el objetivo de 63x de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1.4 y un tamaño de pixel de 60 nm.

Los experimentos realizados en líneas celulares estables se han observado en el microscopio de epifluorescencia (Leica DMI6000 B) con el objetivo de 63x de inmersión en aceite y con una apertura óptica de 1.4.

## 19. Análisis estadístico.

Los resultados se muestran como promedio de las muestras  $\pm$  la desviación estándar de la media (*standard error of the mean*, SEM). El análisis estadístico se ha realizado con el programa Prism8 (GraphPad). En la comparación de datos referentes a una única variable en los genotipos wt y AnxA6ko se ha utilizado el test t-Student para los datos desaparejados. La estadística frente a los datos de ambos genotipos frente a varias variables ha sido ANOVA de dos factores con el post-test de Bonferroni. Para el análisis estadístico de la supervivencia se ha utilizado el Test de Mantel-Cox.<sup>262</sup>

El p-valor muestra la significación estadística de cada experimento. Cada gráfica presenta 1, 2 o 3 estrellas en función del grado de significación:

\*  $p < 0.05$ : significativo

\*  $p < 0.01$ : muy significativo

\*  $p < 0.001$ : el más significativo

El número de muestra (n) utilizado en cada experimento se detalla en el pie de figura.



# Bibliografía





## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Bechmann, L. P. *et al.* The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* **56**, 952-964, doi:10.1016/j.jhep.2011.08.025 (2012).
- 2 Arias, I. M. *et al.* *The liver biology and pathobiology* 5<sup>th</sup> edn, (2009).
- 3 Dooley, J. S., Lok, A. S. F., Burroughs, A. K. & Heathcote, E. J. (ed John Wiley & Sons Ltd.) (2011).
- 4 Martins, P. N., Theruvath, T. P. & Neuhaus, P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* **28**, 3-11, doi:10.1111/j.1478-3231.2007.01628.x (2008).
- 5 Greene, A. K. & Puder, M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* **16**, 99-102 (2003).
- 6 Blouin, A., Bolender, R. P. & Weibel, E. R. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol* **72**, 441-455, doi:10.1083/jcb.72.2.441 (1977).
- 7 Weibel, E. R., Staubli, W., Gnagi, H. R. & Hess, F. A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol* **42**, 68-91, doi:10.1083/jcb.42.1.68 (1969).
- 8 Taub, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 836-847, doi:10.1038/nrm1489 (2004).
- 9 Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* **88**, 125-172, doi:10.1152/physrev.00013.2007 (2008).
- 10 Parker, G. A. & Picut, C. A. Liver immunobiology. *Toxicol Pathol* **33**, 52-62, doi:10.1080/01926230590522365 (2005).
- 11 Brosnan, J. T. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr* **133**, 2068S-2072S, doi:10.1093/jn/133.6.2068S (2003).
- 12 Ekberg, K. *et al.* Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes* **48**, 292-298, doi:10.2337/diabetes.48.2.292 (1999).
- 13 Wu, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* **37**, 1-17, doi:10.1007/s00726-009-0269-0 (2009).
- 14 Curthoys, N. P. & Watford, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr* **15**, 133-159, doi:10.1146/annurev.nu.15.070195.001025 (1995).
- 15 Self, J. T. *et al.* Glutamine synthesis in the developing porcine placenta. *Biol Reprod* **70**, 1444-1451, doi:10.1095/biolreprod.103.025486 (2004).
- 16 Stoll, B. *et al.* Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J Nutr* **128**, 606-614, doi:10.1093/jn/128.3.606 (1998).
- 17 Wu, G. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *Am J Physiol* **272**, G1382-1390, doi:10.1152/ajpgi.1997.272.6.G1382 (1997).
- 18 Wu, G. & Morris, S. M., Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* **336** ( Pt 1), 1-17, doi:10.1042/bj3360001 (1998).
- 19 Kandasamy, P., Gyimesi, G., Kanai, Y. & Hediger, M. A. Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends Biochem Sci* **43**, 752-789, doi:10.1016/j.tibs.2018.05.003 (2018).
- 20 Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J. & Zorzano, A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* **78**, 969-1054, doi:10.1152/physrev.1998.78.4.969 (1998).

- 21 Bröer, S. The SLC38 family of sodium-amino acid co-transporters. *Pflugers Arch* **466**, 155-172, doi:10.1007/s00424-013-1393-y (2014).
- 22 Deng, X. *et al.* Association study of polymorphisms in the neutral amino acid transporter genes SLC1A4, SLC1A5 and the glycine transporter genes SLC6A5, SLC6A9 with schizophrenia. *BMC Psychiatry* **8**, 58, doi:10.1186/1471-244X-8-58 (2008).
- 23 Bassi, M. T. *et al.* SLC7A8, a gene mapping within the lysinuric protein intolerance critical region, encodes a new member of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Genomics* **62**, 297-303, doi:10.1006/geno.1999.5978 (1999).
- 24 Kanai, Y. *et al.* The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med* **34**, 108-120, doi:10.1016/j.mam.2013.01.001 (2013).
- 25 Fotiadis, D., Kanai, Y. & Palacin, M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med* **34**, 139-158, doi:10.1016/j.mam.2012.10.007 (2013).
- 26 Reimer, R. J. SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters. *Mol Aspects Med* **34**, 350-359, doi:10.1016/j.mam.2012.05.004 (2013).
- 27 Biber, J., Custer, M., Werner, A., Kaissling, B. & Murer, H. Localization of NaPi-1, a Na/Pi cotransporter, in rabbit kidney proximal tubules. II. Localization by immunohistochemistry. *Pflugers Arch* **424**, 210-215, doi:10.1007/bf00384344 (1993).
- 28 Yabuuchi, H. *et al.* Hepatic sinusoidal membrane transport of anionic drugs mediated by anion transporter Npt1. *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 1391-1396 (1998).
- 29 Devés, R. & Boyd, C. A. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* **78**, 487-545, doi:10.1152/physrev.1998.78.2.487 (1998).
- 30 Jungas, R. L., Halperin, M. L. & Brosnan, J. T. Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans. *Physiol Rev* **72**, 419-448, doi:10.1152/physrev.1992.72.2.419 (1992).
- 31 Leturque, A., Brot-Laroche, E. & Le Gall, M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E985-992, doi:10.1152/ajpendo.00004.2009 (2009).
- 32 Agius, L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* **414**, 1-18, doi:10.1042/BJ20080595 (2008).
- 33 Chu, C. A. *et al.* Rapid translocation of hepatic glucokinase in response to intraduodenal glucose infusion and changes in plasma glucose and insulin in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G627-634, doi:10.1152/ajpgi.00218.2003 (2004).
- 34 Roach, P. J. Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med* **2**, 101-120, doi:10.2174/1566524024605761 (2002).
- 35 Lehninger. *Principios de bioquímica*. 6<sup>th</sup> edn, 521-559 (Ediciones Omega, S. A., 2014).
- 36 Rui, L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* **4**, 177-197, doi:10.1002/cphy.c130024 (2014).
- 37 McKee, T. & McKee, J. R. *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*. 5<sup>th</sup> edn, (McGRAW-HILL, 2014).
- 38 Raddatz, D. & Ramadori, G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol* **45**, 51-62, doi:10.1055/s-2006-927394 (2007).
- 39 Merkel, M., Eckel, R. H. & Goldberg, I. J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* **43**, 1997-2006, doi:10.1194/jlr.r200015-jlr200 (2002).
- 40 Coleman, R. A. & Lee, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* **43**, 134-176, doi:10.1016/s0163-7827(03)00051-1 (2004).
- 41 Postic, C. & Girard, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* **34**, 643-648, doi:10.1016/S1262-3636(08)74599-3 (2008).
- 42 Ge, F., Zhou, S., Hu, C., Lobdell, H. t. & Berk, P. D. Insulin- and leptin-regulated fatty acid uptake plays a key causal role in hepatic steatosis in mice with intact leptin

- signaling but not in ob/ob or db/db mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**, G855-866, doi:10.1152/ajpgi.00434.2009 (2010).
- 43 Falcon, A. *et al.* FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E384-393, doi:10.1152/ajpendo.00226.2010 (2010).
- 44 Doege, H. *et al.* Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* **130**, 1245-1258, doi:10.1053/j.gastro.2006.02.006 (2006).
- 45 McGarry, J. D. & Brown, N. F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* **244**, 1-14, doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00001.x (1997).
- 46 Nguyen, P. *et al.* Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **92**, 272-283, doi:10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x (2008).
- 47 Fausto, N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl* **7**, 835-844, doi:10.1053/jlts.2001.27865 (2001).
- 48 Higgins, G. M. & Anderson, R. M. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **12**, 186-202 (1931).
- 49 Michalopoulos, G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* **176**, 2-13, doi:10.2353/ajpath.2010.090675 (2010).
- 50 Taub, R., Greenbaum, L. E. & Peng, Y. Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration. *Semin Liver Dis* **19**, 117-127, doi:10.1055/s-2007-1007104 (1999).
- 51 Sakamoto, T. *et al.* Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* **29**, 403-411, doi:10.1002/hep.510290244 (1999).
- 52 Heinrich, P. C. *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**, 1-20, doi:10.1042/BJ20030407 (2003).
- 53 Talarmin, H. *et al.* The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol Cell Biol* **19**, 6003-6011, doi:10.1128/mcb.19.9.6003 (1999).
- 54 Aldeguer, X. *et al.* Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology* **35**, 40-48, doi:10.1053/jhep.2002.30081 (2002).
- 55 Uehara, Y. *et al.* Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* **373**, 702-705, doi:10.1038/373702a0 (1995).
- 56 Burr, A. W., Toole, K., Chapman, C., Hines, J. E. & Burt, A. D. Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J Pathol* **185**, 298-302, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199807)185:3<298::AID-PATH88>3.0.CO;2-B (1998).
- 57 Currier, A. R. *et al.* Plasminogen directs the pleiotropic effects of uPA in liver injury and repair. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G508-515, doi:10.1152/ajpgi.00336.2002 (2003).
- 58 Huh, C. G. *et al.* Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4477-4482, doi:10.1073/pnas.0306068101 (2004).
- 59 Tomiya, T. *et al.* The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor-alpha. *Am J Pathol* **157**, 1693-1701, doi:10.1016/s0002-9440(10)64806-7 (2000).
- 60 Sibilia, M. & Wagner, E. F. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* **269**, 234-238, doi:10.1126/science.7618085 (1995).

- 61 Natarajan, A., Wagner, B. & Sibia, M. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17081-17086, doi:10.1073/pnas.0704126104 (2007).
- 62 Fausto, N., Campbell, J. S. & Riehle, K. J. Liver regeneration. *J Hepatol* **57**, 692-694, doi:10.1016/j.jhep.2012.04.016 (2012).
- 63 Weglarz, T. C. & Sandgren, E. P. Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12595-12600, doi:10.1073/pnas.220430497 (2000).
- 64 Campbell, J. S. *et al.* Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin Invest* **107**, 1285-1292, doi:10.1172/JCI11867 (2001).
- 65 Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-584, doi:10.1038/nature02006 (2003).
- 66 Macias-Silva, M., Li, W., Leu, J. I., Crissey, M. A. & Taub, R. Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *J Biol Chem* **277**, 28483-28490, doi:10.1074/jbc.M202403200 (2002).
- 67 Huang, J. & Rudnick, D. A. Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration. *Am J Pathol* **184**, 309-321, doi:10.1016/j.ajpath.2013.04.034 (2014).
- 68 Rudnick, D. A. & Davidson, N. O. Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *Int J Hepatol* **2012**, 549241, doi:10.1155/2012/549241 (2012).
- 69 Christensen, H. N., Rothwell, J. T. & *et al.* Association between rapid growth and elevated cell concentrations of amino acids; in regenerating liver after partial hepatectomy in the rat. *J Biol Chem* **175**, 101-105 (1948).
- 70 Fowler, F. C., Banks, R. K. & Mailliard, M. E. Characterization of sodium-dependent amino acid transport activity during liver regeneration. *Hepatology* **16**, 1187-1194 (1992).
- 71 Xu, C. S. & Chang, C. F. Expression profiles of the genes associated with metabolism and transport of amino acids and their derivatives in rat liver regeneration. *Amino Acids* **34**, 91-102, doi:10.1007/s00726-007-0576-2 (2008).
- 72 Michalopoulos, G. K. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J* **4**, 176-187 (1990).
- 73 Kilberg, M. S. Amino acid transport in isolated rat hepatocytes. *J Membr Biol* **69**, 1-12, doi:10.1007/bf01871236 (1982).
- 74 Mackenzie, B. & Erickson, J. D. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch* **447**, 784-795, doi:10.1007/s00424-003-1117-9 (2004).
- 75 Freeman, T. L., Ngo, H. Q. & Mailliard, M. E. Inhibition of system A amino acid transport and hepatocyte proliferation following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* **30**, 437-444, doi:10.1002/hep.510300212 (1999).
- 76 Le Cam, A., Rey, J. F., Fehlmann, M., Kitabgi, P. & Freychet, P. Amino acid transport in isolated hepatocytes after partial hepatectomy in the rat. *Am J Physiol* **236**, E594-602, doi:10.1152/ajpendo.1979.236.6.E594 (1979).
- 77 Hyde, R., Peyrollier, K. & Hundal, H. S. Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **277**, 13628-13634, doi:10.1074/jbc.M108609200 (2002).
- 78 Holecek, M. Three targets of branched-chain amino acid supplementation in the treatment of liver disease. *Nutrition* **26**, 482-490, doi:10.1016/j.nut.2009.06.027 (2010).
- 79 Mato, J. M. & Lu, S. C. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology* **45**, 1306-1312, doi:10.1002/hep.21650 (2007).
- 80 Chen, L. *et al.* Impaired liver regeneration in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB J* **18**, 914-916, doi:10.1096/fj.03-1204fje (2004).

- 81 Rudnick, D. A. *et al.* Serum alpha-NH-butyric acid may predict spontaneous survival in pediatric acute liver failure. *Pediatr Transplant* **13**, 223-230, doi:10.1111/j.1399-3046.2008.00998.x (2009).
- 82 Moffatt, B. A. & Ashihara, H. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book* **1**, e0018, doi:10.1199/tab.0018 (2002).
- 83 Hadley, B. *et al.* Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function. *Comput Struct Biotechnol J* **17**, 1123-1134, doi:10.1016/j.csbj.2019.08.002 (2019).
- 84 Gazit, V. *et al.* Liver regeneration is impaired in lipodystrophic fatty liver dystrophy mice. *Hepatology* **52**, 2109-2117, doi:10.1002/hep.23920 (2010).
- 85 Rosa, J. L., Bartrons, R. & Tauler, A. Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver. *Biochem J* **287 ( Pt 1)**, 113-116, doi:10.1042/bj2870113 (1992).
- 86 Caldez, M. J. *et al.* Metabolic Remodeling during Liver Regeneration. *Dev Cell* **47**, 425-438 e425, doi:10.1016/j.devcel.2018.09.020 (2018).
- 87 Murray, A. B., Strecker, W. & Silz, S. Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results. *J Cell Sci* **50**, 433-448 (1981).
- 88 Bucher, N. L. Insulin, glucagon, and the liver. *Adv Enzyme Regul* **15**, 221-230, doi:10.1016/0065-2571(77)90018-8 (1976).
- 89 Brinkmann, A., Katz, N., Sasse, D. & Jungermann, K. Increase of the gluconeogenic and decrease of the glycolytic capacity of rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **359**, 1561-1571, doi:10.1515/bchm2.1978.359.2.1561 (1978).
- 90 Puigserver, P. *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**, 550-555, doi:10.1038/nature01667 (2003).
- 91 Haber, B. A. *et al.* High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression reflect an adaptive response in proliferating liver and diabetes. *J Clin Invest* **95**, 832-841, doi:10.1172/JCI117733 (1995).
- 92 Fernandez, M. A. *et al.* Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* **313**, 1628-1632, doi:10.1126/science.1130773 (2006).
- 93 Weymann, A. *et al.* p21 is required for dextrose-mediated inhibition of mouse liver regeneration. *Hepatology* **50**, 207-215, doi:10.1002/hep.22979 (2009).
- 94 Klingensmith, J. S. & Mehendale, H. M. Chlordecone-induced fat depletion in the male rat. *J Toxicol Environ Health* **10**, 121-129, doi:10.1080/15287398209530236 (1982).
- 95 Gove, C. D. & Hems, D. A. Fatty acid synthesis in the regenerating liver of the rat. *Biochem J* **170**, 1-8, doi:10.1042/bj1700001 (1978).
- 96 Shteyer, E., Liao, Y., Muglia, L. J., Hruz, P. W. & Rudnick, D. A. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology* **40**, 1322-1332, doi:10.1002/hep.20462 (2004).
- 97 Yamauchi, H., Uetsuka, K., Okada, T., Nakayama, H. & Doi, K. Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice. *Exp Toxicol Pathol* **54**, 281-286, doi:10.1078/0940-2993-00265 (2003).
- 98 Zhang, B. H., Weltman, M. & Farrell, G. C. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* **14**, 133-137, doi:10.1046/j.1440-1746.1999.01822.x (1999).
- 99 Sydor, S. *et al.* Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy. *Lab Invest* **93**, 20-30, doi:10.1038/labinvest.2012.142 (2013).
- 100 Huang, W. *et al.* Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* **312**, 233-236, doi:10.1126/science.1121435 (2006).
- 101 Jacinto, E. *et al.* SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **127**, 125-137, doi:10.1016/j.cell.2006.08.033 (2006).

- 102 Haeusler, R. A., Kaestner, K. H. & Accili, D. FoxOs function synergistically to promote glucose production. *J Biol Chem* **285**, 35245-35248, doi:10.1074/jbc.C110.175851 (2010).
- 103 White, M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E413-422, doi:10.1152/ajpendo.00514.2001 (2002).
- 104 Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789, doi:10.1038/378785a0 (1995).
- 105 Li, X., Monks, B., Ge, Q. & Birnbaum, M. J. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 $\alpha$  transcription coactivator. *Nature* **447**, 1012-1016, doi:10.1038/nature05861 (2007).
- 106 Zhang, T. *et al.* Acetylation negatively regulates glycogen phosphorylase by recruiting protein phosphatase 1. *Cell Metab* **15**, 75-87, doi:10.1016/j.cmet.2011.12.005 (2012).
- 107 Kotoulas, O. B., Kalamidas, S. A. & Kondomerkos, D. J. Glycogen autophagy. *Microsc Res Tech* **64**, 10-20, doi:10.1002/jemt.20046 (2004).
- 108 Wu, Z. *et al.* MAPK phosphatase-3 promotes hepatic gluconeogenesis through dephosphorylation of forkhead box O1 in mice. *J Clin Invest* **120**, 3901-3911, doi:10.1172/JCI43250 (2010).
- 109 Sekine, K. *et al.* Foxo1 links insulin signaling to C/EBP $\alpha$  and regulates gluconeogenesis during liver development. *EMBO J* **26**, 3607-3615, doi:10.1038/sj.emboj.7601784 (2007).
- 110 Jiang, G. & Zhang, B. B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E671-678, doi:10.1152/ajpendo.00492.2002 (2003).
- 111 Jelinek, L. J. *et al.* Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* **259**, 1614-1616, doi:10.1126/science.8384375 (1993).
- 112 Herzig, S. *et al.* CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 179-183, doi:10.1038/35093131 (2001).
- 113 Zhang, Z., Zander, C. B. & Grewer, C. The C-terminal domain of the neutral amino acid transporter SNAT2 regulates transport activity through voltage-dependent processes. *Biochem J* **434**, 287-296, doi:10.1042/BJ20100507 (2011).
- 114 Shi, Q., Padmanabhan, R., Villegas, C. J., Gu, S. & Jiang, J. X. Membrane topological structure of neutral system N/A amino acid transporter 4 (SNAT4) protein. *J Biol Chem* **286**, 38086-38094, doi:10.1074/jbc.M111.220277 (2011).
- 115 Boulland, J. L., Rafiki, A., Levy, L. M., Storm-Mathisen, J. & Chaudhry, F. A. Highly differential expression of SN1, a bidirectional glutamine transporter, in astroglia and endothelium in the developing rat brain. *Glia* **41**, 260-275, doi:10.1002/glia.10188 (2003).
- 116 Boulland, J. L. *et al.* Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *Eur J Neurosci* **15**, 1615-1631, doi:10.1046/j.1460-9568.2002.01995.x (2002).
- 117 Umopathy, N. S. *et al.* Expression and function of system N glutamine transporters (SN1/SN2 or SNAT3/SNAT5) in retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 5151-5160, doi:10.1167/iovs.08-2245 (2008).
- 118 Umopathy, N. S., Li, W., Mysona, B. A., Smith, S. B. & Ganapathy, V. Expression and function of glutamine transporters SN1 (SNAT3) and SN2 (SNAT5) in retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 3980-3987, doi:10.1167/iovs.05-0488 (2005).
- 119 Yoshioka, C. *et al.* Expression and role of SNAT3 in the placenta. *Placenta* **30**, 1071-1077, doi:10.1016/j.placenta.2009.09.009 (2009).
- 120 Busque, S. M. & Wagner, C. A. Potassium restriction, high protein intake, and metabolic acidosis increase expression of the glutamine transporter SNAT3 (Slc38a3) in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **297**, F440-450, doi:10.1152/ajprenal.90318.2008 (2009).

- 121 Balkrishna, S., Broer, A., Kingsland, A. & Broer, S. Rapid downregulation of the rat glutamine transporter SNAT3 by a caveolin-dependent trafficking mechanism in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C1047-1057, doi:10.1152/ajpcell.00209.2010 (2010).
- 122 Hatanaka, T. *et al.* Evidence for the transport of neutral as well as cationic amino acids by ATA3, a novel and liver-specific subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta* **1510**, 10-17, doi:10.1016/s0005-2736(00)00390-4 (2001).
- 123 Desforges, M. *et al.* SNAT4 isoform of system A amino acid transporter is expressed in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C305-312, doi:10.1152/ajpcell.00258.2005 (2006).
- 124 Desforges, M. *et al.* The SNAT4 isoform of the system A amino acid transporter is functional in human placental microvillous plasma membrane. *J Physiol* **587**, 61-72, doi:10.1113/jphysiol.2008.161331 (2009).
- 125 Matoba, S. *et al.* Paternal knockout of Slc38a4/SNAT4 causes placental hypoplasia associated with intrauterine growth restriction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 21047-21053, doi:10.1073/pnas.1907884116 (2019).
- 126 Singh, S., Arthur, S. & Sundaram, U. Unique regulation of Na-glutamine cotransporter SN2/SNAT5 in rabbit intestinal crypt cells during chronic enteritis. *J Cell Mol Med* **22**, 1443-1451, doi:10.1111/jcmm.13257 (2018).
- 127 Cubelos, B., Gonzalez-Gonzalez, I. M., Gimenez, C. & Zafra, F. Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia* **49**, 230-244, doi:10.1002/glia.20106 (2005).
- 128 Baird, F. E. *et al.* Bidirectional substrate fluxes through the system N (SNAT5) glutamine transporter may determine net glutamine flux in rat liver. *J Physiol* **559**, 367-381, doi:10.1113/jphysiol.2003.060293 (2004).
- 129 Nakanishi, T. *et al.* Structure, function, and tissue expression pattern of human SN2, a subtype of the amino acid transport system N. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 1343-1348, doi:10.1006/bbrc.2001.4504 (2001).
- 130 Kondoh, N. *et al.* Activation of a system A amino acid transporter, ATA1/SLC38A1, in human hepatocellular carcinoma and preneoplastic liver tissues. *Int J Oncol* **31**, 81-87 (2007).
- 131 Ruderisch, N., Virgintino, D., Makrides, V. & Verrey, F. Differential axial localization along the mouse brain vascular tree of luminal sodium-dependent glutamine transporters Snat1 and Snat3. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**, 1637-1647, doi:10.1038/jcbfm.2011.21 (2011).
- 132 Hatanaka, T., Hatanaka, Y., Tsuchida, J., Ganapathy, V. & Setou, M. Amino acid transporter ATA2 is stored at the trans-Golgi network and released by insulin stimulus in adipocytes. *J Biol Chem* **281**, 39273-39284, doi:10.1074/jbc.M604534200 (2006).
- 133 Gu, S., Langlais, P., Liu, F. & Jiang, J. X. Mouse system-N amino acid transporter, mNAT3, expressed in hepatocytes and regulated by insulin-activated and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling. *Biochem J* **371**, 721-731, doi:10.1042/BJ20030049 (2003).
- 134 Kondou, H. *et al.* Sodium-coupled neutral amino acid transporter 4 functions as a regulator of protein synthesis during liver development. *Hepatol Res* **43**, 1211-1223, doi:10.1111/hepr.12069 (2013).
- 135 Bagchi, S., Baomar, H. A., Al-Walal, S., Al-Sadi, S. & Fredriksson, R. Histological analysis of SLC38A6 (SNAT6) expression in mouse brain shows selective expression in excitatory neurons with high expression in the synapses. *PLoS One* **9**, e95438, doi:10.1371/journal.pone.0095438 (2014).
- 136 Verdon, Q. *et al.* SNAT7 is the primary lysosomal glutamine exporter required for extracellular protein-dependent growth of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E3602-E3611, doi:10.1073/pnas.1617066114 (2017).



- 137 Rebsamen, M. *et al.* SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature* **519**, 477-481, doi:10.1038/nature14107 (2015).
- 138 Wang, S. *et al.* Metabolism. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science* **347**, 188-194, doi:10.1126/science.1257132 (2015).
- 139 Tripathi, R., Hosseini, K., Arapi, V., Fredriksson, R. & Bagchi, S. SLC38A10 (SNAT10) is Located in ER and Golgi Compartments and Has a Role in Regulating Nascent Protein Synthesis. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20246265 (2019).
- 140 Kilberg, M. S., Han, H. P., Barber, E. F. & Chiles, T. C. Adaptive regulation of neutral amino acid transport System A in rat H4 hepatoma cells. *J Cell Physiol* **122**, 290-298, doi:10.1002/jcp.1041220219 (1985).
- 141 Saier, M. H., Jr., Daniels, G. A., Boerner, P. & Lin, J. Neutral amino acid transport systems in animal cells: potential targets of oncogene action and regulators of cellular growth. *J Membr Biol* **104**, 1-20, doi:10.1007/bf01871898 (1988).
- 142 Christensen, H. N. The distribution of amino acids between cellular and extracellular fluids; relation to growth. *Bull New Engl Med Cent* **10**, 108-111 (1948).
- 143 Kilberg, M. S., Handlogten, M. E. & Christensen, H. N. Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. *J Biol Chem* **255**, 4011-4019 (1980).
- 144 Bak, L. K., Schousboe, A. & Waagepetersen, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* **98**, 641-653, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x (2006).
- 145 Bröer, S. & Brookes, N. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem* **77**, 705-719, doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00322.x (2001).
- 146 Felig, P. The glucose-alanine cycle. *Metabolism* **22**, 179-207, doi:10.1016/0026-0495(73)90269-2 (1973).
- 147 Bain, P. J. *et al.* The mechanism for transcriptional activation of the human ATA2 transporter gene by amino acid deprivation is different than that for asparagine synthetase. *J Nutr* **132**, 3023-3029, doi:10.1093/jn/131.10.3023 (2002).
- 148 Varoqui, H. & Erickson, J. D. Selective up-regulation of system a transporter mRNA in diabetic liver. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 903-908, doi:10.1006/bbrc.2001.6281 (2002).
- 149 Chaudhry, F. A. *et al.* Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system a transporters. *J Neurosci* **22**, 62-72 (2002).
- 150 Armano, S. *et al.* Localization and functional relevance of system a neutral amino acid transporters in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* **277**, 10467-10473, doi:10.1074/jbc.M110942200 (2002).
- 151 Mackenzie, B. *et al.* Functional properties and cellular distribution of the system A glutamine transporter SNAT1 support specialized roles in central neurons. *J Biol Chem* **278**, 23720-23730, doi:10.1074/jbc.M212718200 (2003).
- 152 Burkhalter, J., Fiumelli, H., Erickson, J. D. & Martin, J. L. A critical role for system A amino acid transport in the regulation of dendritic development by brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Biol Chem* **282**, 5152-5159, doi:10.1074/jbc.M608548200 (2007).
- 153 Gerke, V. & Moss, S. E. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82**, 331-371, doi:10.1152/physrev.00030.2001 (2002).
- 154 Morgan, R. O. & Fernández, M. P. Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. *Cell Mol Life Sci* **53**, 508-515, doi:10.1007/s000180050064 (1997).
- 155 Morgan, R. O. *et al.* Novel human and mouse annexin A10 are linked to the genome duplications during early chordate evolution. *Genomics* **60**, 40-49, doi:10.1006/geno.1999.5895 (1999).

- 156 Blackwood, R. A. & Ernst, J. D. Characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *Biochem J* **266**, 195-200, doi:10.1042/bj2660195 (1990).
- 157 Gerke, V., Creutz, C. E. & Moss, S. E. Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 449-461, doi:10.1038/nrm1661 (2005).
- 158 Liemann, S. & Lewit-Bentley, A. Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure* **3**, 233-237, doi:10.1016/s0969-2126(01)00152-6 (1995).
- 159 Rescher, U. & Gerke, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* **117**, 2631-2639, doi:10.1242/jcs.01245 (2004).
- 160 Enrich, C. *et al.* Annexin A6-Linking Ca<sup>2+</sup> signaling with cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 935-947, doi:10.1016/j.bbamcr.2010.09.015 (2011).
- 161 Moss, S. E. & Morgan, R. O. The annexins. *Genome Biol* **5**, 219, doi:10.1186/gb-2004-5-4-219 (2004).
- 162 Hoque, M. *et al.* Annexins - scaffolds modulating PKC localization and signaling. *Cell Signal* **26**, 1213-1225, doi:10.1016/j.cellsig.2014.02.012 (2014).
- 163 Gerke, V. & Moss, S. E. Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1357**, 129-154, doi:10.1016/s0167-4889(97)00038-4 (1997).
- 164 Solito, E., Nuti, S. & Parente, L. Dexamethasone-induced translocation of lipocortin (annexin) 1 to the cell membrane of U-937 cells. *Br J Pharmacol* **112**, 347-348, doi:10.1111/j.1476-5381.1994.tb13075.x (1994).
- 165 Eberhard, D. A., Karns, L. R., VandenBerg, S. R. & Creutz, C. E. Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci* **114**, 3155-3166 (2001).
- 166 Tomas, A. & Moss, S. E. Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope. *J Biol Chem* **278**, 20210-20216, doi:10.1074/jbc.M212669200 (2003).
- 167 Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P. & Simons, K. Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J Cell Biol* **142**, 1413-1427, doi:10.1083/jcb.142.6.1413 (1998).
- 168 Babiychuk, E. B. & Draeger, A. Annexins in cell membrane dynamics. Ca<sup>2+</sup>-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* **150**, 1113-1124, doi:10.1083/jcb.150.5.1113 (2000).
- 169 Babiychuk, E. B., Palstra, R. J., Schaller, J., Kampfer, U. & Draeger, A. Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells. *J Biol Chem* **274**, 35191-35195, doi:10.1074/jbc.274.49.35191 (1999).
- 170 Rentero, C. *et al.* Inhibition of H-Ras and MAPK is compensated by PKC-dependent pathways in annexin A6 expressing cells. *Cell Signal* **18**, 1006-1016, doi:10.1016/j.cellsig.2005.08.008 (2006).
- 171 Koese, M. *et al.* Annexin A6 is a scaffold for PKC $\alpha$  to promote EGFR inactivation. *Oncogene* **32**, 2858-2872, doi:10.1038/onc.2012.303 (2013).
- 172 Vilá de Muga, S. *et al.* Annexin A6 inhibits Ras signalling in breast cancer cells. *Oncogene* **28**, 363-377, doi:10.1038/onc.2008.386 (2009).
- 173 de Diego, I. *et al.* Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J Biol Chem* **277**, 32187-32194, doi:10.1074/jbc.M205499200 (2002).
- 174 Lecat, S. *et al.* Different properties of two isoforms of annexin XIII in MDCK cells. *J Cell Sci* **113 ( Pt 14)**, 2607-2618 (2000).
- 175 Solito, E. *et al.* A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J* **17**, 1544-1546, doi:10.1096/fj.02-0941fje (2003).

- 176 White, I. J., Bailey, L. M., Aghakhani, M. R., Moss, S. E. & Futter, C. E. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *EMBO J* **25**, 1-12, doi:10.1038/sj.emboj.7600759 (2006).
- 177 Perretti, M. & D'Acquisto, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* **9**, 62-70, doi:10.1038/nri2470 (2009).
- 178 Manai, M. *et al.* Overexpression of Annexin A1 Is an Independent Predictor of Longer Overall Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *In Vivo* **34**, 177-184, doi:10.21873/invivo.11759 (2020).
- 179 Hayes, M. J. *et al.* Annexin A2 at the interface between F-actin and membranes enriched in phosphatidylinositol 4,5,-bisphosphate. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1086-1095, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.007 (2009).
- 180 Dassah, M., Deora, A. B., He, K. & Hajjar, K. A. The endothelial cell annexin A2 system and vascular fibrinolysis. *Gen Physiol Biophys* **28 Spec No Focus**, F20-28 (2009).
- 181 Flood, E. C. & Hajjar, K. A. The annexin A2 system and vascular homeostasis. *Vascul Pharmacol* **54**, 59-67, doi:10.1016/j.vph.2011.03.003 (2011).
- 182 Bharadwaj, A., Bydoun, M., Holloway, R. & Waisman, D. Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* **14**, 6259-6305, doi:10.3390/ijms14036259 (2013).
- 183 Hayes, M. J., Rescher, U., Gerke, V. & Moss, S. E. Annexin-actin interactions. *Traffic* **5**, 571-576, doi:10.1111/j.1600-0854.2004.00210.x (2004).
- 184 Christensen, M. V. *et al.* Annexin A2 and S100A10 as Candidate Prognostic Markers in Epithelial Ovarian Cancer. *Anticancer Res* **39**, 2475-2482, doi:10.21873/anticancer.13367 (2019).
- 185 Wu, N., Liu, S., Guo, C., Hou, Z. & Sun, M. Z. The role of annexin A3 playing in cancers. *Clin Transl Oncol* **15**, 106-110, doi:10.1007/s12094-012-0928-6 (2013).
- 186 Harashima, M. *et al.* Annexin A3 expression increases in hepatocytes and is regulated by hepatocyte growth factor in rat liver regeneration. *J Biochem* **143**, 537-545, doi:10.1093/jb/mvm248 (2008).
- 187 Huang, K. *et al.* Annexin A3 is necessary for parallel artery-vein alignment in the mouse retina. *Dev Dyn*, doi:10.1002/dvdy.154 (2020).
- 188 Boye, T. L. *et al.* Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair. *Nat Commun* **8**, 1623, doi:10.1038/s41467-017-01743-6 (2017).
- 189 Jiang, K., Tang, Z., Li, J., Wang, F. & Tang, N. Anxa4 mediated airway progenitor cell migration promotes distal epithelial cell fate specification. *Sci Rep* **8**, 14344, doi:10.1038/s41598-018-32494-z (2018).
- 190 Rand, J. H. Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* **15**, 107-111, doi:10.1006/jaut.2000.0410 (2000).
- 191 Lin, Y. C., Chipot, C. & Scheuring, S. Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition. *Nat Commun* **11**, 230, doi:10.1038/s41467-019-14045-w (2020).
- 192 Yu, C., Munoz, L. E., Mallavarapu, M., Herrmann, M. & Finnemann, S. C. Annexin A5 regulates surface alphavbeta5 integrin for retinal clearance phagocytosis. *J Cell Sci* **132**, doi:10.1242/jcs.232439 (2019).
- 193 Hosoya, H., Kobayashi, R., Tsukita, S. & Matsumura, F. Ca(2+)-regulated actin and phospholipid binding protein (68 kD-protein) from bovine liver: identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization. *Cell Motil Cytoskeleton* **22**, 200-210, doi:10.1002/cm.970220307 (1992).
- 194 Grewal, T. *et al.* Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. *J Biol Chem* **275**, 33806-33813, doi:10.1074/jbc.M002662200 (2000).
- 195 Takagi, H., Asano, Y., Yamakawa, N., Matsumoto, I. & Kimata, K. Annexin 6 is a putative cell surface receptor for chondroitin sulfate chains. *J Cell Sci* **115**, 3309-3318 (2002).

- 196 Meneses-Salas, E. *et al.* Annexin A6 modulates TBC1D15/Rab7/StARD3 axis to control  
endosomal cholesterol export in NPC1 cells. *Cell Mol Life Sci*, doi:10.1007/s00018-019-  
03330-y (2019).
- 197 Grewal, T. *et al.* Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to  
modulate Ras and Raf-1 activity. *Oncogene* **24**, 5809-5820,  
doi:10.1038/sj.onc.1208743 (2005).
- 198 Guo, C., Liu, S., Greenaway, F. & Sun, M. Z. Potential role of annexin A7 in cancers. *Clin  
Chim Acta* **423**, 83-89, doi:10.1016/j.cca.2013.04.018 (2013).
- 199 Ye, W. *et al.* Effect of annexin A7 suppression on the apoptosis of gastric cancer cells.  
*Mol Cell Biochem* **429**, 33-43, doi:10.1007/s11010-016-2934-4 (2017).
- 200 S nder, S. L. *et al.* Annexin A7 is required for ESCRT III-mediated plasma membrane  
repair. *Sci Rep* **9**, 6726, doi:10.1038/s41598-019-43143-4 (2019).
- 201 Goebeler, V., Ruhe, D., Gerke, V. & Rescher, U. Annexin A8 displays unique  
phospholipid and F-actin binding properties. *FEBS Lett* **580**, 2430-2434,  
doi:10.1016/j.febslet.2006.03.076 (2006).
- 202 Goebeler, V., Poeter, M., Zeuschner, D., Gerke, V. & Rescher, U. Annexin A8 regulates  
late endosome organization and function. *Mol Biol Cell* **19**, 5267-5278,  
doi:10.1091/mbc.E08-04-0383 (2008).
- 203 Goebeler, V., Ruhe, D., Gerke, V. & Rescher, U. Atypical properties displayed by  
annexin A9, a novel member of the annexin family of Ca(2+) and lipid binding proteins.  
*FEBS Lett* **546**, 359-364, doi:10.1016/s0014-5793(03)00634-3 (2003).
- 204 Yu, S., Bian, H., Gao, X. & Gui, L. Annexin A9 promotes invasion and metastasis of  
colorectal cancer and predicts poor prognosis. *Int J Mol Med* **41**, 2185-2192,  
doi:10.3892/ijmm.2018.3432 (2018).
- 205 Mussunoor, S. & Murray, G. I. The role of annexins in tumour development and  
progression. *J Pathol* **216**, 131-140, doi:10.1002/path.2400 (2008).
- 206 Kim, J. K. *et al.* Decreased expression of annexin A10 in gastric cancer and its  
overexpression in tumor cell growth suppression. *Oncol Rep* **24**, 607-612 (2010).
- 207 Tomas, A., Futter, C. & Moss, S. E. Annexin 11 is required for midbody formation and  
completion of the terminal phase of cytokinesis. *J Cell Biol* **165**, 813-822,  
doi:10.1083/jcb.200311054 (2004).
- 208 Hayes, M. J. & Moss, S. E. Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun* **322**,  
1166-1170, doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.124 (2004).
- 209 Menell, J. S. *et al.* Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J  
Med* **340**, 994-1004, doi:10.1056/NEJM199904013401303 (1999).
- 210 Rand, J. H. The annexinopathies: a new category of diseases. *Biochim Biophys Acta*  
**1498**, 169-173, doi:10.1016/s0167-4889(00)00093-8 (2000).
- 211 Srivastava, M. *et al.* Defects in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, Ca(2+)  
signaling, and insulin secretion in the anx7(+/-) knockout mouse. *Proc Natl Acad Sci U S  
A* **96**, 13783-13788, doi:10.1073/pnas.96.24.13783 (1999).
- 212 Grewal, T., Wason, S. J., Enrich, C. & Rentero, C. Annexins - insights from knockout  
mice. *Biol Chem* **397**, 1031-1053, doi:10.1515/hsz-2016-0168 (2016).
- 213 Hannon, R. *et al.* Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-  
/- mouse. *FASEB J* **17**, 253-255, doi:10.1096/fj.02-0239fje (2003).
- 214 Ling, Q. *et al.* Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J  
Clin Invest* **113**, 38-48, doi:10.1172/JCI19684 (2004).
- 215 Heinick, A. *et al.* Annexin A4 is a novel direct regulator of adenylyl cyclase type 5.  
*FASEB J* **29**, 3773-3787, doi:10.1096/fj.14-269837 (2015).
- 216 Brachvogel, B. *et al.* Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol*  
**23**, 2907-2913, doi:10.1128/mcb.23.8.2907-2913.2003 (2003).
- 217 Ueki, H. *et al.* Loss of maternal annexin A5 increases the likelihood of placental platelet  
thrombosis and foetal loss. *Sci Rep* **2**, 827, doi:10.1038/srep00827 (2012).

- 218 Benz, J. *et al.* The structure of recombinant human annexin VI in crystals and  
membrane-bound. *J Mol Biol* **260**, 638-643, doi:10.1006/jmbi.1996.0426 (1996).
- 219 Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Romisch, J. & Paques, E. P. The calcium binding sites  
in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for  
membrane binding and calcium channel activity. *FEBS Lett* **275**, 15-21,  
doi:10.1016/0014-5793(90)81428-q (1990).
- 220 Moss, S. E. & Crumpton, M. J. Alternative splicing gives rise to two forms of the p68  
Ca<sup>2+</sup>(+)-binding protein. *FEBS Lett* **261**, 299-302, doi:10.1016/0014-5793(90)80576-5  
(1990).
- 221 Kawasaki, H., Avila-Sakar, A., Creutz, C. E. & Kretsinger, R. H. The crystal structure of  
annexin VI indicates relative rotation of the two lobes upon membrane binding.  
*Biochim Biophys Acta* **1313**, 277-282, doi:10.1016/0167-4889(96)00100-0 (1996).
- 222 Clark, D. M., Moss, S. E., Wright, N. A. & Crumpton, M. J. Expression of annexin VI (p68,  
67 kDa-callectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in  
B- and T-lymphocytes. *Histochemistry* **96**, 405-412, doi:10.1007/bf00315998 (1991).
- 223 Tagoe, C. E., Boustead, C. M., Higgins, S. J. & Walker, J. H. Characterization and  
immunolocalization of rat liver annexin VI. *Biochim Biophys Acta* **1192**, 272-280,  
doi:10.1016/0005-2736(94)90128-7 (1994).
- 224 Ayala-Sanmartin, J. Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of  
annexins by their core domain. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 72-79,  
doi:10.1006/bbrc.2001.4748 (2001).
- 225 Jäckle, S. *et al.* Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes. *J Biol Chem*  
**269**, 1026-1032 (1994).
- 226 Chang, T. Y., Chang, C. C., Ohgami, N. & Yamauchi, Y. Cholesterol sensing, trafficking,  
and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 129-157,  
doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656 (2006).
- 227 Cubells, L. *et al.* Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin  
export from the Golgi complex. *Traffic* **8**, 1568-1589, doi:10.1111/j.1600-  
0854.2007.00640.x (2007).
- 228 Südhof, T. C. & Rothman, J. E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM  
proteins. *Science* **323**, 474-477, doi:10.1126/science.1161748 (2009).
- 229 Bennett, M. K. *et al.* The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* **74**, 863-  
873, doi:10.1016/0092-8674(93)90466-4 (1993).
- 230 Reverter, M. *et al.* Cholesterol transport from late endosomes to the Golgi regulates t-  
SNARE trafficking, assembly, and function. *Mol Biol Cell* **22**, 4108-4123,  
doi:10.1091/mbc.E11-04-0332 (2011).
- 231 Reverter, M. *et al.* Cholesterol regulates Syntaxin 6 trafficking at trans-Golgi network  
endosomal boundaries. *Cell Rep* **7**, 883-897, doi:10.1016/j.celrep.2014.03.043 (2014).
- 232 Grewal, T. *et al.* Annexin A6-A multifunctional scaffold in cell motility. *Cell Adh Migr*  
**11**, 288-304, doi:10.1080/19336918.2016.1268318 (2017).
- 233 Álvarez-Guaita, A. *et al.* Evidence for annexin A6-dependent plasma membrane  
remodelling of lipid domains. *Br J Pharmacol* **172**, 1677-1690, doi:10.1111/bph.13022  
(2015).
- 234 Schmitz-Peiffer, C., Browne, C. L., Walker, J. H. & Biden, T. J. Activated protein kinase C  
alpha associates with annexin VI from skeletal muscle. *Biochem J* **330 ( Pt 2)**, 675-681,  
doi:10.1042/bj3300675 (1998).
- 235 Hunter, T., Ling, N. & Cooper, J. A. Protein kinase C phosphorylation of the EGF  
receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma  
membrane. *Nature* **311**, 480-483, doi:10.1038/311480a0 (1984).
- 236 Grewal, T. & Enrich, C. Molecular mechanisms involved in Ras inactivation: the annexin  
A6-p120GAP complex. *Bioessays* **28**, 1211-1220, doi:10.1002/bies.20503 (2006).
- 237 Davis, A. J., Butt, J. T., Walker, J. H., Moss, S. E. & Gawler, D. J. The Ca<sup>2+</sup>-dependent  
lipid binding domain of P120GAP mediates protein-protein interactions with Ca<sup>2+</sup>-

- dependent membrane-binding proteins. Evidence for a direct interaction between annexin VI and P120GAP. *J Biol Chem* **271**, 24333-24336, doi:10.1074/jbc.271.40.24333 (1996).
- 238 Chow, A. & Gawler, D. Mapping the site of interaction between annexin VI and the p120GAP C2 domain. *FEBS Lett* **460**, 166-172, doi:10.1016/s0014-5793(99)01336-8 (1999).
- 239 Wang, Z., Tung, P. S. & Moran, M. F. Association of p120 ras GAP with endocytic components and colocalization with epidermal growth factor (EGF) receptor in response to EGF stimulation. *Cell Growth Differ* **7**, 123-133 (1996).
- 240 Monastyrskaya, K. *et al.* Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca<sup>2+</sup> entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **284**, 17227-17242, doi:10.1074/jbc.M109.004457 (2009).
- 241 Hawkins, T. E., Roes, J., Rees, D., Monkhouse, J. & Moss, S. E. Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice. *Mol Cell Biol* **19**, 8028-8032, doi:10.1128/mcb.19.12.8028 (1999).
- 242 Gunteski-Hamblin, A. M. *et al.* Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function in transgenic mice. *Am J Physiol* **270**, H1091-1100, doi:10.1152/ajpheart.1996.270.3.H1091 (1996).
- 243 Cornely, R. *et al.* Annexin A6 regulates interleukin-2-mediated T-cell proliferation. *Immunol Cell Biol* **94**, 543-553, doi:10.1038/icb.2016.15 (2016).
- 244 Cairns, R. *et al.* Altered hepatic glucose homeostasis in AnxA6-KO mice fed a high-fat diet. *PLoS One* **13**, e0201310, doi:10.1371/journal.pone.0201310 (2018).
- 245 Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21, doi:10.1038/35036035 (2000).
- 246 Putney, J. W. *Membrane dynamics and calcium signaling*. Vol. 981 (Nature Spring, 2017).
- 247 Hoth, M. & Penner, R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**, 353-356, doi:10.1038/355353a0 (1992).
- 248 Putney, J. W. Forms and functions of store-operated calcium entry mediators, STIM and Orai. *Adv Biol Regul* **68**, 88-96, doi:10.1016/j.jbior.2017.11.006 (2018).
- 249 Izquierdo, J. H., Bonilla-Abadia, F., Canas, C. A. & Tobon, G. J. Calcium, channels, intracellular signaling and autoimmunity. *Reumatol Clin* **10**, 43-47, doi:10.1016/j.reuma.2013.05.008 (2014).
- 250 Roos, J. *et al.* STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* **169**, 435-445, doi:10.1083/jcb.200502019 (2005).
- 251 Liou, J. *et al.* STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* **15**, 1235-1241, doi:10.1016/j.cub.2005.05.055 (2005).
- 252 Feske, S. *et al.* A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179-185, doi:10.1038/nature04702 (2006).
- 253 Kilch, T. *et al.* Mutations of the Ca<sup>2+</sup>-sensing stromal interaction molecule STIM1 regulate Ca<sup>2+</sup> influx by altered oligomerization of STIM1 and by destabilization of the Ca<sup>2+</sup> channel Orai1. *J Biol Chem* **288**, 1653-1664, doi:10.1074/jbc.M112.417246 (2013).
- 254 Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C. R., Konig, S. & Bernheim, L. STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca<sup>2+</sup> release. *J Cell Biol* **194**, 335-346, doi:10.1083/jcb.201012157 (2011).
- 255 Prakriya, M. *et al.* Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* **443**, 230-233, doi:10.1038/nature05122 (2006).
- 256 Fukushima, M., Tomita, T., Janoshazi, A. & Putney, J. W. Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J Cell Sci* **125**, 4354-4361, doi:10.1242/jcs.104919 (2012).

- 257 Arruda, A. P. *et al.* Defective STIM-mediated store operated Ca(2+) entry in hepatocytes leads to metabolic dysfunction in obesity. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.29968 (2017).
- 258 Maus, M. *et al.* Store-Operated Ca(2+) Entry Controls Induction of Lipolysis and the Transcriptional Reprogramming to Lipid Metabolism. *Cell Metab* **25**, 698-712, doi:10.1016/j.cmet.2016.12.021 (2017).
- 259 Ali, E. S., Rychkov, G. Y. & Barritt, G. J. Metabolic Disorders and Cancer: Hepatocyte Store-Operated Ca(2+) Channels in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Adv Exp Med Biol* **993**, 595-621, doi:10.1007/978-3-319-57732-6\_30 (2017).
- 260 Jardin, I., Salido, G. M. & Rosado, J. A. Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1. *Channels (Austin)* **2**, 401-403, doi:10.4161/chan.2.6.7055 (2008).
- 261 Galan, C., Woodard, G. E., Dionisio, N., Salido, G. M. & Rosado, J. A. Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store-operated Ca(2+) entry. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 1083-1093, doi:10.1016/j.bbamcr.2010.06.006 (2010).
- 262 Bland, J. M. & Altman, D. G. The logrank test. *BMJ* **328**, 1073, doi:10.1136/bmj.328.7447.1073 (2004).
- 263 Fausto, N., Campbell, J. S. & Riehle, K. J. Liver regeneration. *Hepatology* **43**, S45-53, doi:10.1002/hep.20969 (2006).
- 264 Bruno, S. & Darzynkiewicz, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* **25**, 31-40, doi:10.1111/j.1365-2184.1992.tb01435.x (1992).
- 265 Hess, J., Angel, P. & Schorpp-Kistner, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* **117**, 5965-5973, doi:10.1242/jcs.01589 (2004).
- 266 Lew, D. J., Dulic, V. & Reed, S. I. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* **66**, 1197-1206, doi:10.1016/0092-8674(91)90042-w (1991).
- 267 Glinghammar, B. *et al.* Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int J Mol Med* **23**, 621-631, doi:10.3892/ijmm\_00000173 (2009).
- 268 Farrell, G. C. Probing Prometheus: fat fueling the fire? *Hepatology* **40**, 1252-1255, doi:10.1002/hep.20522 (2004).
- 269 Gazzola, R. F. *et al.* The adaptive regulation of amino acid transport system A is associated to changes in ATA2 expression. *FEBS Lett* **490**, 11-14, doi:10.1016/s0014-5793(01)02126-3 (2001).
- 270 Yamamoto, H., Aikawa, T., Matsutaka, H., Okuda, T. & Ishikawa, E. Interorganal relationships of amino acid metabolism in fed rats. *Am J Physiol* **226**, 1428-1433, doi:10.1152/ajplegacy.1974.226.6.1428 (1974).
- 271 Albert, V. & Hall, M. N. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr Opin Cell Biol* **33**, 55-66, doi:10.1016/j.ceb.2014.12.001 (2015).
- 272 Jewell, J. L., Russell, R. C. & Guan, K. L. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 133-139, doi:10.1038/nrm3522 (2013).
- 273 Dibble, C. C. & Manning, B. D. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat Cell Biol* **15**, 555-564, doi:10.1038/ncb2763 (2013).
- 274 Sengupta, S., Peterson, T. R., Laplante, M., Oh, S. & Sabatini, D. M. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* **468**, 1100-1104, doi:10.1038/nature09584 (2010).
- 275 Edwards, H. C. & Moss, S. E. Functional and genetic analysis of annexin VI. *Mol Cell Biochem* **149-150**, 293-299, doi:10.1007/bf01076591 (1995).
- 276 Turro, S. *et al.* Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: A novel membrane-associated protein that resides on hepatic lipid droplets. *Traffic* **7**, 1254-1269, doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00465.x (2006).

- 277 Cairns, R. *et al.* Role of hepatic Annexin A6 in fatty acid-induced lipid droplet  
formation. *Exp Cell Res* **358**, 397-410, doi:10.1016/j.yexcr.2017.07.015 (2017).
- 278 Wilson, C. H. *et al.* Steatosis inhibits liver cell store-operated Ca(2)(+) entry and  
reduces ER Ca(2)(+) through a protein kinase C-dependent mechanism. *Biochem J* **466**,  
379-390, doi:10.1042/BJ20140881 (2015).
- 279 Fleet, A. *et al.* Inhibition of EGF-dependent calcium influx by annexin VI is splice form-  
specific. *Biochem Biophys Res Commun* **260**, 540-546, doi:10.1006/bbrc.1999.0915  
(1999).
- 280 Lin-Moshier, Y. *et al.* The Two-pore channel (TPC) interactome unmasks isoform-  
specific roles for TPCs in endolysosomal morphology and cell pigmentation. *Proc Natl  
Acad Sci U S A* **111**, 13087-13092, doi:10.1073/pnas.1407004111 (2014).
- 281 Grewal, T., Koese, M., Rentero, C. & Enrich, C. Annexin A6-regulator of the EGFR/Ras  
signalling pathway and cholesterol homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 580-584,  
doi:10.1016/j.biocel.2009.12.020 (2010).
- 282 García-Melero, A. *et al.* Annexin A6 and Late Endosomal Cholesterol Modulate Integrin  
Recycling and Cell Migration. *J Biol Chem* **291**, 1320-1335,  
doi:10.1074/jbc.M115.683557 (2016).
- 283 Ortega, D., Pol, A., Biermer, M., Jackle, S. & Enrich, C. Annexin VI defines an apical  
endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *J Cell Sci* **111 ( Pt 2)**, 261-269 (1998).
- 284 O'Brien, T. & Woychik, R. Our small relative. *Nat Genet* **33**, 3-4, doi:10.1038/ng1069  
(2003).
- 285 Mouse Genome Sequencing, C. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of  
the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562, doi:10.1038/nature01262 (2002).
- 286 Coleman, D. L. & Hummel, K. P. The influence of genetic background on the expression  
of the obese (Ob) gene in the mouse. *Diabetologia* **9**, 287-293,  
doi:10.1007/bf01221856 (1973).
- 287 Champy, M. F. *et al.* Genetic background determines metabolic phenotypes in the  
mouse. *Mamm Genome* **19**, 318-331, doi:10.1007/s00335-008-9107-z (2008).
- 288 Fernandez-Rojo, M. A. *et al.* Caveolin-1 orchestrates the balance between glucose and  
lipid-dependent energy metabolism: implications for liver regeneration. *Hepatology*  
**55**, 1574-1584, doi:10.1002/hep.24810 (2012).
- 289 Fujita, J. *et al.* Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial  
hepatectomy in mice. *Surgery* **129**, 48-54, doi:10.1067/msy.2001.109120 (2001).
- 290 Ong, K. T., Mashek, M. T., Bu, S. Y., Greenberg, A. S. & Mashek, D. G. Adipose  
triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and  
fatty acid signaling and partitioning. *Hepatology* **53**, 116-126, doi:10.1002/hep.24006  
(2011).
- 291 Chlystun, M. *et al.* Regulation of mitochondrial morphogenesis by annexin A6. *PLoS  
One* **8**, e53774, doi:10.1371/journal.pone.0053774 (2013).
- 292 Padanad, M. S. *et al.* Fatty Acid Oxidation Mediated by Acyl-CoA Synthetase Long  
Chain 3 Is Required for Mutant KRAS Lung Tumorigenesis. *Cell Rep* **16**, 1614-1628,  
doi:10.1016/j.celrep.2016.07.009 (2016).
- 293 Nakatani, K. *et al.* Myocardial energy provision is preserved by increased utilization of  
glucose and ketone bodies in CD36 knockout mice. *Metabolism* **64**, 1165-1174,  
doi:10.1016/j.metabol.2015.05.017 (2015).
- 294 Anderson, W. R., Zieve, L. & Lindblad, S. Ultrastructural study of hepatic regeneration  
following one-lobe, two-lobe, and subtotal hepatectomy in the rat. *Exp Pathol* **38**, 61-  
72, doi:10.1016/s0232-1513(11)80200-8 (1990).
- 295 Hoffmann, T. M. *et al.* Effects of Sodium and Amino Acid Substrate Availability upon  
the Expression and Stability of the SNAT2 (SLC38A2) Amino Acid Transporter. *Front  
Pharmacol* **9**, 63, doi:10.3389/fphar.2018.00063 (2018).



- 296 Freeman, T. L. & Mailliard, M. E. Posttranscriptional regulation of ATA2 transport during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 729-732, doi:10.1006/bbrc.2000.3876 (2000).
- 297 Freeman, T. L., Thiele, G. M., Tuma, D. J., Machu, T. K. & Mailliard, M. E. ATA2-mediated amino acid uptake following partial hepatectomy is regulated by redistribution to the plasma membrane. *Arch Biochem Biophys* **400**, 215-222, doi:10.1016/S0003-9861(02)00006-1 (2002).
- 298 Hatanaka, T., Huang, W., Martindale, R. G. & Ganapathy, V. Differential influence of cAMP on the expression of the three subtypes (ATA1, ATA2, and ATA3) of the amino acid transport system A. *FEBS Lett* **505**, 317-320, doi:10.1016/s0014-5793(01)02848-4 (2001).
- 299 Novak, D., Quiggle, F. & Haafiz, A. Impact of forskolin and amino acid depletion upon System A activity and SNAT expression in BeWo cells. *Biochimie* **88**, 39-44, doi:10.1016/j.biochi.2005.07.002 (2006).
- 300 Wu, J., Cheng, D., Liu, L., Lv, Z. & Liu, K. TBC1D15 affects glucose uptake by regulating GLUT4 translocation. *Gene* **683**, 210-215, doi:10.1016/j.gene.2018.10.025 (2019).
- 301 Broer, A., Rahimi, F. & Broer, S. Deletion of Amino Acid Transporter ASCT2 (SLC1A5) Reveals an Essential Role for Transporters SNAT1 (SLC38A1) and SNAT2 (SLC38A2) to Sustain Glutaminolysis in Cancer Cells. *J Biol Chem* **291**, 13194-13205, doi:10.1074/jbc.M115.700534 (2016).
- 302 Kok, J. W., Babia, T. & Hoekstra, D. Sorting of sphingolipids in the endocytic pathway of HT29 cells. *J Cell Biol* **114**, 231-239, doi:10.1083/jcb.114.2.231 (1991).
- 303 Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687, doi:10.1016/s0092-8674(02)00971-6 (2002).
- 304 Takada, Y., Ye, X. & Simon, S. The integrins. *Genome Biol* **8**, 215, doi:10.1186/gb-2007-8-5-215 (2007).
- 305 McNally, K. E. *et al.* Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling. *Nat Cell Biol* **19**, 1214-1225, doi:10.1038/ncb3610 (2017).
- 306 Rabouille, C. Retriever fetches integrins from endosomes. *Nat Cell Biol* **19**, 1144-1146, doi:10.1038/ncb3612 (2017).
- 307 Scott, C. C., Vacca, F. & Gruenberg, J. Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol* **31**, 2-10, doi:10.1016/j.semcdb.2014.03.034 (2014).
- 308 Ding, L., Han, L., Dube, J. & Billadeau, D. D. WASH Regulates Glucose Homeostasis by Facilitating Glut2 Receptor Recycling in Pancreatic beta-Cells. *Diabetes* **68**, 377-386, doi:10.2337/db18-0189 (2019).
- 309 Zhang, X. & Wang, Y. Glycosylation Quality Control by the Golgi Structure. *J Mol Biol* **428**, 3183-3193, doi:10.1016/j.jmb.2016.02.030 (2016).
- 310 Burd, C. & Cullen, P. J. Retromer: a master conductor of endosome sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, doi:10.1101/cshperspect.a016774 (2014).
- 311 Urano, Y. *et al.* Transport of LDL-derived cholesterol from the NPC1 compartment to the ER involves the trans-Golgi network and the SNARE protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16513-16518, doi:10.1073/pnas.0807450105 (2008).
- 312 Alvarez-Guaita, A. *et al.* Evidence for annexin A6-dependent plasma membrane remodelling of lipid domains. *Br J Pharmacol* **172**, 1677-1690, doi:10.1111/bph.13022 (2015).
- 313 Michalopoulos, G. K. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr Physiol* **3**, 485-513, doi:10.1002/cphy.c120014 (2013).
- 314 Gilgenkrantz, H. & Collin de l'Hortet, A. Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine. *Am J Pathol* **188**, 1316-1327, doi:10.1016/j.ajpath.2018.03.008 (2018).
- 315 Häggglund, M. G. *et al.* Identification of SLC38A7 (SNAT7) protein as a glutamine transporter expressed in neurons. *J Biol Chem* **286**, 20500-20511, doi:10.1074/jbc.M110.162404 (2011).

- 316 Melone, M. *et al.* Localization of the glutamine transporter SNAT1 in rat cerebral cortex and neighboring structures, with a note on its localization in human cortex. *Cereb Cortex* **14**, 562-574, doi:10.1093/cercor/bhh018 (2004).
- 317 Gonzalez-Gonzalez, I. M., Cubelos, B., Gimenez, C. & Zafra, F. Immunohistochemical localization of the amino acid transporter SNAT2 in the rat brain. *Neuroscience* **130**, 61-73, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.023 (2005).
- 318 Ge, Y., Gu, Y., Wang, J. & Zhang, Z. Membrane topology of rat sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2). *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1860**, 1460-1469, doi:10.1016/j.bbamem.2018.04.005 (2018).
- 319 Mikros, E. & Diallinas, G. Tales of tails in transporters. *Open Biol* **9**, 190083, doi:10.1098/rsob.190083 (2019).
- 320 Hellsten, S. V., Hagglund, M. G., Eriksson, M. M. & Fredriksson, R. The neuronal and astrocytic protein SLC38A10 transports glutamine, glutamate, and aspartate, suggesting a role in neurotransmission. *FEBS Open Bio* **7**, 730-746, doi:10.1002/2211-5463.12219 (2017).
- 321 Soupene, E. & Kuypers, F. A. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp Biol Med (Maywood)* **233**, 507-521, doi:10.3181/0710-MR-287 (2008).
- 322 Diaz-Munoz, M., Hamilton, S. L., Kaetzel, M. A., Hazarika, P. & Dedman, J. R. Modulation of Ca<sup>2+</sup> release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedlin). *J Biol Chem* **265**, 15894-15899 (1990).
- 323 Song, G. *et al.* Altered mechanical properties and intracellular calcium signaling in cardiomyocytes from annexin 6 null-mutant mice. *FASEB J* **16**, 622-624, doi:10.1096/fj.01-0892fje (2002).
- 324 Freye-Minks, C., Kretsinger, R. H. & Creutz, C. E. Structural and dynamic changes in human annexin VI induced by a phosphorylation-mimicking mutation, T356D. *Biochemistry* **42**, 620-630, doi:10.1021/bi026742h (2003).
- 325 Orito, A. *et al.* Calcium-dependent association of annexin VI, protein kinase C alpha, and neurocalcin alpha on the raft fraction derived from the synaptic plasma membrane of rat brain. *J Neurosci Res* **64**, 235-241, doi:10.1002/jnr.1071 (2001).
- 326 Bosch, M. *et al.* Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr Biol* **21**, 681-686, doi:10.1016/j.cub.2011.03.030 (2011).
- 327 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 328 Bradford, M. M. 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, doi:10.1006/abio.1976.9999 (1976).
- 329 Zor, T. & Selinger, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* **236**, 302-308, doi:10.1006/abio.1996.0171 (1996).
- 330 Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-675, doi:10.1038/nmeth.2089 (2012).
- 331 Casado, M., Sierra, C., Batllori, M., Artuch, R. & Ormazabal, A. A targeted metabolomic procedure for amino acid analysis in different biological specimens by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Metabolomics* **14**, 76, doi:10.1007/s11306-018-1374-4 (2018).
- 332 Unzu, C. *et al.* Sustained enzymatic correction by rAAV-mediated liver gene therapy protects against induced motor neuropathy in acute porphyria mice. *Mol Ther* **19**, 243-250, doi:10.1038/mt.2010.210 (2011).
- 333 Hermens, W. T. *et al.* Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks

- for gene transfer in the nervous system. *Hum Gene Ther* **10**, 1885-1891, doi:10.1089/10430349950017563 (1999).
- 334 Nakai, H. *et al.* Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol* **79**, 214-224, doi:10.1128/JVI.79.1.214-224.2005 (2005).
- 335 Lin, J. S. & Lai, E. M. Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* **1615**, 211-219, doi:10.1007/978-1-4939-7033-9\_17 (2017).
- 336 Pol, A. & Enrich, C. Membrane transport in rat liver endocytic pathways: preparation, biochemical properties and functional roles of hepatic endosomes. *Electrophoresis* **18**, 2548-2557, doi:10.1002/elps.1150181410 (1997).

## ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Álvarez-Guaita, A.,\* **Blanco-Muñoz, P.**,\* Meneses-Salas, E., Wahba, M., Pollock, A., Jose, J., Casado, M., Bosch, M., Artuch, R., Gaus, K., Lu, A., Pol, A., Tebar, F., Moss, S. E., Grewal, T., Enrich, C., Rentero, C. Annexin A6 is critical to maintain glucose homeostasis and survival during liver regeneration. Accepted in **Hepatology**. February 2020. **\*These authors have contributed equally in this publication.**

Hoque, M., Elmaghrabi, Y., Koese, M., Beevi, S., Jose, J., Meneses-Salas, E., **Blanco-Muñoz, P.**, Conway, J., Swarbrick, A., Timpson, P., Tebar, F., Enrich, C., Rentero, C., Grewal, T. Annexin A6 improves anti-metastatic properties of tyrosine kinase inhibitors in EGFR overexpressing human squamous epithelial cells. **FEBS J.** 2019. doi: 10.1111/febs.15186.

Meneses-Salas, E.,\* García-Melero, A.,\* Kanerva, K., **Blanco-Muñoz, P.**, Morales-Paytuví, F., Bonjoch, J., Casas, J., Egert, A., Beevi, S. S., Jose, J., Llorente-Cortés, V., Rye, K. A., Heeren, J., Lu, A., Pol, A., Tebar, F., Ikonen, E., Grewal, T., Enrich, C., Rentero, C. Annexin A6 depletion restores late endosomal cholesterol export in NPC1 mutant cells. **Cell. Mol. Life Sci.** 2019. doi: 10.1007/s00018-019-03330-y.

Cairns, R.,\* Fischer, A. W.,\* **Blanco-Muñoz, P.**,\* Álvarez-Guaita, A., Meneses-Salas, E., Egert, A., Buechler, C., Hoy, A. J., Heeren, J., Enrich, C., Rentero, C., Grewal, T. Altered hepatic glucose homeostasis in AnxA6-KO mice fed a high-fat diet. **PLoS One** 2018, 13, 1310. **\*These authors have contributed equally in this publication.**

Rentero, C., **Blanco-Muñoz, P.**, Meneses-Salas, E., Grewal, T., Enrich, C. Annexins – Coordinators of Cholesterol Homeostasis in Endocytic Pathways. **Int. J. Mol. Sci.** 2018, 19, 1444.





