

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

NUEVAS DIANAS DE ACTUACIÓN DE LA PROTEÍNA
QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK)

MARÍA DEL CARMEN SOLAZ FUSTER

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 30 de Novembre de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Santiago Rodríguez de Córdoba
- D^a. Marta Casado Pinna
- D^a. M^a del Mar García Rocha
- D^a. Susana Rodríguez Navarro
- D. Francisco Estruch Ros

Va ser dirigida per:

D. Pascual Felipe Sanz Bigorra

D. José Vicente Gimeno Alcañiz

©Copyright: Servei de Publicacions
María del Carmen Solaz Fuster

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7002-5

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

NUEVAS DIANAS DE ACTUACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK)

Memoria presentada por María del Carmen Solaz Fuster
para optar al grado de Doctora en Bioquímica.

Valencia 2007



Universitat
de València
Departamento
de Bioquímica
y Biología Molecular



Consejo Superior
de Investigaciones
Científicas
Instituto de
Biomedicina
de Valencia

ciberer
Centro de Investigación
Biomédica En Red
de Enfermedades Raras



D. Pascual Felipe Sanz Bigorra, Doctor en Farmacia e Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y del Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) y

D. Jose Vicente Gimeno Alcañiz, Doctor en Ciencias Biológicas y Titulado Superior Especializado del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICAN:

Que Dña. María del Carmen Solaz Fuster, licenciada en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título *“Nuevas dianas de actuación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)”*.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora.

En Valencia, a 27 de Junio de 2007.

Dr. Pascual F. Sanz Bigorra

Dr. Jose V. Gimeno Alcañiz

Para la realización de esta Tesis, la autora ha disfrutado de una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) (BES-2003-2058) del Ministerio de Educación y Ciencia.

El trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos “Las levaduras como sistema modelo para estudiar las bases moleculares del proceso de señalización por glucosa en células pancreáticas de tipo beta” (BMC2002-00208) y “Relación funcional entre la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y el complejo fosfatasa PPI. Su efecto en la regulación y fisiopatología del metabolismo del glucógeno” (SAF2005-00852), financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia.

A mis padres
y a mi hermano.

Todos me han avisado sobre este momento, el más difícil, el de escribir los agradecimientos. No es fácil resumir en pocas líneas todo lo que he aprendido, todas las experiencias y todos los recuerdos que me quedan de mi estancia en el IBV.

En primer lugar tengo que agradecerle a Pascual que me brindara la posibilidad de realizar la Tesis en su laboratorio y que haya compartido conmigo la sabiduría de “gran espíritu”.

Jose ha sido mi “padre científico”. Todo lo que sé, me lo ha enseñado él. Ha estado a mi lado compartiendo banco en el laboratorio y además de dirigir mi Tesis, me ha guiado dándome los mejores consejos que yo haya podido necesitar.

Y esta Tesis no sería lo mismo sin mis compañeros de laboratorio, con los que he compartido tantas horas cada día: Ada es la experiencia del laboratorio, a ella recurrimos todos en momentos de duda (también tienes un poco de culpa de esta Tesis); Leda, además de mi compañera, mi amiga, con la que he compartido tantas y tantas conversaciones al lado del ordenador... Juntas empezamos esto y juntas lo acabaremos (ánimo Leda!!); Dani, gracias por ayudarme con mis montones de placas, y por tantas cosas más...; Miguel, el super-técnico, siempre dispuesto a ayudar y a aprender, pero que nos ha llevado a todos más rectos que una vela!!; Luisa, que siempre nos contagia con su risa que le hace única; y Santi, el último en llegar pero que tanto me está ayudando en los pasos burocráticos que me toca hacer ahora. No me puedo olvidar de los que ya han pasado por el laboratorio: Lidia, nuestro gran apoyo cuando llegamos Leda y yo; M^a Carmen, con la que compartí tantas conversaciones mientras nos lavábamos los dientes...; Rosa, siempre tan comedida y serena; Itziar, que vino para dos semanas y casi la tuvimos que echar! y Bart, el toque internacional que tuvimos durante unos meses... No me puedo olvidar del laboratorio de Marta, por ser como mi segundo laboratorio, siempre dispuestas a ayudarme (gracias, Belén!) y del laboratorio de Juanjo, por su ayuda inestimable con las bidimensionales (gracias, Libia!)

Agradecimientos

También hay muchas personas de las que presumo de que sean mis amigos dentro y fuera del Instituto: Marisa, Marian, Ana, Encarna, Isabel, Paula, Marta, Fernando... Con ellos he compartido cervezas, cenas, fiestas, y algún que otro partido de fútbol-sala... Y también Susana, Emilio, Carlos, Salva... con los que hemos compartido la hora de comer al solecito...

A Luisa de la limpieza, por llevarnos siempre tan limpios; a M^a Luz, por ser siempre tan eficaz con el papeleo, a los chicos de seguridad (Yolanda, Jorge, Josep...) por esos ratitos de conversación al entrar o al salir... Y a todo el IBV en general por esos saludos o por una simple sonrisa cada vez que nos hemos cruzado por el pasillo. Todos han hecho que estos cinco años hayan sido (hasta el momento) los mejores de mi vida.

A mis amigas bioquímicas (Amparo y Sara) también les tengo que agradecer muchas cosas. Por esas cenas con declaraciones firmadas y por algún que otro intercambio de protocolos por e-mail...

Y por último, pero no por eso menos importante... A mis padres, por apoyarme en todas mis decisiones y por poner cara de estar entendiéndolo cuando les contaba algo del laboratorio... Y a mi hermano Edu (y a M^a Amparo también, claro!!), por ayudarme en los aspectos informáticos y estéticos, y por esa portada “de diseño”.

MC.

Índices

1. Índice General

Índices	7
1. Índice General	9
2. Índice de Figuras	15
3. Índice de Tablas	21
Abreviaturas, Acrónimos y Siglas	23
Introducción	31
1. Estructura de AMPK	34
2. Regulación de AMPK	37
3. SNF1, el homólogo de AMPK en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
4. Situaciones que producen la activación de AMPK	41
4.1. Estrés celular	41
4.2. Ejercicio y contracción	42
4.3. Drogas antidiabéticas	43
4.4. Formas constitutivamente activas y dominante negativas de AMPK	43
5. Reconocimiento de proteínas dianas por AMPK	44
6. Efectos fisiológicos de AMPK	45
6.1. Inhibición del anabolismo mediante fosforilación de proteínas	46
6.2. Estimulación del catabolismo mediante fosforilación de proteínas	48
6.3. Integración de señales hormonales	49
6.4. Regulación transcripcional	50
6.4.1. TRIP6	50

Índice General

7. AMPK y el metabolismo del glucógeno	53
7.1. Diferencias en el metabolismo del glucógeno según tejidos	54
7.2. Regulación de las enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno	55
7.2.1. La proteína fosfatasa de tipo 1 (PP1) y sus subunidades reguladoras	58
7.2.1.1. R5	58
8. Enfermedad de Lafora	60
8.1. Genes implicados en la enfermedad de Lafora	61
8.2. Mecanismo de la enfermedad	64
Objetivos	67
Materiales y Métodos	71
1. Reactivos comunes de Biología Molecular	73
2. Material biológico y condiciones de crecimiento	73
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
2.2. Cultivos celulares	74
3. Plásmidos	77
3.1. Vectores de expresión en levadura	77
3.2. Vectores de expresión en bacterias	77
3.3. Vectores de expresión en células de mamífero	78
3.4. Clonajes y subclonajes	78
3.4.1. Construcciones utilizadas en el trabajo con TRIP6	79
3.4.2. Construcciones utilizadas en el trabajo con R5	84
4. Infección con adenovirus	87
4.1. Amplificación de los adenovirus	87

4.2. Titulación adenoviral	89
5. Análisis de proteínas	89
5.1. Electroforesis, transferencia e inmunodetección (<i>Western Blot</i>)	89
5.2. Desnudado de membranas (<i>Stripping</i>)	91
5.3. Electroforesis bidimensional	92
6. Doble híbrido	93
6.1. Escrutinio genético de doble híbrido en levadura	94
6.2. Ensayos β -galactosidasa	95
7. Arrastre con GST (<i>Pull-down</i>)	96
8. Ensayo de coimmunoprecipitación en líneas celulares continuas	96
9. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	97
10. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	98
11. Localización subcelular de las fusiones a GFP en líneas celulares continuas	99
12. Ensayos de actividad luciferasa	99
13. Determinación de glucógeno	101
14. Análisis estadístico de los datos	102
Resultados I	103
1. Escrutinio genético de doble híbrido en levadura	105
2. TRIP6 interacciona físicamente con AMPK α 2	106
2.1. Doble híbrido en levadura	108
2.2. Arrastre con GST en células de levadura	110
2.3. Doble híbrido en células de mamífero	111
2.4. Coimmunoprecipitación en células de mamífero	112

3. AMPK fosforila a TRIP6 <i>in vitro</i>	114
3.1. Análisis de mutantes de TRIP6 en posibles sitios de fosforilación	115
3.2. Acotado de la región de TRIP6 fosforilada por AMPK	118
4. AMPK no afecta a la interacción de TRIP6 con otras proteínas	120
4.1. Estudio de la interacción de TRIP6 con THR β y RXR α	120
4.2. Estudio de la interacción de TRIP6 con LPA2R-CT y CasL/HEF1	121
5. La actividad transcripcional de TRIP6 aumenta por la actividad AMPK	123
5.1. Actividad transcripcional de TRIP6 en levadura	123
5.1.1. Efecto de la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de AMPK sobre la actividad transcripcional de TRIP6	124
5.1.2. Actividad transcripcional de los mutantes de TRIP6	125
5.2. Actividad transcripcional de TRIP6 en células de mamífero	126
5.2.1. Localización subcelular de TRIP6	127
5.2.2. Análisis de mutaciones en la secuencia de exportación nuclear (NES)	129
5.2.3. Actividad transcripcional del mutante TRIP6 S102A en células de mamífero	130
5.2.4. Coimmunoprecipitación de AMPK α 2 y TRIP6 S102A en células de mamífero	132
5.2.5. Actividad transcripcional del mutante TRIP6 S102A en levadura	133
5.2.6. Estudio de la fosforilación de residuos de la NES por AMPK	134
5.2.7. Estudio del efecto de AMPK sobre la localización subcelular de TRIP6	135
5.3. La activación de AMPK mejora las propiedades coactivadoras de TRIP6 en la transcripción regulada por NF- κ B	137

Resultados II	143
1. AMPK interacciona con R5	145
1.1. Doble híbrido en levadura	145
1.2. Coinmunoprecipitación en células de mamífero	146
2. AMPK fosforila a R5 <i>in vitro</i>	147
2.1. Análisis de mutantes de R5 en posibles sitios de fosforilación	148
3. Estudio del residuo Ser35 de R5	149
3.1. Interacción con AMPK	150
3.2. Interacción con PPI y con laforina	151
4. La sobreexpresión de R5 incrementa la producción de glucógeno en células de mamífero	153
4.1. AMPK disminuye el efecto glucogenogénico de la sobreexpresión de R5	155
5. R5 se fosforila en un sitio diferente de la Ser35	158
6. AMPK y las proteínas laforina y malina	160
6.1. AMPK interacciona con laforina	160
6.2. AMPK fosforila a laforina <i>in vitro</i>	162
6.3. AMPK regula la interacción entre laforina y malina	163
7. El complejo laforina-malina disminuye el efecto glucogenogénico de la sobreexpresión de R5	166
7.1. La expresión de una forma dominante negativa de AMPK contrarresta el efecto del complejo laforina-malina sobre la actividad glucogenogénica de R5	169
Discusión	177
1. TRIP6	180
2. R5	187

Índice General

Conclusiones	197
Bibliografía	201

2. Índice de Figuras

Introducción

Figura 1: Dominios típicos de la estructura de las subunidades α , β y γ de AMPK.	35
Figura 2: Esquema de los estados inactivo y activo de AMPK, donde se representan los factores que influyen en ellos.	37
Figura 3: Esquema de los estados inactivo y activo de SNF1, donde se representan los factores que influyen en ellos.	41
Figura 4: Alineamiento de secuencias parciales de 6 proteínas fosforiladas por AMPK.	45
Figura 5: Procesos clave del metabolismo energético que están regulados por AMPK.	46
Figura 6: Dianas de AMPK.	47
Figura 7: Funciones propuestas para AMPK en el control del metabolismo energético del organismo.	49
Figura 8: Diagrama esquemático de la estructura en dominios de TRIP6.	51
Figura 9: <i>Northern Blot</i> donde se muestra la expresión de TRIP6 en diferentes tejidos humanos.	53
Figura 10: Representación esquemática de la síntesis y degradación del glucógeno y de la regulación de la glucógeno sintasa.	57
Figura 11: <i>Northern Blot</i> donde se muestra la expresión de R5 en diferentes tejidos humanos.	59
Figura 12: Diagrama de R5 mostrando la localización de los dominios de unión a PP1, glucógeno y glucógeno sintasa.	59
Figura 13: Cuerpos de Lafora.	61
Figura 14: Representación de 38 mutaciones conocidas en el gen de laforina y de 34 mutaciones conocidas en el gen de malina.	63

Índice de Figuras

Figura 15: Diagrama que muestra las distintas proteínas que interactúan con laforina.	65
Resultados I	
Figura 16: Representación esquemática del sistema de doble híbrido que se utilizó para llevar a cabo el escrutinio genético.	105
Figura 17: Secuencia aminoacídica completa de TRIP6, donde se muestran los aminoácidos que componen la NES y cada uno de los dominios LIM.	107
Figura 18: Arrastre con GST entre GST-AMPK $\alpha 2$ y HA-TRIP6.	111
Figura 19: Análisis de doble híbrido en células de mamífero para cuantificar la interacción entre AMPK $\alpha 2$ y TRIP6.	112
Figura 20: Coimmunoprecipitación de <i>myc</i> -AMPK $\alpha 2$ y TRIP6.	113
Figura 21: Fosforilación <i>in vitro</i> de TRIP6 por AMPK.	115
Figura 22: Secuencia aminoacídica completa de TRIP6 donde se muestran los aminoácidos incluidos en posibles secuencias consenso de fosforilación por AMPK.	116
Figura 23: Fosforilación <i>in vitro</i> de los mutantes en posibles sitios de fosforilación de TRIP6.	117
Figura 24: Diagrama esquemático de la estructura en dominios de TRIP6 donde se representan los fragmentos N-terminal y C-terminal que se han utilizado en el ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> .	118
Figura 25: Fosforilación <i>in vitro</i> de distintas formas de TRIP6.	119
Figura 26: La activación de AMPK incrementa ligeramente la actividad transcripcional de TRIP6.	127
Figura 27: Localización subcelular de TRIP6.	128
Figura 28: Alineamiento de las secuencias de las NES de TRIP6 humana, de ratón y de otras proteínas de la misma familia.	129

Figura 29: La activación de AMPK incrementa la actividad transcripcional de la forma nuclear de TRIP6.	131
Figura 30: Coimmunoprecipitación de <i>myc</i> -AMPK $\alpha 2$ y GBD-TRIP6 S102A.	132
Figura 31: Fosforilación <i>in vitro</i> de TRIP6 S102A por AMPK.	135
Figura 32: Localización subcelular de TRIP6 tras diferentes tratamientos de activación de AMPK.	136
Figura 33: Efecto, dependiente del tiempo, del AICAR sobre la expresión del gen reportero regulado por NF- κ B.	138
Figura 34: El tratamiento con AICAR durante 1 h es capaz de activar AMPK endógena.	139
Figura 35: La activación de AMPK mejora las propiedades coactivadoras de TRIP6 en la transcripción regulada por NF- κ B.	140
Resultados II	
Figura 36: Coimmunoprecipitación de <i>myc</i> -AMPK $\alpha 2$ y HA-R5.	147
Figura 37: Secuencia aminoacídica de R5 donde se muestran los aminoácidos que forman parte de la secuencia consenso de fosforilación por AMPK.	148
Figura 38: Fosforilación <i>in vitro</i> de GST-R5 (1-183) y de los mutantes en sitios de fosforilación de R5.	149
Figura 39: Coimmunoprecipitación de <i>myc</i> -AMPK $\alpha 2$ y HA-R5 y los mutantes en la Ser35.	151
Figura 40: Coimmunoprecipitación de <i>myc</i> -PP1 α y HA-R5 y los mutantes en la Ser35.	153
Figura 41: Determinación de glucógeno producido por la sobreexpresión de las fusiones HA-R5, HA-R5 S35A y HA-R5 S35D.	155

Índice de Figuras

Figura 42: Determinación de glucógeno producido por la sobreexpresión de las fusiones HA-R5, HA-R5 S35A y HA-R5 S35D, junto a la expresión de AMPK α 2 T172D, β 2 y γ 1.	157
Figura 43: Análisis mediante electroforesis bidimensional de la fosforilación de R5.	159
Figura 44: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción de AMPK con laforina y malina.	161
Figura 45: Coimmunoprecipitación de laforina y HA-AMPK α 2.	162
Figura 46: Fosforilación <i>in vitro</i> de GST-laforina.	163
Figura 47: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción de laforina y malina.	164
Figura 48: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción de laforina y malina en distintas condiciones.	165
Figura 49: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción de laforina y malina al sobreexpresar una forma constitutivamente activa de AMPK.	166
Figura 50: Incremento en la acumulación de glucógeno de forma dosis-dependiente producido por cantidades crecientes del adenovirus que expresa la fusión GFP-PTG.	167
Figura 51: Determinación de la cantidad de glucógeno producido por distintas cantidades de los adenovirus que expresan laforina y malina.	168
Figura 52: La cantidad de la proteína GFP-PTG disminuye con la expresión de laforina y malina.	169
Figura 53: Determinación de la cantidad de glucógeno producido por la expresión de las proteínas GFP-PTG, AMPK D.N., laforina y malina.	170
Figura 54: Análisis de la cantidad de la proteína GFP-PTG con la expresión de AMPK D.N., laforina y malina.	171

- Figura 55: Incremento en la cantidad de glucógeno producido por la expresión de las proteínas GFP-PTG y/o AMPK D.N. en fibroblastos. 173
- Figura 56: Determinación de la cantidad de glucógeno producido por la expresión de las proteínas GFP-PTG, laforina y malina en fibroblastos. 174
- Figura 57: Análisis de la cantidad de la proteína GFP-PTG con la expresión de laforina y/o malina en fibroblastos. 175
- Discusión**
- Figura 58: Múltiples funciones para las proteínas de las familias de la zixina y la paxilina. 185
- Figura 59: Modelo propuesto para el complejo laforina-malina, R5 y AMPK en la síntesis del glucógeno. 193

3. Índice de Tablas

Materiales y Métodos

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados.	82
Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas analizadas por SDS-PAGE.	90

Resultados I

Tabla 3: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción por doble híbrido entre la subunidad catalítica $\alpha 2$ de AMPK y TRIP6.	109
Tabla 4: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción por doble híbrido entre Snf1 y TRIP6.	110
Tabla 5: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción de TRIP6 con THR β y RXR α .	121
Tabla 6: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción de TRIP6 con LPA2R-CT y CasL/HEF1.	122
Tabla 7: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la actividad transcripcional de TRIP6.	124
Tabla 8: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la actividad transcripcional de TRIP6 al sobreexpresar una forma constitutivamente activa de AMPK.	125
Tabla 9: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la actividad transcripcional de los diferentes mutantes de TRIP6.	126
Tabla 10: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la actividad transcripcional del mutante S102A de TRIP6.	133

Índice de Tablas

Resultados II

Tabla 11: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción de AMPK con distintas subunidades de PPI.	146
Tabla 12: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción de AMPK con R5 y sus mutantes.	150
Tabla 13: Medida de actividad β -galactosidasa para cuantificar la interacción de PPI y laforina con R5 y sus mutantes.	152

Abreviaturas, Acrónimos y Siglas

2-DE:	Electroforesis bidimensional
° C:	Grado centígrado
ACCI/ACC2:	Isoformas 1 (α) y 2 (β) de la acetil-CoA carboxilasa
AD:	VP16 <i>Activating Domain</i>
ADE2:	Gen que codifica para la <i>Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase</i> de levaduras (cataliza una reacción en la ruta biosintética <i>de novo</i> de las purinas)
AICAR:	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido
AMP:	Adenosín monofosfato
AMPK:	<i>AMP-activated protein kinase</i> (proteína quinasa activada por AMP)
ASC:	<i>Association with SNFI complex</i>
ATF4:	<i>Activating Transcription Factor 4</i>
ATP:	Adenosín trifosfato
BLAST:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA:	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albúmina de suero bovino)
C/EBP α :	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>
C.A.:	Constitutivamente activo
CaMK:	<i>Calcium/calmodulin dependent protein kinase</i> (proteína quinasa calcio/calmodulina-dependiente)
CaMKK:	<i>CaMK kinase</i> (proteína quinasa de CaMK)
cAMP:	<i>cyclic AMP</i> (AMP cíclico)
Cas:	<i>Crk-associated substrate</i>
CasL/HEFI:	<i>Human Enhancer of Filamentation 1</i>
CBD:	<i>Carbohydrate Binding Domain</i> (dominio de unión a carbohidratos)
CBS:	<i>Cystathionine β-Synthase</i>
CD36/FAT:	<i>CD36/Fatty Acid Translocase</i>
cDNA:	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (DNA complementario)
CFTR:	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
cGMP:	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
CHO-IR:	<i>Chinese Hamster Ovary cells- Insulin Receptor</i>
Ci:	Curio
CKI/II:	<i>Casein Kinase I/II</i>
cm:	Centímetro
CMV:	<i>Cytomegalovirus</i>
CPE:	<i>Cytophatic effect</i> (efecto citopático)
C-ter:	Extremo carboxilo-terminal
DAPI:	<i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO:	Dimetilsulfóxido

Abreviaturas, Acrónimos y Siglas

D.N.:	Dominante negativo
D.O.:	Densidad óptica
DSPD:	<i>Dual Specificity Phosphatase Domain</i>
DTT:	<i>DL-Dithiothreitol</i>
EC:	Extracto crudo
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EF-2:	<i>Elongation Factor-2</i> (factor de elongación-2)
EPM2A/2B:	<i>Epilepsy of Progressive Myoclonus type 2 gene A/B</i> (gen A/B de la epilepsia mioclónica progresiva tipo 2)
FAS:	<i>Fatty Acid Synthase</i> (ácido graso sintasa)
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i> (suero bovino fetal)
g:	Gramo
<i>g</i> :	Aceleración de la gravedad
G-6-P:	<i>Glucose-6-Phosphate</i> (glucosa-6-fosfato)
G6Pasa:	<i>Glucose-6-Phosphatase</i> (glucosa-6-fosfatasa)
GAD:	<i>Gal4 Activating Domain</i> (dominio de activación de Gal4)
GBD:	<i>Gal4 DNA Binding Domain</i> (dominio de unión a DNA de Gal4)
GBD:	<i>Glycogen-Binding Domain</i> (dominio de unión a glucógeno)
GFP:	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
Glu:	Glucosa
Glu-1-P:	<i>Glucose-1-phosphate</i> (glucosa-1-fosfato)
GLUT1/2/4:	<i>Glucose transporter 1/2/4</i> (transportador de glucosa 1/2/4)
GP:	<i>Glycogen Phosphorilase</i> (glucógeno fosforilasa)
GPK:	<i>Glycogen Phosphorilase Kinase</i> (glucógeno fosforilasa quinasa)
GS:	<i>Glycogen Synthase</i> (glucógeno sintasa)
GSK3:	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i> (glucógeno sintasa quinasa 3)
GST:	<i>Glutathione-S-Transferase</i> (Glutación-S-Transferasa)
h:	Hora
HA:	<i>Human influenza virus hemagglutinin epitope</i>
HCM:	<i>Hypertrophic cardiomyopathy</i> (cardiomiopatía hipertrófica)
HEK:	<i>Human Embryonic Kidney cells</i>
Hepes:	<i>N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]</i>
HIS3:	Gen que codifica para la <i>Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase</i> en levaduras (cataliza la sexta reacción en la biosíntesis de la histidina)

HMG-CoA:	3-Hidroxi-3-MetilGlutaril-CoA
HMGR:	3-Hidroxi-3-MetilGlutaril-CoA Reductasa
HNF-4 α :	<i>Hepatocyte Nuclear Factor-4α</i> (factor nuclear de hepatocitos-4 α)
HRP:	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSL:	<i>Hormone-Sensitive Lipase</i> (lipasa sensible a hormona)
HUVEC:	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
Hxk2:	Hexoquinasa PII
IEF:	<i>Isoelectric focusing</i> (isoelectroenfoque)
IP:	Inmunoprecipitación
IPTG:	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
IRS-1:	<i>Insulin Receptor Substrate-1</i>
KD:	<i>Kinase Domain</i> (dominio quinasa)
kDa:	kiloDalton
KIS:	<i>Kinase Interacting Sequence</i>
L:	Litro
<i>lacZ</i> :	Gen que codifica para la enzima β -galactosidasa
LB:	Medio de cultivo Luria-Bertani
LEU2:	Gen que codifica para la <i>Beta-isopropylmalate dehydrogenase</i> en levaduras (cataliza la tercera reacción en la ruta de la biosíntesis de la leucina)
LIM:	<i>Lin-11, Isl-1 y Mec-3 domain</i>
LIMD1:	<i>LIM Domain containing 1</i>
LPA2R:	<i>Lysophosphatidic acid 2 receptor</i> (receptor del ácido lisofosfatídico 2)
LPP:	<i>Lipoma Preferred Partner</i>
M:	Molar (moles/Litro)
MAP:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEF2:	<i>Myocyte-specific Enhancer Factor-2</i>
mg:	Miligramo
min:	Minuto
mm:	Milímetro
MO25:	<i>Mouse protein 25</i>
mRNA:	<i>messenger ribonucleic acid</i> (RNA mensajero)
mU:	Miliunidad de actividad enzimática
<i>myc</i> :	<i>Avian myelocytomatosis virus epitope</i>
μ L:	Microlitro
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
n.d.:	No determinado
NES:	<i>Nuclear Exporting Sequence</i> (secuencia de exportación nuclear)
NF- κ B:	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>

Abreviaturas, Acrónimos y Siglas

ng:	Nanogramo
eNOS/nNOS:	<i>endothelial/neuronal Nitric Oxide Synthase</i> (isoformas endotelial y neuronal de la óxido nítrico sintasa)
NRF1:	<i>Nuclear Respiratory Factor-1</i>
N-ter:	Extremo amino-terminal
ONPG:	o-nitrofenil β -D-galactopiranosido
pb:	Pares de bases
PBS:	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG:	Polietilenglicol
PEPCK:	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> (fosfoenol piruvato carboxiquinasa)
PFK2/FBPase2:	<i>Phosphofructokinase 2 / Fructose 2,6-bisphosphatase</i> (fosfofructoquinasa 2/fructosa 2,6-bifosfatasa)
PFU:	<i>Plaque-forming unit</i>
PGC1 α :	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activator-1α</i>
pI:	Punto isoeléctrico
PI 3-K:	<i>Phosphoinositide-3 Kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinasa)
PJS:	<i>Peutz-Jeghers Syndrome</i> (síndrome de Peutz-Jeghers)
PKA:	<i>Protein kinase A (cAMP-dependent protein kinase)</i>
PKB:	<i>Protein kinase B (Akt)</i>
PKC:	<i>Protein kinase C</i>
PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PPI/2A/2C:	<i>Protein phosphatase 1/2A/2C</i> (proteína fosfatasa de tipo 1/2A/2C)
PPAR- γ :	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>
PTG:	<i>Protein Targeting to Glycogen</i>
PTP:	<i>Protein Tyrosine Phosphatases</i>
p/v:	Peso/volumen
PVDF:	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
9-cis-RA:	<i>9-cis-retinoic acid</i> (9-cis-ácido retinoico)
RD:	<i>Regulatory Domain</i> (dominio regulador)
RING:	<i>Really Interesting New Group of Proteins domain</i>
r.p.m.:	Revoluciones por minuto
RXR:	<i>Retinoid X Receptor</i> (receptor de retinoides X)
SC:	Medio de cultivo Sintético Completo
SDS-PAGE:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SNFI:	<i>Sucrose, Non-Fermenting 1</i>

Abreviaturas, Acrónimos y Siglas

SREBP-1c:	<i>Sterol Response Element Binding Protein-1c</i> (proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides-1c)
STRAD:	<i>STE20-related adaptor protein</i>
T ₃ :	<i>3,3',5-triiodothyronine</i> (hormona tiroidea)
TBS:	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCID ₅₀ :	<i>Tissue Culture Infectious Dose 50</i>
TGF-β:	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNFα:	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
mTOR:	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
TR:	<i>Thyroid Hormone Receptor</i> (receptor de la hormona tiroidea)
Triac:	<i>3,3',5-triiodothyroacetic acid</i>
TRIP:	<i>Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein</i>
TRP1:	Gen que codifica para la <i>Phosphoribosylanthranilate isomerase</i> en levaduras (cataliza la tercera reacción en la biosíntesis del triptófano)
Tween-20:	<i>Polyoxyethylene sorbitan monolaurate</i>
UAS:	<i>Upstream Activation Sequence</i>
UDP-Glu:	Uridina-5'-difosfato-glucosa
URA3:	Gen que codifica para la <i>Orotidine-5'-phosphate</i> (OMP) <i>decarboxylase</i> en levaduras (cataliza la sexta reacción enzimática en la biosíntesis <i>de novo</i> de las pirimidinas)
V:	Voltio
v/v:	Volumen/volumen
WPWS:	<i>Wolff-Parkinson-White Syndrome</i> (Síndrome Wolff-Parkinson-White)
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
YNB:	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD:	<i>Yeast extract-Peptone-Dextrose medium</i>
ZMP:	5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-D-ribofuranosil-5'-monofosfato
ZRPI:	<i>Zyxin Related Protein 1</i>

Abreviaturas, Acrónimos y Siglas

Aminoácidos

A	(Ala)	Alanina
C	(Cys)	Cisteína
D	(Asp)	Ácido aspártico
E	(Glu)	Ácido glutámico
F	(Phe)	Fenilalanina
G	(Gly)	Glicina
H	(His)	Histidina
I	(Ile)	Isoleucina
K	(Lys)	Lisina
L	(Leu)	Leucina
M	(Met)	Metionina
N	(Asn)	Asparagina
P	(Pro)	Prolina
Q	(Gln)	Glutamina
R	(Arg)	Arginina
S	(Ser)	Serina
T	(Thr)	Treonina
V	(Val)	Valina
W	(Trp)	Triptófano
Y	(Tyr)	Tirosina

Bases Nitrogenadas

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

Introducción

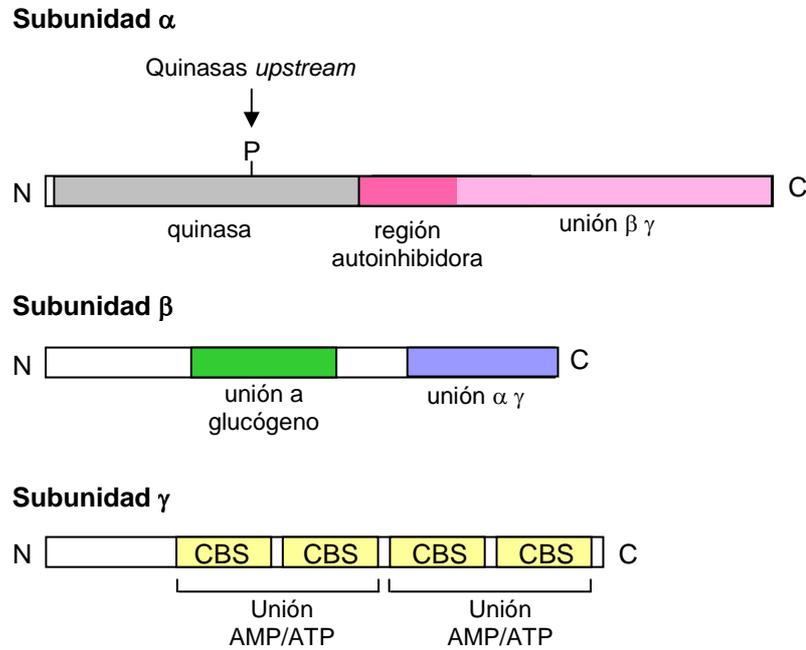
Los organismos vivos constantemente se enfrentan a un aporte irregular de nutrientes; sin embargo, la habilidad de mantener el balance energético durante la privación de alimento es crítica para la supervivencia. Esta presión ha conducido a los organismos a desarrollar sistemas complejos para almacenar sustratos energéticos durante el aporte de alimento y a reducir el gasto de energía durante la escasez del mismo. La insulina es la principal hormona anabólica que estimula la toma y almacenamiento de sustratos energéticos en músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. El desequilibrio del balance energético causado por la sobrealimentación y la vida sedentaria ha conducido a un aumento en la prevalencia de diabetes tipo 2, un desorden metabólico asociado a la resistencia a insulina en tejidos periféricos. Ya que el balance energético está regulado por múltiples procesos, la investigación de dianas celulares que regulen la toma de sustratos y el gasto de energía podría aportar un mayor conocimiento del síndrome metabólico (serie de factores de riesgo coronario que incluyen, entre otros, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia e hipertensión arterial) y un acercamiento hacia el desarrollo de nuevas estrategias preventivas y de tratamiento farmacológico (Long and Zierath, 2006).

En múltiples tejidos de los mamíferos, la **proteína quinasa activada por AMP (AMPK)** controla el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Carling, 2004; Hardie, 2004). Además, AMPK integra circuitos de señalización entre tejidos periféricos y el hipotálamo para regular la ingesta y el gasto energético de todo el organismo. Esta importante función de AMPK como sensor energético y regulador clave del metabolismo está conservada evolutivamente como lo demuestra el papel regulador que desempeña su ortólogo (SNF1) en el metabolismo de la glucosa en el eucariota unicelular *Saccharomyces cerevisiae* (Carling, 2004; Hardie, 2004).

I. Estructura de AMPK

AMPK es un complejo heterotrimérico compuesto por una subunidad catalítica α y subunidades reguladoras β y γ (Hardie et al., 2003) (Figura 1), cada una de las cuales está codificada por dos o tres genes distintos ($\alpha 1$, $\alpha 2$; $\beta 1$, $\beta 2$; $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$). Todas las posibles combinaciones entre las distintas isoformas son posibles para formar el complejo y, junto a las variantes en el procesamiento y el uso de promotores alternativos, conducen a un amplio abanico de complejos AMPK diferentes. Aunque la quinasa de mamíferos es la única que está bien caracterizada a nivel bioquímico, se han encontrado genes que codifican para ortólogos de las subunidades α , β y γ de todas las especies eucariotas cuyo genoma ya ha sido secuenciado, incluyendo, incluso, al primitivo parásito *Giardia lamblia* (Hardie et al., 2003), que carece de mitocondrias y, según la filogenia molecular, dista de los humanos más de dos veces de lo que lo hace *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que la existencia de ortólogos de AMPK parece ser una característica fundamental de todas las células eucariotas (Hardie, 2004).

Las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ contienen un dominio quinasa convencional de serinas y treoninas en su extremo amino-terminal. La región carboxilo-terminal se requiere para formar el complejo con las subunidades β y γ (Figura 1). Los complejos AMPK que contienen la isoforma $\alpha 2$ predominan en músculo esquelético, corazón e hígado, mientras que AMPK $\alpha 1$ se expresa de forma ubicua (Woods et al., 2000). La isoforma $\alpha 1$ se encuentra principalmente en el citoplasma, mientras que la isoforma $\alpha 2$ se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo (Salt et al., 1998a). Las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ muestran diferencias en cuanto a la especificidad por la proteína diana. Estas diferencias en la localización subcelular y en la especificidad de sustrato sugieren que $\alpha 1$ y $\alpha 2$ desarrollan funciones distintas (Schimmack et al., 2006).



Adaptado de Hardie et al., 2006.

Figura 1: Dominios típicos de la estructura de las subunidades α , β y γ de AMPK.

Las subunidades reguladoras β y γ ayudan a mantener la estabilidad del complejo AMPK, aunque están apareciendo nuevas funciones para estas subunidades. La comparación entre las secuencias de las subunidades β de diferentes especies revela que contienen dos regiones conservadas que originalmente se denominaron dominios KIS (*kinase interacting sequence*) y ASC (*association with SNF1 complex*). Trabajos recientes indican que, en mamíferos, el dominio ASC es suficiente para la formación del complejo con las subunidades α y γ , mientras que el dominio KIS no está implicado (como previamente se pensó) en la interacción con las subunidades, sino que en realidad es un dominio de unión a glucógeno (GBD, *glycogen-binding domain*) (Hudson et al., 2003) (Figura 1). Estos dominios GBD no catalíticos se encuentran normalmente en enzimas que metabolizan las

ramificaciones $\alpha 1 \rightarrow 6$ en los poliglucosanos como el glucógeno o el almidón (Hardie, 2004).

Respecto a las subunidades reguladoras γ , tras la región variable N-terminal contienen 4 repeticiones en tándem de un motivo que fue denominado dominio CBS (*cystathionine β -synthase*) por describirse por primera vez en la cistationina β -sintasa (Bateman, 1997) (Figura 1). La estructura formada por dos motivos CBS en tándem (denominada dominio Bateman) es la unidad básica funcional, de forma que por cada dos dominios CBS se une una molécula de AMP o de ATP de forma excluyente (Scott et al., 2004). Sin embargo, la unión de dos moléculas de AMP o de ATP se realiza de forma fuertemente cooperativa, lo que podría ser un mecanismo más para incrementar la sensibilidad del sistema AMPK a pequeños cambios en los niveles de nucleótidos (Kahn et al., 2005).

Hasta diez mutaciones puntuales distintas en el gen que codifica para la isoforma $\gamma 2$, localizadas tanto en el dominio Bateman amino-terminal como en el dominio carboxi-terminal, causan en humanos una enfermedad cardíaca hereditaria denominada Síndrome Wolff-Parkinson-White (WPWS), la cual normalmente está asociada con cardiomiopatía hipertrófica (HCM) (Scott et al., 2004). Cómo estas mutaciones provocan WPWS y HCM es un tema complicado que todavía es objeto de numerosas investigaciones. Todas las mutaciones interfieren en la activación de AMPK por AMP. Sin embargo, hay evidencias, aunque indirectas, de que algunas mutaciones también incrementan la fosforilación basal y la activación de AMPK. Si esto fuera correcto, podría explicar por qué las mutaciones son dominantes y parecen actuar como mutaciones de ganancia de función, tal y como hace una mutación similar en $\gamma 3$ en cerdos (R225Q, equivalente a R302Q en $\gamma 2$). Esta mutación produce un alto contenido de glucógeno en músculo esquelético debido a un incremento en la toma de glucosa y/o en la síntesis de glucógeno (Milan et al., 2000). La mutación equivalente en $\gamma 1$ (R70Q) todavía no se ha visto que ocurra de forma natural, pero parece ser más activa que la forma silvestre bajo condiciones basales cuando se expresa en células en cultivo (Kahn et al., 2005).

2. Regulación de AMPK

El complejo se activa en respuesta a un aumento en la relación de AMP respecto a ATP en el interior de la célula y, por lo tanto, actúa como un eficiente sensor del estado energético celular.

AMPK se activa por 5'-AMP de tres formas distintas, las cuales se inhiben por altas concentraciones de ATP (Figura 2).

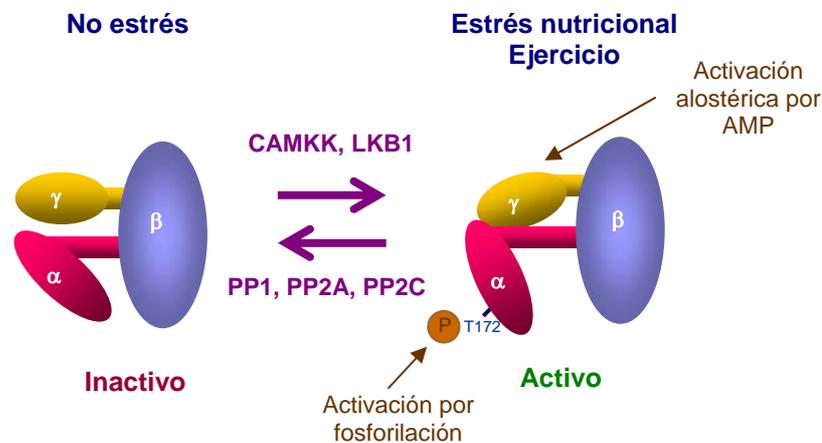


Figura 2: Esquema de los estados inactivo y activo de AMPK, donde se representan los factores que influyen en ellos.

Primero, la unión de AMP causa activación alostérica de AMPK de mamíferos (Figura 2). La magnitud de este efecto varía entre las isoformas de AMPK, pero suele ser de cinco veces o inferior. Este efecto no ha podido ser demostrado para las quinasas ortólogas de levadura ni de plantas.

En un segundo nivel de regulación, la unión de AMP hace que AMPK sea un mejor sustrato para la quinasa que la fosforila. Esta quinasa activa a AMPK por fosforilación de la subunidad α en un residuo específico de treonina (Thr172) dentro del llamado lazo de activación (Hawley et al., 1996) (Figura 2).

La identificación de las quinasas que fosforilan a Snf1 (el ortólogo de AMPK α en *Saccharomyces cerevisiae*) fue un gran paso en el estudio de la regulación de AMPK. Aunque no hay homólogos claros y obvios en mamíferos, los dominios quinasa de Elm1, Sak1 y Tos3 (las quinasas que fosforilan a Snf1) están muy relacionados con los de la proteína quinasa LKB1 y las proteínas quinasa quinasa calcio/calmodulina-dependientes, CaMKK α y CaMKK β . Rápidamente se obtuvo evidencias de que las tres, pero especialmente LKB1, podían fosforilar la Thr172 y activar así a AMPK en células *in vivo* (Hawley et al., 2003).

LKB1 existe como un complejo con dos subunidades accesorias, STRAD (*STE20-related adaptor protein*) y MO25 (*mouse protein 25*). STRAD es una pseudoquinasa mientras que MO25 estabiliza la interacción de LKB1 y STRAD. Además de activar LKB1, la unión de MO25 y STRAD parece localizar a LKB1 en el citoplasma (Kahn et al., 2005). LKB1 había sido originariamente identificada en humanos como un supresor tumoral, indicando por primera vez una relación entre AMPK y cáncer. LKB1 es el gen mutado en una rara enfermedad genética autosómica dominante humana denominada síndrome de Peutz-Jeghers (PJS). LKB1 se requiere para la activación de AMPK en respuesta a tratamientos que elevan los niveles de AMP o a agentes miméticos del AMP, tanto en células en cultivo como en músculo esquelético *in vivo*. Sin embargo, el complejo LKB1 por sí mismo no se regula por AMP y parece estar constitutivamente activo, por lo que la activación de la cascada estaría producida por la unión del AMP a AMPK convirtiéndola en un mejor sustrato para LKB1 (Hardie et al., 2006). Es posible que LKB1 se regule indirectamente, por ejemplo, mediante la asociación con MO25 y/o STRAD y/o cambios en su localización subcelular (Kahn et al., 2005).

Sorprendentemente, el incremento en AMP no estimula la fosforilación de la Thr172 por las CaMKKs, lo que sí se obtiene con un aumento en Ca^{+2} (Hardie et al., 2006). Mientras que LKB1 se expresa de forma ubicua, las CaMKKs se expresan principalmente en tejido nervioso mientras que su expresión es baja en otros tejidos como hígado y músculo

esquelético, sugiriendo que la ruta AMPK estaría regulada por múltiples mecanismos que podrían ser específicos de tejido (Long and Zierath, 2006).

La fosforilación de la Thr172 causa, al menos, una activación de 50 a 100 veces, que cuantitativamente es mucho más importante que la activación alostérica. Al igual que el efecto alostérico, la activación por fosforilación se estimula por AMP y se inhibe por altas concentraciones de ATP. La estimulación de la actividad quinasa por AMP sólo se observa si se usa el complejo $\alpha\beta\gamma$ intacto y no el dominio quinasa aislado (que carece de los sitios de unión a AMP residentes en la subunidad γ) (Hawley et al., 2003). Esto demuestra que el efecto se debe a la unión del AMP al complejo AMPK y no a la quinasa que fosforila a AMPK. El residuo crítico de treonina y la secuencia de alrededor están conservados en las subunidades α de los ortólogos de AMPK de todos los eucariotas, y la mutación a alanina del residuo de treonina equivalente en la subunidad α de levadura (Snf1) causa una pérdida total de función *in vivo* (Estruch et al., 1992). Así que, aunque todavía no está claro si la activación alostérica por AMP está conservada en todos los eucariotas, la regulación por fosforilación sí que lo está.

Por último, la unión de AMP a AMPK actúa a un tercer nivel de regulación inhibiendo la defosforilación de la Thr172 por proteínas fosfatasa (Figura 2). Este mecanismo de activación por AMP también ha sido descrito en plantas superiores (Hardie, 2004).

3. SNF1, el homólogo de AMPK en *Saccharomyces cerevisiae*

En presencia de glucosa, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* reprime la transcripción de numerosos genes, incluyendo aquellos implicados en la utilización de fuentes de carbono alternativas, gluconeogénesis y respiración. Estudios bioquímicos y genéticos han identificado a la proteína quinasa Snf1 (*sucrose, non-fermenting 1*) como uno de los protagonistas de la ruta de represión por glucosa. Snf1 es una proteína quinasa de serinas y treoninas que activa la transcripción inhibiendo represores transcripcionales (p. ej. Mig1) o estimulando activadores transcripcionales (p. ej. Cat8 y Sip4) (Hardie et al., 1998). La proteína

quinasa Snf1 (ortólogo de la subunidad α de AMPK) forma el complejo SNF1 junto a la subunidad Snf4 (ortólogo de la subunidad γ de AMPK) y miembros de la familia Sip1/Sip2/Gal83 (ortólogos de la subunidad β de AMPK). La actividad de Snf1 está regulada por fosforilación en el residuo de treonina 210 (McCartney and Schmidt, 2001). Las quinasas Elm1, Sak1 y Tos3 fosforilan y activan Snf1. Estas quinasas parecen tener funciones redundantes y solapantes, ya que se requiere la eliminación de las tres quinasas para abolir la actividad Snf1 *in vivo* y obtener un fenotipo similar al del mutante *snf1* (Hong et al., 2003). La actividad de la quinasa Snf1 está regulada por glucosa: cuando las células crecen en baja glucosa, la quinasa Snf1 está activa (fosforilada), mientras que en un medio conteniendo alta glucosa la quinasa Snf1 está inactiva (defosforilada) (Jiang and Carlson, 1996) (Figura 3). Al contrario que AMPK de mamíferos, Snf1 no se activa directamente por AMP (Wilson et al., 1996). Dado que la actividad de las tres quinasas de Snf1 parece ser constitutiva, la regulación del estado de fosforilación de Snf1 debe depender de la fosfatasa implicada en la defosforilación de la Thr210. En este sentido, la proteína fosfatasa PPI de levadura, Glc7, y su subunidad reguladora, Reg1, son las responsables de la defosforilación e inactivación de la proteína quinasa Snf1 en respuesta a la glucosa (Sanz et al., 2000). Otro componente crucial en la ruta de represión por glucosa de la levadura es la hexoquinasa PII (Hxk2). Además de su papel en la fosforilación de la glucosa en la glicólisis, Hxk2 también participa en la regulación de la actividad del complejo SNF1. En ausencia de Hxk2, el complejo quinasa SNF1 se mantiene en su estado fosforilado activo, incluso en presencia de glucosa. La función de Hxk2 está mediada por Reg1; de hecho, Hxk2 regula el estado de fosforilación de Reg1 (Sanz, 2007).

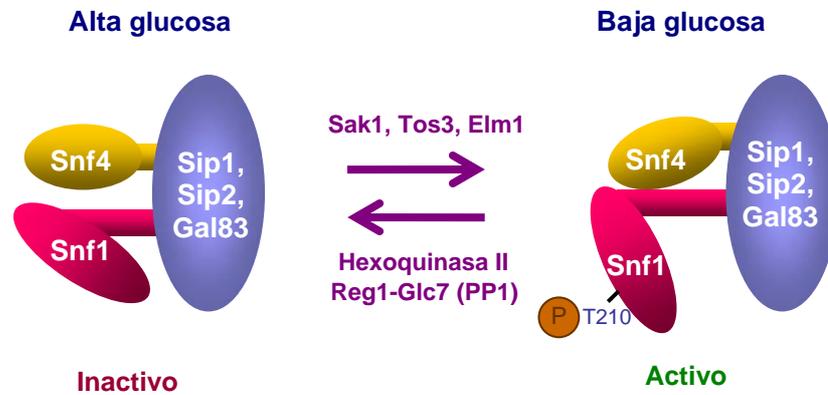


Figura 3: Esquema de los estados inactivo y activo de SNF1, donde se representan los factores que influyen en ellos.

4. Situaciones que producen la activación de AMPK

4.1. Estrés celular

AMPK se activa por estreses patológicos como la ausencia de glucosa, isquemia, hipoxia, estrés oxidativo y estrés hiperosmótico. A excepción del último, todos están asociados con un aumento en la razón AMP : ATP celular (Kahn et al., 2005). El hallazgo de que AMPK se activa por la ausencia de glucosa es particularmente interesante porque extensos estudios genéticos muestran que el ortólogo de AMPK en levaduras, el complejo SNF1, se requiere para la respuesta de supervivencia a la falta de glucosa (Hardie et al., 1998).

AMPK se activa por diversos venenos metabólicos que producen disminución de los niveles de ATP, como inhibidores del ciclo del ácido tricarboxílico (arsenito), la cadena respiratoria (antimicina A, azida sódica), o la ATP sintasa mitocondrial (oligomicina), así como desacopladores de la fosforilación oxidativa como el dinitrofenol.

La activación farmacológica de AMPK se puede obtener mediante el tratamiento de las células con un activador artificial, 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido (AICAR). El AICAR es un análogo de la adenosina que puede ser captado por las células. Una vez en el interior celular es fosforilado para formar 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-D-ribofuranosil-5'-monofosfato (ZMP), un mimético del AMP que confiere efectos activadores (Corton et al., 1995). Sin embargo, se sabe que el ZMP puede afectar a otras enzimas reguladas por AMP (Long and Zierath, 2006) por un mecanismo independiente de AMPK.

4.2. Ejercicio y contracción

Los estreses patológicos o farmacológicos descritos anteriormente interfieren en la producción de ATP, pero un estrés metabólico que activa AMPK bajo condiciones más fisiológicas es el ejercicio o la contracción en el músculo esquelético, por el aumento en el consumo de ATP que conlleva. El grado de activación de AMPK depende de la intensidad del ejercicio y se piensa que está inducido por cambios en la razón AMP/ATP y creatina/fosfocreatina. Sin embargo, el ejercicio también activa AMPK en hígado y tejido adiposo, lo que resultaría, en parte, de la liberación inducida por el ejercicio de moléculas como la interleuquina-6 por parte del músculo. La activación de AMPK en respuesta al ejercicio activa el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos para restaurar los niveles de ATP en músculo. También desempeña un papel importante en la respuesta adaptativa del músculo al entrenamiento continuado alterando las reservas energéticas del músculo y la expresión de genes de respuesta al ejercicio. La actividad física reduce el riesgo de desarrollar resistencia a insulina y diabetes tipo 2, y la activación de AMPK podría participar en algunos de los efectos beneficiosos del ejercicio, como son el incremento en la oxidación de ácidos grasos, el aumento de la biogénesis mitocondrial y en la toma de glucosa (Kahn et al., 2005).

4.3. Drogas antidiabéticas

El mayor interés en el potencial papel de la ruta AMPK en el tratamiento de la diabetes tipo 2 se generó a partir de hallazgos que mostraban que AMPK se activaba indirectamente por metformina y tiazolidinedionas, compuestos ampliamente usados en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Tanto la metformina como las tiazolidinedionas inhiben el complejo I de la cadena respiratoria, y así es como podrían estar activando AMPK. Sin embargo, mientras las tiazolidinedionas producen un aumento en la razón AMP : ATP celular, en el caso de la metformina no ha podido ser demostrado. Muchas de las acciones de las tiazolidinedionas se cree que pueden ser explicadas por medio de otra diana, el PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*), un receptor nuclear. Ya que no hay otras dianas conocidas para la metformina aparte del complejo I, se necesitan más estudios para esclarecer la importancia de la activación de AMPK en el efecto terapéutico de estas drogas (Kahn et al., 2005).

4.4. Formas constitutivamente activas y dominante negativas de AMPK

En la forma inactiva no fosforilada de AMPK α , el dominio quinasa interacciona con una región autoinhibidora localizada en la región de interacción con las subunidades reguladoras (residuos 313-392) (Hardie et al., 1998) (Figura 1). La interacción de la subunidad γ con el dominio C-ter de AMPK α contrarresta la función del dominio autoinhibidor. Debido a esta acción autoinhibidora, se han construido formas cortas de las subunidades α conteniendo sólo el dominio quinasa (residuos 1-312) y se han usado como formas activas de la enzima. Aunque estas formas son inicialmente inactivas, se convierten en activas tras la fosforilación en el residuo Thr172 o por la sustitución de este residuo por un aspártico (T172D), mimetizando la carga negativa del fosfato (Scott et al., 2002).

También se han construido varias formas dominante negativas de AMPK α , p. ej. K45R, D157A y T172A. En estos casos, la sustitución de residuos críticos localizados cerca o en el sitio catalítico puede abolir completamente la actividad quinasa de la enzima. Pero además, estas formas

todavía pueden unirse a las subunidades β y γ , y su sobreexpresión podría “secuestrar” las subunidades β y γ de los complejos endógenos, lo que llevaría a la inhibición de la actividad total de AMPK (Crute et al., 1998; Mitchelhill et al., 1997; Mu et al., 2001; Woods et al., 2000).

5. Reconocimiento de proteínas dianas por AMPK

Las primeras proteínas diana de AMPK que fueron identificadas fueron las enzimas biosintéticas de lípidos 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa y la isoforma ACC1 (α) de la acetil-CoA carboxilasa. La comparación de los sitios fosforilados en éstas y otras dianas revelaron secuencias conservadas, especialmente residuos hidrofóbicos en las posiciones P-5 y P+4 (es decir, 5 residuos hacia N-terminal y 4 hacia C-terminal del aminoácido fosforilado) y un único residuo básico en P-3 o P-4 (**Figura 4**). La importancia de estos residuos se confirmó usando una serie de variantes de dos péptidos relacionados; uno de ellos es el péptido *SAMS*, un péptido de 15 residuos basado en la secuencia que rodea a la Ser79 de la ACC1 de rata que se ha convertido en el sustrato estándar para los ensayos de actividad quinasa AMPK. El motivo de reconocimiento por AMPK definido en estos estudios es *Hid-(Bás,X)-X-X-Ser/Thr-X-X-X-Hid*, donde *Hid* es un residuo hidrofóbico (Leu, Met, Ile, Phe o Val), *Bás* es un residuo básico (Arg, Lys o His, que pueden estar en P-3 o P-4) y *X* es cualquier aminoácido (Hardie et al., 2003).

Acetil-CoA carboxilasa α de rata (Ser79)	H <u>M</u> R <u>S</u> S <u>M</u> S <u>G</u> L <u>H</u> L <u>V</u>
Acetil-CoA carboxilasa α de rata (Ser1200)	P <u>T</u> L <u>N</u> R <u>M</u> S <u>F</u> A <u>S</u> N <u>L</u>
Acetil-CoA carboxilasa α de rata (Ser1215)	G <u>M</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>V</u> A <u>S</u> <u>V</u> S <u>D</u> <u>V</u> L
HMG-CoA reductasa de hámster chino (Ser871)	H <u>M</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>N</u> R <u>S</u> <u>K</u> I <u>N</u> L <u>Q</u>
Lipasa sensible a hormona de rata (Ser565)	S <u>M</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> A <u>A</u> L <u>A</u>
Glucógeno sintasa muscular de rata (Ser7)	P <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>P</u>
Consenso:	X <u>M</u> <u>X</u> <u>R</u> <u>X</u> <u>X</u> <u>S</u> <u>X</u> <u>X</u> <u>X</u> <u>L</u>
	I <u>R</u> <u>X</u> T M
	L <u>K</u> I
	F <u>H</u> F
	V <u></u> V

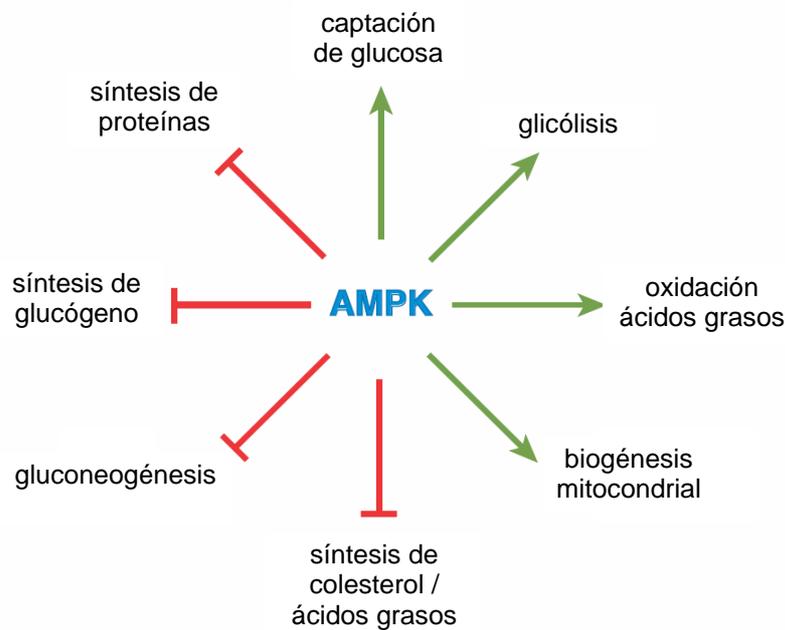
Adaptado de Hardie and Carling, 1997.

Figura 4: Alineamiento de secuencias parciales de 6 proteínas fosforiladas por AMPK. La Ser/Thr fosforilada está en negrita y subrayada. Los residuos hidrofóbicos y básicos implicados en el reconocimiento están en negrita y subrayados, respectivamente.

6. Efectos fisiológicos de AMPK

Con el objetivo de mantener el balance energético celular, la activación de AMPK va a inhibir rutas anabólicas (biosintéticas) y otros procesos que consuman ATP, mientras que va a activar rutas catabólicas que generen ATP (Figura 5). Estos efectos se alcanzan tanto por fosforilación directa de enzimas metabólicas así como a través de efectos a largo plazo por la regulación de la expresión génica.

AMPK afecta a la toma, utilización y almacenamiento de energía a través de la regulación en la ingesta, el flujo de sustratos y el metabolismo. AMPK regula muchas moléculas y rutas en músculo esquelético, corazón, tejido adiposo, hígado, células β pancreáticas y cerebro, que controlan la toma, almacenamiento y utilización de glucosa y lípidos (Kahn et al., 2005). A continuación se revisan algunos de estos efectos.

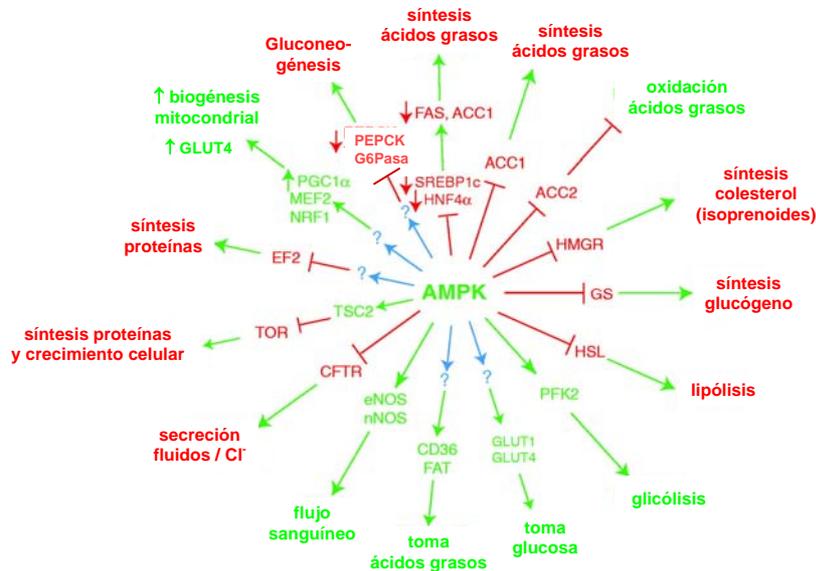


Adaptado de Hardie et al., 2006.

Figura 5: Procesos clave del metabolismo energético que están regulados por AMPK. Las flechas verdes indican activación y las líneas rojas indican inhibición.

6.1. Inhibición del anabolismo mediante fosforilación de proteínas

AMPK va a inhibir la biosíntesis de lípidos mediante la fosforilación e inactivación de enzimas metabólicas clave como ACC1 (síntesis de ácidos grasos), glicerol fosfato acil transferasa (síntesis de triacilgliceroles), y HMG-CoA reductasa (biosíntesis de colesterol/isoprenoides) (Hardie et al., 2003) (Figura 6). AMPK también va a inhibir la síntesis de glucógeno mediante la inactivación de la isoforma muscular de la glucógeno sintasa por fosforilación en la Ser10 (sitio 2), como se revisa más adelante en el apartado 7.2. de esta Introducción (Carling and Hardie, 1989).



Adaptado de Hardie, 2004.

Figura 6: Dianas de AMPK. Las proteínas diana y los procesos activados por AMPK se muestran en verde, y aquellos inhibidos por AMPK se muestran en rojo. Donde el efecto está causado por un cambio en la expresión génica, una flecha verde hacia arriba al lado de la proteína indica un aumento, mientras que una flecha roja hacia abajo indica una disminución en la expresión.

Además de inhibir tanto la biosíntesis de lípidos como la de carbohidratos, también se ha visto que la activación de AMPK inhibe la síntesis de proteínas mediante la fosforilación del factor de elongación-2 (Figura 6) provocado por la activación de la EF-2 quinasa (Horman et al., 2002).

Otra diana de AMPK identificada recientemente es el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) (Figura 6), cuyo gen se encuentra mutado en la fibrosis quística. Ya que la apertura y cierre del canal requiere intercambio de ATP, la inhibición de CFTR conduciría a la conservación de los niveles de ATP (Hallows et al., 2000).

6.2. Estimulación del catabolismo mediante fosforilación de proteínas

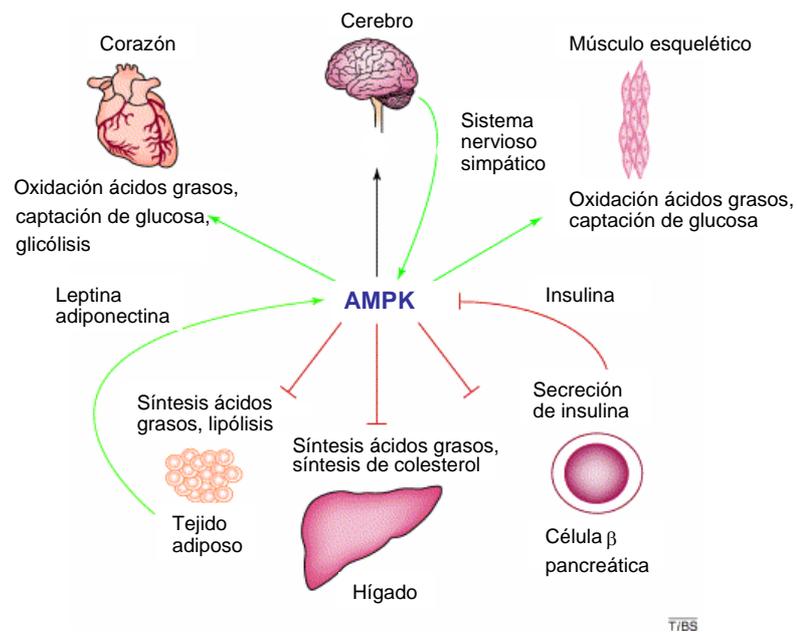
Ejemplos de cómo la activación de AMPK puede aumentar los niveles de ATP estimulando el catabolismo incluyen la estimulación de la oxidación de ácidos grasos mediante la fosforilación de ACC2, la estimulación de la captación de glucosa por activación del transportador de glucosa GLUT1 y el incremento en la expresión y translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática (Hardie et al., 2006) (Figura 6). Otro mecanismo por el que AMPK incrementa la generación de ATP es la fosforilación de PFK2 (Figura 6), que estimula la producción de fructosa-2,6-bisfosfato, un activador fisiológico de la enzima clave de la glicólisis, 6-fosfofructo-1-quinasa. Hay 4 isoformas de PFK2, pero sólo la isoforma cardíaca y la llamada isoforma inducible son dianas de AMPK. La fosforilación de la isoforma cardíaca de PFK2 por AMPK representa un mecanismo para estimular la producción glicolítica de ATP durante isquemia o hipoxia en el corazón. La isoforma inducible de PFK2 se expresa en monocitos por efecto de lipopolisacáridos bacterianos. La fosforilación y activación de esta isoforma por parte de AMPK (Marsin et al., 2002) puede ser un mecanismo que permita a los monocitos producir más ATP mediante la glicólisis para poder trabajar en el ambiente hipóxico de los tejidos infectados o enfermos.

Otra diana fisiológica de AMPK que tiene que ver con la estimulación de la producción de ATP es la óxido nítrico sintasa (NOS) (Figura 6); tanto la isoforma endotelial como la neuronal (eNOS y nNOS) pueden ser fosforiladas por AMPK. La fosforilación de eNOS se da en músculo cardíaco por isquemia (disminución del riego sanguíneo) y la de nNOS en músculo esquelético por ejercicio (Chen et al., 2000).

No debemos dejar de nombrar en este somero análisis a la proteína sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) que actúa como sitio de unión para la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-K). Se ha comprobado que IRS-1 se fosforila en la Ser789 por AMPK (Jakobsen et al., 2001). Esta fosforilación parece incrementar la unión de PI 3-K a la proteína, acentuando los efectos que la insulina posee sobre la captación de glucosa tras el ejercicio.

6.3. Integración de señales hormonales

Una de las principales funciones de AMPK en la regulación de la homeostasis de la glucosa en el organismo es la integración de las señales hormonales y nutricionales en múltiples tejidos (Figura 7). AMPK podría mediar los efectos nutricionales de hormonas como la leptina, adiponectina o la resistina en diferentes tejidos. Además, la disponibilidad energética en el organismo podría correlacionarse con la actividad de AMPK en el hipotálamo, el cual desarrolla un papel clave en la regulación del metabolismo periférico y la ingesta en respuesta a hormonas y nutrientes (Kahn et al., 2005; Long and Zierath, 2006).



Adaptado de Carling, 2004.

Figura 7: Funciones propuestas para AMPK en el control del metabolismo energético del organismo. La activación de AMPK estimula las rutas que generan energía (flechas verdes) e inhibe las rutas que consumen energía (líneas rojas).

6.4. Regulación transcripcional

AMPK también es responsable de regular la expresión de numerosos genes (Figura 6). En músculo, la activación de AMPK incrementa la expresión de GLUT4, hexoquinasa, y enzimas mitocondriales. En células hepáticas, la activación de AMPK disminuye la expresión de enzimas de la gluconeogénesis (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y glucosa-6-fosfatasa). Otro tipo de genes que disminuyen su expresión en hígado son aquellos que codifican para enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos (ácido graso sintasa y ACC1) (Hardie et al., 2003).

Además, la activación de AMPK también se ha visto que reduce la expresión (por mecanismos desconocidos) de varios factores de transcripción importantes, como la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides-1c (SREBP-1c) (Zhou et al., 2001), el factor nuclear de hepatocitos-4 α (HNF-4 α) (Leclerc et al., 2001), C/EBP α y PPAR- γ (Habinowski and Witters, 2001).

6.4.1. TRIP6

Las potenciales dianas de AMPK en el núcleo podrían incluir factores transcripcionales específicos, coactivadores o correpresores transcripcionales o componentes de la maquinaria transcripcional principal como la RNA polimerasa (Leff, 2003).

Un ejemplo de coactivador transcripcional regulado por AMPK es TRIP6, objeto de estudio en este trabajo.

TRIP6 (*T*hyroid *H*ormone *R*eceptor *I*nteracting *P*rotein *6*), también llamada ZRP1 (*Z*yxin-related protein 1) (Murthy et al., 1999), fue identificada por primera vez como una proteína capaz de interactuar de forma ligando-dependiente con el receptor de la hormona tiroidea (TR β_1) de rata, en un escrutinio de doble híbrido de levadura usando una genoteca de cDNA de células HeLa (Lee et al., 1995). En el trabajo de Lee *et al* se identificaron 15 proteínas denominadas TRIPs (*T*R-*i*nteracting *p*roteins),

capaces de interactuar con el TR β_1 , algunas sólo cuando la hormona tiroidea (T₃) estaba presente y otras sólo cuando estaba ausente. Casi todas las TRIPs (incluida TRIP6) también muestran de manera similar una interacción ligando-dependiente con el receptor de retinoides X (RXR), pero ninguna interacciona con el receptor de glucocorticoides.

Últimamente se ha relacionado más a TRIP6 con una familia de proteínas con dominios LIM que incluye a la zixina (Beckerle, 1986), ajuba (Goyal et al., 1999), *lipoma preferred partner* (LPP) (Petit et al., 1996) y *LIM Domain containing 1* (LIMD1) (Kiss et al., 1999). Los dominios LIM (*Lin-11*, *Isl-1* y *Mec-3*) son motivos de dedos de zinc ricos en cisteína que median interacciones proteína-proteína. TRIP6 presenta una región N-terminal rica en prolina seguida de tres dominios LIM en tándem en el extremo C-terminal (Yi and Beckerle, 1998) (Figura 8).

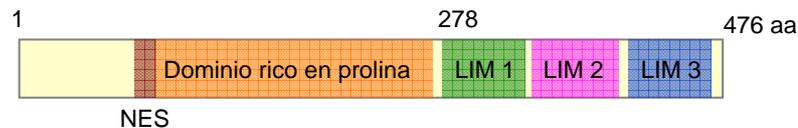


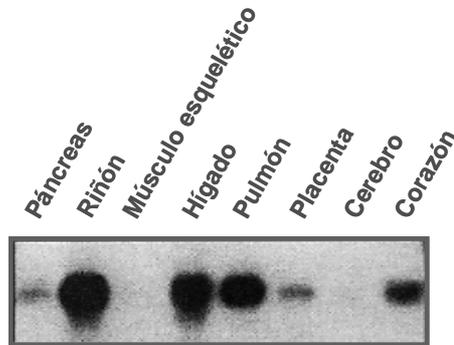
Figura 8: Diagrama esquemático de la estructura en dominios de TRIP6. Presenta una secuencia de exportación nuclear (NES) en la parte N-terminal, seguida de un dominio rico en prolina. En el extremo C-terminal presenta tres dominios LIM.

TRIP6 está presente en placas de adhesión focal, que son estructuras que se localizan bajo la membrana plasmática donde se ensamblan las fibras de actina y que están implicadas en motilidad celular. Pero, además, es capaz de viajar del citoplasma al núcleo, debido a regiones de señalización nuclear localizadas tanto en N- como en C-terminal y a una señal de exportación nuclear (NES, *Nuclear Exporting Sequence*) rica en leucinas (característica de las NES dependientes de la exportina Crm-1) que se localiza en su extremo N-terminal. También presenta varios dominios de activación transcripcional tanto en la parte N-terminal como en la parte C-terminal.

Sin embargo, no presenta capacidad de unirse al DNA *in vitro* (Wang and Gilmore, 2001).

TRIP6 interacciona con múltiples proteínas. Ha sido identificada como una proteína capaz de interactuar con la proteína fosfatasa de tirosinas citosólica hPTP1E (Murthy et al., 1999); con CasL/HEF1, una proteína de anclaje, miembro de la familia Cas, presente en las placas de adhesión focal (Yi et al., 2002); con el receptor 2 del ácido lisofosfatídico (LPA2R), implicado en el reordenamiento de la actina y la motilidad celular (Xu et al., 2004); con la endoglina, un componente del complejo del receptor del TGF- β (Sanz-Rodríguez et al., 2004) o con el supresor tumoral Scrib (Petit et al., 2005). Incluso se ha visto que TRIP6 se fosforila en la Tyr55 por mediación de la quinasa c-Src (Lai et al., 2005). Recientemente, también se ha publicado que TRIP6 se fosforila en la Ser92 (Olsen et al., 2006) y en la Tyr131 (Goss et al., 2006) mediante análisis a gran escala. Y aunque la función de TRIP6 todavía no se ha elucidado, siempre se ha propuesto como molécula responsable de transmitir señales entre las placas de adhesión focal y el núcleo. Además, también existen publicaciones recientes que apuntan a TRIP6 como un coactivador de los promotores regulados por NF- κ B (Kassel et al., 2004; Li et al., 2005), sugiriendo la posibilidad de que TRIP6 desempeñe un papel en regulación transcripcional.

TRIP6 se expresa en páncreas, riñón, hígado, pulmón o corazón, por lo que podría desarrollar funciones en estos tejidos. Sin embargo, no se expresa en músculo esquelético o cerebro (Lee et al., 1995; Murthy et al., 1999) (Figura 9).



Adaptado de Lee et al., 1995.

Figura 9: *Northern Blot* donde se muestra la expresión de TRIP6 en diferentes tejidos humanos.

7. AMPK y el metabolismo del glucógeno

Dentro de los efectos metabólicos que produce AMPK, una mención especial merece su implicación en la regulación del metabolismo del glucógeno.

El glucógeno es una de las formas más importantes de almacenamiento de energía de las que disponen los mamíferos. La acumulación de glucógeno es una respuesta fisiológica al incremento en la concentración de glucosa en sangre que se da tras una comida. La ruta bioquímica que permite la incorporación de una nueva unidad de glucosa a la molécula de glucógeno en formación implica la acción sucesiva de varias proteínas y enzimas.

La síntesis de una molécula de glucógeno se inicia sobre la glicogenina, una proteína que posee actividad autocatalítica para unir varias moléculas de UDP-glucosa. La cadena naciente se extiende por la adición secuencial de hasta ocho residuos de UDP-glucosa. En este punto, es donde entran en juego la glucógeno sintasa (GS), que cataliza la adición de residuos de glucosa a la cadena naciente de glucógeno a través de enlaces α -1,4-

glicosídicos usando UDP-glucosa como sustrato, y la enzima ramificante, que cataliza la formación de enlaces α -1,6-glicosídicos en los puntos de ramificación. La estructura final es esférica y muy homogénea; todas las cadenas tienen la misma longitud (de 12 a 14 residuos de glucosa) y todas, menos las externas, presentan dos ramificaciones α -1,6 (ver detalle en la Figura 10 A). En la degradación del glucógeno también participan dos enzimas: la glucógeno fosforilasa (GP), que rompe los enlaces α -1,4, y la enzima desramificante, que rompe los enlaces α -1,6 (Nelson, 2005).

7.1. Diferencias en el metabolismo del glucógeno según tejidos

En los mamíferos, los mayores depósitos de glucógeno, en cuanto a cantidad, se encuentran en el músculo esquelético y en el hígado, pero son muchos los tejidos capaces de sintetizar glucógeno. El músculo cardíaco y el músculo liso, el riñón, los astrocitos e incluso el tejido adiposo pueden sintetizar y acumular glucógeno (Roach, 2002).

La glucosa-6-fosfato que se libera del glucógeno en el músculo esquelético puede dirigirse a la glicólisis y ser utilizada como fuente de energía para la contracción muscular. En el hígado, la degradación del glucógeno tiene un propósito distinto: liberar glucosa a la sangre cuando los niveles de glucosa en sangre disminuyen, y esto es entre comidas. Esto requiere una enzima, la glucosa-6-fosfatasa, que está presente en hígado y riñón, pero no en otros tejidos (Nelson, 2005).

En mamíferos existen dos isoformas de la glucógeno sintasa, una se expresa en el músculo y en muchos otros tejidos y la otra en el hígado. No hay evidencias de que ambas isoformas se expresen en el mismo tipo celular. Las glucógeno sintasas de hígado y músculo comparten un 70% de identidad en sus secuencias (Figura 10 B) y generalmente tienen propiedades similares (Roach, 2002). Sin embargo, la isoforma muscular de la GS es capaz de translocarse del núcleo al citoplasma en respuesta a la glucosa, y del citoplasma al núcleo cuando las células no tienen glucosa (Ferrer et al., 1997).

En el músculo dos van a ser los procesos más regulados en la síntesis del glucógeno: el transporte de glucosa a la célula por el transportador GLUT4, y la formación de los enlaces α -1,4-glicosídicos por la glucógeno sintasa. En cambio, en el hígado, la glucosa entra a las células a favor de gradiente a través del transportador GLUT2 y van a ser la glucoquinasa y la glucógeno sintasa las que van a regular ese flujo (Roach, 2002).

Es ampliamente conocido que son los astrocitos los que almacenan la mayor parte del glucógeno que utiliza el cerebro como fuente de energía. Por lo tanto, parecía que las neuronas eran incapaces de sintetizar glucógeno. Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que las neuronas expresan la isoforma muscular de la GS, pero que ésta se encuentra fuertemente inhibida ya que se mantiene en su estado fosforilado (inactivo) (Brown, 2004; Vilchez et al., 2007).

7.2. Regulación de las enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno

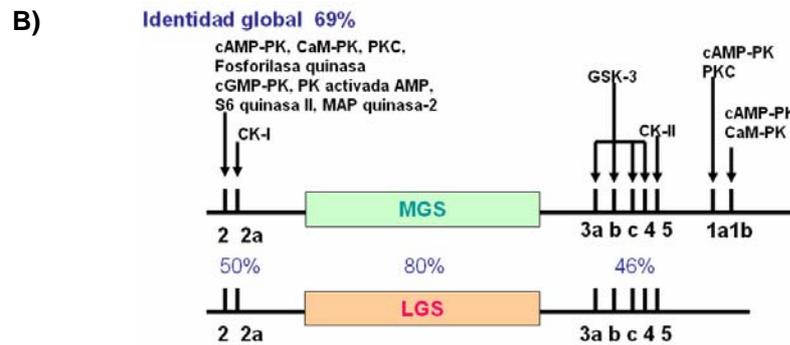
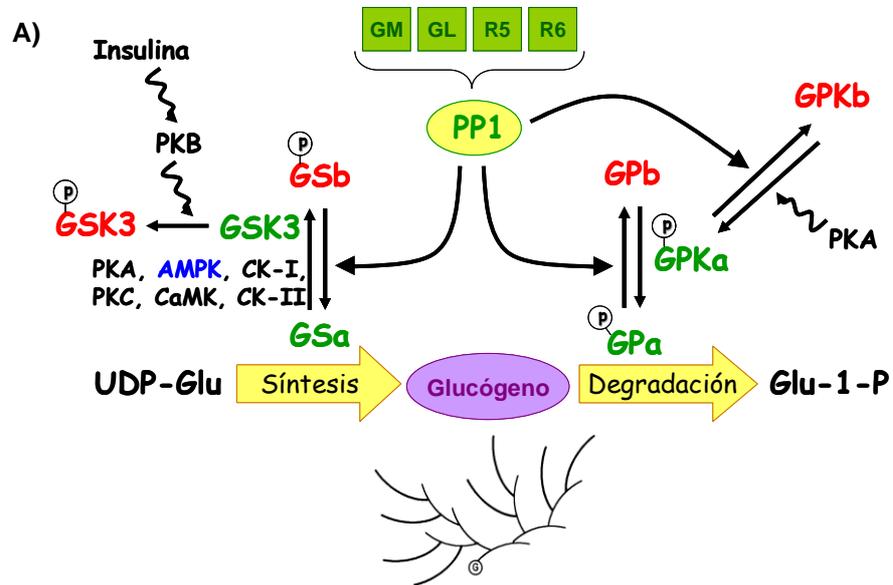
Tradicionalmente, la glucógeno sintasa, que cataliza el paso clave en la síntesis del glucógeno, ha sido considerada como la enzima que ejercía más control sobre esta ruta metabólica. De hecho, la actividad GS está muy regulada por fosforilación en múltiples sitios y por efectores alostéricos, principalmente, la glucosa-6-fosfato (G-6-P). Además, la reacción catalizada por la GS está regulada negativamente por la tasa de producción de glucógeno (Ferrer et al., 2003).

La fosforilación y defosforilación reversibles de la GS conducirán a su inactivación y activación, respectivamente. Por lo tanto, la activación de la GS tendrá lugar a través de la inactivación de quinasas que fosforilan a la GS y por activación de fosfatasas que la defosforilan. La GS está sujeta a fosforilación en 9 o más sitios (**Figura 10 B**). Dos sitios, los sitios 2 y 2a, que corresponden a la Ser7 y Ser10 de la GS de músculo esquelético de conejo, están localizados cerca del extremo N-ter. Al menos 7 sitios (sitios 3a-c, 4, 5, 1a-b) están localizados en los 100 últimos residuos del extremo C-ter. La fosforilación de los sitios 2, 2a, 3a y 3b generalmente disminuyen la actividad

más que la fosforilación de los restantes sitios, que tienen un menor o ningún efecto sobre la actividad GS *in vitro*. Notablemente, la fosforilación inicial del sitio 5 por la caseína quinasa 2 crea una secuencia de reconocimiento para la GS quinasa 3 (GSK3), que entonces, y secuencialmente, fosforila los sitios 4, 3c, 3b y 3a. Este fenómeno se denomina fosforilación jerárquica y también se ha demostrado que ocurre con los sitios del extremo N-ter de la GS, donde la modificación del sitio 2 por la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), AMPK u otras quinasas, es un prerrequisito para la fosforilación del sitio 2a por la caseína quinasa 1 (Nielsen and Wojtaszewski, 2004). La insulina va a ser quien desencadene la activación de la GS bloqueando la actividad de la GSK3 al fosforilarse por acción de la proteína quinasa B (PKB) (Nelson, 2005) (Figura 10 A).

Al igual que la GS, la glucógeno fosforilasa (GP) está regulada tanto por su unión a ligando como por fosforilación. Además, también está regulada de forma alostérica por AMP (sobretudo la isoforma muscular). La unión del AMP es cooperativa, se ve favorecida tras la fosforilación y compite con el ATP o la glucosa-6-P. La fosforilasa quinasa es la responsable de la fosforilación de la GP en la Ser14, y su activación está mediada por el aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelulares o por la fosforilación por parte de la proteína quinasa A (PKA) (Roach, 2002) (Figura 10 A).

La defosforilación por parte de la proteína fosfatasa de serinas y treoninas de tipo 1 (PP1) desempeña un papel central en la mediación de los efectos de la insulina en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. PP1 va a ser, por tanto, clave en la regulación hormonal del metabolismo del glucógeno, catalizando la defosforilación de la glucógeno sintasa (GS), de la glucógeno fosforilasa (GP) y de la fosforilasa quinasa (GPK). Estas reacciones de defosforilación promueven la síntesis neta de glucógeno activando la glucógeno sintasa e inhibiendo la fosforilasa (Fong et al., 2000) (Figura 10 A).



Adaptado de Ferrer et al., 2003.

Figura 10: Representación esquemática de la síntesis y degradación del glucógeno y de la regulación de la glucógeno sintasa (GS). A) Se ha representado la estructura del glucógeno ramificado a partir de la glicogenina y las enzimas responsables de la regulación del metabolismo del glucógeno aparecen en rojo en su estado inactivado y en verde en su estado activado. GM, GL, R5 y R6 son subunidades reguladoras de PP1. B) Comparación de las estructuras primarias de las isoformas muscular (MGS) y hepática (LGS) de la GS. Los sitios de fosforilación conocidos en los extremos N- y C-terminal se indican en la Figura, junto a las quinastas que fosforilan esos sitios *in vitro*.

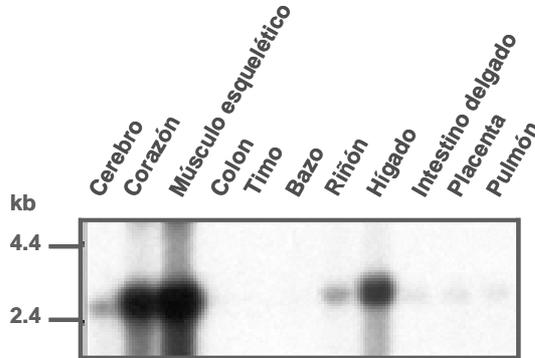
7.2.1. La proteína fosfatasa de tipo 1 (PP1) y sus subunidades reguladoras

PP1 se expresa de forma ubicua y reside en la mayoría de compartimentos celulares. Sin embargo, la activación hormonal de la enzima se restringe a sitios discretos como las partículas de glucógeno, sugiriendo que deben existir mecanismos que aseguren la regulación localizada de la enzima (Fong et al., 2000). Las subunidades que dirigen a PP1 al glucógeno fueron inicialmente propuestas como mediadoras de la activación de la proteína fosfatasa por la insulina. Sin embargo, últimamente se ha propuesto a estas subunidades como “andamiajes moleculares”, poniendo directamente en contacto a la enzima con sus sustratos en un complejo macromolecular. En este proceso, además, conferirían a la actividad PP1 especificidad de sustrato.

Varias proteínas diferentes son las responsables de dirigir a PP1 a las partículas de glucógeno. Las más estudiadas son GM/R3, que está presente tanto en músculo esquelético como en corazón; GL/R4, que se encuentra en hígado (y en humanos, también en músculo esquelético) y R5 y R6, que se encuentran más ampliamente distribuidas (Brady and Saltiel, 2001).

7.2.1.1. R5

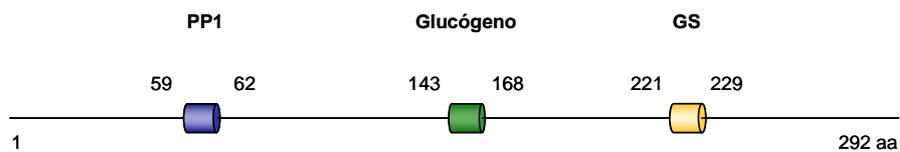
R5, el homólogo humano de la proteína presente en roedores PTG (*protein targeting to glycogen*), va a ser objeto de estudio en el presente trabajo. R5 se expresa de forma mayoritaria en todos los tejidos sensibles a insulina, especialmente en músculo esquelético, hígado y corazón (Printen et al., 1997) (Figura II).



Adaptado de Fernandez-Sanchez et al., 2003.

Figura 11: *Northern Blot* donde se muestra la expresión de R5 en diferentes tejidos humanos.

Además de unir a PP1 con el glucógeno, R5 también puede formar complejos con las enzimas que regulan el metabolismo del glucógeno y que son sustratos de PP1, como son la glucógeno sintasa, la glucógeno fosforilasa y la fosforilasa quinasa (Brady et al., 1997) (Figura 12). La sobreexpresión de R5 produce un incremento en la acumulación de glucógeno en líneas celulares y tejidos, señalando una importante función para esta proteína en la regulación del metabolismo del glucógeno (Fong et al., 2000).

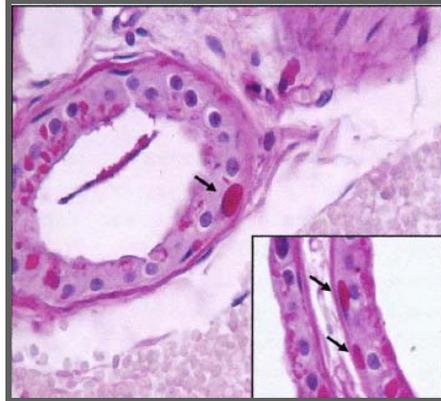


Adaptado de Fernandez-Sanchez et al., 2003.

Figura 12: Diagrama de R5 mostrando la localización de los dominios de unión a PP1, glucógeno y glucógeno sintasa (GS).

8. Enfermedad de Lafora

La epilepsia mioclónica progresiva de tipo Lafora es un desorden autosómico recesivo de consecuencias fatales caracterizado por la presencia de deterioro neurológico progresivo, mioclonía y epilepsia (Berkovic et al., 1986). La enfermedad de Lafora se manifiesta inicialmente durante la adolescencia (normalmente entre los 10 y los 17 años de edad) y conforme la enfermedad progresa, la mioclonía aumenta en frecuencia hasta llegar a ser constante. Una rápida y progresiva demencia lleva a los pacientes a un estado vegetativo y, finalmente, a la muerte, que se suele producir en la primera década desde la aparición de los primeros síntomas. La enfermedad de Lafora fue descrita por primera vez en 1911 por Gonzalo R. Lafora (Lafora, 1911a; Lafora, 1911b). Originariamente, él describió la presencia de cuerpos de inclusión intracelulares de poliglucosano, también llamados cuerpos de Lafora, en el cerebro y médula espinal de un paciente adolescente (Lafora, 1911b). Entonces se demostró que estos cuerpos de inclusión eran típicos de la enfermedad y que no se limitaban al sistema nervioso central (**Figura 13**), lo que sugería que la enfermedad podía ser un desorden generalizado relacionado con las glucogenosis. Más tarde se mostró que los cuerpos de Lafora tienen una composición que se asemeja al glucógeno o a la amilopectina, ya que tienen la misma estructura de polímero de residuos de glucosa unidos por enlaces α -1,4-glicosídicos; pero a diferencia del glucógeno, que tiene ramificaciones cada 8-12 residuos a través de enlaces α -1,6-glicosídicos, los cuerpos de Lafora presentan menos ramificaciones, lo que le confiere una estructura cristalina y los hace insolubles (Worby et al., 2006).



Adaptado de Van Heycop Ten Ham, 1974.

Figura 13: Cuerpos de Lafora. Tinción PAS sobre una muestra de tejido de una biopsia de piel axilar, donde se pueden observar los característicos cuerpos de inclusión en las células mioepiteliales de los acini de las glándulas apocrinas.

Los cuerpos de Lafora, además de en el sistema nervioso central, también se encuentran en retina, corazón, hígado, músculo y piel (Delgado-Escueta et al., 2001; Van Heycop Ten Ham, 1974). La enfermedad de Lafora es particularmente común en los países mediterráneos del sur de Europa y norte de África, en el sur de la India y en Oriente Medio (Fernandez-Sanchez et al., 2003).

8.1. Genes implicados en la enfermedad de Lafora

Se han identificado dos genes que se encuentran mutados en la enfermedad de Lafora. El primero es EPM2A (*epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene A*), que codifica para la proteína laforina y es responsable para, aproximadamente, el 48% de los casos de enfermedad de Lafora (Minassian et al., 1998; Serratosa et al., 1999). Laforina es una fosfatasa de especificidad dual que contiene un dominio de unión a carbohidratos (CBD, *Carbohydrate Binding Domain*) en el extremo N-ter, mientras que la actividad fosfatasa (DSPD, *Dual Specificity Phosphatase Domain*) reside en el extremo C-ter. De acuerdo con esto, laforina va a ser

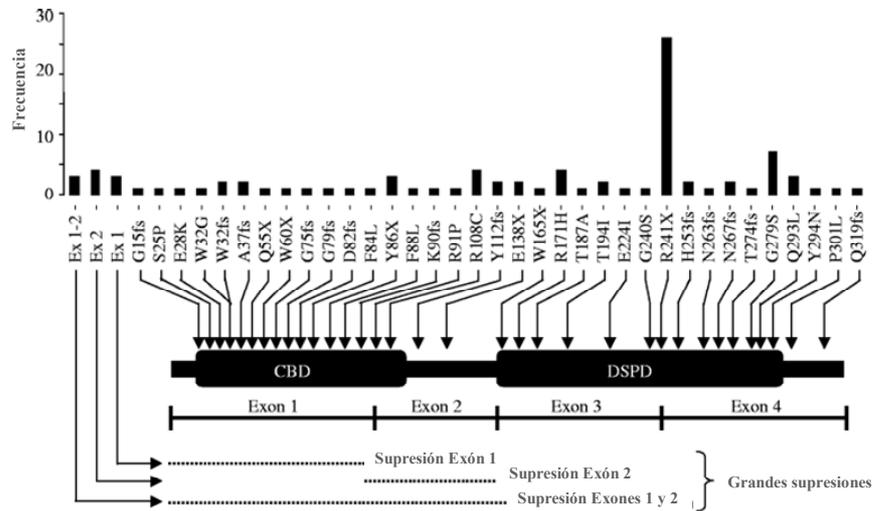
capaz de desempeñar dos funciones, ya que va a poder unir polisacáridos complejos así como hidrolizar fosfoserinas/treoninas y fosfotirosinas de sus sustratos (Ganesh et al., 2000; Wang et al., 2002).

El segundo gen implicado en la enfermedad de Lafora, EPM2B, codifica para una E3 ubiquitina ligasa, denominada **malina**, y es responsable de, aproximadamente, un 40% de los casos de enfermedad de Lafora (Chan et al., 2003; Gentry et al., 2005). Malina es una proteína multidominios que contiene un dominio RING (*Really Interesting New Group of Proteins*) y seis dominios NHL. Los dominios RING son indicativos de una clase de E3 ubiquitina ligasas, mientras que los dominios NHL forman una hélice β de seis hojas y están implicados en interacciones entre proteínas (Pickart, 2001). Una de las funciones críticas de malina va a ser la regulación de la concentración celular de laforina, ya que malina interacciona con laforina conduciendo a su degradación mediada por ubiquitina (Gentry et al., 2005).

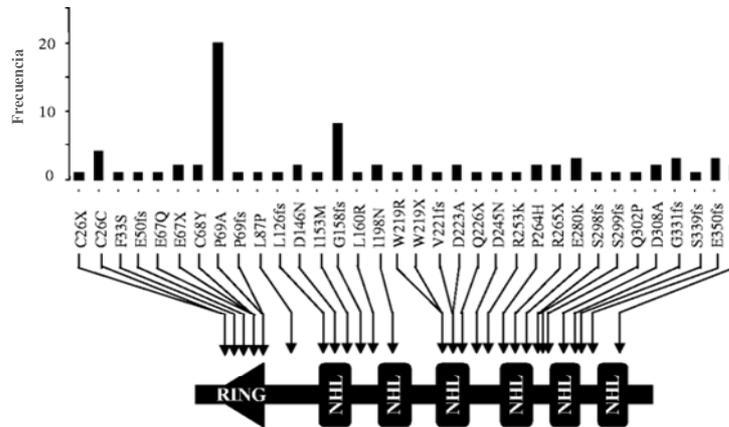
El 10% restante de las familias con enfermedad de Lafora no presentan mutaciones en los genes EPM2A o EPM2B, sugiriendo la presencia de un tercer locus para la enfermedad de Lafora (Ganesh et al., 2006).

Hasta la fecha se han descrito 38 mutaciones distintas y varios polimorfismos en el gen de laforina. Las mutaciones se distribuyen entre los 4 exones conocidos del gen EPM2A. Destaca la prevalencia de la mutación R241X dentro de la población española (Ganesh et al., 2006) (**Figura 14**). También se han descrito hasta 34 mutaciones y varios polimorfismos en el gen de malina, siendo la mutación P69A la más prevalente. Las mutaciones se reparten entre el dominio RING, los dominios NHL, así como en las regiones de unión entre los dominios (**Figura 14**).

Laforina



Malina



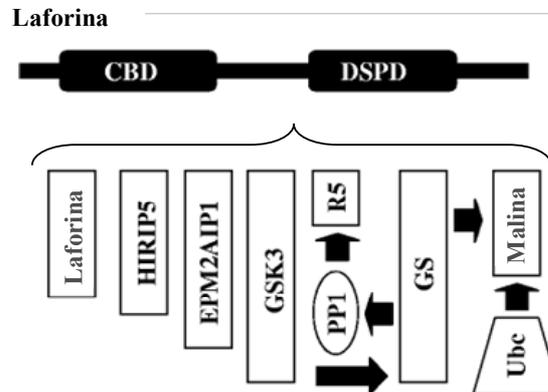
Adaptado de Ganesh et al., 2006.

Figura 14: Representación de 38 mutaciones conocidas en el gen de laforina (parte superior) y de 34 mutaciones conocidas en el gen de malina (parte inferior). Los diagramas muestran la organización en dominios de las proteínas, la posición de las distintas mutaciones encontradas en las familias con enfermedad de Lafora y su frecuencia (número de familias independientes con una determinada mutación). La Figura también muestra la organización genómica del gen de laforina y las grandes supresiones asociadas con la enfermedad de Lafora.

Tanto los pacientes con mutaciones en el gen EPM2A como los pacientes con mutaciones en el gen EPM2B presentan manifestaciones clínicas similares. Sin embargo, los pacientes asociados al gen EPM2A parecen tener un desarrollo clínico más severo, ya que los pacientes deficientes en EPM2B tienden a vivir más que aquellos con defectos en EPM2A (Gomez-Abad et al., 2005).

8.2. Mecanismo de la enfermedad

Una de las características de la enfermedad de Lafora es la presencia de los cuerpos de poliglucosanos, que contienen un 80-93% de glucosa y 6% de proteínas. Esto indica la existencia de una ruta bioquímica desconocida, relacionada con el metabolismo del glucógeno, defectos en la cual resultan en la acumulación de los cuerpos de poliglucosanos de la enfermedad de Lafora. Curiosamente, los cuerpos de Lafora se encuentran más comúnmente en los órganos con un mayor metabolismo de la glucosa, como son el cerebro, el corazón y el hígado, y todos estos tejidos expresan laforina de forma abundante en condiciones normales. Además, también se ha demostrado que el dominio CBD de laforina la dirige al glucógeno y a los cuerpos de Lafora *in vitro* (Ganesh et al., 2006). También se ha demostrado que laforina interacciona con R5, una de las subunidades reguladoras de PPI (Fernandez-Sanchez et al., 2003), implicada en la regulación de las enzimas del metabolismo del glucógeno (ver apartado 7.2.1.1. de esta Introducción). Usando aproximaciones *in vitro* e *in vivo*, también se ha visto que malina interacciona con la GS y que laforina defosforila a la GSK3, el principal inhibidor de la GS (Ganesh et al., 2006), aunque esta última acción de laforina no ha podido ser reproducida por otros autores. También se sabe que laforina, además de con R5, GS, GSK3 y malina, interacciona con al menos dos proteínas más: HIRIP5, una proteína citosólica relacionada con el metabolismo del hierro, y EPM2AIP1, una proteína de función desconocida (Ganesh et al., 2003; Ianzano et al., 2003) (Figura 15).



Adaptado de Ganesh et al., 2006.

Figura 15: Diagrama que muestra las distintas proteínas que interaccionan con laforina.

Objetivos

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el estudio de **nuevas dianas de actuación de AMPK**.

Para ello se realizaron dos aproximaciones:

- En primer lugar se abordó un escrutinio de doble híbrido en levadura utilizando AMPK $\alpha 2$ como cebo. Uno de los clones positivos fue identificado como TRIP6 y su estudio se presenta en el apartado de Resultados I.

- En una segunda etapa se estudió la interacción entre AMPK y R5 y las proteínas relacionadas con la enfermedad de Lafora, laforina y malina, basándonos en el nexo común de su relación funcional con el metabolismo del glucógeno. Estos datos se presentan en el apartado de Resultados II.

Materiales y Métodos

1. Reactivos comunes de Biología Molecular

Los reactivos de Biología Molecular utilizados en el laboratorio han sido proporcionados por J.T. Baker, Fluka, Merck, Panreac, Roche y Sigma.

2. Material biológico y condiciones de crecimiento

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de levadura utilizadas fueron:

- TAT7: *MAT α ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80 LYS2::LexAop-HIS3, URA3::LexAop-lacZ*, cedida por R. Sternglanz (State University of New York, Stony Brook, USA).
- CTY10.5d: *MAT α ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80 URA3::LexAop-lacZ*, cedida por R. Sternglanz (State University of New York, Stony Brook, USA).
- FY250: *MAT α his3 leu2 trp1 ura3 SUC2*, cedida por F. Winston (Harvard Medical School, Boston, USA).
- FY250 *snf1 Δ 10*: derivado de FY250 con la mutación *snf1 Δ 10* (Sanz et al., 2000).
- FY250 *hvk2 Δ ::TRP1*: derivado de FY250 donde el gen *hvk2* ha sido sustituido por el marcador *TRP1* (Sanz et al., 2000).
- BY4741 *gac1 Δ ::KanMX*: *MAT α his3 leu2 TRP1 ura3*, donde el gen *gac1* se ha sustituido por *KanMX4*, cedida por el Dr. Joaquín Ariño (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona).

Los cultivos de levadura se crecieron en medio rico YPD [extracto de levadura 1% (p/v), peptona bacteriológica 2% (p/v), glucosa 2% (p/v)] o en medio sintético completo SC [YNB (Difco™ *Yeast Nitrogen Base*) 0,67%, mezcla de aminoácidos al 0,095%] con los suplementos adecuados para mantener la selección de los plásmidos (Rose, 1990) y con diferentes fuentes

de carbono (glucosa o rafinosa) usando las concentraciones indicadas en cada caso. La temperatura de crecimiento fue de 30° C. Los cultivos se crecieron en medio líquido con agitación continua en un agitador orbital a 200 r.p.m. Los medios sólidos se prepararon con agar al 2% (p/v).

La transformación de levadura se llevó a cabo usando el protocolo del acetato de litio (Ito et al., 1983). La cepa de levadura correspondiente se creció en YPD o en SC con los requerimientos adecuados hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ($D.O_{600}$) entre 0,3 y 0,8. Tras centrifugar, las células se resuspendieron en tampón TE-LiAc (acetato de litio 0,1 M pH 7,5, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A 50 μ L de las células en tampón TE-LiAc, se le adicionó 2 μ L de DNA de esperma de salmón (Sigma) como DNA vehículo, 3 μ L de cada plásmido y 300 μ L de PEG-TE-LiAc [tampón TE-LiAc al que se le añade PEG al 40% (p/v)]. Tras una incubación a 30° C durante 30 min, se efectuó un choque térmico a 42° C durante 5 min en presencia de DMSO al 10% (v/v). Después, se lavaron las células con agua estéril y se sembraron en las placas de SC correspondientes al requerimiento de aminoácidos para la selección de los plásmidos. Las células se dejaron crecer a 30° C durante tres días.

2.2. Cultivos celulares

El material plástico de cultivos en el que se han sembrado las células ha sido proporcionado por Sarstedt. Todo el trabajo que ha implicado manipulación de los cultivos celulares ha sido realizado en una campana de bioseguridad de nivel II-A.

El crecimiento de los cultivos celulares se ha llevado a cabo en condiciones constantes de temperatura (37° C) y concentración de CO₂ (5%) y en atmósfera húmeda. Los pases necesarios para el mantenimiento de los cultivos celulares se han realizado mediante tripsinización [Tripsina-EDTA, 200 mg/L Versene (EDTA), 500 mg/L Tripsina 1:250, BioWhittaker].

Para conservar durante largo tiempo las células, éstas se resuspendieron en el correspondiente medio de cultivo al que se le adicionó un 10% (v/v) de DMSO y se pasaron a un criotubo donde se congelaron

lentamente a -80° C. Posteriormente se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido. La descongelación se llevó a cabo sometiendo los criotubos a un baño de 37° C, y después se diluyeron las células rápidamente en el correspondiente medio para ser centrifugadas y sembradas con su medio de cultivo.

Se han utilizado las siguientes líneas continuas y cultivos primarios de células de mamífero:

- **COS7:** Células procedentes de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Fueron cedidas por la Dra. Marta Casado (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC).

Se crecieron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, BioWhittaker) 4,5 g/L de glucosa, completo (es decir, suplementado con 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y glutamina 2 mM, de BioWhittaker) y 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS, de GIBCO) inactivado (durante 30 min a 56° C).

Para su transfección se utilizó el reactivo FuGene 6 (Roche), que es un agente de transfección basado en lípidos que se acomplejan con el DNA y lo transportan al interior de las células.

- **HEK293T:** Células de riñón humano embrionario. Fueron cedidas por la Dra. Marta Casado (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC).

Se crecieron en medio DMEM completo y 10% (v/v) de FBS inactivado.

Se transfectaron usando el método del fosfato cálcico (Graham and van der Eb, 1973). Para placas de 100 mm de diámetro, se mezcló 600 μ L de HBS 2 x [NaCl 280 mM, Hepes (*N*-[2-Hydroxyethyl] piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]) 50 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, pH 7,05], 5 μ g de cada plásmido y 60 μ L de CaCl₂ 2 M. Tras esperar 20 min para que se formaran los precipitados de fosfato cálcico, se añadió lentamente a las placas donde se habían sembrado las células el día anterior.

- **CHO-IR:** Células de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) expresando el receptor humano de la insulina. Fueron cedidas por el Dr.

Joan J. Guinovart (Institut de Recerca Biomédica, Parc Científic de Barcelona, Universidad de Barcelona).

Se han crecido en medio Ham's F-12 (GIBCO) (con una concentración de glucosa de 10 mM) suplementado con 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y glutamina 2 mM, además de con Hepes 10 mM y 10% (v/v) de FBS inactivado. También se les ha añadido el antibiótico Geneticina (G418-sulfato, GIBCO) para la selección del receptor de insulina humano (IR) a una concentración de 0,7 mg/mL.

Estas células han sido transfectadas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen), que es un reactivo basado en lípidos catiónicos capaces de atravesar la membrana plasmática.

- **FTO-2B:** Línea celular procedente de hepatoma de rata (Gomis et al., 2002). Fueron cedidas por el Dr. Joan J. Guinovart (Institut de Recerca Biomédica, Parc Científic de Barcelona, Universidad de Barcelona).

Se han crecido en medio DMEM completo y 10% (v/v) de FBS inactivado.

Para obtener una buena eficiencia de transformación estas células fueron infectadas con adenovirus.

- **Fibroblastos:** Se han utilizado cultivos primarios de fibroblastos procedentes de piel de dos pacientes de enfermedad de Lafora, portando la mutación **Y86X** (sustitución de la Tyr86 por un codón de parada) o **R241X** (sustitución de la Arg241 por un codón de parada). Estos fibroblastos fueron obtenidos, transformados (usando el plásmido T22, que contiene el antígeno SV40T) y cedidos por el Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid). Como controles sanos se utilizaron fibroblastos GM003349 (Coriell Cell Repositories, U.S.A., cedidos por el Dr. Erwin Knecht, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia) procedentes de piel humana y GM09503 (Coriell Cell Repositories, U.S.A., cedidos por el Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid) procedentes de piel humana de abdomen.

Todos los fibroblastos se crecieron en medio DMEM completo y 15% (v/v) de FBS inactivado.

Los fibroblastos fueron infectados con adenovirus.

3. Plásmidos

3.1. Vectores de expresión en levadura

Las proteínas de fusión con LexA se generaron usando el vector pEG202 (Golemis, 1997), que lleva el marcador *HIS3* o el vector pBTM116 (Vojtek, 1997) que lleva *TRPI* de marcador.

Las fusiones con GAD (*GAL4 Activation Domain*) se obtuvieron a partir del vector pACTII (Legrain et al., 1994) que, además, lleva una etiqueta HA (Hemaglutinina) y cuyo marcador es *LEU2*.

Las proteínas etiquetadas con tres HA se construyeron usando el vector pWS93 (Song and Carlson, 1998), que lleva el marcador *URA3*. El plásmido pSK93 también lleva tres etiquetas HA pero como marcador lleva *TRPI* (Sanz et al., 2000).

Otro plásmido utilizado fue pSH18-18 (que contiene 6 operadores LexA fusionados a lacZ, con el marcador de selección *URA3*, proporcionado por R. Brent de Massachusetts General Hospital, Boston, USA).

El plásmido pEG-GST (Mayordomo and Sanz, 2001) se utilizó para fusionar GST (*Glutathion-S-Transferasa*) en el extremo N-terminal de la proteína clonada, que lleva como marcador de selección *HIS3*.

3.2. Vectores de expresión en bacterias

Los plásmidos pGEX-3X y pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences) se utilizaron para expresar proteínas de fusión con GST en *Escherichia coli*.

pUC18, al ser un plásmido de tamaño reducido, se utilizó para introducir mutaciones por PCR en la secuencia clonada.

3.3. Vectores de expresión en células de mamífero

El vector pEGFP-N1 (Promega), que fue amablemente cedido por el Dr. Jordi Pérez-Tur (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC) fue utilizado para expresar fusiones a GFP (*Green Fluorescent Protein*) en el extremo C-ter de la proteína clonada.

Para expresar proteínas etiquetadas con *myc* o con HA en células de mamífero, utilizamos el vector pCMV-*myc* o pCMV-HA (BD-Biosciences).

Los vectores utilizados en los ensayos de actividad luciferasa son pBIND, que produce una fusión a GBD (*Gal4 DNA Binding Domain*) y que aporta además el gen de la luciferasa de *renilla* como control interno de la transfección; pACT, que produce una fusión a AD (VP16 *Activating Domain*) y pG5-luc (5 x UAS_{GAL4}-luciferasa) y proceden de “*CheckMate Mammalian two-hybrid System*” de Promega.

El plásmido pNF- κ B-luc (5 x UAS_{NF- κ B}-luciferasa) (BD Biosciences) fue proporcionado por la Dra. M. J. Díaz-Guerra (Universidad de Castilla La Mancha, Albacete).

El plásmido pcDNA3.1 fue cedido por el Dr. Benoit Viollet (INSERM U567, CNRS URM8104, Institut Cochin, Dpt GDPM, Paris, France).

3.4. Clonajes y subclonajes

Para la preparación del vector y del inserto, los fragmentos de DNA digeridos con el correspondiente enzima de restricción o amplificados por PCR, fueron purificados utilizando el *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences). Los vectores digeridos con un único enzima de restricción fueron tratados con fosfatasa alcalina (Roche) para defosforilar los extremos 5' y evitar así su religación. Para la construcción de los plásmidos se utilizó T4 DNA ligasa (Roche) y *Escherichia coli* DH5 α como cepa hospedadora. Se creció en medio Luria-Bertani, [LB, peptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,5] y para la selección de plásmidos se utilizó 100 μ g/mL de

ampicilina (o Kanamicina para el caso del vector pEGFP-N1). La temperatura de crecimiento fue de 37° C. Los cultivos se crecieron en medio líquido con agitación continua en un agitador orbital a 200 r.p.m. Los medios sólidos se prepararon con agar al 2% (p/v).

E. coli se transformó mediante electroporación a 1.700 voltios y la extracción de DNA plasmídico se realizó utilizando *GFXTM Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences). Para la obtención de DNA a gran escala para su uso en la transfección de células de mamífero se utilizó *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN). El DNA se diluyó en tampón de carga 6 x (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%) para su análisis en gel de agarosa D-1: media EEO (Pronadisa) al 0,7% (p/v) en tampón TAE [Tris 0,04 M, ácido acético 6% (v/v), EDTA 0,05 M pH 8,0].

3.4.1. Construcciones utilizadas en el trabajo con TRIP6

La secuencia completa de TRIP6 humano (de 1.431 pb), obtenida por PCR a partir del plásmido pBS-TRIP6-A7 [amablemente cedido por la Dra. M. C. Beckerle, Huntsman Cancer Institute and Dept. of Biology, Univ. Utah, Salt Lake City, USA, (Yi and Beckerle, 1998)] utilizando los oligos TRIP6-1 y TRIP6-2 (Tabla 1), se subclonó en los sitios *EcoRI/SaI* de los vectores pWS93, pEG202, pGEX-6P-1, y pUC18. En el caso de pACTII, la secuencia de TRIP6 cortada con *SaI* se subclonó en el sitio *XhoI*. El mismo inserto se utilizó para clonarlo en el sitio de restricción *SaI* del vector pBIND. Para obtener la fusión TRIP6-GFP, se eliminó el codón de parada de la secuencia de TRIP6 mediante PCR utilizando los oligos TRIP6-1 y TRIP6-GFP (Tabla 1) y se subclonó en los sitios *EcoRI/SaI* del vector pEGFP-N1.

Los diferentes mutantes de TRIP6 en posibles sitios de fosforilación fueron obtenidos mediante PCR utilizando la *Pfu Turbo DNA polimerasa* (Stratagene) y oligonucleótidos específicos. Tras comprobar que no se había introducido cambios indeseados mediante secuenciación, se subclonaron en los sitios *EcoRI/SaI* de los vectores pEG202 y pGEX-6P-1. Los plásmidos pEGFP-N1-TRIP6 S101A y pEGFP-N1 TRIP6 S102A se obtuvieron reemplazando, en pEGFP-N1-TRIP6, el fragmento *EcoRI/BstXI* de pUC-18-

TRIP6 S101A y pUC18-TRIP6 S102A, donde se había introducido la correspondiente mutación mediante PCR utilizando los oligonucleótidos adecuados (Tabla 1). La construcción pBIND-TRIP6 S102A se hizo por PCR a partir del plásmido pUC18-TRIP6 S102A con los oligonucleótidos TRIP6-1 y TRIP6-2 (Tabla 1) y subclonando en el sitio *SaI* de pBIND.

La parte N-terminal (de los aminoácidos 1 al 290) de TRIP6, de 870 pb, y la parte C-terminal (de los aminoácidos 291 al 476) de TRIP6, de 561 pb, también fueron subclonados en los sitios *EcoRI/SaI* de los vectores pEG202 y pGEX-6P-1. Las construcciones con TRIP6 (1-290) S101A y TRIP6 (1-290) S102A se obtuvieron a partir de PCR utilizando los oligonucleótidos TRIP6-1 y TRIP6 1-290 (Tabla 1) sobre el plásmido pUC18-TRIP6 S101A o pUC18-TRIP6 S102A y subclonando en los sitios *EcoRI/SaI* de los vectores pEG202 y pGEX-6P-1.

Para construir las fusiones LexA-THR β y LexA-RXR α se amplificaron los fragmentos del aminoácido 164 al 456 de THR β (881 pb) y del aminoácido 198 al 462 de RXR α (797 pb), mediante PCR, a partir de las secuencias humanas completas de ambos receptores, cedidas por el Dr. Domingo Baretino (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC). Estos fragmentos comprenden el dominio de unión a ligando de los receptores, y excluyen el dominio de unión a DNA (Lee et al., 1995). THR β fue subclonado en pEG202 en los sitios *BamHI/SaI* y RXR α fue también subclonado en pEG202 en los sitios *EcoRI/SaI*.

El fragmento que contiene el dominio C-terminal (aa 296-351, de 170 pb) de LPA2R se obtuvo por PCR utilizando los oligonucleótidos adecuados (Tabla 1) y el plásmido pCMV-FLAG2-LPA2R como molde [cedido por la Dra. F. T. Lin, Dept. of Cell Biology, Univ. of Alabama, Birmingham, USA, (Xu et al., 2004)]. El fragmento fue digerido con *BamHI/SaI* y subclonado en pEG202. El fragmento conteniendo el dominio interno de CasL/HEF1 [del aa 163 al 315, de 459 pb, (Yi et al., 2002)] se amplificó por PCR con los oligonucleótidos apropiados (Tabla 1) y usando el clon nº 4820745 de IMAGE Consortium como molde. El fragmento se digirió con *EcoRI/SaI* para subclonarlo en pEG202.

La secuencia codificante de AMPK $\alpha 2$ de rata (de 1.935 pb) se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos alpha2-13 y alpha2-4 (Tabla 1) a partir del plásmido pGBT9-AMPK $\alpha 2$ (amablemente cedido por el Dr. D. Carling, Cellular Stress Group, MRC Clinical Sciences Centre, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, London, W12 0NN, U.K.). Posteriormente se digirió con *SaI* y se subclonó en pACT cortado con *SaI* para obtener la construcción pACT-AMPK $\alpha 2$. A partir de esta construcción, el inserto cortado con *SaI* se subclonó en pCMV-*myc* cortado con *XhoI* para obtener la construcción pCMV-*myc*-AMPK $\alpha 2$. pEG-GST-AMPK $\alpha 2$ se obtuvo subclonando un fragmento *EcoRI* procedente de pEG202-AMPK $\alpha 2$, donde se había subclonado el fragmento *EcoRI* conteniendo la secuencia de AMPK $\alpha 2$ de pGBT9-AMPK $\alpha 2$.

El plásmido pSK93-AMPK $\alpha 2$ KD T172D se construyó clonando un fragmento *BamHI/SaI* (que contenía el dominio quinasa de AMPK $\alpha 2$, del aminoácido 1 al 312, de 900 pb) amplificado por PCR con los oligonucleótidos alpha2-3 y alpha2-2 (Tabla 1) a partir de pUC18-AMPK $\alpha 2$ T172D, donde la mutación T172D fue introducida por PCR usando como molde el plásmido pUC18-AMPK $\alpha 2$ (Gimeno-Alcaniz and Sanz, 2003) y los oligonucleótidos adecuados (Tabla 1).

La construcción pEG202-AMPK $\gamma 1$ se obtuvo subclonando la secuencia codificante de AMPK $\gamma 1$ de rata (de 1.053 pb) amplificada por PCR con los oligonucleótidos adecuados (Tabla 1) a partir del plásmido pcDNA3-AMPK $\gamma 1$ (amablemente cedido por el Dr. D. Carling, Cellular Stress Group, MRC Clinical Sciences Centre, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, London, W12 0NN, U.K.) y digerida con *NotI/XhoI*.

Otras construcciones utilizadas en este trabajo son: pBTM116-AMPK $\alpha 2$, pBTM116-AMPK $\alpha 2$ KD, pBTM116-AMPK $\alpha 2$ RD, pBTM116-AMPK $\beta 1$, pBTM116-AMPK $\beta 2$ y pBTM116-SNF1 (Gimeno-Alcaniz and Sanz, 2003).

Todas las construcciones obtenidas fueron confirmadas por secuenciación a partir de ambos extremos.

Material es y Métodos

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados. Los nuevos sitios de restricción y los codones que introducen una mutación están subrayados. Los codones de inicio y parada están en negrita.

pACTII-1:	5' AAT ACC ACT ACA ATG GAT GAT G 3'
pACTII-2:	5' GAT GCA CAG TTG AAG TGA ACT TGC 3'
TRIP6-1:	5' GGG <u>CGT CGA CTA</u> <u>GAA TTC</u> ATG TCG GGG CCC ACC TGG CTG 3'
TRIP6-2:	5' GGG <u>CGT CGA CTA</u> TCA GCA GTC AGT GGT GAC GGT 3'
TRIP6 S101A-1:	5' GAC GCC GAG ATA GAC TTG CTA <u>GCA</u> AGC ACG CTG GCC GAG CTG AAT G 3'
TRIP6 S101A-2:	5' C ATT CAG CTC GGC CAG CGT GCT <u>TGC</u> TAG CAA GTC TAT CTC GGC GTC 3'
TRIP6 S102A-1:	5' C GAG ATA GAC TTG CTG AGT <u>GCT</u> ACG CTG GCC GAG CTG AAT GG 3'
TRIP6 S102A-2:	5' CC ATT CAG CTC GGC CAG CGT <u>AGC</u> ACT CAG CAA GTC TAT CTC G 3'
TRIP6 S272A-1:	5' CAC GAC ATG AAC CAC CCG CCA <u>GCT</u> GGG GAG TAC TTT GGC CAG TGT 3'
TRIP6 S272A-2:	5' ACA CTG GCC AAA GTA CTC CCC <u>AGC</u> TGG CGG GTG GTT CAT GTC GTG 3'
TRIP6 T341A-1:	5' GCC ACC CTG GAG AAA TGT GCC <u>GCA</u> TGC TCC CAG CCC ATC CTG GAC 3'
TRIP6 T341A-2:	5' GTC CAG GAT GGG CTG GGA GCA <u>TGC</u> GGC ACA TTT CTC CAG GGT GGC 3'
TRIP6 S461A-1:	5' CAC ATC TTG TGC AAG GCC TGC <u>GCC</u> GCC TGG CGC ATC CAG GAG CTC 3'
TRIP6 S461A-2:	5' GAG CTC CTG GAT GCG CCA GGC <u>GGC</u> GCA GGC CTT GCA CAA GAT GTG 3'
TRIP6 1-290:	5' GCG <u>CGT CGA CTA</u> CCC ATC CCC AAC CAC ATC TTC 3'
TRIP6 291-476:	5' GGG <u>CGT CGA CTA</u> <u>GAA TTC</u> GCT GGG GTT GTG GCC TTT GAT CGC GTC 3'
TRIP6-GFP:	5' GCG <u>AGT CGA CGC</u> GCA GTC AGT GGT GAC GGT G 3'

HEFI-1:	5' GGG <u>CGT CGA</u> CTA <u>GAA TTC</u> TAC GTA TAC GAG TAC CCA TCC AGA 3'
HEFI-2:	5' GGG <u>CGT CGA</u> CTA TCA TGC GTC GTT CTG AGA GCC CAC 3'
LPA2R-1:	5' GGG <u>CGG ATC</u> CTA TCT TGC CGA GAT GCT GAG ATG C 3'
LPA2R-2:	5' GGG <u>CGT CGA</u> CTA CTA AAG GGT GGA GTC CAT CAG 3'
THRBI-1:	5' GGG <u>CGG ATC</u> CTA TGC ATC TAT GTT GGC ATG GCA 3'
THRBI-2:	5' GGG <u>CGT CGA</u> CTA CTA ATC CTC GAA CAC TTC CAG 3'
RXRA-1:	5' GGG <u>CCT CGA</u> GTA <u>GAA TTC</u> ATG GGC ATG AAG CGG GAA GCC 3'
RXRA-2:	5' GGG <u>CCT CGA</u> GTA CTA AGT CAT TTG GTG CGG CGC 3'
Alpha2-2:	5' G CGG <u>GTC GAC</u> TTA GTA TAA ACT GTT CAT CAC TTC TGA TTC 3'
Alpha2-3:	5' CGC <u>GGG ATC</u> CGT ATG GCT GAG AAG CAG AAG CAC G 3'
Alpha2-4:	5' GCC <u>GGT CGA</u> CTT TCA ACG GGC TAA AGC AGT GAT AAG 3'
Alpha2-11:	5' CTT <u>CGA ATT</u> CGA ATG GCT GAG AAG CAG AAG CAC G 3'
Alpha2-13:	5' GGG CGT <u>CGA CTA</u> ATG GCT GAG AAG CAG AAG CAC G 3'
Alpha2 T172D-1:	5' CA GAT GGT GAA TTC CTA CGA <u>GAC</u> AGC TGT GGA TCG CCA AAT TAT G 3'
Alpha2 T172D-2:	5' C ATA ATT TGG CGA TCC ACA GCT <u>GTC</u> TCG TAG AAA TTC ACC ATC TG 3'
Gammal-1:	5' GA <u>GGG CGG CCG</u> CCA ATG GAG TCG GTT GCT GCA G 3'
Gammal-2:	5' GGG <u>CTC GAG</u> TTA CAG CAG GCA GGC AGT GAG 3'
GM-1:	5' G <u>GGG ATC</u> CTT ATG GAG CCT TCT GAA GTA CCT AG 3'
GM-2:	5' C TCG <u>GTC GAC</u> TTA CTT CTT TTT GAC AGA CTC TTT TTG 3'

Material es y Métodos

GL-1:	5' G <u>GGG ATC CTT</u> ATG ATG GCT GTG GAC ATC GAG TAC 3'
GL-2:	5' CTC <u>GGT CGA CTA</u> GTA GTA GGG CCC TAG CTT TTC 3'
R5-1:	5' GCG <u>TGG ATC CCC</u> ATG AGG CTT TGC TTG GCA CAT TC 3'
R5-4:	5' GCC <u>GAA TTC</u> TCA ATA CAC ATT TTT CAT ATA GAC ACA G 3'
R5 S35A-1:	5' G AAT AAA TTA AAG CCC CTG AAA <u>GCA TGC</u> CTC AAT ATA AAA CAC AAA GCC 3'
R5 S35A-2:	5' GGC TTT GTG TTT TAT ATT GAG <u>GCA TGC</u> TTT CAG GGG CTT TAA TTT ATT C 3'
R5 S35D-1:	5' G AAT AAA TTA AAG CCC <u>CTT AAG GAC</u> TGT CTC AAT ATA AAA CAC AAA GCC 3'
R5 S35D-2:	5' GGC TTT GTG TTT TAT ATT GAG ACA <u>GTC CTT AAG</u> GGG CTT TAA TTT ATT C 3'
R5 S69A-1:	5' GTG TTT GCT GAC TCC AAG GGC CTC <u>GCG</u> CTC ACT GCG ATC CAT GTC TTC 3'
R5 S69A-2:	5' GAA GAC ATG GAT CGC AGT GAG <u>CGC</u> GAG GCC CTT GGA GTC AGC AAA CAC 3'
R5 S77A-1:	5' CTC ACT GCG ATC CAT GTC TTC <u>GCG</u> GAC CTC CCA GAA GAA CCA GCG 3'
R5 S77A-2:	5' CGC TGG TTC TTC TGG GAG GTC <u>CGC</u> GAA GAC ATG GAT CGCAGT GAG 3'

3.4.2. Construcciones utilizadas en el trabajo con R5

El plásmido pACTII-GM se obtuvo subclonando un fragmento *Bam*HI/*Sa*I de pUC18-GM, donde se había introducido la secuencia de GM de conejo (de 3.330 pb) amplificada por PCR utilizando los oligonucleótidos adecuados (Tabla 1) a partir del plásmido pcDNA3-FLAG-rabGM (cedido por el Dr. D.L. Brautigan, Center for Cell Signaling and Department of Microbiology, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, Virginia 22908).

pACTII-GL se obtuvo subclonando un fragmento *Bam*HI/*Sa*I, que contenía la secuencia humana de GL (de 858 pb), amplificado por PCR usando como molde el clon nº 13484-G21 IMAGE *Consortium* y los oligonucleótidos de la **Tabla 1**, en el vector pACTII cortado con *Bam*HI/*Xho*I.

El plásmido pACTII-R5, que contenía la secuencia humana de R5 (de 879 pb), fue amablemente cedido por el Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid), así como el plásmido pGEX-A-R5 (1-183), que expresa una fusión a GST de los 183 primeros aminoácidos de R5. A partir del plásmido pGEX-A-R5 (1-183), los oligonucleótidos de mutagénesis y los oligonucleótidos R5-1 y R5-4 (**Tabla 1**), se generaron las mutaciones S35A, S69A y S77A que se clonaron en los sitios *Bam*HI/*Eco*RI del vector pGEX-3X, para obtener las construcciones pGEX-R5 (1-183) S35A, pGEX-R5 (1-183) S69A y pGEX-R5 (1-183) S77A.

Para obtener el plásmido pACTII-R5 S35A, se obtuvo un fragmento *Bam*HI/*Pst*I de pGEX-R5 (1-183) S35A que se sustituyó por el fragmento *Bam*HI/*Pst*I que se eliminó de pACTII-R5. A partir de pACTII-R5 se subclonó un fragmento *Bam*HI/*Xba*I en el plásmido pUC18, para poder obtener el mutante R5 S35D, mediante PCR con los oligonucleótidos adecuados (**Tabla 1**). El fragmento *Bam*HI/*Sa*I de pUC18-R5 S35D fue subclonado en el sitio *Bam*HI/*Xho*I del plásmido pACTII para obtener la construcción pACTII-R5 S35D.

A partir de pACTII-R5, pACTII-R5 S35A y pACTII-R5 S35D el fragmento *Sfi*I/*Bgl*II de cada uno de los plásmidos anteriores fue subclonado en el plásmido pCMV-HA para obtener los consecuentes derivados.

AMPK $\alpha 2$ amplificado por PCR a partir de pGBT9-AMPK $\alpha 2$ y utilizando los oligonucleótidos alfa2-11 y alfa2-4 (**Tabla 1**) se cortó con *Eco*RI/*Sa*I para introducirlo en el vector pACTII cortado con *Eco*RI/*Xho*I. El plásmido pcDNA3-AMPK $\alpha 2$ T172D se obtuvo digiriendo un fragmento *Eco*RI de pUC18-AMPK $\alpha 2$ T172D (explicado en el apartado 3.4.1. de Materiales y Métodos), y subclonando en el plásmido pcDNA3.1.

Materialles y Métodos

Los plásmidos pcDNA3-AMPK β 2 y pcDNA3-AMPK γ 1 fueron proporcionados por el Dr. D. Carling (Cellular Stress Group, MRC Clinical Sciences Centre, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, London, W12 0NN, U.K.).

pCMV-HA-AMPK α 2 se obtuvo clonando el fragmento *Sa*I procedente de pACT-AMPK α 2 (explicado en el apartado 3.4.1. de Materiales y Métodos) e introduciéndolo en el sitio *Xho*I de pCMV-HA.

Las construcciones pSK93-AMPK α 2 KD T172D, pCMV-*myc*-AMPK α 2 y pEG202-AMPK γ 1 han sido ya descritas en el apartado 3.4.1. de Materiales y Métodos.

pBTM116-AMPK α 2, pBTM116-AMPK β 2, pACT11-AMPK β 2 y pACT11-AMPK γ 1 están descritas en Gimeno-Alcaniz and Sanz, 2003.

pEG202-laforina se obtuvo subclonando el fragmento *Bam*HI/*Sa*I de pGBT9-laforina (amablemente cedido por el Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid) en pEG202. pCINeo-laforina, pGEX-laforina y pACT11-malina también fueron proporcionados por el Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid). pBTM116-malina se obtuvo subclonando un fragmento *Sma*I/*Bam*HI procedente de pGBT9-malina (amablemente cedido por el Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid).

A partir del plásmido pECFP-N1-hPPI α (cedido por la Dra. Ada García-Gimeno, Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC), la secuencia humana de la subunidad catalítica (α) de PPI (993 pb) se digirió con *Eco*RI y *Bam*HI para clonarla en los sitios *Eco*RI/*Bg*II del vector pCMV-*myc*. El plásmido pBTM116-PPI α también fue amablemente cedido por la Dra. Ada García-Gimeno (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC).

Todas las construcciones obtenidas fueron confirmadas por secuenciación a partir de ambos extremos.

4. Infección con adenovirus

Todo el trabajo que ha conllevado la manipulación de adenovirus se ha realizado en un laboratorio de bioseguridad de nivel P-2 y en una campana de bioseguridad de nivel II-A.

La infección con los correspondientes adenovirus se realizó en 1 mL de medio DMEM completo conteniendo sólo 0,5% (v/v) de FBS para placas de 60 mm de diámetro. Se han utilizado los siguientes adenovirus, que todos ellos expresan la proteína clonada bajo el control del promotor CMV:

- Ad-GFP (10^{11} pfu/mL): expresa la proteína GFP.
- Ad-GFP-PTG (R5) (2×10^{11} pfu/mL): expresa la fusión de PTG de ratón a GFP.
- Ad-laforina (2×10^{12} pfu/mL): expresa laforina humana.
- Ad-malina (4×10^{12} pfu/mL): expresa malina humana etiquetada con HA.

Todos ellos cedidos por el Dr. Joan J. Guinovart (Institut de Recerca Biomédica, Parc Científic de Barcelona, Universidad de Barcelona).

- Ad-AMPK $\alpha 1$ D157A D.N. (10^{11} pfu/mL): que expresa la isoforma $\alpha 1$ de AMPK con la mutación D157A que impide la actividad quinasa.

Cedido por la Dra. Fabienne Fougère (INSERM Unit 671, Université Paris 6, Centre de Recherches Biomedicales des Cordeliers, Paris, France).

Dos horas tras la infección, el medio conteniendo los adenovirus se reemplazó por medio DMEM completo con 0,5% (v/v) de FBS.

4.1. Amplificación de los adenovirus

En primer lugar, realizamos una pre-amplificación infectando con 100 μ L del virus a amplificar en una placa de 60 mm de diámetro donde se había sembrado el día anterior alrededor de 1.000.000 de células Ad293 (cedidas por el Dr. Joan J. Guinovart, Institut de Recerca Biomédica, Parc Científic de Barcelona, Universidad de Barcelona). Esta línea celular

contiene los genes víricos Ad5 E1A y E1B que complementan la ausencia de esta región, esencial para el ciclo lítico, en el adenovirus recombinante.

La infección se hizo en 1 mL final de medio de infección [DMEM completo con 0,5% (v/v) de FBS inactivado]. Dos horas después de la infección, se reemplazó el medio por 4 mL de medio fresco [DMEM completo con 0,5% (v/v) de FBS inactivado]. Al día siguiente, se chequeó la infección comparando en el microscopio óptico de contraste de fases el estado de las células con un control sin infectar, y cuando la mayoría de las células estaban infectadas, se congeló la placa a -20° C. Después, se descongeló la placa y se recogió el medio y las células con ayuda de un rascador y se pasó todo a un tubo donde se congeló por segunda vez. Se repitió el ciclo de congelación y descongelación hasta 4 veces. Antes de la última congelación, se centrifugaron para eliminar los restos celulares y una vez congeladas por cuarta vez, se guardaron a -20° C hasta el momento de la amplificación.

En la amplificación se infectaron 5 placas de 100 mm de diámetro donde se había sembrado 500.000 células Ad293 tres días antes. Los 4 mL de sobrenadante de cultivo procedentes de la pre-amplificación se llevaron a 20 mL finales con DMEM completo con 0,5% (v/v) de FBS inactivado y se repartieron 4 mL a cada placa para llevar a cabo la infección. Dos horas después, se cambió el medio por 10 mL de DMEM completo con 0,5% (v/v) de FBS inactivado. Al día siguiente, cuando la mayoría de las células estaban infectadas (comparando el estado de las células con un control sin infectar), se congelaron las placas a -20° C. Después se descongelaron, se recogieron las células y se pasaron, junto con el medio, a un tubo donde se volvieron a congelar por segunda vez. De nuevo, se repitió el ciclo de congelación y descongelación hasta cuatro veces, centrifugando para eliminar restos celulares antes de la última congelación y, por último, se hicieron alícuotas que se guardaron a -20° C.

4.2. Titulación adenoviral

Para establecer el título de los adenovirus se utilizó el método TCID₅₀ (*Tissue Culture Infectious Dose 50*), basado en la estimación del título viral a partir de un estudio a tiempo final de diluciones seriadas de un virus y la aparición del efecto citopático (CPE, *cytophatic effect*) en células Ad293.

Para realizar el ensayo, se sembraron células Ad293 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10⁴ células por pocillo en medio DMEM completo con 2% (v/v) de FBS. Posteriormente, se añadió 100 µL de las diferentes diluciones del virus (de 10⁻⁹ a 10⁻¹⁶). En los pocillos control (sin infectar) se añadió la misma cantidad de medio. Transcurridos 10 días, se contaron el número de pocillos que presentaban CPE para cada dilución. Para calcular el TCID₅₀/mL se utilizó el método estadístico KÄRBER:

$$T = 10^{1+d(S-0,5)}$$

d = log 10 del factor de dilución empleado.

S = suma de las frecuencias de CPE encontradas para cada dilución.

Una vez calculado el valor de TCID₅₀/mL, se obtuvo el título viral:

$$PFU/mL = 10^{TCID50 - 0,7}$$

5. Análisis de proteínas

5.1. Electroforesis, transferencia e inmunodetección (Western Blot)

La metodología de *Western Blot* empleada ha sido la descrita en “*Current Protocols in Protein Science*” (Coligan, 2003). Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE usando geles de diferentes porcentajes de poliacrilamida (del 8 al 12%). Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga 2 x [Tris:HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (v/v), azul de bromofenol 0,04 mg/mL, ditioneitol (DTT) 31 mg/mL] y se hirieron durante 3 minutos. La electroforesis se realizó en un sistema *mini-protean Electrophoresis System* (Bio-Rad) a 15-20 miliamperios

Materiales y Métodos

constantes y en tampón compuesto por glicina 0,2 M, Tris 25 mM, SDS 0,1% (p/v).

La transferencia se realizó a una membrana de PVDF (*Immobilon Transfer Membranas*, Millipore) durante una hora (para geles de 0,75 mm de grosor) o 90 minutos (para geles de 1,5 mm de grosor) a 100 voltios constantes, y en tampón compuesto por glicina 0,1 M, Tris 12,5 mM, metanol 20% (v/v).

El bloqueo de la membrana se hizo en leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS-T [Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, *Tween-20* 0,1 % (v/v)] durante 45 min a temperatura ambiente en agitación, o durante toda la noche a 4° C.

La inmunodetección se realizó con el anticuerpo de la **Tabla 2** especificado en cada caso. Los anticuerpos se diluyeron en leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS-T y, tras tres lavados con TBS-T durante 10 min, la membrana se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario (**Tabla 2**), realizándose posteriormente otros tres lavados con TBS-T de 10 min.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas analizadas por SDS-PAGE. Se especifica la procedencia, la dilución utilizada, el tipo de anticuerpo y el anticuerpo secundario que necesitan.

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Tipo	Anticuerpo Secundario
Anticuerpos primarios				
Anti-actina	Sigma	1:800	policlonal	Anti-conejo
Anti-AMPK α	Cell Signaling	1:1.000	policlonal	Anti-conejo
Anti-fosfo-AMPK α (T172P)	Cell Signaling	1:1.000	policlonal	Anti-conejo
Anti-GFP *	Immunokontakt	1:5.000	policlonal	Anti-conejo
Anti-GST-HRP	Amersham Biosciences	1:10.000	policlonal	—

Anti-GS LI *	Cedido por el Dr. Joan J. Guinovart (García-Rocha et al., 2001)	1:10.000	policlonal	Anti-conejo
Anti-MGS3 *	Cedido por el Dr. Joan J. Guinovart (Cid et al., 2005)	1:1.000	policlonal	Anti-conejo
Anti-HA	Roche Applied Sciences	1:10.000	monoclonal	Anti-ratón
Anti-HA-HRP	Sigma	1:10.000	monoclonal	—
Anti-laforina A7	Cedido por el Dr. S. Rdguez. de Córdoba (Fernandez-Sanchez et al., 2003)	1:500	monoclonal	Anti-ratón
Anti-myc	BD-Biosciences	1:1.000	monoclonal	Anti-ratón
Anti-TRIP6	Bethyl lab.	1:1.000	policlonal	Anti-conejo
Anticuerpos secundarios				
Anti-conejo-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:10.000	policlonal	—
Anti-ratón-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:10.000	policlonal	—

* En lugar de diluirse en leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS-T, se diluyeron en BSA al 3% (p/v) en PBS-T [NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 4 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4, Tween-20, 1% (v/v)].

Los anticuerpos fueron detectados utilizando el reactivo de quimioluminiscencia ECL o ECL Plus (Amersham Biosciences).

5.2. Desnudado de membranas (*Stripping*)

En los casos donde se necesitó revelar frente a más de un anticuerpo, las membranas se sometieron a *Stripping*. Para ello, se incubaron durante 30 min a 50° C en SDS 2% (p/v), Tris·HCl 65 mM pH 6,8 y β-mercaptoetanol 0,7% (v/v). Después se realizaron tres lavados en TBS-T durante 10 min y se

procedió de nuevo a bloquear la membrana y a incubarla con el nuevo anticuerpo.

5.3. Electroforesis bidimensional

Las células CHO-IR se transfectaron con los correspondientes plásmidos usando Lipofectamina 2000. En el caso del tratamiento con AICAR (*Toronto Research Chemicals*), éste se añadió a las células, 18 horas tras las transfección, en una concentración final de 0,5 mM durante 6 horas. 24 horas después de la transfección se hicieron los extractos en tampón de lisis [urea 9,7 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 20 mM]. La cantidad de proteína total se valoró mediante el método Bradford [Bio-Rad *Protein Assay*, basado en (Bradford, 1976)]. Para el tratamiento con λ -fosfatasa, las células se recogieron en tampón λ -fosfatasa con $MnCl_2$ 2 mM y los extractos se cuantificaron con el sistema *Dc Protein Assay*, de Bio-Rad [basado en el método Lowry (Lowry et al., 1951) para cuantificar proteínas en presencia de agentes reductores y detergentes]. 50 μ g de extracto en tampón λ -fosfatasa conteniendo $MnCl_2$ 2 mM se trató a 30^o C durante 30 min con 50 unidades de λ -fosfatasa (New England Biolabs). Una vez transcurrida la reacción, el tampón λ -fosfatasa se intercambió por tampón de lisis utilizando el sistema *Microcon* YM 10 (Millipore).

La fusión HA-R5 se analizó por 2-DE usando un instrumento IPGphor (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweeden). Para la primera dimensión (isoelectroenfoque, IEF), 50 μ g de proteína total en 100 μ L de urea 9,7 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 20 mM, tampón IPG 0,5% (v/v) y azul de bromofenol 0,5% (v/v), se cargó en una tira IPG *ImmobilineTM DryStrip* pH 6-11, de 7 cm, previamente hidratada. La hidratación se realizó con un tampón compuesto por urea 8 M, CHAPS 2% (p/v), DTT 20 mM, tampón IPG 0,5% (v/v) y azul de bromofenol 0,5% (v/v), durante toda la noche anterior a temperatura ambiente por hidratación pasiva. El IEF se realizó en las siguientes condiciones: 500 V durante 30 min o 250 V/h, 1.000 V durante 30 min o 500 V/h y 5.000 V durante 80 min o 6.666 V/h. Una vez finalizado, las tiras se guardaron a -20^o C hasta la realización de la segunda dimensión.

Antes de llevarla a cabo, las tiras se equilibraron en tampón compuesto por Tris·HCl 50 mM pH 8,8, urea 6 M, SDS 2% (p/v), glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (v/v) y DTT 20 mM, durante 15 min a temperatura ambiente y, seguidamente, en Tris·HCl 50 mM pH 8,8, urea 6 M, SDS 2% (p/v), glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (v/v) y yodoacetamida 25 mg/mL, durante 15 min a temperatura ambiente. La segunda dimensión se realizó mediante un SDS-PAGE en geles de 10% de acrilamida, posteriormente transferido e inmunodetectado con anti-HA-HRP.

6. Doble híbrido

La técnica de doble híbrido fue diseñada por Stanley Fields (Fields and Song, 1989) como una herramienta para identificar proteínas que se asociaran en un sistema *in vivo*. Esta técnica permite caracterizar interacciones ya conocidas, pero indudablemente su aplicación más valiosa es la identificación de nuevas interacciones proteína-proteína. El sistema se fundamenta en un ensayo genético en el que la interacción entre dos proteínas se mide por la reconstitución de un factor de transcripción funcional en levadura. El fundamento molecular está basado en el carácter modular de factores de transcripción que presentan dos dominios funcionales independientes: un dominio de unión a secuencias específicas de DNA y un dominio activador de la transcripción. El dominio de unión a DNA dirige al factor de transcripción a unas secuencias específicas de un promotor, y el dominio de activación facilita el ensamblaje del complejo de iniciación, permitiendo la transcripción del gen reportero.

El término doble híbrido deriva de la utilización de dos proteínas híbridas recombinantes. La proteína de interés (proteína cebo) se fusiona a un dominio de unión al DNA, y la segunda proteína híbrida (proteína presa) se fusiona a un dominio de activación de la transcripción. La asociación física entre las proteínas cebo y presa permite la formación de un heterodímero con capacidad de unir DNA específicamente y de activar la transcripción génica. La reconstitución del factor de transcripción se produce por una fusión física no covalente entre la proteína cebo y la

proteína presa. Esta unión se ensaya en una levadura con un fondo genético particular, que contiene genes reporteros bajo el control de la UAS (*Upstream Activation Sequence*) correspondiente al dominio de unión al DNA (LexA o Gal4) del vector en el que se construye la proteína cebo. La mayoría de cepas existentes tienen dos genes reporteros independientes: un gen que permite una selección nutricional (biosíntesis de histidina, *HIS3*) y otro que codifica para una enzima cuya actividad es cuantificable (*lacZ*).

La aplicación más extendida del ensayo de doble híbrido es la búsqueda de nuevas interacciones con una proteína cebo de interés (Fields and Song, 1989). Para ello, se emplea como fuente de proteínas presa una genoteca de cDNA fusionada en pauta de lectura a un dominio de activación (generalmente al dominio de activación de Gal4, GAD).

6.1. Escrutinio genético de doble híbrido en levadura

Llevamos a cabo un escrutinio genético de doble híbrido (Fields and Song, 1989) en busca de proteínas que interaccionaran con LexA-AMPK $\alpha 2$ (pBTM116-AMPK $\alpha 2$) en la cepa de levadura TAT7. Esta cepa se transformó con una genoteca de cDNA de páncreas humano comercial clonada en el vector pACTII (Clontech).

Los transformantes se crecieron en condiciones selectivas [SC, 2% (p/v) glucosa sin Trp, Leu ni His] y, posteriormente, se determinó la actividad β -galactosidasa en filtro (ver más adelante en el apartado 6.2. de Materiales y Métodos).

Los plásmidos de los clones positivos se obtuvieron por extracción del DNA total de levadura y se usaron para transformar *E. coli*. La extracción del DNA total de levadura se hizo a partir de cultivos crecidos en SC con los requerimientos necesarios. Las células se rompieron mediante agitación con perlas de vidrio en 0,2 mL de tampón compuesto por Triton X-100 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM, Tris·HCl 10 mM pH 8,0, Na₂EDTA 1 mM y con 0,2 mL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). El DNA se recogió en el sobrenadante y se precipitó con tres volúmenes de etanol absoluto. Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados usando los oligonucleótidos

pACTII-1 y pACTII-2 (Tabla 1) y las secuencias fueron comparadas con las bases de datos del NCBI utilizando la aplicación informática *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

6.2. Ensayos β -galactosidasa

La actividad β -galactosidasa se ensayó en filtro y en células permeabilizadas. Para los ensayos en filtro (Yang et al., 1992), se crecieron clones individuales en medio SC sólido con los requerimientos necesarios para mantener los plásmidos. Las células se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (Millipore) y se congelaron a -80°C para permeabilizarlas. A continuación, el filtro se puso en contacto con tampón Z [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, KCl 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM y β -mercaptoetanol 2,7% (v/v)] y el sustrato artificial X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, de Roche Applied Science) 1 mg/mL, y se observó la aparición de color azul sobre los clones a 30°C .

Los ensayos cuantitativos (Ludin et al., 1998) se realizaron con la cantidad de células equivalente a 0,5 unidades de D.O.₆₀₀ en 1 mL de tampón Z con 25 μL de SDS 0,1% (p/v) y 25 μL de cloroformo. Como sustrato se utilizó 200 μL de ONPG (o-nitrofenil β -D-galactopiranosido, de SIGMA) 4 mg/mL y la reacción se paró con 500 μL de Na_2CO_3 1 M a tiempos controlados. El color amarillo desarrollado a 30°C se midió a D.O.₄₂₀ y se expresó en unidades Miller, aplicando la siguiente transformación:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{\text{D.O.}_{420} \times 1.000}{t \text{ (min)}} \times 2$$

En los casos en los que se ha medido la actividad β -galactosidasa en condiciones de alta glucosa [4% (p/v) glucosa], una alícuota de las células ha sido lavada dos veces con H_2O y cambiadas a un medio de baja glucosa [0,05% (p/v) glucosa] durante tres horas, obteniéndose después una nueva medida de actividad β -galactosidasa.

Los ensayos de actividad β -galactosidasa con el receptor de hormonas tiroideas (THR β) y el receptor de retinoides X (RXR α) se realizaron en ausencia y en presencia de los ligandos 3,3',5-ácido triyodotiroacético (triac, análogo de la hormona tiroidea) 1 μ M (Sigma) y 9-cis ácido retinoico (9-cis RA) 1 μ M (cedido por el Dr. Domingo Baretino, Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC) como se indica en Lee et al., 1995.

7. Arrastre con GST (*Pull-down*)

La cepa de levadura FY250 transformada con los plásmidos pEG-GST-AMPK α 2 (GST-AMPK α 2) y pWS93-TRIP6 (HA-TRIP6) se creció en SC con los requerimientos necesarios para mantener los plásmidos y en 2% (p/v) de glucosa. El tampón de extracción que se utilizó fue Tris·HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 0,1% (v/v), glicerol 10% (v/v), DTT 1 mM, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM, y una mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science). La cantidad de proteína total se midió mediante Bradford (BioRad *Protein Assay*). 500 μ g de proteína total obtenida de los extractos de levadura se unieron a una matriz de glutatión-sefarosa (Amersham Biosciences) durante 1 h a 4^o C con agitación. A continuación, la resina se lavó 3 veces con el tampón de extracción (Tomas-Cobos and Sanz, 2002). Las proteínas retenidas se analizaron por SDS-PAGE seguido de transferencia e inmunodetección.

8. Ensayo de coimmunoprecipitación en líneas celulares continuas

El día anterior a la transfección se sembraron 1.500.000 células HEK293T en placas de 100 mm de diámetro. Las células se transfectaron con los plásmidos correspondientes para cada ensayo mediante el protocolo del fosfato de calcio. 24 horas después de la transfección, en el caso en el que se indica, las células fueron tratadas con leptomicina B 20 ng/mL, 15 min (Sigma). En todos los casos, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis [Tris·HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 10 mM, EDTA 2 mM, glicerol 15% (v/v),

nonidet P40 (*nonylphenyl-polyethylene glycol*) 1% (v/v), una mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science) y PMSF 1 mM]. Las células se lisaron por sucesivos ciclos de congelación y descongelación. Los lisados celulares se centrifugaron a 10.000 x *g* durante 15 min y la fracción soluble se recogió y se cuantificó utilizando el sistema *Dc Protein Assay* de Bio-Rad. Se incubó 300 µg de extracto crudo con el anticuerpo pertinente: Anti-TRIP6 1:500, Anti-*myc* 1:250 o Anti-HA 1:250, en un volumen final de 500 µL (completado con PBS) durante, al menos, 4 horas a 4° C. Las proteínas que se unieron al anticuerpo se retuvieron durante toda la noche a 4° C en 50 µL de proteína A-sefarosa IPA-300 (*RepliGen*) y, tras varios lavados de 10 min a 4° C con PBS y con PBS + NP-40 0,05% (v/v), fueron analizadas mediante SDS-PAGE e inmunodetección. De los extractos crudos se cargó 1/10 del volumen utilizado en la coimmunoprecipitación para comprobar la expresión de la proteína.

9. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

La purificación de las proteínas de fusión GST-TRIP6, GST-TRIP6 S272A, GST-TRIP6 T341A, GST-TRIP6 S461A, GST-TRIP6 (1-290), GST-TRIP6 (291-476), GST-TRIP6 (1-290) S101A y GST-TRIP6 (1-290) S102A, expresadas en *E. coli*, se llevó a cabo a partir de 500 mL de LB con ampicilina. Los transformantes se crecieron a 37° C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó un valor de 0,5. Entonces se añadió 0,1 mM de isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG), y los cultivos se incubaron a 25° C durante toda la noche con agitación. Las células se recogieron y resuspendieron en 20 mL de tampón de sonicación [Hepes:NaOH 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, glicerol 10% (v/v), Triton X-100 0,1% (v/v), DTT 2 mM, PMSF 2 mM, y una mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science)]. Las células se rompieron por sonicación en 15 ciclos de 30 segundos a 11 micrones alternados por 1 min en hielo y las proteínas de fusión se purificaron pasando los extractos por una columna de glutatión-sefarosa (Amersham Biosciences) de 1 mL de volumen de lecho

(García-Gimeno et al., 2003). Las proteínas se eluyeron de la columna con glutatión 25 mM y las muestras se guardaron a -80°C .

Para eliminar la etiqueta de GST de la fusión GST-TRIP6, la proteína se purificó como se ha descrito anteriormente y una vez unida a la resina se trató con *PreScission Protease* (Amersham Biosciences), enzima que corta entre la etiqueta GST y la proteína. La proteína se recuperó en el eluido y se guardó a -80°C .

La purificación de las fusiones GST-R5 (1-183), GST-R5 (1-183) S35A, GST-R5 (1-183) S69A y GST-R5 (1-183) S77A y GST-laforina, expresadas en *E. coli*, se llevó a cabo a partir de 150 mL de LB con ampicilina. Los transformantes se crecieron a 37°C hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó un valor de 0,5. Entonces se añadió 0,1 mM de IPTG, y los cultivos se incubaron a 25°C durante toda la noche con agitación. Las células se recogieron y resuspendieron en 10 mL de PBS, PMSF 2 mM, y una mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science). Las células se rompieron por sonicación y, tras centrifugar, el sobrenadante se incubó con 900 μL de glutatión-sefarosa (Amersham Biosciences) durante toda la noche a 4°C . Tras varios lavados de 10 min a 4°C con PBS, las proteínas se recuperaron con glutatión 25 mM y se alicuotaron y guardaron a -80°C .

10. Ensayos de fosforilación *in vitro*

Para los ensayos de fosforilación se utilizó tampón compuesto por Hepes/NaOH 20 mM pH 7,0, MgCl_2 10 mM y DTT 1 mM. La reacción se llevó a cabo con 50 mU de AMPK (Cell Signaling Solutions), AMP 300 μM y 100 μM de una mezcla 1:4 de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mmol, proporcionado por Amersham Biosciences) y ATP. Tras 1 hora a 30°C , la reacción se paró calentando las muestras a 95°C durante tres minutos con tampón de carga. A continuación, las proteínas se analizaron por SDS-PAGE, el gel se secó con bomba de vacío a 80°C y se analizó por autorradiografía. Como control de carga también se analizaron por SDS-PAGE cantidades equivalentes de las mismas diluciones de las proteínas utilizadas como sustrato, se tiñeron con tinción Coomassie [Coomassie 0,25% (p/v), metanol 5% (v/v), ácido acético

10% (v/v)] y los lavados se hicieron con metanol 5% (v/v), ácido acético 10% (v/v).

11. Localización subcelular de las fusiones a GFP en líneas celulares continuas

El día anterior a la transfección se sembraron 200.000 células COS7 en placas de 35 mm de diámetro donde previamente se habían depositado tres cubreobjetos redondos. El plásmido pEGFP-N1-TRIP6 y sus derivados se introdujeron en las células utilizando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche). Al día siguiente de la transfección se realizaron los tratamientos si así se indica y durante los tiempos especificados en cada caso. Las células se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) y los núcleos se tiñeron con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol, Sigma) 1:1.000 en PBS. Los cubreobjetos se montaron con Fluoromount-G (Southern Biotech) sobre los portaobjetos. Las imágenes de TRIP6-GFP y DAPI se capturaron directamente por microscopía de fluorescencia usando un microscopio Leica DMRXA2 y el programa informático Leica FW4000.

12. Ensayos de actividad luciferasa

El día anterior a la transfección se sembraron 425.000 células HEK293T en cada pocillo de placas de 6 pocillos. Los plásmidos que se necesitaron para cada ensayo se introdujeron en las células mediante el protocolo de transfección del fosfato de calcio. En los ensayos a los que se añadieron diferentes tratamientos a las células, éstos se adicionaron a las 18 horas tras la transfección. El AICAR (Toronto Research Chemicals) se añadió a una concentración final de 0,5 mM durante 6 horas. El TNF α (Sigma) se usó a una concentración final de 10 ng/mL durante 6 horas y/o AICAR (0,5 mM) durante la última hora de tratamiento. En todos los casos, 24 horas después de la transfección, las células se lisaron y la actividad luciferasa se cuantificó usando el “*Dual-Luciferase Reporter Assay System*” de Promega, y un luminómetro Wallac 1420 VICTOR.

El “*Dual-Luciferase Reporter Assay System*” utiliza dos luciferasas distintas: La *firefly* luciferasa es una proteína monomérica de 61 kDa proveniente de la luciérnaga *Photinus pyralis* que no necesita modificaciones postraduccionales para ser catalíticamente activa y oxidar a la luciferina hasta oxiluciferina en una reacción bioluminiscente. La técnica se basa en cuantificar la expresión de la *firefly* luciferasa a través de la reacción de bioluminiscencia que ésta cataliza. La reacción es lineal en un amplio rango de concentraciones, dentro del cual la cantidad de luz emitida será proporcional a la expresión de la *firefly* luciferasa. Normalmente, la actividad luciferasa se normaliza respecto a la expresión de otra proteína para corregir diferencias debidas a la eficiencia de la transfección. En nuestro caso, el sistema utilizado incorporaba el gen de la *renilla* luciferasa bajo un promotor independiente en el vector pBIND. La *renilla* luciferasa es una proteína monomérica de 36 kDa proveniente de la medusa *Renilla reniformis* que también cataliza una reacción luminiscente y que es muy diferente a la *firefly* luciferasa en cuanto a estructura y requerimientos de sustratos debido a su distinto origen evolutivo. Estas diferencias hacen posible discriminar eficazmente entre la señal de uno u otro enzima de forma que podemos medir la actividad *firefly* luciferasa y posteriormente bloquear dicha reacción y medir la actividad *renilla* luciferasa sobre la misma muestra.

En los casos donde se analizaron las proteínas por *Western Blot* se realizaron extractos proteicos de células que se sembraron, transfectaron y recibieron los mismos tratamientos (si éste era el caso) que las células utilizadas para el ensayo de actividad luciferasa. Las células se recogieron en tampón de lisis [Tris·HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 10 mM, glicerol 15% (v/v), nonidet P40 1% (v/v), una mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science), EDTA 50 mM, NaF 50 mM y Na₂P₂O₇ 5 mM como inhibidores de proteínas quinasa y proteínas fosfatasa, y PMSF 1 mM]. Las células se lisaron por sucesivos ciclos de congelación y descongelación. Los lisados celulares se centrifugaron a 10.000 x *g* durante 15 min y la fracción soluble se recogió y se cuantificó utilizando el sistema *Dc Protein Assay* de Bio-Rad.

13. Determinación de glucógeno

En el caso de las células CHO-IR, se sembraron 1.000.000 de células en placas de 60 mm de diámetro el día anterior a la transfección con Lipofectamina 2000. 24 horas tras la transfección, las placas se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80° C hasta su utilización para la determinación del contenido en glucógeno.

Las células FTO-2B también fueron sembradas el día anterior a ser infectadas en placas de 60 mm de diámetro y también se sembraron 1.000.000 de células por placa. 24 horas tras la infección, las placas se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80° C hasta su utilización para la determinación del contenido en glucógeno.

Para el caso de los fibroblastos, fueron 150.000 células las que se sembraron en placas de 60 mm de diámetro y se infectaron tres días después. 24 horas tras la infección, las placas se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80° C hasta su utilización para la determinación del contenido en glucógeno.

El protocolo utilizado para la determinación de glucógeno se ha basado en lo descrito en la bibliografía (Chan and Exton, 1976). Las células sembradas en placas de 60 mm de diámetro se descongelaron en hielo y se recogieron en 100 µL de KOH 30% (p/v). Los extractos obtenidos se calentaron a 100° C durante 15 min y 15 µL de muestra se guardaron para cuantificar proteína total mediante un ensayo Bradford (Bio-Rad *Protein Assay*). El resto de muestra se depositó sobre papeles Whatman 31-ET CHR de 3,5 x 2 cm y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, los papeles se lavaron con EtOH 66% frío durante 10 min, seguido de dos lavados más con EtOH 66% a temperatura ambiente durante 20 min cada uno. Después de secarse a temperatura ambiente durante toda la noche, los papeles se incubaron con 1 mL de amiloglucosidasa (0,5 mg/mL en acetato sódico 0,02 M pH 4,8) a 37° C durante 90 min en tubos individuales. Se utilizaron 150 µL de muestra para cuantificar la glucosa liberada por acción de la amiloglucosidasa. Se incubó con 100 µL de K₂HPO₄ 0,2 M y 1 mL de Reactivo Glucostat (tampón fosfato potásico 100 mM pH 7,0, 2,7

unidades/mL de glucosa oxidasa, 2 unidades/mL de peroxidasa y 150 µg/mL de o-dianisidina) durante 30 min a 37° C. El método se fundamenta en la oxidación de la glucosa a ácido glucónico por acción de la enzima glucosa oxidasa, acompañada de la formación de H₂O₂. El peróxido de hidrógeno formado, en presencia de la peroxidasa, produce la oxidación de la o-dianisidina dando un producto coloreado. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa presente inicialmente en la muestra. La reacción se paró con 1 mL de HCl 6N y el color púrpura desarrollado se cuantificó espectrofotométricamente a 540 nm. La cantidad de glucógeno se ha expresado como cantidad de glucosa liberada por mg de proteína total.

En los casos donde se analizaron las proteínas por *Western Blot* se realizaron extractos proteicos de células que se sembraron y transfectaron o infectaron igual que las células utilizadas para la determinación de glucógeno. Las células se recogieron en tampón de homogeneización [Tris·HCl 10 mM pH 7,0, EDTA 15 mM pH 8,0, NaF 50 mM, Sacarosa 0,6 M, Na₂P₂O₇ 5 mM, una mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science), β-mercaptoetanol 15 mM y PMSF 1 mM]. Las células se lisaron al pasarlas varias veces por una jeringa de insulina (25 G - 0,5 x 16 mm). La cantidad de proteína total presente en el extracto se cuantificó utilizando el método Bradford (Bio-Rad *Protein Assay*).

14. Análisis estadístico de los datos

Los datos se han expresado como medias ± desviación estándar. El test estadístico utilizado para evaluar las diferencias entre grupos ha sido el test *U de Mann-Whitney* o el *t de Student*, de dos colas, considerándose estadísticamente significativos para * P < 0,05, ** P < 0,01 o *** P < 0,001, como se indica en cada caso. Los datos han sido analizados con los programas informáticos SPSS para Windows, versión 13.0 o Excel 2003 de Microsoft Office.

Resultados I

Con el objetivo de identificar nuevas dianas sobre las que actúe AMPK, se había llevado a cabo en el laboratorio un escrutinio genético de doble híbrido en levadura.

I. Escrutinio genético de doble híbrido en levadura

Para llevar a cabo nuestro objetivo, la cepa de levadura TAT7 (ver Materiales y Métodos) se transformó con los plásmidos que contenían, por un lado, nuestra proteína cebo, AMPK $\alpha 2$ (pBTM116-AMPK $\alpha 2$), y por el otro, una genoteca de cDNA de páncreas humano (pACTII-genoteca), de Clontech (Figura 16).

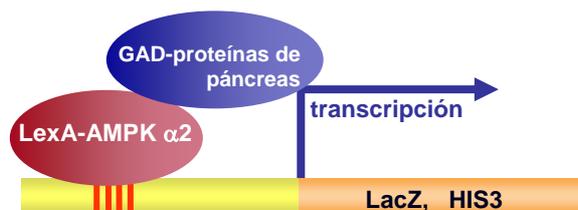


Figura 16: Representación esquemática del sistema de doble híbrido que se utilizó para llevar a cabo el escrutinio genético. La proteína cebo (AMPK $\alpha 2$) se fusionó al dominio de unión a DNA del factor de transcripción LexA y las proteínas de la genoteca estaban fusionadas al dominio de activación de Gal4. Cuando se produce la interacción entre la proteína cebo y la proteína presa se reconstituye un activador transcripcional funcional que provoca la activación de los genes reporteros, confiriendo a las levaduras la capacidad de crecer en ausencia de histidina y de presentar actividad β -galactosidasa.

Debido a la posible implicación que AMPK puede tener en enfermedades como la diabetes, decidimos utilizar una genoteca de páncreas humano en busca de proteínas que interaccionaran. Aunque se ha descrito que AMPK $\alpha 1$ es más abundante en las células β pancreáticas, utilizamos AMPK $\alpha 2$ en el escrutinio ya que se ha descrito que esta isoforma podría

desempeñar una función en la regulación génica en estas células (Salt et al., 1998b).

Se crecieron un total de 10^6 transformantes en condiciones selectivas [SC 2% (p/v) glucosa sin Trp, Leu ni His], de los cuales, sólo 28 dieron positivo para la actividad β -galactosidasa, ensayada en filtro. A continuación, los plásmidos conteniendo los fragmentos de cDNA de las proteínas que podrían ser capaces de interactuar con AMPK $\alpha 2$ se extrajeron de las levaduras. El cDNA de estos clones que habían mostrado actividad β -galactosidasa se secuenció y la identificación de las secuencias se realizó por comparación con las bases de datos del NCBI utilizando la aplicación informática *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Dieciséis de los posibles clones positivos fueron excluidos de posteriores análisis por carecer de sentido biológico (correspondían a secuencias fuera de la pauta de lectura o secuencias genómicas no traducidas). De los restantes 12 posibles clones positivos, encontramos dos que codificaban para proteínas relacionadas con la transcripción:

- ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*)
- TRIP6 (*Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein 6*)

El resto se trataba de clones que codificaban para proteínas de función desconocida.

TRIP6 era la proteína que mostraba una mayor interacción con AMPK $\alpha 2$, por lo que decidimos continuar nuestro estudio con ella.

2. TRIP6 interactúa físicamente con AMPK $\alpha 2$

El clon que se recuperó del escrutinio de doble híbrido sólo contenía los dos últimos dominios LIM de la secuencia de TRIP6 humano (del aminoácido 331 al 476) (Figura 17), así que decidimos recuperar el cDNA completo de TRIP6 para confirmar la interacción con AMPK $\alpha 2$.

1	MSGPTWLPPK QPEPARAPQG RAIPRGTPGP PPAHGAALQP HPRVNFCLP	
51	SEQCYQAPGG PEDRGPAWVG SHGVLQHTQG LPADRGGLRP GSLDAEIDL	Secuencia de Exportación Nuclear (NES)
101	SSTLAEL NGG RGHASRRPDR QAYEPPPPPA YRTGSLKPNP ASPLPASPYG	
151	GPTPASYYTA STPAGPAFPV QVKVAQPVRG CGPPRRGASQ ASGPLPGPHF	
201	PLPGRGEVWG PGYRSQREPG PGAKEEAAGV SGPAGRGRGG EHGQVPLSQ	
251	PPEDELDRLT KKLVDHMNHP PSGEYFGQCG GCGEDVVDG AGVVALDRVF	Dominio LIM 1
301	HVGFCVFCSTC RAQLRGQHFY AVERRAYCEG <u>CYVATLEKCA TCSOPILDRI</u>	Dominio LIM 2
351	<u>LRAMGKAYHP GCFTCVVCHR GLDGIPFTVD ATSOIHCIED FHRKFAPRCS</u>	
401	<u>VCGGAIMPEP GOETVRIVA LDRSFHIGCY KCEECGLLLS SEGECQGCYP</u>	Dominio LIM 3
451	<u>LDGHILCKAC SAWRIOELSA TVTDC</u>	

Figura 17: Secuencia aminoacídica completa de TRIP6, donde se muestran los aminoácidos que componen la NES y cada uno de los dominios LIM. La parte de la secuencia subrayada se corresponde con el fragmento del cDNA aislado originalmente de la genoteca.

La secuencia completa del cDNA de TRIP6 se obtuvo por PCR a partir del plásmido pBS-TRIP6-A7, amablemente cedido por la Dra. M.C. Beckerle (Huntsman Cancer Institute and Dept. of Biology, Univ. Utah, Salt Lake City, USA) (Yi and Beckerle, 1998), usando los oligonucleótidos adecuados (Tabla 1, de Materiales y Métodos) que nos permitieron amplificar la secuencia codificante completa de TRIP6 desde el codón de inicio hasta el codón de parada.

Una vez obtuvimos el cDNA completo de TRIP6, lo subclonamos en diferentes plásmidos que nos permitieron corroborar la interacción con AMPK $\alpha 2$ utilizando diferentes técnicas:

2.1. Doble híbrido en levadura

En primer lugar, y utilizando de nuevo la técnica de doble híbrido, cuantificamos la interacción entre AMPK $\alpha 2$ y TRIP6 completo mediante un ensayo de actividad β -galactosidasa. Para ello, usamos una fusión entre TRIP6 y el dominio de activación del factor transcripcional GAL4 de levadura, GAD (pACTII-TRIP6) y una fusión entre AMPK $\alpha 2$ y la proteína de unión a DNA, LexA (pBTM116-AMPK $\alpha 2$). Con estas dos construcciones se transformó la cepa de levadura CTY10.5d, que posee el gen reportero de la β -galactosidasa bajo el control de cuatro operadores LexA. La proteína completa TRIP6 interacciona fuertemente con la subunidad catalítica $\alpha 2$ de AMPK en condiciones de alta glucosa [4% (p/v) glucosa], y además, en baja glucosa [0,05% (p/v) glucosa] esta interacción aumenta (Tabla 3).

También comprobamos si existía interacción entre TRIP6 y las subunidades reguladoras de AMPK ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\gamma 1$) mediante un ensayo de actividad β -galactosidasa en filtro. Para ello transformamos la cepa CTY10.5d con los plásmidos pBTM116-AMPK $\beta 1$, pBTM116-AMPK $\beta 2$ o pEG202-AMPK $\gamma 1$ y pACTII-TRIP6. Los resultados indicaron que no existe interacción por doble híbrido entre TRIP6 y las subunidades reguladoras de AMPK, confirmando que TRIP6 interacciona solamente con la subunidad catalítica $\alpha 2$ de AMPK.

Para profundizar más en el estudio de la interacción entre AMPK $\alpha 2$ y TRIP6, se estudió la interacción por doble híbrido de TRIP6 con los dominios catalítico (KD, *Kinase Domain*, parte N-terminal que contiene un típico dominio serin/treonin proteína quinasa) y regulador (RD, *Regulatory Domain*, parte C-terminal capaz de interactuar con las subunidades reguladoras) de la subunidad $\alpha 2$ de AMPK (Tabla 3). Los resultados muestran que TRIP6 interacciona principalmente con el dominio quinasa de la subunidad catalítica de AMPK. Además, al igual que con la proteína $\alpha 2$ completa, la interacción es mayor en condiciones de baja glucosa.

		<u>β-galactosidasa (unidades)</u>	
		<u>4% glucosa</u>	<u>0,05% glucosa</u>
LexA	GAD-TRIP6	<1	<1
LexA-AMPK α 2	GAD	<1	<1
LexA-AMPK α 2	GAD-TRIP6	112	186
LexA-AMPK α 2 KD	GAD	1	1
LexA-AMPK α 2 KD	GAD-TRIP6	97	198
LexA-AMPK α 2 RD	GAD	<1	<1
LexA-AMPK α 2 RD	GAD-TRIP6	9	12

Tabla 3: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción por doble híbrido entre la subunidad catalítica α 2 de AMPK y TRIP6. La cepa de levadura CTY10.5d se transformó con los plásmidos pBTM116-AMPK α 2 y pACT11-TRIP6. Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5) y tras dos lavados con H₂O, se cambiaron a un medio con 0,05% (p/v) de glucosa durante tres horas. De la misma manera, también se midió la interacción entre los dos dominios catalítico, KD (del aminoácido 1 al 312) y regulador, RD (del aminoácido 313 al 552) de AMPK α 2 y TRIP6. Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (desviación estándar <15% en todos los casos).

También quisimos comprobar si TRIP6 era capaz de interactuar con Snfl, el ortólogo de AMPK α en la levadura *S. cerevisiae*. Aunque la interacción es más débil que con AMPK α 2 de mamíferos, pudimos cuantificar la interacción entre TRIP6 y Snfl (Tabla 4).

Resultados I

		<u>β-galactosidasa (unidades)</u>	
		<u>4% glucosa</u>	<u>0,05% glucosa</u>
LexA-Snf1	GAD	<1	3,1
LexA-Snf1	GAD-TRIP6	6,8	9,0

Tabla 4: Medida de actividad β-galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción por doble híbrido entre Snf1 y TRIP6. La cepa de levadura CTY10.5d se transformó con los plásmidos pBTM116-Snf1 y pACT11-TRIP6. Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5) y tras dos lavados con H₂O, se cambiaron a un medio con 0,05% (p/v) de glucosa durante tres horas. Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (desviación estándar <15% en todos los casos).

2.2. Arrastre con GST en células de levadura

En segundo lugar, corroboramos la interacción entre TRIP6 y AMPK α2 usando la técnica de arrastre con GST (*Pull-Down*). Para poder llevarlo a cabo, se transformó la cepa de levadura FY250 con los plásmidos que expresaban las proteínas de fusión GST-AMPK α2 (pEG-GST-AMPK α2) y HA-TRIP6 (pWS93-TRIP6). Los extractos crudos se obtuvieron de cultivos crecidos en 2% (p/v) de glucosa. Pudimos comprobar que HA-TRIP6 copurificaba con GST-AMPK α2 y no en el correspondiente control en el que solamente se coexpresaban HA-TRIP6 y GST (Figura 18).

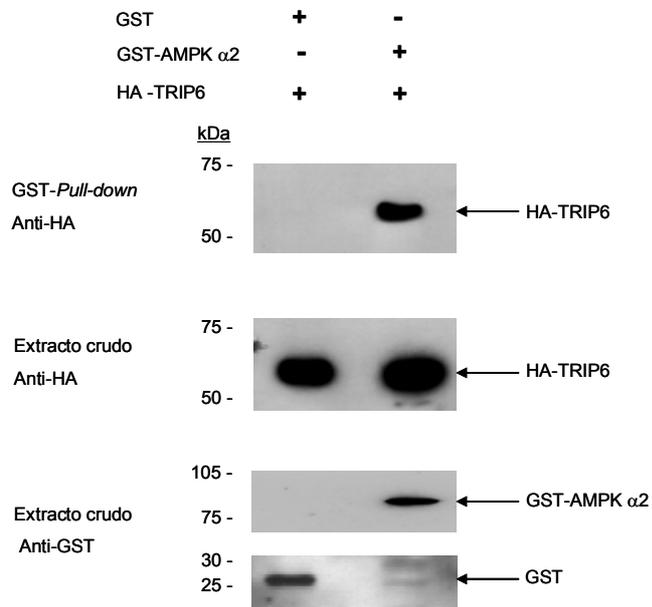


Figura 18: Arrastre con GST entre GST-AMPK α 2 y HA-TRIP6. La cepa de levadura FY250 se transformó con los plásmidos que expresaban las proteínas de fusión GST-AMPK α 2 y HA-TRIP6. Los extractos crudos se obtuvieron de cultivos crecidos en 2% (p/v) de glucosa. HA-TRIP6 sólo es arrastrado por GST-AMPK α 2, y no por GST.

2.3. Doble híbrido en células de mamífero

Posteriormente, confirmamos la interacción entre TRIP6 y AMPK α 2 en células de mamífero. Para ello, llevamos a cabo un análisis de doble híbrido en células HEK293T, donde sobreexpresamos las fusiones GBD-TRIP6 (pBIND-TRIP6) y AD-AMPK α 2 (pACT-AMPK α 2). En este caso, fusionamos TRIP6 al dominio de unión al DNA de Gal4 y AMPK α 2 se fusionó al dominio de activación de VP16. Ambos plásmidos, junto al vector que contiene el gen reportero, pG5luc (5 x UAS_{GAL4}-luciferasa), fueron introducidos en células HEK293T mediante el protocolo de transfección del fosfato de calcio. La actividad luciferasa resultante debida a la interacción

Resultados I

entre TRIP6 y AMPK α 2 se normalizó con un control interno de transfección (ver apartado 12. de Materiales y Métodos). Todas las interacciones se refieren al valor obtenido por el par GBD + AD-AMPK α 2, que se ha ajustado a 1. En presencia de las fusiones GBD-TRIP6 y AD-AMPK α 2, la expresión del gen reportero aumentó 3,9 veces respecto a la expresión obtenida sólo en presencia de GBD-TRIP6 (Figura 19).

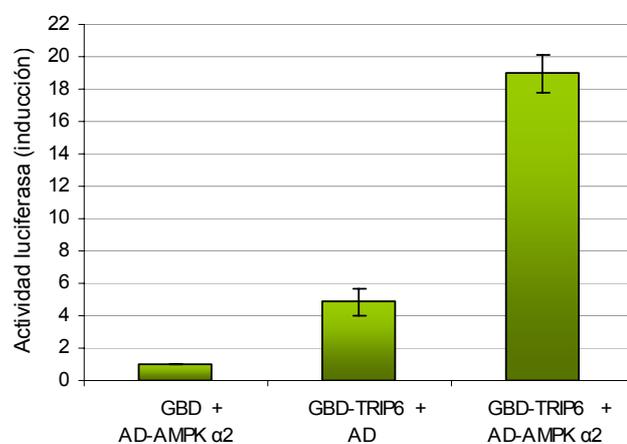


Figura 19: Análisis de doble híbrido en células de mamífero para cuantificar la interacción entre AMPK α 2 y TRIP6. Las células HEK293T fueron cotransfectadas con los plásmidos pBIND-TRIP6 (GBD-TRIP6), pACT-AMPK α 2 (AD-AMPK α 2) y pG5luc. La actividad luciferasa se midió y se normalizó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores que se muestran son la media resultante de, al menos, 4 transfecciones independientes (las barras indican la desviación estándar).

2.4. Coimmunoprecipitación en células de mamífero

Por último, también quisimos comprobar la interacción entre TRIP6 y AMPK α 2 realizando experimentos de coimmunoprecipitación en células HEK293T sobreexpresando la proteína AMPK α 2 fusionada a la etiqueta *myc* (pCMV-*myc*-AMPK α 2). Sin embargo, no fuimos capaces de detectar la

fusión *myc*-AMPK $\alpha 2$ cuando inmunoprecipitábamos la proteína TRIP6 endógena con anticuerpos específicos (Figura 20). No obstante, razonamos que, posiblemente, estas proteínas no fueran capaces de interactuar por no encontrarse en el mismo compartimento subcelular, ya que la isoforma $\alpha 2$ de AMPK posee localización nuclear y TRIP6 se localiza preferentemente en el citoplasma aunque es capaz de viajar al núcleo.

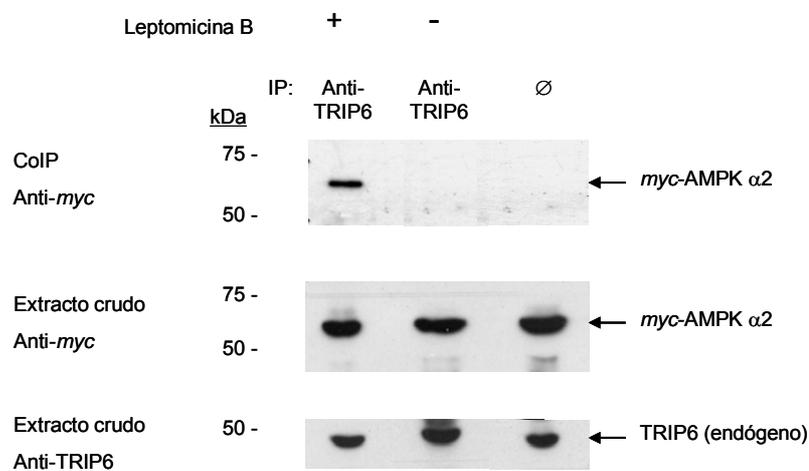


Figura 20: Coimmunoprecipitación de *myc*-AMPK $\alpha 2$ y TRIP6. Los extractos de proteína total (300 μ g) se obtuvieron de células HEK293T transfectadas con el plásmido pCMV-*myc*-AMPK $\alpha 2$ y tratadas o no con leptomicina B (20 ng/mL, 15 min) como se describe en Materiales y Métodos. TRIP6 endógeno se inmunoprecipitó con 1 μ L de anti-TRIP6 y el control negativo (Ø) se hizo en ausencia de anticuerpo. Las proteínas precipitadas se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetectadas con anti-*myc*.

Por ello tratamos las células HEK293T con leptomicina B (un inhibidor del transportador nuclear Crm-1, que reconoce específicamente las secuencias NES ricas en leucinas), que según la bibliografía (Wang and Gilmore, 2001), es capaz de retener a TRIP6 en el núcleo. Fue en este caso, tras el tratamiento con leptomicina B, cuando logramos visualizar la interacción entre *myc*-AMPK $\alpha 2$ y TRIP6 (Figura 20). Este resultado nos

sugiere que, sólo cuando estas proteínas se encuentran en el núcleo de la célula, son capaces de interactuar.

3. AMPK fosforila a TRIP6 *in vitro*

Dado que habíamos visto que TRIP6 era capaz de interactuar con AMPK $\alpha 2$, y específicamente con el dominio quinasa (Tabla 3), quisimos investigar si TRIP6 era un posible sustrato de fosforilación de AMPK.

Para ello, purificamos en una columna de afinidad de glutatión-seferosa una fusión GST-TRIP6 producida en bacteria para llevar a cabo un ensayo de fosforilación por AMPK *in vitro*. Utilizamos AMPK comercial, GST-TRIP6 como sustrato de la reacción de fosforilación y ATP marcado radiactivamente con ^{32}P en su fosfato γ . Tras la reacción, las muestras se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Pudimos comprobar que TRIP6 era un sustrato de AMPK ya que se fosforilaba por acción de la quinasa y, además, en presencia de AMP (el activador alostérico de AMPK), la fosforilación se veía mejorada (Figura 21). En el ensayo de fosforilación también aparecieron fosforiladas bandas de menor tamaño que, presumiblemente, se corresponden con productos de degradación de la forma entera. Las bandas que aparecen en las calles sin GST-TRIP6 corresponden a autofosforilación de AMPK. Como control negativo se utilizó GST y como control de carga, utilizamos cantidades equivalentes de la proteína de fusión GST-TRIP6 que fueron analizadas en paralelo por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

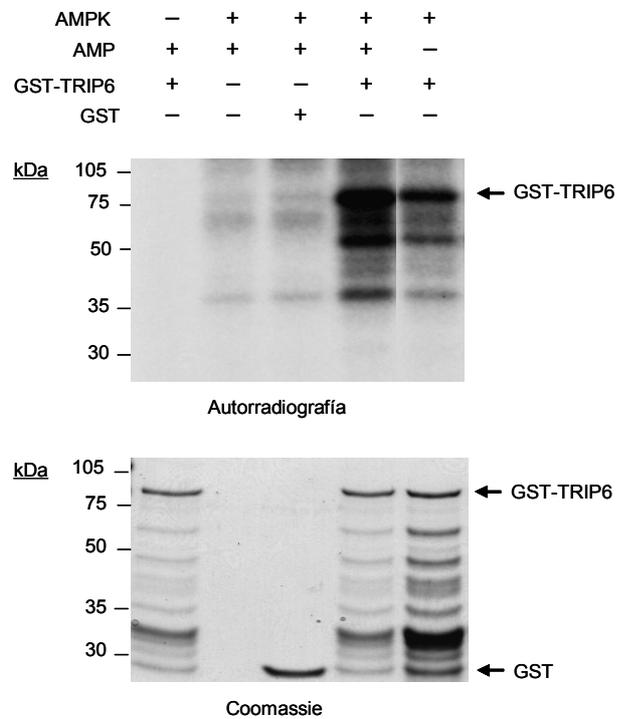


Figura 21: Fosforilación *in vitro* de TRIP6 por AMPK. Se utilizaron 50 ng de la proteína de fusión GST-TRIP6 purificada junto a 50 mU de AMPK, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Como control de carga, 250 ng de la proteína de fusión GST-TRIP6 se analizaron por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie.

3.1. Análisis de mutantes de TRIP6 en posibles sitios de fosforilación

Para intentar localizar el residuo de TRIP6 fosforilado por AMPK, analizamos la secuencia aminoacídica de TRIP6 en busca de residuos de Ser o Thr. Dado que TRIP6 es una proteína muy rica en estos residuos (posee 27 Ser y 20 Thr), nos centramos únicamente en aquellos que se ceñían a las características de la secuencia consenso de fosforilación por AMPK (Figura

Resultados I

4, Introducción). Encontramos únicamente 3 residuos que cumplieran estos requisitos: Ser272, Thr341 y Ser461 (Figura 22).

```
1   MSGPTWLPPK QPEPARAPQG RAIPRGTPGP PPAHGAALQP HPRVNFCLP
51  SEQCYQAPGG PEDRGPAWVG SHGVLQHTQG LPADRGGLRP GSLDAEIDLL
101 SSTLAELNGG RGHASRRPDR QAYEPPPPPA YRTGSLKPNP ASPLPASPYG
151 GPTPASYTTA STPAGPAFPV QVKVAQPVRG CGPPRRGASQ ASGPLPGPHF
201 PLPGRGEVWG PGYRSQREPG PGAKEEAAGV SGPAGRGRGG EHGPOVPLSQ
251 PPEDELDRLT KKLVDHMNHP PSGEYFGQCG GCGEDVVGDG AGVVALDRVF
301 HVGCFVCSTC RAQLRGQHFY AVERRAYCEG CYVATLEKCA TCSQPILDRI
351 LRAMGKAYHP GCFTCVVCHR GLDGIPFTVD ATSQIHCIED FHRKFAPRCS
401 VCGAIMEP GQETVRIVA LDRSFHIGCY KCEECGLLLS SEGECQGCYP
451 LDGHILCKAC SAWRIQELSA TVTTDC
```

Secuencia de Exportación Nuclear (NES)

Dominio LIM 1

Dominio LIM 2

Dominio LIM 3

Figura 22: Secuencia aminoacídica completa de TRIP6 donde se muestran los aminoácidos incluidos en posibles secuencias consenso de fosforilación por AMPK. Los residuos que forman parte de la secuencia consenso aparecen en naranja. La Ser272, la Thr341 y la Ser461 están en naranja y subrayadas.

Una vez localizados estos tres residuos, fueron mutados a alanina mediante mutagénesis dirigida y, de nuevo, se purificaron por columna de afinidad las correspondientes proteínas de fusión expresadas en *E. coli*. Las proteínas GST-TRIP6 S272A, GST-TRIP6 T341A y GST-TRIP6 S461A se utilizaron como sustratos en nuevas reacciones de fosforilación por AMPK *in vitro* y siempre en presencia de AMP.

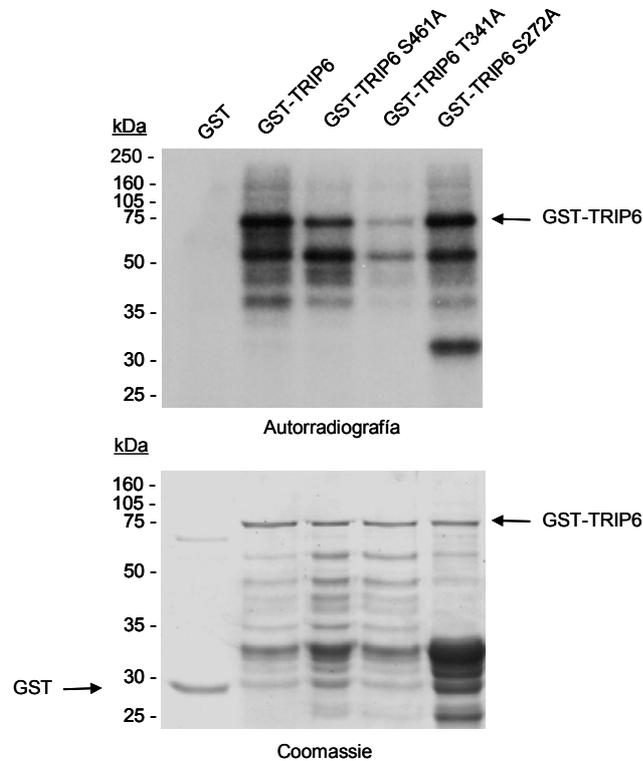


Figura 23: Fosforilación *in vitro* de los mutantes en posibles sitios de fosforilación de TRIP6. Se utilizaron 50 ng de las diferentes fusiones a GST junto a 50 mU de AMPK y en presencia de AMP, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Como control de carga, 250 ng de las proteínas de fusión se analizaron por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie.

Como se puede observar en la Figura 23, los mutantes de TRIP6 en los posibles sitios de fosforilación por AMPK también aparecían fosforilados tras el ensayo *in vitro*. Aunque el mutante T341A parece incorporar menos ^{32}P que los otros mutantes estudiados o que la forma silvestre, posteriores estudios descartaron la posibilidad de que este residuo fuera un sitio de fosforilación de AMPK (ver más adelante en el apartado 3.2. y 5.1.2. de Resultados I).

3.2. Acotado de la región de TRIP6 fosforilada por AMPK

Con el objetivo de acotar las regiones de la proteína que contenían residuos potencialmente fosforilables por AMPK, dividimos TRIP6 en dos partes: Parte N-terminal (del aminoácido 1 al 290) y parte C-terminal (del aminoácido 291 al 476) (Figura 24). Estas proteínas se expresaron como fusiones a GST en *E. coli*, se purificaron en columnas de afinidad y se utilizaron como sustratos en un nuevo ensayo de fosforilación por AMPK *in vitro* y en presencia de AMP. Tanto la parte N-terminal como la C-terminal aparecían fosforiladas, aunque el fragmento C-terminal parece presentar una disminución importante en la cantidad de ^{32}P incorporado (Figura 25), por lo que la fosforilación dependiente de AMPK parece residir principalmente en la parte amino-terminal de la proteína TRIP6.

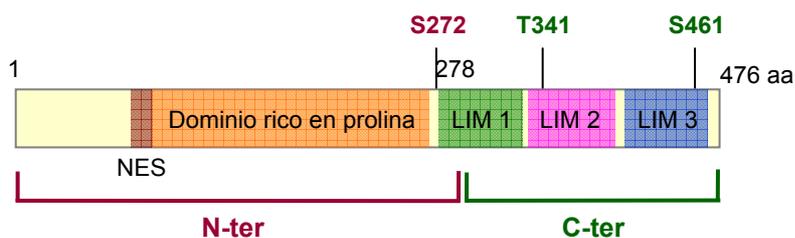


Figura 24: Diagrama esquemático de la estructura en dominios de TRIP6 donde se representan los fragmentos N-terminal y C-terminal que se han utilizado en el ensayo de fosforilación *in vitro*.

Estos datos indicarían que los sitios posibles de fosforilación por AMPK, Thr341 y Ser461, no deben ser funcionales, al localizarse en el extremo C-terminal, que presenta una fosforilación minoritaria.

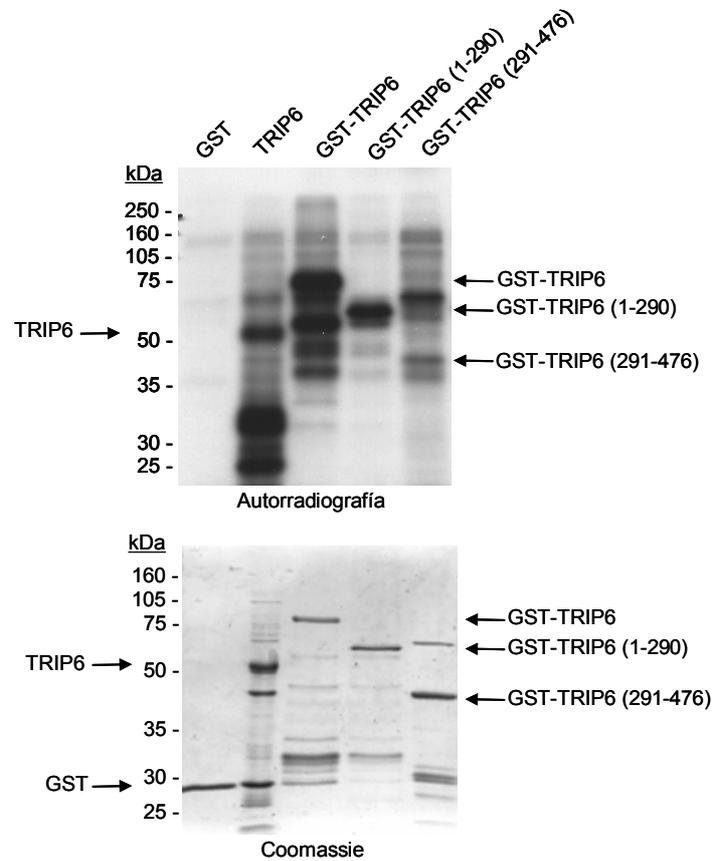


Figura 25: Fosforilación *in vitro* de distintas formas de TRIP6. Se utilizaron 50 ng de las diferentes proteínas junto a 50 mU de AMPK y en presencia de AMP, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Como control de carga, 250 ng de las proteínas se analizaron por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie.

También utilizamos como sustrato TRIP6 (sin la etiqueta GST) en este ensayo. Aunque ya habíamos comprobado que GST no era fosforilado por AMPK, comprobamos de esta forma que la fusión a GST no influye en la fosforilación de TRIP6 (Figura 25).

4. AMPK no afecta a la interacción de TRIP6 con otras proteínas

4.1. Estudio de la interacción de TRIP6 con *THRβ* y *RXRα*

TRIP6 fue descrita por primera vez como proteína capaz de unirse al receptor de hormonas tiroideas (Lee et al., 1995). Y además, también se describía en ese mismo artículo que era capaz de interactuar con el receptor de retinoides X. Partiendo de estos datos, quisimos averiguar si AMPK podría modificar la interacción descrita.

Para ello, construimos las fusiones LexA-THRβ (del aa 164 al 456) y LexA-RXRα (del aa 198 al 462), y junto a una fusión GAD-TRIP6, transformamos la cepa de levadura FY250 que ya había sido transformada con el plásmido pSH18-18 (6 LexAop::lacZ). No utilizamos los receptores nucleares completos porque ellos mismos ya tienen actividad transcripcional, y nos ceñimos a los dominios de unión a ligando descritos en el trabajo inicial (Lee et al., 1995). Los ensayos de actividad β-galactosidasa se realizaron en ausencia y en presencia de los respectivos ligandos: Ácido triyodotiroacético (triac) 1 μM para el caso de THRβ o 9-cis ácido retinoico (9-cis RA) 1 μM para el caso de RXRα. No pudimos observar ninguna interacción entre THRβ y TRIP6, ni siquiera en presencia de triac (Tabla 5). En el caso de RXRα, la actividad β-galactosidasa sólo pudo medirse en presencia de ligando, pero no había diferencias significativas entre la actividad β-galactosidasa debida a la actividad transcripcional residual de RXRα y la obtenida en presencia de TRIP6 (Tabla 5). Los ensayos se realizaron en condiciones de alta [4% (p/v)] y baja [0,05% (p/v)] glucosa para comprobar si la disponibilidad del azúcar y la activación de SNFI (el ortólogo en levadura de AMPK) afectaba a la interacción, pero como se puede observar, se obtuvieron resultados similares en ambos casos.

		β-galactosidasa (unidades)			
		+ triac 1 μM			
		4% glucosa	0,05% glucosa	4% glucosa	0,05% glucosa
LexA	GAD-TRIP6	<1	1,5	1,1	1,5
LexA-THRβ	GAD	<1	<1	<1	<1
LexA-THRβ	GAD-TRIP6	<1	<1	<1	<1
		+ 9-cis RA 1 μM			
		4% glucosa	0,05% glucosa	4% glucosa	0,05% glucosa
LexA-RXRα	GAD	<1	1,0	3,2	35,0
LexA-RXRα	GAD-TRIP6	<1	<1	4,5	50,2

Tabla 5: Medida de actividad β-galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción de TRIP6 con THRβ y RXRα. La cepa de levadura FY250 se transformó con los plásmidos pSH18-18 (6 LexAop::lacZ), pEG202-THRβ (LexA-THRβ) o pEG202-RXRα (LexA-RXRα), y pACT11-TRIP6 (GAD-TRIP6). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa, sin o con triac 1 μM o 9-cis RA 1 μM, hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5) y tras dos lavados con H₂O, se cambiaron a un medio con 0,05% (p/v) de glucosa durante tres horas, sin o con triac 1 μM o 9-cis RA 1 μM. Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (desviación estándar <15% en todos los casos).

4.2. Estudio de la interacción de TRIP6 con LPA2R-CT y CasL/HEFI

También se ha publicado que TRIP6 interacciona con componentes de las placas de adhesión focal. Interacciona con la parte C-ter del receptor 2 del ácido lisofosfatídico (LPA) (Xu et al., 2004) y también con CasL/HEFI (*Human Enhancer Filamentation 1*), un miembro de la familia Cas (*Crk-associated substrate*) (Yi et al., 2002). Estas proteínas están implicadas en el ensamblaje y coordinación de los componentes de la señalización intracelular en las adhesiones focales.

Resultados I

Como AMPK fosforila a TRIP6 *in vitro*, quisimos saber si la interacción entre TRIP6 y LPA2R-CT o CasL/HEF1 se veía afectada por la acción de AMPK. Para poder llevarlo a cabo, construimos las fusiones LexA-LPA2R-CT (del aa 296 al 351) y LexA-CasL/HEF1 (del aa 163 al 315) [como se describe en (Xu et al., 2004; Yi et al., 2002)] y, junto a una fusión GAD-TRIP6, transformamos la cepa de levadura CTY10.5d. En este caso sí observamos una interacción por doble híbrido entre TRIP6 y las proteínas ensayadas. Sin embargo, la expresión de una forma constitutivamente activa de AMPK [una forma truncada que comprende el dominio quinasa (aa 1-312) de AMPK α 2 con la sustitución T172D] no era capaz de modificar de forma significativa la interacción por doble híbrido en levadura entre TRIP6 y LPA2R-CT o CasL/HEF1 (Tabla 6).

	<u>β-galactosidasa (unidades)</u>
<u>LexA-LPA2R-CT + GAD-TRIP6</u>	
+ HA	22
+ HA-AMPK C.A.	29
<u>LexA-CasL/HEF1 + GAD-TRIP6</u>	
+ HA	92
+ HA-AMPK C.A.	84

Tabla 6: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción de TRIP6 con LPA2R-CT y CasL/HEF1. La cepa de levadura CTY10.5d se transformó con los plásmidos pEG202-LPA2R-CT (LexA-LPA2R-CT) o pEG202-CasL/HEF1 (LexA-CasL/HEF1), pACTII-TRIP6 (GAD-TRIP6) y pSK93 (HA) o pSK93-AMPK α 2 KD T172D (HA-AMPK C.A.). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5). Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (desviación estándar <15% en todos los casos).

5. La actividad transcripcional de TRIP6 aumenta por la actividad AMPK

5.1. Actividad transcripcional de TRIP6 en levadura

TRIP6 es capaz de activar la transcripción tanto en levadura como en células de mamífero cuando se le dirige a un promotor apropiado, aunque no tiene la habilidad de unirse al DNA directamente (Wang et al., 1999; Wang and Gilmore, 2001). Dado que tanto AMPK en mamíferos, como SNF1 en levadura, regulan mediante fosforilación la actividad transcripcional de diferentes proteínas, quisimos comprobar si la activación transcripcional de TRIP6 respondía al estado de activación de la quinasa. Transformamos para ello las cepas de levadura FY250, FY250 *snf1Δ* y FY250 *hxxk2Δ* con la fusión LexA-TRIP6, junto con el plásmido episomal pSH18-18 conteniendo el gen reportero (6 LexAop-lacZ). Pudimos comprobar que en una cepa silvestre TRIP6 posee actividad transcripcional y además ésta aumenta considerablemente en condiciones de baja glucosa [0,05% (p/v) glucosa], condiciones en las cuales la quinasa Snf1 (el ortólogo en levadura de AMPK α de mamíferos) está activada. Este aumento es dependiente de la actividad de Snf1 ya que cuando la actividad β -galactosidasa se ensayó en una cepa carente de Snf1 (*snf1Δ*), TRIP6 seguía manteniendo su actividad transcripcional basal pero ésta no aumentaba al pasar las células a un medio con 0,05% (p/v) de glucosa. En el caso de una cepa *hxxk2Δ*, donde Snf1 está activo constitutivamente en condiciones de alta glucosa, la capacidad de transactivación se veía aumentada más de 9 veces (Tabla 7).

Estos resultados indicaban que la actividad transcripcional de TRIP6 humano se incrementaba por acción de la quinasa Snf1 de levadura.

Resultados I

β-galactosidasa (unidades)			
	4% glucosa	0,05% glucosa	inducción
silvestre			
LexA	<1	4	
LexA-TRIP6	144	2053	x 14,3
<i>snf1Δ</i>			
LexA	1	<1	
LexA-TRIP6	176	198	x 1,1
<i>hxx2Δ</i>			
LexA	<1	4	
LexA-TRIP6	1324	2085	x 1,6

Tabla 7: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la actividad transcripcional de TRIP6. Las cepas de levadura FY250, FY250 *snf1 Δ* y FY250 *hxx2 Δ* se transformaron con los plásmidos pSH18-18 (6 LexAop::lacZ) y pEG202-TRIP6 (LexA-TRIP6). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5) y tras dos lavados con H₂O, se cambiaron a un medio con 0,05% (p/v) de glucosa durante tres horas. Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (desviación estándar <15% en todos los casos).

5.1.1. Efecto de la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de AMPK sobre la actividad transcripcional de TRIP6

Una vez habíamos visto que la actividad transcripcional de TRIP6 se veía afectada por la actividad Snf1 de levaduras (Tabla 7), quisimos comprobar el efecto de la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de AMPK α 2 (KD T172D) en levadura. Obtuvimos un incremento de 3,5 veces en la actividad transcripcional de TRIP6 en células creciendo en presencia de glucosa (Tabla 8).

β-galactosidasa (unidades)	
<i>snf1Δ10</i> + LexA-TRIP6	
+ HA	144
+ HA-AMPK C.A.	509

Tabla 8: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la actividad transcripcional de TRIP6 al sobreexpresar una forma constitutivamente activa de AMPK. La cepa de levadura FY250 *snf1 Δ 10* se transformó con los plásmidos pSH18-18 (6 LexAop::lacZ), pEG202-TRIP6 (LexA-TRIP6) y pSK93 (HA) o pSK93-AMPK α 2 KD T172D (HA-AMPK C.A.). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa, hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5). Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (desviación estándar <15% en todos los casos).

Estos resultados indican que la quinasa de mamíferos de AMPK podría regular la actividad transcripcional de TRIP6, al menos en un sistema heterólogo como *S. cerevisiae*.

5.1.2. Actividad transcripcional de los mutantes de TRIP6

Con el objetivo de comprobar si las mutaciones en potenciales sitios de fosforilación por AMPK afectaban a la actividad transcripcional de LexA-TRIP6, medimos la actividad transcripcional de cada uno de los mutantes obtenidos (ver apartado 3.1. de Resultados I). En el caso de la fusión LexA-TRIP6 S272A no pudimos cuantificar la actividad porque la proteína LexA-TRIP6 S272A se degradaba rápidamente. Los demás mutantes mostraron actividad transcripcional en una cepa silvestre con 2% (p/v) glucosa, y cuando los cultivos se crecían en 2% (p/v) rafinosa (condiciones en las que Snf1 se activa) esta actividad era similar a la de la proteína silvestre (Tabla 9), lo que indicaba que ninguna de estas mutaciones afectaba a la actividad transcripcional de TRIP6 en condiciones de activación de SNF1, el ortólogo de AMPK en levadura.

	<u>β-galactosidasa (unidades)</u>	
	<u>2% glucosa</u>	<u>2% rafinosa</u>
LexA	<1	<1
LexA-TRIP6	115	487
LexA-TRIP6 S461A	66	334
LexA-TRIP6 T341A	63	350
LexA-TRIP6 S272A	n. d.	n. d.

Tabla 9: Medida de actividad β-galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la actividad transcripcional de los diferentes mutantes de TRIP6. La cepa de levadura CTY10.5d se transformó con los plásmidos pEG202-TRIP6 (LexA-TRIP6), pEG202-TRIP6 S461A (LexA-TRIP6 S461A), pEG202-TRIP6 T341A (LexA-TRIP6 T341A) o pEG202-TRIP6 S272A (LexA-TRIP6 S272A). Las células se crecieron en SC con 2% (p/v) de glucosa o con 2% (p/v) de rafinosa + 0,05% (p/v) de glucosa, hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5). Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (desviación estándar <15% en todos los casos) (n. d.: no determinado).

5.2. Actividad transcripcional de TRIP6 en células de mamífero

También quisimos comprobar el incremento en la actividad transcripcional de TRIP6 por AMPK en células de mamífero. Ya habíamos visto (como se muestra en la Figura 19) que una fusión GBD-TRIP6 tenía actividad transcripcional, ya que producía un incremento de unas 5 veces en la expresión del gen reportero luciferasa en células HEK293T. Por ello, tratamos estas células con AICAR, un activador de AMPK, y observamos un ligero aumento en las propiedades transcripcionales de TRIP6, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa (Figura 26).

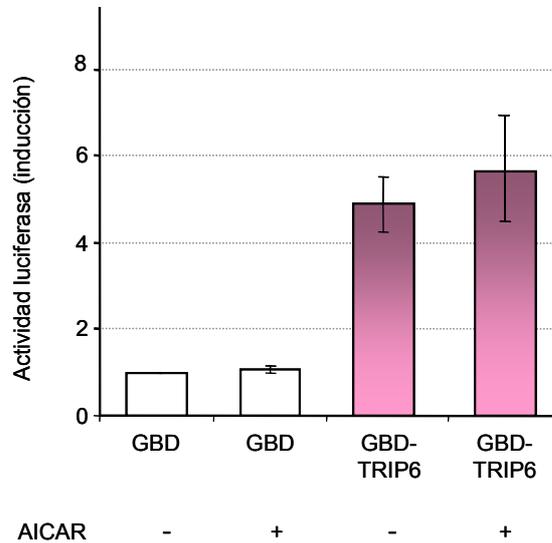


Figura 26: La activación de AMPK incrementa ligeramente la actividad transcripcional de TRIP6. Las células HEK293T fueron cotransfectadas con los plásmidos pG5luc y pBIND (GBD) o pBIND-TRIP6 (GBD-TRIP6). 18 h tras la transfección, las células fueron tratadas o no con AICAR 0,5 mM durante 6 h. La actividad luciferasa se midió y se normalizó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores que se muestran son la media resultante de, al menos, 10 transfecciones independientes (las barras indican la desviación estándar).

Ya que, como hemos descrito en la Figura 20, la interacción entre TRIP6 y AMPK $\alpha 2$ se produce sólo cuando las dos proteínas son nucleares, pensamos en analizar la actividad transcripcional de TRIP6 en condiciones en las que se localizara en el núcleo.

5.2.1. Localización subcelular de TRIP6

Como se ha nombrado anteriormente, TRIP6 es una proteína que, aunque puede viajar al núcleo de la célula, se localiza preferentemente en placas de adhesión focal, en la membrana plasmática (Wang et al., 1999; Wang and Gilmore, 2001). De manera consistente con estas observaciones, nosotros pudimos comprobar que al sobreexpresar una fusión TRIP6-GFP

Resultados I

en células COS7 obteníamos un patrón punteado y perinuclear (Figura 27). Sin embargo, tras 15 minutos de tratamiento con leptomicina B (un inhibidor de la exportación nuclear dependiente de Crm-1), TRIP6-GFP se acumulaba en el núcleo, sugiriendo que TRIP6 viaja entre el núcleo y el citoplasma de la célula en rápidos ciclos de importación y exportación.

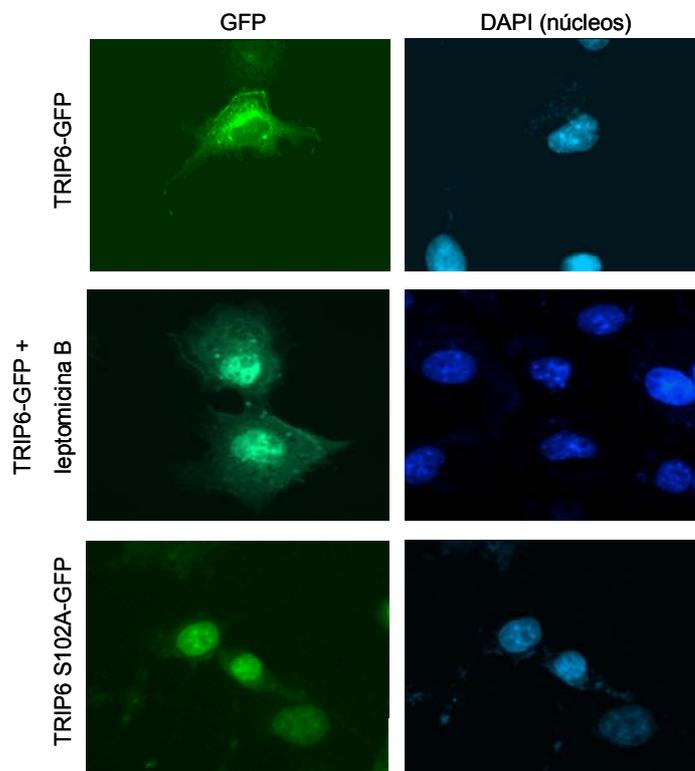


Figura 27: Localización subcelular de TRIP6. Las células COS7 se transfectaron con los plásmidos pEGFP-N1-TRIP6 (paneles superiores) o pEGFP-N1-TRIP6 S102A (paneles inferiores). La correspondiente fusión TRIP6-GFP se detectó por microscopía de fluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. La posición del núcleo se detectó mediante tinción con DAPI. También se trataron células COS7 expresando TRIP6-GFP con leptomicina B (20 ng/mL, 15 min) para bloquear la exportación nuclear (paneles del medio).

Quizás el corto tiempo de residencia de TRIP6 en el núcleo era el responsable de la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en el incremento de la actividad transcripcional de TRIP6 mediada por AMPK (Figura 26). Así que razonamos que si éramos capaces de aumentar el tiempo de residencia de TRIP6 en el interior del núcleo, el efecto de AMPK sobre la actividad transcripcional de TRIP6 podría ser observado mejor.

5.2.2. Análisis de mutaciones en la secuencia de exportación nuclear (NES)

Puesto que la leptomicina B es un inhibidor general de la exportación mediada por la exportina Crm-1, pensamos en modificar específicamente la localización de TRIP6 con el fin de evaluar el efecto de la activación de AMPK sobre su actividad transcripcional. Ya que TRIP6 contiene una secuencia de exportación nuclear funcional (NES), mutamos los residuos de Ser presentes en ella y que se encuentran muy conservados en proteínas de la misma familia (Figura 28), para obtener proteínas con una NES no funcional. Así obtuvimos las proteínas mutantes TRIP6 S101A y TRIP6 S102A.

NES:

	100	L	S	S	T	L	A	E	L	107
TRIP6 humano		L	T	S	M	L	A	D	L	
TRIP6 de ratón		L	S	S	L	L	D	D	M	
Zixina humana		L	T	S	I	L	A	D	L	
LPP humana										

Adaptado de Wang and Gilmore, 2001.

Figura 28: Alineamiento de las secuencias de las NES de TRIP6 humana, de ratón y de otras proteínas de la misma familia. Existen dos serinas, o una serina y una treonina, conservadas en los residuos 101 y 102.

Como se observa en la **Figura 27**, las células COS7 sobreexpresando TRIP6 S102A-GFP muestran una localización preferentemente nuclear de la proteína mutante. Resultados similares se obtuvieron con la proteína de fusión TRIP6 S101A-GFP.

5.2.3. Actividad transcripcional del mutante TRIP6 S102A en células de mamífero

Una vez comprobada la localización nuclear del mutante TRIP6 S102A, volvimos a estudiar la actividad transcripcional de la fusión GBD-TRIP6 S102A en células HEK293T. Tal y como se puede observar en la **Figura 29**, las propiedades transactivadoras de la forma nuclear de TRIP6 (TRIP6 S102A) son mayores que la forma silvestre, y cuando las células sobreexpresando esta forma mutada de TRIP6 se trataron con AICAR para activar la AMPK endógena, obteníamos un aumento estadísticamente significativo en la actividad transcripcional. Esto venía a corroborar nuestras observaciones de que la interacción física entre AMPK $\alpha 2$ y TRIP6 ocurre sólo cuando TRIP6 se localiza en el núcleo (**Figura 20**).

También comprobamos que las diferencias que observábamos en la actividad transcripcional no se debían a diferencias en la cantidad de proteína, como se puede ver en el *Western Blot* que acompaña a la **Figura 29**.

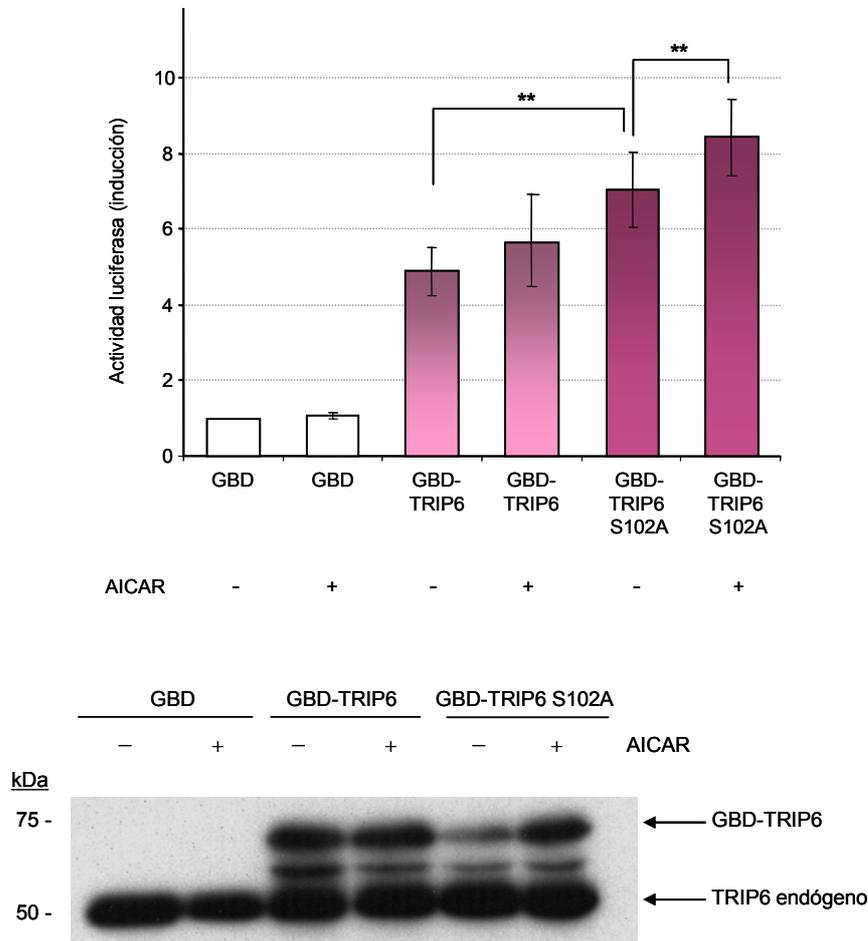


Figura 29: La activación de AMPK incrementa la actividad transcripcional de la forma nuclear de TRIP6. Las células HEK293T fueron cotransfectadas con los plásmidos pG5luc y pBIND (GBD), pBIND-TRIP6 (GBD-TRIP6) o pBIND-TRIP6 S102A (GBD-TRIP6 S102A). 18 h tras la transfección, las células fueron tratadas o no con AICAR 0,5 mM durante 6 h. La actividad luciferasa se midió y se normalizó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores que se muestran son la media resultante de, al menos, 10 transfecciones independientes (las barras indican la desviación estándar; ** $p < 0,01$; $n=10$). 20 μ g de los extractos crudos indicados fueron analizados por *Western Blot* utilizando el anticuerpo comercial anti-TRIP6.

5.2.5. Actividad transcripcional del mutante TRIP6 S102A en levadura

Una vez habíamos visto que el mutante S102A de TRIP6 presentaba mayor capacidad de activar la transcripción en células de mamífero (Figura 29), quisimos corroborar estos resultados en levadura. De nuevo la actividad de TRIP6 (1-290) S102A también aumentaba respecto de la forma silvestre. Además, cuando las células crecían en baja glucosa, la actividad transcripcional era mayor, siendo este incremento dependiente de Snf1, ya que en células mutantes para Snf1 no se observa este aumento (Tabla 10). Estos resultados validan el uso de la levadura como sistema modelo, ya que los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos en células de mamífero.

	β-galactosidasa (unidades)	
	4% glucosa	0,05% glucosa
silvestre		
LexA TRIP6 (1-290)	66	488
LexA TRIP6 (1-290) S102A	333	1218
<i>snf1Δ10</i>		
LexA TRIP6 (1-290)	144	182
LexA TRIP6 (1-290) S102A	291	322

Tabla 10: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la actividad transcripcional del mutante S102A de TRIP6. Las cepas de levadura FY250 y FY250 *snf1 Δ 10* se transformaron con el plásmido pSH18-18 (6 LexAop::lacZ) y los plásmidos pEG202-TRIP6 (1-290) [LexA-TRIP6 (1-290)] o pEG202-TRIP6 (1-290) S102A [LexA-TRIP6 (1-290) S102A]. Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5) y tras dos lavados con H₂O, se cambiaron a un medio con 0,05% (p/v) de glucosa durante tres horas. Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (desviación estándar <15% en todos los casos).

Además, dado que en estos estudios utilizamos la forma truncada (aa 1-290) de TRIP6, podemos concluir que este fragmento contiene sitios de fosforilación por AMPK responsables del aumento en las propiedades como activador de la transcripción, y que la Ser102 no forma parte de estos sitios de regulación.

5.2.6. Estudio de la fosforilación de residuos de la NES por AMPK

Mutamos los residuos de Ser presentes en la NES contemplando la posibilidad de que AMPK fosforilara a TRIP6 en estas serinas y pudiera regular así la localización subcelular de TRIP6. Sin embargo, al realizar de nuevo un ensayo de fosforilación *in vitro* por AMPK, pudimos comprobar que la fusión GST-TRIP6 (1-290) S102A también era fosforilada por la quinasa (Figura 3I), por lo que la Ser102 no forma parte del sistema de regulación por AMPK.

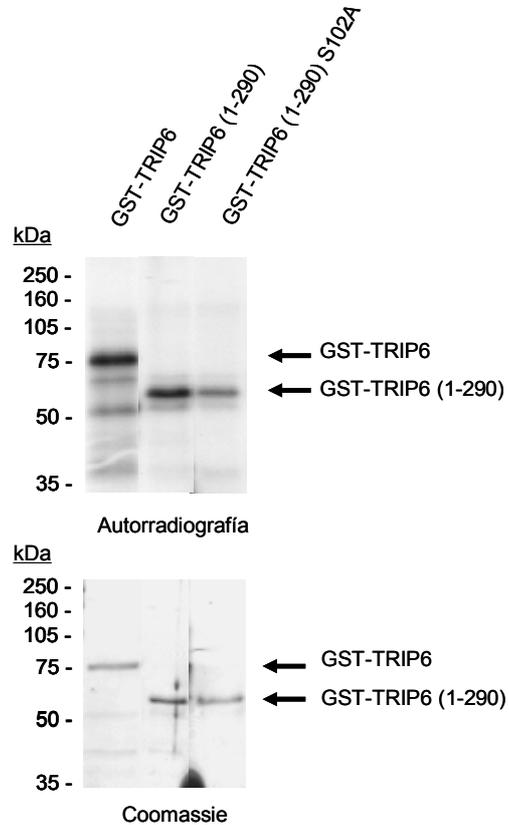


Figura 31: Fosforilación *in vitro* de TRIP6 S102A por AMPK. Se utilizaron 50 ng de la proteína de fusión GST-TRIP6, GST-TRIP6 (1-290) y GST-TRIP6 (1-290) S102A purificadas, junto a 50 mU de AMPK, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Como control de carga, 250 ng de las diferentes proteínas de fusión se analizaron por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie.

5.2.7. Estudio del efecto de AMPK sobre la localización subcelular de TRIP6

Todos estos datos indicaban que, tanto la acumulación de TRIP6 en el núcleo como la activación de AMPK, son capaces de aumentar las

Resultados I

propiedades de coactivador transcripcional de TRIP6. Una posibilidad a tener en cuenta era que AMPK pudiera estar regulando la localización subcelular de TRIP6. Para estudiar esta posibilidad, sometimos a células COS7 expresando TRIP6-GFP a distintos tratamientos que conducen a la activación de AMPK, como son el AICAR, la metformina o el sorbitol (que produce estrés osmótico). Sin embargo, en ninguno de los casos vimos que la localización subcelular de TRIP6-GFP se viera alterada (Figura 32). Siempre observamos un patrón perinuclear y punteado similar al que presentan las células no tratadas.

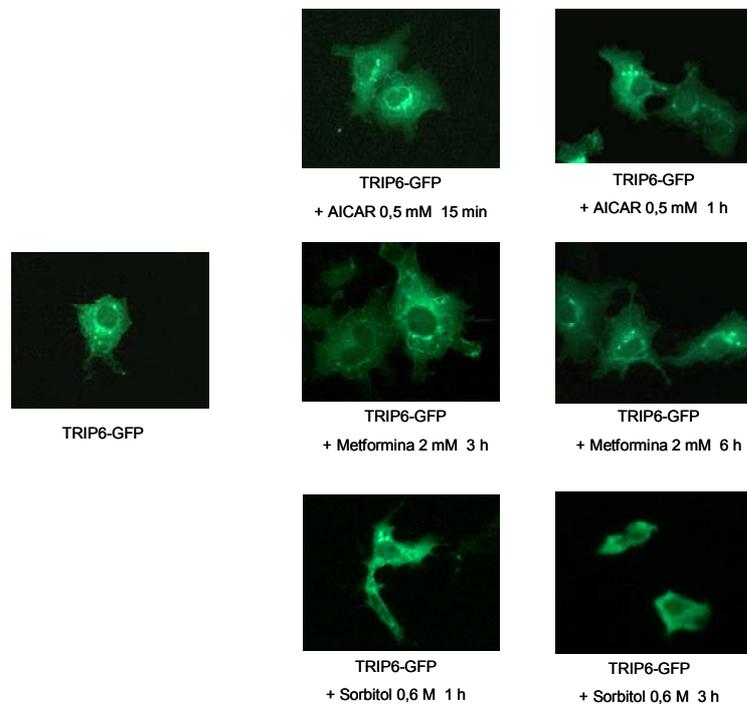


Figura 32: Localización subcelular de TRIP6 tras diferentes tratamientos de activación de AMPK. Células COS7 se transfectaron con el plásmido pEGFP-N1-TRIP6 y (a excepción de las células utilizadas como control) se sometieron a diferentes tratamientos durante los tiempos indicados en la Figura. La fusión TRIP6-GFP se detectó por microscopía de fluorescencia como se describe en Materiales y Métodos.

5.3. La activación de AMPK mejora las propiedades coactivadoras de TRIP6 en la transcripción regulada por NF- κ B

Recientemente se ha descrito que TRIP6 podría actuar como coactivador de los promotores regulados por NF- κ B (Kassel et al., 2004; Li et al., 2005). NF- κ B es uno de los principales factores transcripcionales implicado en numerosos procesos biológicos como son inflamación, angiogénesis, metástasis, proliferación, anti-apoptosis y supervivencia, inmortalidad, etc., regulando la expresión de citoquinas, factores de crecimiento y enzimas (Hayden and Ghosh, 2004; Kumar et al., 2004).

Ya que la actividad transcripcional de TRIP6 S102A está estimulada por AMPK (Figura 29), quisimos estudiar si esta activación dependiente de AMPK podría afectar el papel de TRIP6 en la expresión de genes a partir de promotores regulados por NF- κ B.

Sin embargo, en los experimentos iniciales pudimos observar que el tratamiento con AICAR (durante 6 horas) ya era capaz, por sí solo, de reducir la activación del gen reportero regulado por NF- κ B (5 x UAS_{NF- κ B}-luciferasa) inducida por TNF α (*tumor necrosis factor α*) (Figura 33).

Resultados I

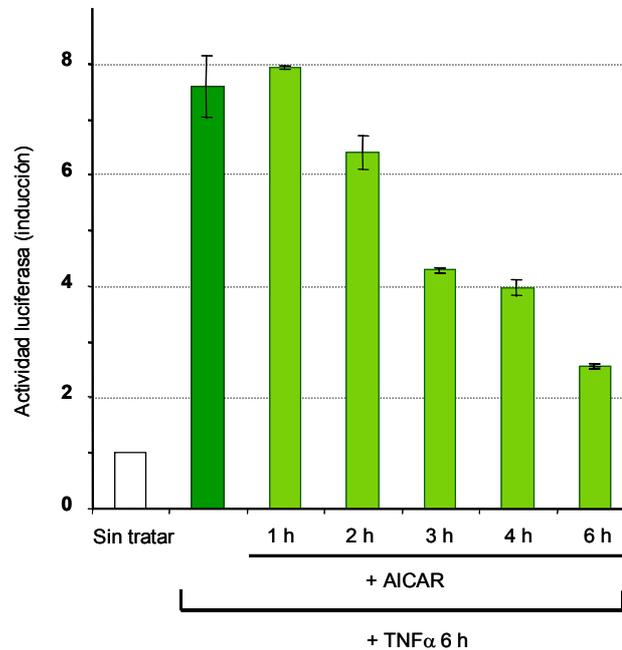


Figura 33: Efecto, dependiente del tiempo, del AICAR sobre la expresión del gen reportero regulado por NF- κ B. Células HEK293T se transfectaron con el plásmido pNF- κ B-luc. 18 h después de la transfección, las células se trataron con TNF α (10 ng/mL) durante 6 horas y AICAR (0,5 mM) durante diferentes periodos de tiempo (desde 1 h hasta 6 h de coincubación), o se dejaron sin tratar. La actividad luciferasa se midió y se normalizó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores se refieren al valor obtenido en las células sin tratar que se ha ajustado a 1. Se ha hecho media de dos transfecciones independientes (las barras indican la desviación estándar).

Este efecto del AICAR sobre la transcripción de genes regulados por NF- κ B ha sido publicado recientemente en células endoteliales de cordón umbilical humanas (HUVEC) (Cacicedo et al., 2004) y en células gliales (Giri et al., 2004). Así que decidimos acortar el tiempo de tratamiento con AICAR hasta 1 hora, condición donde no observábamos efecto sobre la transcripción del gen reportero regulado por NF- κ B (Figura 33), pero sí que era suficiente para activar AMPK endógena, ya que la Thr172 aparece fosforilada (Figura 34).

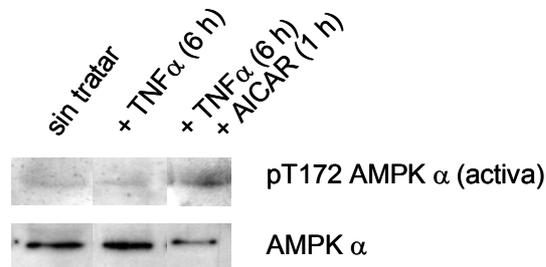


Figura 34: El tratamiento con AICAR durante 1 h es capaz de activar AMPK endógena. 30 μ g de los extractos crudos indicados se analizaron por *Western Blot* usando anti-AMPK α y anti- fosfo-AMPK α (T172P).

Una vez determinadas las condiciones de uso de AICAR, estudiamos el efecto de la activación de AMPK sobre las propiedades coactivadoras de TRIP6 en genes reporteros bajo el control del promotor NF- κ B. En primer lugar, pudimos comprobar, como ya se había descrito (Kassel et al., 2004; Li et al., 2005), que cuando sobreexpresamos TRIP6 (pBIND-TRIP6), la expresión del gen reportero regulado por NF- κ B aumenta 4,8 veces cuando las células se tratan con TNF α . Sin embargo, esta activación es incluso mayor cuando sobreexpresamos la forma nuclear de TRIP6 (pBIND-TRIP6 S102A) (Figura 35).

Resultados I

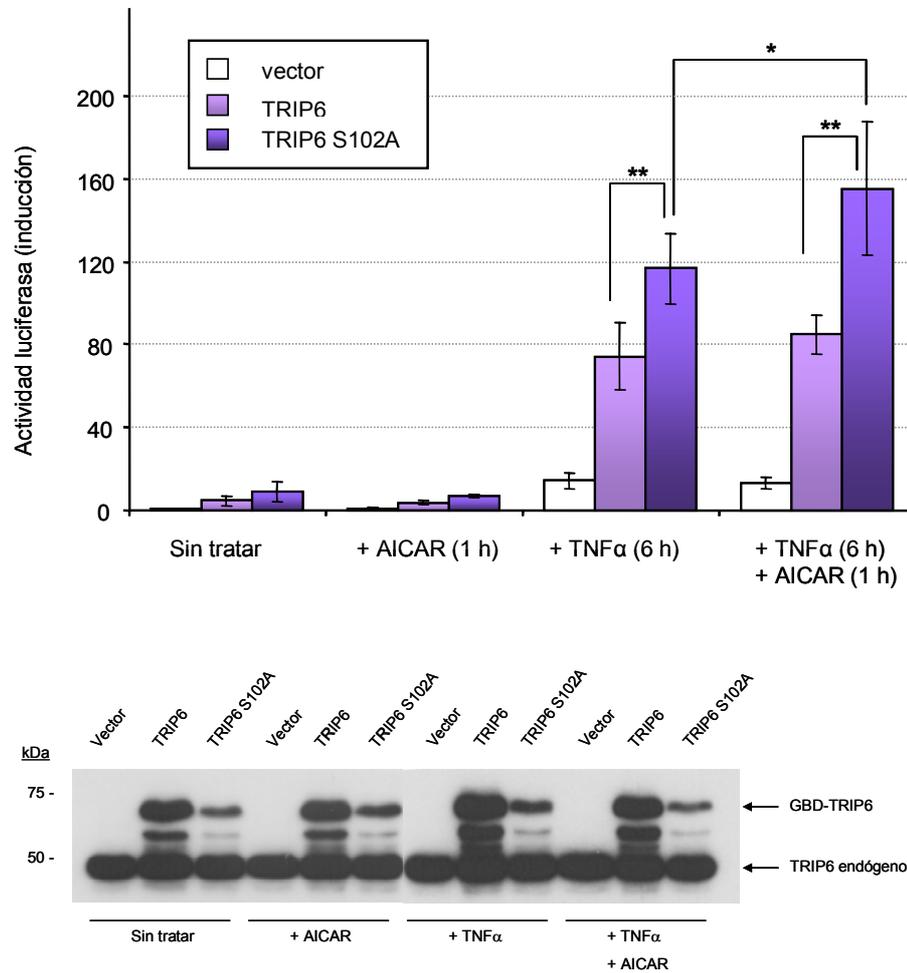


Figura 35: La activación de AMPK mejora las propiedades coactivadoras de TRIP6 en la transcripción regulada por NF- κ B. Células HEK293T se cotransfectaron con los plásmidos pNF- κ B-luc y pBIND (vector), pBIND-TRIP6 o pBIND-TRIP6 S102A. 18 h después de la transfección, las células se trataron con TNF α (10 ng/mL) durante 6 horas y/o con AICAR (0,5 mM) durante la última hora de tratamiento, o se dejaron sin tratar. La actividad luciferasa se midió y se normalizó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores se refieren al valor obtenido en las células sin tratar y transfectadas con pBIND, que se ha ajustado a 1. Los valores son la media de diez transfecciones independientes (las barras indican la desviación estándar; * P <0,05, n=10; ** P <0,01, n=10). 15 μ g de los extractos crudos indicados fueron analizados por *Western Blot* utilizando el anticuerpo comercial anti-TRIP6.

Cuando añadíamos el tratamiento con AICAR durante la última hora de las 6 h del tratamiento con TNF α , observábamos un incremento estadísticamente significativo en la capacidad de la forma nuclear de TRIP6 (TRIP6 S102A) en promover la expresión regulada por NF- κ B (Figura 35), confirmando que la activación de AMPK por AICAR era capaz de estimular las propiedades coactivadoras de una forma nuclear de TRIP6. Sin embargo, esto no se cumple con TRIP6 silvestre, lo que confirma los resultados obtenidos anteriormente, que nos llevan a proponer la hipótesis que relaciona funcionalmente ambas proteínas sólo si éstas residen en el núcleo.

También comprobamos que las diferencias que observábamos en la actividad transcripcional no se debían a diferencias en la cantidad de proteína, como se puede ver en el *Western Blot* que acompaña a la Figura 35.

Por lo tanto, podemos concluir que la activación de AMPK incrementa la capacidad transactivadora de TRIP6 cuando ésta se encuentra en el núcleo de la célula.

Resultados II

La quinasa de levaduras Snf1 (el ortólogo de AMPK α) ejerce un papel importante en la síntesis de glucógeno que en levadura y, al contrario de lo que ocurre en mamíferos, está estimulada por la escasez de nutrientes. Snf1 es necesaria para la defosforilación y activación de la glucógeno sintasa Gsy2, ya que va a activar el complejo proteína fosfatasa Gac1/Glc7 (Francois and Parrou, 2001; Hardy et al., 1994). Glc7 es la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa de tipo 1 de levaduras y Gac1 es la subunidad reguladora implicada en la acumulación de glucógeno (Wu et al., 2001).

Basándonos en los datos que apuntan a SNF1 como una de las proteínas implicadas en la síntesis de glucógeno en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, quisimos estudiar la relación de AMPK con componentes del metabolismo del glucógeno en mamíferos.

1. AMPK interacciona con R5

Comenzamos nuestro estudio analizando la posible interacción de AMPK con las subunidades reguladoras de la proteína fosfatasa PPI relacionadas con el metabolismo del glucógeno. Mientras que en levaduras la subunidad más importante implicada en el metabolismo del glucógeno es Gac1, en mamíferos son varias: GM, GL, R5 y R6 (ver Introducción).

1.1. Doble híbrido en levadura

Utilizando el sistema de doble híbrido en levadura, cuantificamos la interacción entre las distintas subunidades de AMPK y las tres subunidades reguladoras de PPI más importantes implicadas en el metabolismo del glucógeno (GM, GL y R5). Como se observa en la **Tabla II**, observamos una interacción entre R5 y varias subunidades de AMPK: R5 interacciona de manera más fuerte con la subunidad $\beta 2$ de AMPK, aunque también interacciona con $\alpha 2$. Sin embargo no muestra interacción con la subunidad $\gamma 1$. También observamos una interacción entre la subunidad GL y $\beta 2$, aunque fue mucho más débil que con R5.

Resultados II

	β-galactosidasa (unidades)			
	GAD	GAD-GM	GAD-GL	GAD-R5
LexA	<1	<1	<1	<1
LexA-AMPK α 2	1,0 \pm 0,3	1,3 \pm 0,5	1,0 \pm 0,5	26,0 \pm 1,9
LexA-AMPK β 2	1,0 \pm 0,3	1,0 \pm 0,3	8,4 \pm 1,3	69,9 \pm 2,8
LexA-AMPK γ 1	<1	<1	<1	<1

Tabla II: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción de AMPK con distintas subunidades de PPI. La cepa de levadura CTY10.5d se transformó con los plásmidos pBTM116 (LexA), pBTM116-AMPK α 2 (LexA-AMPK α 2), pBTM116-AMPK β 2 (LexA-AMPK β 2) o pEG202-AMPK γ 1 (LexA-AMPK γ 1) y pACT11 (GAD), pACT11-GM (GAD-GM), pACT11-GL (GAD-GL) o pACT11-R5 (GAD-R5). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5). Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes \pm la desviación estándar.

1.2. Coimmunoprecipitación en células de mamífero

A continuación, comprobamos la interacción entre R5 y AMPK mediante coimmunoprecipitación en células HEK293T donde sobreexpresamos la subunidad α 2 de AMPK etiquetada con *myc* y R5 fusionada a la etiqueta HA. Tras inmunoprecipitar α 2 con anti-*myc*, pudimos comprobar que HA-R5 era capaz de coimmunoprecipitar (Figura 36).

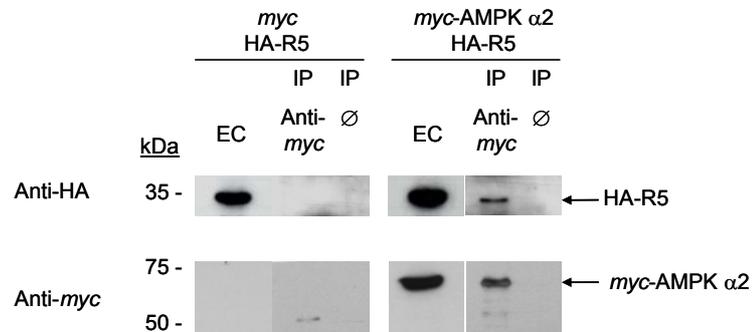


Figura 36: Coimmunoprecipitación de *myc*-AMPK α 2 y HA-R5. Los extractos de proteína total (300 μ g) se obtuvieron de células HEK293T transfectadas con los plásmidos pCMV-HA-R5 y pCMV-*myc*-AMPK α 2 o pCMV-*myc*. *myc*-AMPK α 2 se inmunoprecipitó con 2 μ L de anti-*myc* y el control negativo (\emptyset) se hizo en ausencia de anticuerpo. Las proteínas precipitadas se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetectadas con anti-HA. EC: Extracto crudo.

2. AMPK fosforila a R5 *in vitro*

Ya que habíamos visto que R5 era capaz de interactuar con AMPK α 2, se comenzó a estudiar si R5 era un posible sustrato de fosforilación de AMPK.

Sin embargo, fue imposible purificar la fusión GST-R5 en bacterias ya que resultaba ser insoluble. Así que se obtuvieron formas truncadas de R5, siendo el fragmento soluble más grande que se pudo purificar el que comprendía del aminoácido 1 al 183 (Figura 37).

Para llevar a cabo el ensayo de fosforilación *in vitro* por AMPK se utilizó AMPK comercial y como sustrato de la reacción de fosforilación, GST-R5 (1-183) y ATP marcado radiactivamente con 32 P en su fosfato γ . Tras la reacción, las muestras se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía.

Tras comprobar que GST-R5 (1-183) se fosforilaba por acción de AMPK (Figura 38) y que no lo hacía el correspondiente control con GST, se pasó a localizar el residuo donde recaía la fosforilación.

2.1. Análisis de mutantes de R5 en posibles sitios de fosforilación

En el fragmento que comprende del aminoácido 1 al 183 de R5 se encuentran 16 Ser y 7 Thr, pero sólo tres están flanqueadas por residuos correspondientes a la secuencia consenso de fosforilación de AMPK no estricta (Figura 4, Introducción): son la Ser35, la Ser69 y la Ser77 (Figura 37).

1	MRLCLAHSPV	VKSFLGPYDE	FQRRHFVNKL	KPLK <u>S</u> CLNIK	HKAKSQNDWK	
51	CSHNQAKKRV	VFADSKGL <u>S</u> L	TAIHVF <u>S</u> DLP	EEPAWDLQFD	LDLNDISSA	Motivo de unión a PP1
101	LKHHEEKNLI	LDFPQPSTDY	LSFRSHFQKN	FVCLENCILQ	ERTVT <u>GTVKV</u>	Dominio unión glucógeno
151	<u>KNVSFEKKVQ</u>	<u>IRITFD</u> SWKN	YTDVDCVYMK	NVYGGTDSDT	FSFAIDLPPV	
201	IPTEQKIEFC	ISYHANGQVF	<u>WDNNDGQ</u> NYR	IVHVQWKPDG	VQTQMAPQDC	Dominio unión sustrato
251	AFHQTSPKTE	LESTIFGSPR	LASGLFPEWQ	SWGARMENLAS	YR	

Figura 37: Secuencia aminoacídica de R5, donde se muestran los aminoácidos que forman parte de la secuencia consenso de fosforilación por AMPK. Se muestran los residuos que componen el motivo de unión a PP1 y los dominios de unión a glucógeno y a sustrato. El residuo 183 aparece en morado. Los residuos que forman parte de la secuencia consenso de fosforilación por AMPK aparecen en naranja. La Ser35, la Ser69 y la Ser77 están en naranja y subrayadas.

Del aminoácido 184 al 292 sólo hay un posible sitio de fosforilación por AMPK (la Ser273) con una secuencia consenso muy pobre.

Los residuos Ser35, Ser69 y Ser77, situados en el extremo N-terminal, fueron mutados a alanina mediante mutagénesis dirigida y, de nuevo, se purificaron por afinidad las correspondientes proteínas de fusión a GST expresadas en *E. coli*. Las proteínas GST-R5 (1-183) S35A, GST-R5 (1-183) S69A y GST-R5 (1-183) S77A se utilizaron como sustratos en nuevas reacciones de fosforilación *in vitro* por AMPK y siempre en presencia de AMP. Como control de carga, se utilizaron cantidades equivalentes de estas proteínas de fusión que fueron analizadas en paralelo por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

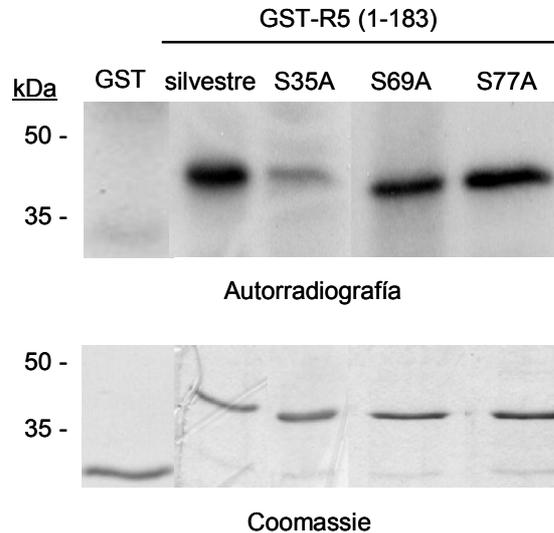


Figura 38: Fosforilación *in vitro* de GST-R5 (1-183) y de los mutantes en sitios de fosforilación de R5. Se utilizaron 50 ng de las diferentes fusiones a GST junto a 50 mU de AMPK y en presencia de AMP, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Como control de carga, 250 ng de las proteínas de fusión se analizaron por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie.

Como se observa en la Figura 38, dos de los tres mutantes en posibles sitios de fosforilación (S69A y S77A) se fosforilan en presencia de AMPK. No obstante, el mutante a alanina de la Ser35 aparece mucho menos fosforilado que la forma silvestre y que el resto de mutantes ensayados.

3. Estudio del residuo Ser35 de R5

Como la Ser35 podría ser un residuo fosforilado por AMPK, decidimos estudiar si mutaciones en este residuo afectaban a la interacción de R5 con AMPK, con la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa de tipo 1 (PP1 α) u otras proteínas que se han descrito que también interaccionan con R5 como laforina (Fernandez-Sanchez et al., 2003), una de las proteínas implicadas en la enfermedad de Lafora.

Resultados II

Para ello, aparte de la mutación de la Ser35 a alanina (S35A) que impide la fosforilación en este residuo, también realizamos la mutación a aspártico que simula fosforilación constitutiva (S35D).

3.1. Interacción con AMPK

Como primera aproximación, realizamos un ensayo de doble híbrido en levadura para cuantificar la interacción de los mutantes generados de R5 (S35A y S35D) con las distintas subunidades de AMPK.

Como se puede observar en la Tabla 12, el mutante S35D interacciona mucho menos con las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ de AMPK, que el mutante S35A, que interacciona de la misma manera que lo hace la forma silvestre.

	β-galactosidasa (unidades)		
	GAD-R5	GAD-R5 S35A	GAD-R5 S35D
LexA	<1	<1	<1
LexA-AMPK $\alpha 2$	26	21	5
LexA-AMPK $\beta 2$	70	82	5
LexA-AMPK $\gamma 1$	<1	<1	<1

Tabla 12: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción de AMPK con R5 y sus mutantes. La cepa de levadura CTY10.5d se transformó con los plásmidos pBTM116 (LexA), pBTM116-AMPK $\alpha 2$ (LexA-AMPK $\alpha 2$), pBTM116-AMPK $\beta 2$ (LexA-AMPK $\beta 2$) o pEG202-AMPK $\gamma 1$ (LexA-AMPK $\gamma 1$) y pACTII-R5 (GAD-R5), pACTII-R5 S35A (GAD-R5 S35A) o pACTII-R5 S35D (GAD-R5 S35D). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5). Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (desviación estándar <15% en todos los casos).

Sin embargo, cuando quisimos corroborar esta pobre interacción del mutante R5 S35D con la subunidad $\alpha 2$ de AMPK por coimmunoprecipitación en células de mamífero, no obtuvimos el mismo resultado. El mutante S35D de R5 es capaz también de coimmunoprecipitar con AMPK $\alpha 2$, al igual que el mutante S35A, y que R5 silvestre (Figura 39).

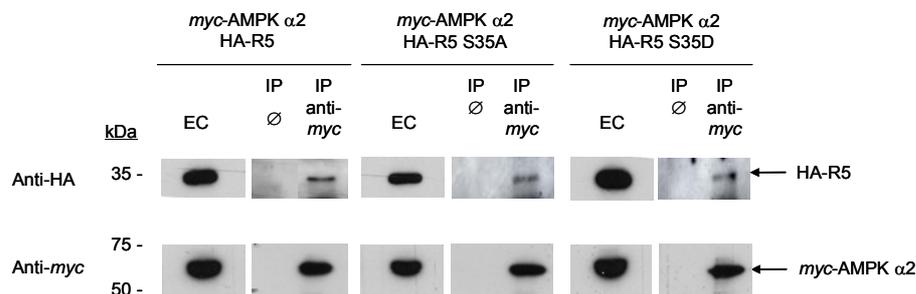


Figura 39: Coimmunoprecipitación de *myc*-AMPK $\alpha 2$ y HA-R5 y los mutantes en la Ser35. Los extractos de proteína total (300 μ g) se obtuvieron de células HEK293T transfectadas con los plásmidos pCMV-*myc*-AMPK $\alpha 2$ y pCMV-HA-R5, pCMV-HA-R5 S35A o pCMV-HA-R5 S35D. *myc*-AMPK $\alpha 2$ se inmunoprecipitó con 2 μ L de anti-*myc* y el control negativo (\emptyset) se hizo en ausencia de anticuerpo. Las proteínas precipitadas se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetectadas con anti-HA. EC: Extracto crudo.

3.2. Interacción con PPI y con laforina

De nuevo, realizamos doble híbrido en levadura para cuantificar también las interacciones entre R5 y sus mutantes en el residuo S35 con PPI α y con laforina.

La interacción con laforina no se ve afectada ni al mutar la Ser35 a alanina ni a aspártico. Sin embargo, si bien la interacción de R5 S35A con la subunidad catalítica de PPI es similar a la de la forma silvestre, el mutante S35D mostró una drástica disminución en su interacción con PPI α (Tabla 13).

	β -galactosidasa (unidades)		
	GAD-R5	GAD-R5 S35A	GAD-R5 S35D
LexA	<1	<1	<1
LexA-PP1 α	203	284	8
LexA-laforina	67	63	64

Tabla 13: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción de PP1 y laforina con R5 y sus mutantes. La cepa de levadura CTY10.5d se transformó con los plásmidos pBTM116 (LexA), pBTM116-PP1 α (LexA-PP1 α) o pEG202-laforina (LexA-laforina) y pACT11-R5 (GAD-R5), pACT11-R5 S35A (GAD-R5 S35A) o pACT11-R5 S35D (GAD-R5 S35D). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5). Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (desviación estándar <15% en todos los casos).

También quisimos comprobar si R5 S35D interaccionaba menos con la subunidad catalítica de PP1 por coimmunoprecipitación en células de mamífero. Pero tanto R5, como R5 S35A, como R5 S35D, coimmunoprecipitaban junto a PP1 α (Figura 40).

Una posible explicación para la diferente interacción medida por ensayos de doble híbrido y coimmunoprecipitación, tanto en el caso de AMPK α 2 como de PP1 α , podría ser que R5, PP1 α y AMPK α 2 estuvieran formando parte de un complejo multiproteico, y aunque la mutación S35D impida a R5 interaccionar con PP1 α y AMPK α 2, otras proteínas pueden estar manteniendo el complejo y hacer que coimmunoprecipiten juntas.

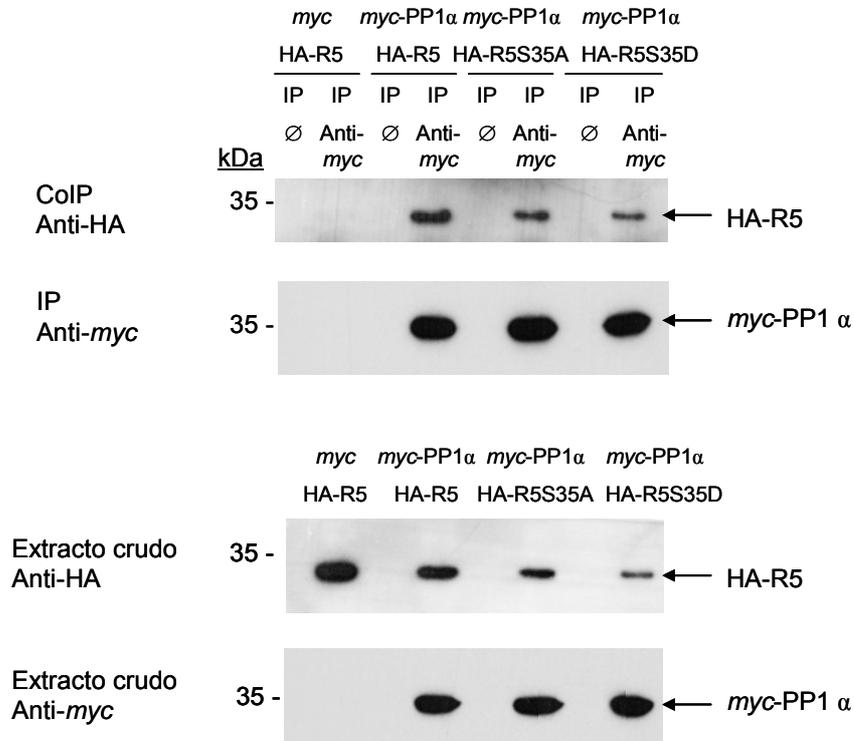


Figura 40: Coimmunoprecipitación de *myc*-PP1 α y HA-R5 y los mutantes en la Ser35. Los extractos de proteína total (300 μ g) se obtuvieron de células HEK293T transfectadas con los plásmidos pCMV-*myc*-PP1 α y pCMV-HA-R5, pCMV-HA-R5 S35A o pCMV-HA-R5 S35D. *myc*-PP1 α se inmunoprecipitó con 2 μ L de anti-*myc* y el control negativo (\emptyset) se hizo en ausencia de anticuerpo. Las proteínas precipitadas se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetectadas con anti-HA.

4. La sobreexpresión de R5 incrementa la producción de glucógeno en células de mamífero

A continuación nos propusimos ensayar el efecto biológico de la posible modificación de R5 por AMPK. Según la bibliografía, la sobreexpresión de R5 produce un incremento en el glucógeno acumulado en las células (Berman et al., 1998; Fong et al., 2000; Printen et al., 1997).

Quisimos comprobar la capacidad glucogenogénica de los mutantes en el residuo Ser35 que habíamos obtenido. Para ello, utilizamos células CHO-IR que sobreexpresan el receptor de insulina humano y no expresan R5 endógeno (Printen et al., 1997) y que ya habían sido utilizadas por otros autores para cuantificar el glucógeno producido por la sobreexpresión de R5 (Fong et al., 2000; Printen et al., 1997). Comprobamos que al sobreexpresar R5 en presencia de glucosa éramos capaces de observar un incremento significativo en la producción de glucógeno. Al transfectar las células CHO-IR con un plásmido que sobreexpresaba una fusión HA-R5, obteníamos un incremento de más de diez veces en la cantidad de glucógeno presente en las células (Figura 41). Obteníamos el mismo incremento cuando sobreexpresábamos el mutante S35A de R5 (Figura 41); sin embargo, la forma S35D de R5 no era capaz de producir el mismo incremento en la producción de glucógeno que el resto de formas testadas (Figura 41).

Como se puede observar en el *Western Blot* que acompaña a la Figura 41, aunque la forma mutante S35D de R5 produce tres veces menos glucógeno que la forma silvestre, los niveles de proteína que se expresan son similares, lo que indica que R5 S35D tiene una capacidad glucogenogénica reducida.

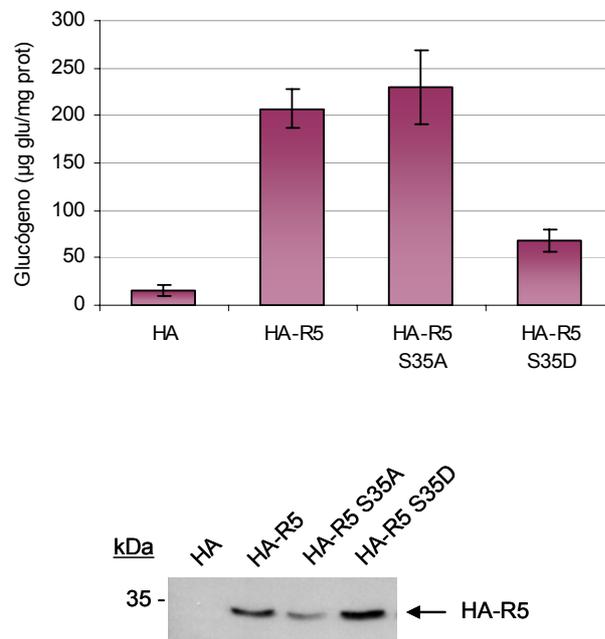


Figura 41: Determinación de glucógeno producido por la sobreexpresión de las fusiones HA-R5, HA-R5 S35A y HA-R5 S35D. Células CHO-IR se transfirieron con los plásmidos pCMV-HA (HA), pCMV-HA-R5 (HA-R5), pCMV-HA-R5 S35A (HA-R5 S35A) o pCMV-HA-R5 S35D (HA-R5 S35D). La cantidad de glucógeno se determinó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las barras indican la desviación estándar de, al menos, 5 experimentos independientes. 15 µg de los extractos crudos indicados fueron analizados por *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-HA.

4.1. AMPK disminuye el efecto glucogenogénico de la sobreexpresión de R5

Una vez habíamos comprobado que R5 producía un aumento en el glucógeno presente en las células y que R5 S35D tenía una capacidad glucogenogénica reducida, quisimos comprobar si la actuación de AMPK conducía a similares efectos. Con este propósito cotransfectamos las células con una forma de AMPK $\alpha 2$ (T172D) constitutivamente activa, o con una

combinación de las tres subunidades ($\alpha 2$ T172D, $\beta 2$, $\gamma 1$) con el fin de estabilizar el complejo AMPK.

Como se muestra en la **Figura 42**, tanto la subunidad $\alpha 2$ de AMPK con la mutación T172D, como las tres subunidades de AMPK, hacen que el glucógeno que se produce por efecto de la sobreexpresión de R5 sea menor. Esto lo pudimos comprobar tanto para la forma silvestre de R5 como para el mutante S35A. En el caso del mutante S35D no observamos efecto de AMPK.

Mediante *Western Blot* comprobamos que había cantidades equivalentes de todas las formas de R5 que habíamos introducido (**Figura 42**). También comprobamos que se había expresado la subunidad $\alpha 2$ de AMPK, y tal como se observa en la Figura, al sobreexpresar las tres subunidades, obtenemos una estabilización del complejo.

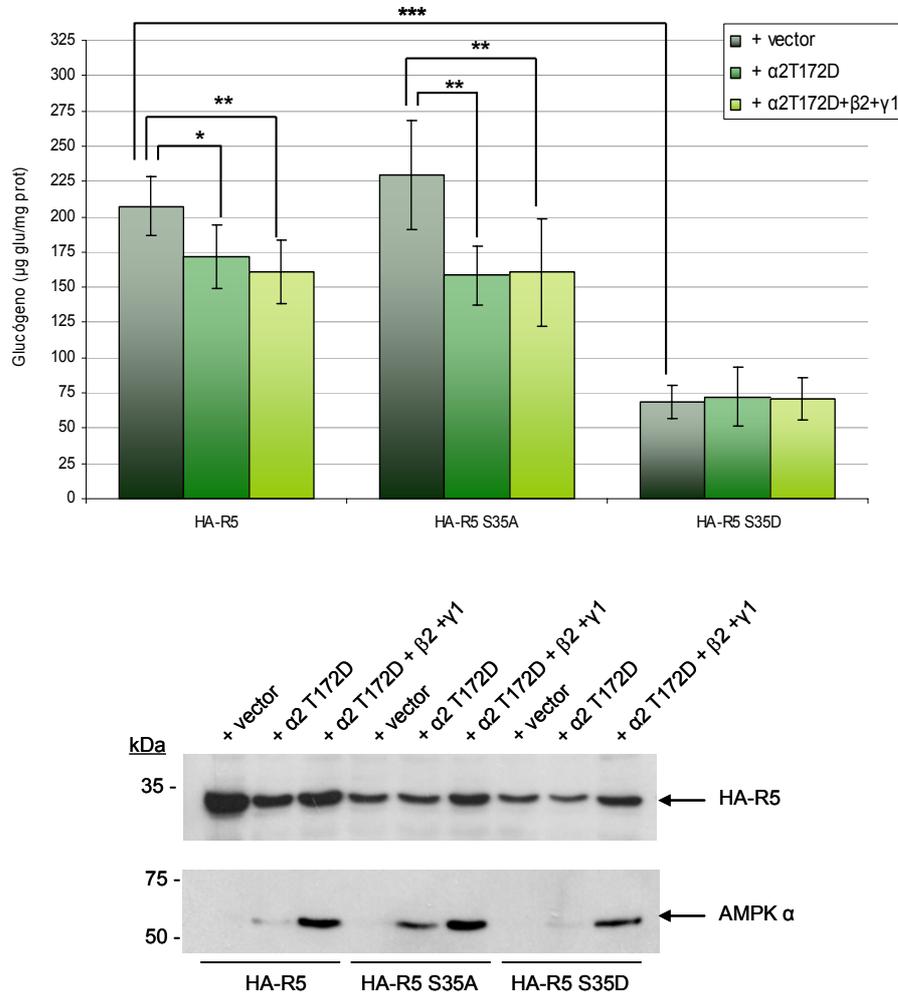


Figura 42: Determinación de glucógeno producido por la sobreexpresión de las fusiones HA-R5, HA-R5 S35A y HA-R5 S35D, junto a la expresión de AMPK α 2 T172D, β 2 y γ 1. Células CHO-IR se transfectaron con los plásmidos pCMV-HA-R5 (HA-R5), pCMV-HA-R5 S35A (HA-R5 S35A) o pCMV-HA-R5 S35D (HA-R5 S35D) y pcDNA3.1 (vector), pcDNA-AMPK α 2 T172D (α 2 T172D) o pcDNA-AMPK α 2 T172D, pcDNA-AMPK β 2 y pcDNA-AMPK γ 1 (α 2 T172D + β 2 + γ 1). La cantidad de glucógeno se determinó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las barras indican la desviación estándar de, al menos, 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. 15 μ g de los extractos crudos indicados fueron analizados por *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-HA-HRP y anti-AMPK α .

5. R5 se fosforila en un sitio diferente de la Ser35

Todos los ensayos mostrados hasta este momento nos indicaban que el mutante S35A (incapaz de fosforilarse) se comportaba igual que la forma silvestre de R5 y que esta mutación no afectaba ni a la interacción con otras proteínas, ni a su capacidad glucogenogénica. Decidimos comprobar de nuevo si realmente R5 se fosforilaba *in vivo* en este residuo, detectando formas fosforiladas de R5 *in vivo* mediante electroforesis bidimensional, y comprobando si éstas variaban al expresar los mutantes en la Ser35.

Transfectamos células CHO-IR con una fusión HA-R5 y, en un primer ensayo, comprobamos que aparecen, al menos, dos manchas separadas por su diferente punto isoelectrónico (pI) (**Figura 43 A**). Además, cuando tratábamos el extracto con λ -fosfatasa, la mancha que había migrado más hacia la parte positiva desaparecía, lo que indicaba que se correspondía con la población de la proteína que se encuentra fosforilada (**Figura 43 A**). Si tratábamos las células con AICAR (un activador de AMPK), obteníamos un patrón diferente, ya que la mancha que más migraba desaparecía, pero aparecía una nueva mancha de menor movilidad más cercana a la forma no fosforilada (**Figura 43 A**). El tratamiento con λ -fosfatasa también eliminaba esta forma intermedia, sugiriendo que también es una forma fosforilada. El mismo patrón de formas fosforiladas tras el tratamiento con AICAR se obtuvo cuando las células se cotransfectaron con una forma constitutivamente activa de AMPK (**Figura 43 B**), lo que indica que AMPK es capaz de modificar *in vivo* el estado de fosforilación de R5.

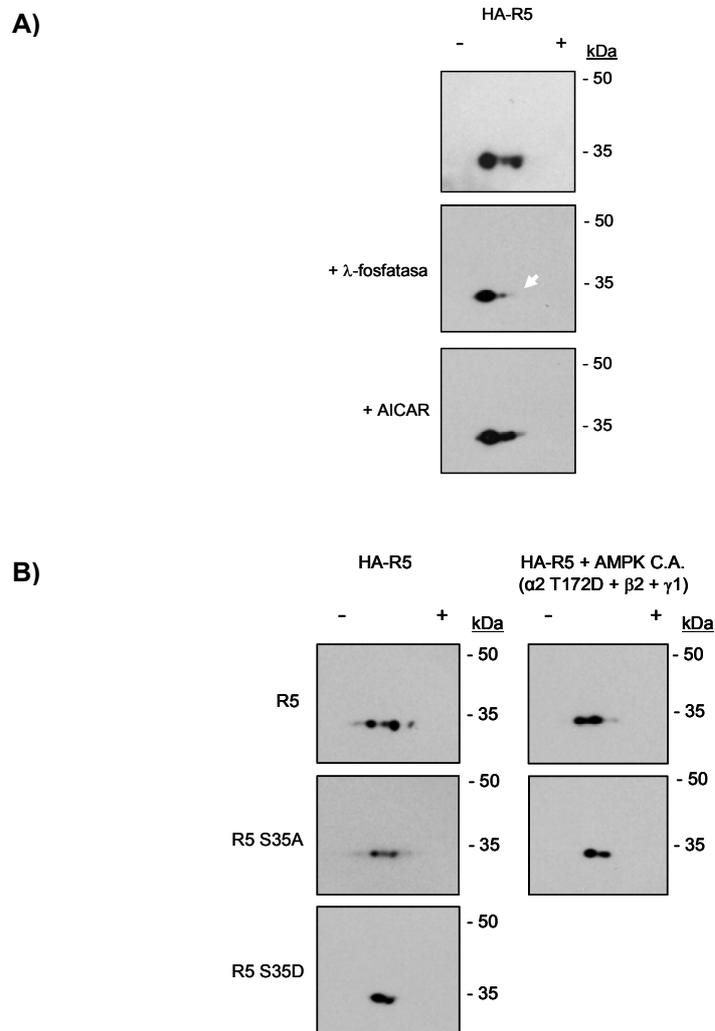


Figura 43: Análisis mediante electroforesis bidimensional de la fosforilación de R5. Células CHO-IR se transfectaron con el plásmido pCMV-HA-R5 (HA-R5) en A), o con los plásmidos pCMV-HA-R5 (HA-R5), pCMV-HA-R5 S35A (HA-R5 S35A) o pCMV-HA-R5 S35D (HA-R5 S35D) y pcDNA-AMPK α 2 T172D, pcDNA-AMPK β 2 y pcDNA-AMPK γ 1 (α 2 T172D + β 2 + γ 1) en B). Los tratamientos realizados a las células o a los extractos se especifican en Materiales y Métodos. 50 μ g de las muestras se separaron en una primera dimensión que consistió en un isoelectroenfoque de pH 6-11 (los signos - y + indican la polaridad) y la segunda dimensión, en un SDS-PAGE, tal y como se indica en Materiales y Métodos. La proteína se inmunodetectó con el anticuerpo anti-HA-HRP.

Posteriormente, pasamos a comprobar los mutantes en el residuo Ser35. Como se puede observar en la **Figura 43 B**, al transfectar las células CHO-IR con la fusión HA-R5 S35A se obtenía el mismo patrón de fosforilación que con la forma silvestre (**Figura 43 B**). Además, la cotransfección con una forma constitutivamente activa de AMPK modificaba el patrón de fosforilación de manera similar a lo observado con la forma silvestre (**Figura 43 B**). En el caso del mutante S35D, no aparecían las formas de mayor movilidad (**Figura 43 B**).

Todos estos resultados nos indicaban que R5 se fosforila *in vivo* en un sitio diferente de la Ser35 ya que aunque este residuo esté mutado a Ala, la proteína sigue teniendo capacidad de fosforilarse. La modificación S35D parece afectar tanto a la fosforilación *in vivo* de R5 como a su capacidad glucogenogénica, quizás porque promueva cambios conformacionales en la estructura de la proteína.

6. AMPK y las proteínas laforina y malina

Ya que habíamos comprobado que R5 interactuaba con AMPK y dado que se ha descrito que R5 interactúa con laforina (Fernandez-Sanchez et al., 2003), quisimos comprobar la posible interacción funcional entre AMPK y laforina. Y debido a que también se ha visto que laforina interactúa con malina (Gentry et al., 2005; Lohi et al., 2005), estudiamos la posible interacción entre malina y AMPK.

6.1. AMPK interactúa con laforina

Para estudiar las posibles interacciones entre estas proteínas, transformamos la cepa de levadura CTY10.5d con los plásmidos que contenían las distintas subunidades de AMPK fusionadas al dominio de activación de la transcripción de Gal4, GAD, y con los que contenían laforina o malina fusionadas al dominio de unión a DNA, LexA. Pudimos observar que laforina es capaz de interactuar con la subunidad $\alpha 2$ de AMPK, y que incluso la interacción es mayor con la subunidad $\beta 2$ (**Figura**

44). Sin embargo, no existía interacción con la subunidad $\gamma 1$. Por otro lado, malina no mostraba interacción con ninguna de las subunidades de AMPK (Figura 44).

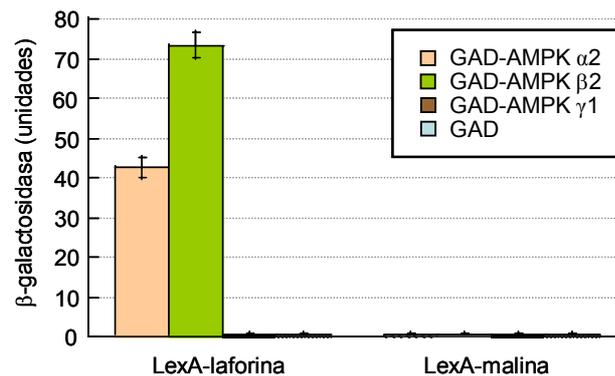


Figura 44: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción de AMPK con laforina y malina. La cepa de levadura CTY10.5d se transformó con los plásmidos pACTII-AMPK $\alpha 2$ (GAD-AMPK $\alpha 2$), pACTII-AMPK $\beta 2$ (GAD-AMPK $\beta 2$), pACTII-AMPK $\gamma 1$ (GAD-AMPK $\gamma 1$) o pACTII (GAD) y pEG202-laforina (LexA-laforina) o pBTM116-malina (LexA-malina). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5). Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (las barras indican la desviación estándar).

A continuación quisimos comprobar la interacción de AMPK $\alpha 2$ y laforina mediante coimmunoprecipitación. Transfectamos células HEK293T con los plásmidos que sobreexpresaban laforina y la subunidad $\alpha 2$ de AMPK etiquetada con HA e inmunoprecipitamos con el anticuerpo frente a la etiqueta HA. Como se puede observar en la Figura 45, al inmunoprecipitar HA-AMPK $\alpha 2$ éramos capaces de detectar laforina.

Resultados II

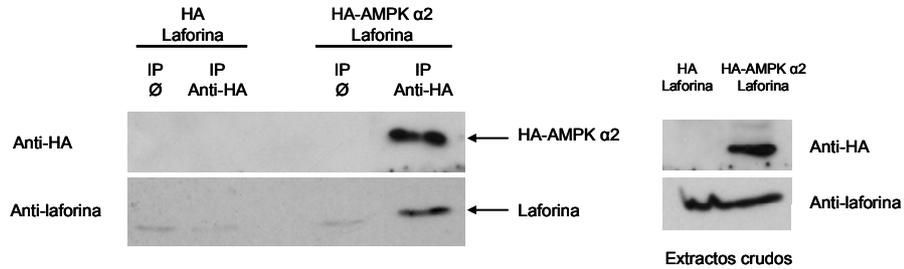


Figura 45: Coimmunoprecipitación de laforina y HA-AMPK $\alpha 2$. Los extractos de proteína total (300 μg) se obtuvieron de células HEK293T transfectadas con los plásmidos pCMV-HA-AMPK $\alpha 2$ y pCINeo-laforina. HA-AMPK $\alpha 2$ se inmunoprecipitó con 2 μL de anti-HA y el control negativo (\emptyset) se hizo en ausencia de anticuerpo. Las proteínas precipitadas se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetectadas con anti-laforina A7.

6.2. AMPK fosforila a laforina *in vitro*

Una vez habíamos visto que laforina también interactuaba con la subunidad catalítica de AMPK, decidimos purificar una fusión GST-laforina en bacterias para realizar un ensayo de fosforilación *in vitro* con AMPK y ATP marcado radiactivamente con ^{32}P . GST-laforina resultó ser fosforilada *in vitro* por AMPK, tal y como se muestra en la Figura 46.

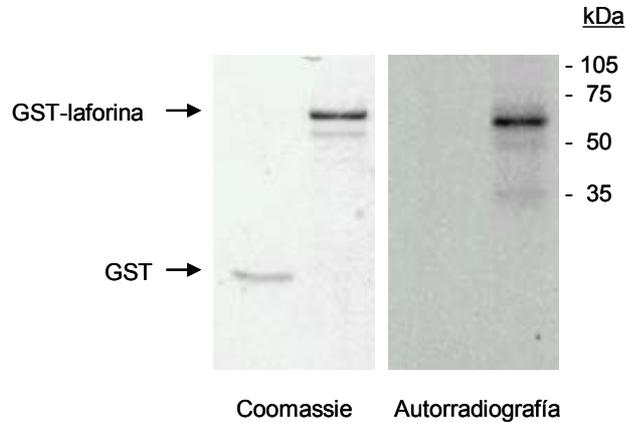


Figura 46: Fosforilación *in vitro* de GST-laforina. Se utilizaron 50 ng de la fusión GST-laforina junto a 50 mU de AMPK y en presencia de AMP, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Como control de carga, 250 ng de las proteínas de fusión se analizaron por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie.

6.3. AMPK regula la interacción entre laforina y malina

Ya que AMPK era capaz de interactuar con laforina, quisimos comprobar si afectaba a la interacción de laforina con malina o con R5.

Para poder llevar a cabo este estudio, transformamos la cepa de levadura CTY10.5d con los plásmidos que expresaban las fusiones LexA-laforina y GAD-malina. En la Figura 47 se puede ver como laforina interacciona físicamente con malina y, además, esta interacción aumenta tres veces cuando las levaduras crecen en un medio con una baja concentración de glucosa, condiciones de activación de la quinasa Snfl.

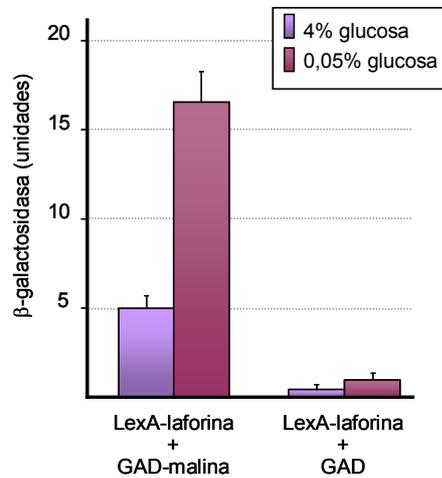


Figura 47: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción de laforina y malina. La cepa de levadura CTY10.5d se transformó con los plásmidos pEG202-laforina (LexA-laforina) y pACTII (GAD) o pACTII-malina (GAD-malina). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa, hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5) y tras dos lavados con H₂O, se cambiaron a un medio con 0,05% (p/v) de glucosa durante tres horas. Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (las barras indican la desviación estándar).

También se ensayó la interacción de laforina con R5 de manera similar, y obtuvimos 851 unidades Miller cuando las células crecían en alta concentración de glucosa, frente a 995 unidades Miller que resultaron en condiciones de baja concentración de glucosa; por lo que esta interacción no mostraba diferencias significativas al variar las condiciones de activación de SNFI.

El hecho de que la interacción entre laforina y malina aumentara en condiciones de baja disponibilidad de glucosa podría deberse, o bien a la actividad de SNFI, o bien a que en esas condiciones es cuando las levaduras sintetizan glucógeno. Así que realizamos de nuevo un ensayo de doble híbrido, pero en cepas mutantes para Snfl y para GacI. Para el caso de la cepa *gacIΔ* (incapaz de sintetizar glucógeno), la interacción aumentó de igual manera en condiciones de baja glucosa que en la cepa silvestre. Sin embargo,

para el caso de *snf1Δ*, la interacción no aumentó cuando las células crecieron en un medio que sólo contenía un 0,05% (p/v) de glucosa (Figura 48), lo que indicaba que la interacción entre laforina y malina era dependiente de la actividad SNF1.

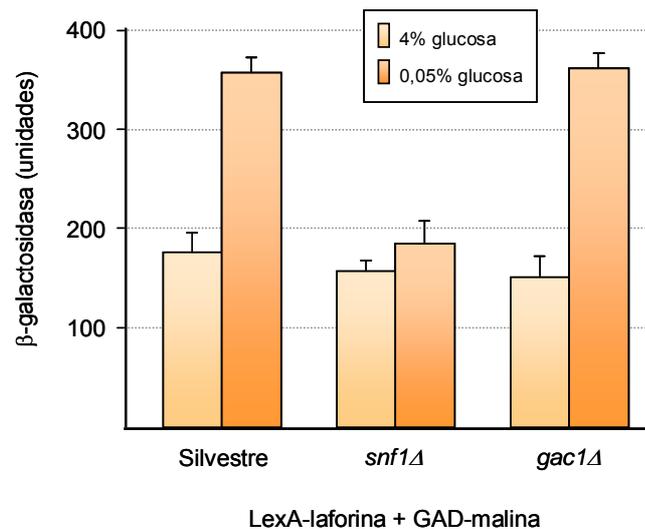


Figura 48: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción de laforina y malina en distintas condiciones. Las cepas de levadura FY250, FY250 *snf1Δ* y BY4741 *gac1Δ* se transformaron con los plásmidos pSH18-18 (6 LexAop::lacZ), pEG202-laforina (LexA-laforina) y pACTII-malina (GAD-malina). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5) y tras dos lavados con H₂O, se cambiaron a un medio con 0,05% (p/v) de glucosa durante tres horas. Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (las barras indican la desviación estándar).

De forma consistente con los datos anteriores, cuando transformamos la cepa de levadura CTY10.5d con LexA-laforina, GAD-malina y una forma constitutivamente activa de AMPK α 2 (KD T172D), observamos un incremento en la interacción incluso en condiciones de alta glucosa (Figura 49).

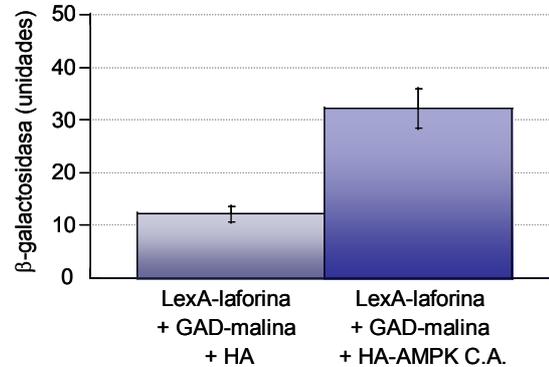


Figura 49: Medida de actividad β -galactosidasa (expresada en unidades Miller) para cuantificar la interacción de laforina y malina al sobreexpresar una forma constitutivamente activa de AMPK. La cepa de levadura CTY10.5d se transformó con los plásmidos pEG202-laforina (LexA-laforina), pACTII-malina (GAD-malina) y pSK93 (HA) o pSK93-AMPK α 2 KD T172D (HA-AMPK C.A.). Las células se crecieron en SC con 4% (p/v) de glucosa, hasta fase logarítmica (D.O.₆₀₀ 0,5). Los valores se corresponden a las medias obtenidas de entre 4 y 6 transformantes (las barras indican la desviación estándar).

Todos estos datos nos indicaban que la interacción entre laforina y malina se ve favorecida por la actividad SNF1 de levaduras y AMPK de mamíferos.

7. El complejo laforina-malina disminuye el efecto glucogenogénico de la sobreexpresión de R5

A continuación, quisimos comprobar si la interacción de R5 con el complejo laforina-malina tenía algún significado fisiológico.

Para poder llevar a cabo estos experimentos utilizamos células FTO-2B, provenientes de hepatoma de rata, y que son incapaces de producir glucógeno ya que carecen de glucoquinasa (Gomis et al., 2002). Sin embargo, al sobreexpresar R5 pueden acumular glucógeno (Berman et al., 1998). Así que, células FTO-2B fueron infectadas, en un estudio preliminar, con diferentes cantidades del adenovirus que sobreexpresa el homólogo de R5 en

ratón (PTG) fusionado a GFP. Como se puede ver en la Figura 50, se produce un incremento en la acumulación de glucógeno de forma dosis-dependiente, cuando las células fueron infectadas con cantidades crecientes del adenovirus conteniendo GFP-PTG.

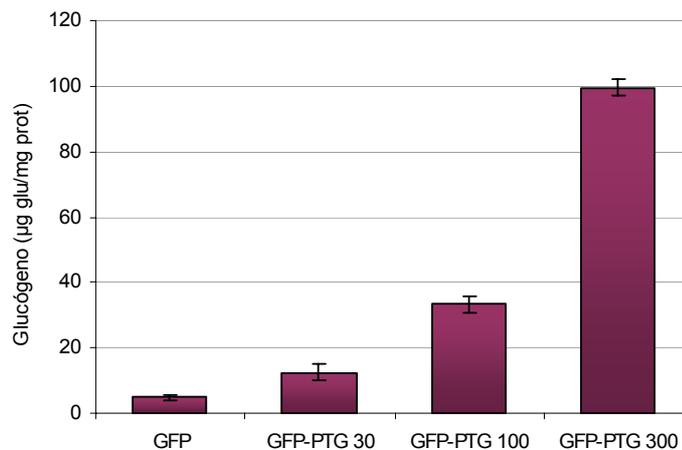


Figura 50: Incremento en la acumulación de glucógeno de forma dosis-dependiente producido por cantidades crecientes del adenovirus que expresa la fusión GFP-PTG. Células FTO-2B se infectaron con los adenovirus Ad-GFP o cantidades crecientes de Ad-GFP-PTG (los números del gráfico indican la cantidad de adenovirus, en μL). La cantidad de glucógeno se determinó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las barras indican la desviación estándar de, al menos, 5 experimentos independientes.

A continuación, coinfectamos células FTO-2B con el adenovirus que expresa GFP-PTG y con los adenovirus que expresan laforina y malina. Observamos que la acumulación de glucógeno inducido por R5 se veía inhibida progresivamente por la coinfección de cantidades crecientes de los adenovirus que expresan laforina y malina (Figura 51). Además, este efecto era dependiente de la presencia de ambas proteínas, ya que en ausencia de una de ellas, no se observaba inhibición de las propiedades glucogenogénicas de R5 (Figura 51). Como control se utilizaron cantidades equivalentes del adenovirus conteniendo GFP.

Resultados II

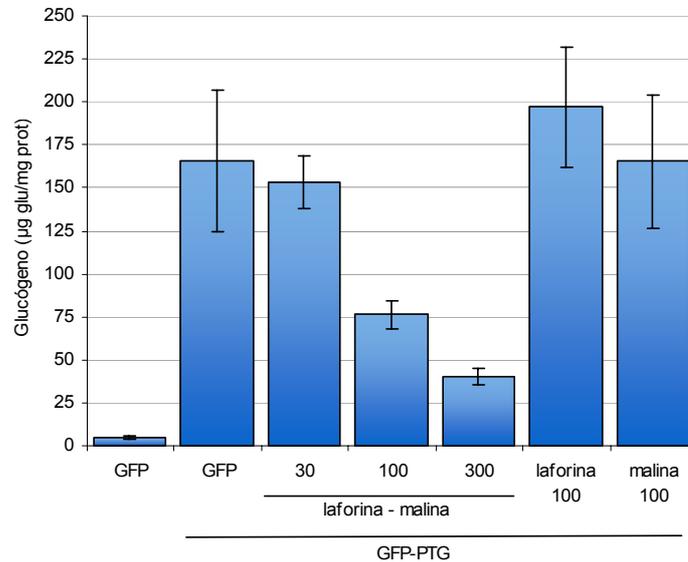


Figura 51: Determinación de la cantidad de glucógeno producido por distintas cantidades de los adenovirus que expresan laforina y malina. Células FTO-2B se infectaron con los adenovirus Ad-GFP, Ad-GFP-PTG, Ad-laforina y Ad-HA-malina (los números del gráfico indican la cantidad de adenovirus, en μL). La cantidad de glucógeno se determinó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las barras indican la desviación estándar de, al menos, 5 experimentos independientes.

Además, pudimos comprobar que el descenso en la cantidad de glucógeno producido por la expresión de laforina y malina podría deberse a la degradación de R5, ya que mediante *Western Blot*, vimos que la cantidad de proteína de la fusión GFP-PTG se veía disminuida cuando se expresaban las tres proteínas (Figura 52).

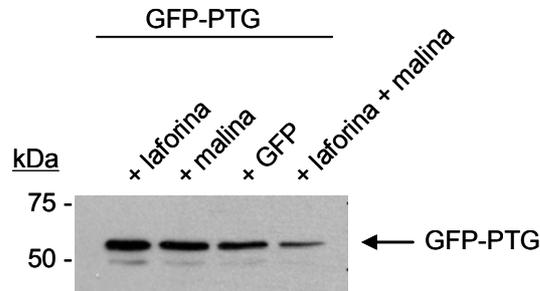


Figura 52: La cantidad de la proteína GFP-PTG disminuye con la expresión de laforina y malina. Células FTO-2B se infectaron con los adenovirus Ad-GFP-PTG, Ad-laforina y/o Ad-HA-malina. 20 μ g de proteína total se analizó por *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-GFP.

7.1. La expresión de una forma dominante negativa de AMPK contrarresta el efecto del complejo laforina-malina sobre la actividad glucogenogénica de R5

Como hemos visto anteriormente, disponíamos de datos que indicaban que el complejo laforina-malina podría estar modulado por AMPK, así que postulamos que el complejo laforina-malina podría prevenirse expresando una forma dominante negativa (D.N.) de la subunidad catalítica de AMPK (α 1 D157A), lo que debería provocar un incremento en la actividad glucogenogénica de R5.

Al infectar células FTO-2B con los adenovirus que expresan GFP-PTG y AMPK D.N. obtuvimos un incremento estadísticamente significativo de la actividad glucogenogénica de R5 (Figura 53). Además, este efecto no era producido simplemente por la expresión de la forma dominante negativa de AMPK porque no obteníamos el mismo incremento cuando coinfectábamos con GFP en vez de GFP-PTG.

A continuación comprobamos si AMPK D.N. era capaz de prevenir la inhibición de la actividad glucogenogénica de R5 producida por la sobreexpresión del complejo laforina-malina. De nuevo, al infectar células

Resultados II

FTO-2B con los adenovirus que expresan GFP-PTG, laforina, malina y AMPK D.N. obteníamos un incremento significativo en las propiedades glucogenogénicas de R5, respecto de las células que no expresaban AMPK D.N. (Figura 53), sugiriendo que AMPK D.N. podría prevenir parcialmente la inhibición por parte del complejo laforina-malina sobre la producción de glucógeno, interfiriendo en la interacción entre ambas proteínas.

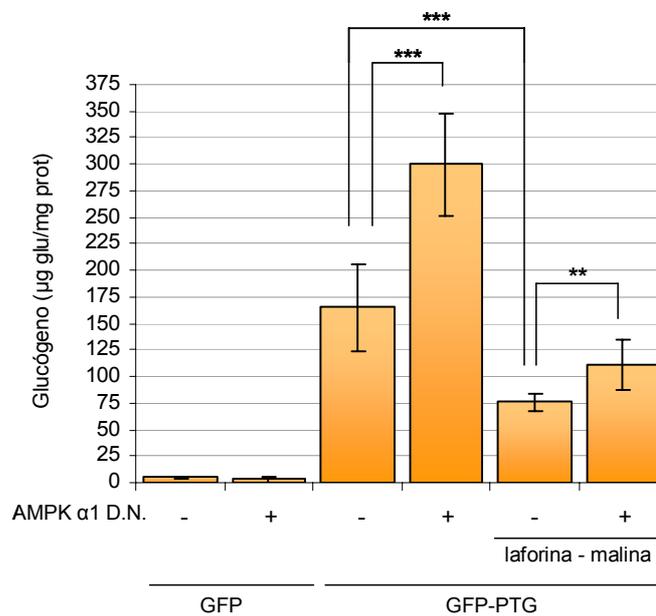


Figura 53: Determinación de la cantidad de glucógeno producido por la expresión de las proteínas GFP-PTG, AMPK D.N., laforina y malina. Células FTO-2B se infectaron con los adenovirus Ad-GFP, Ad-GFP-PTG, Ad-AMPK α 1 D157A (D.N.), Ad-laforina y Ad-HA-malina. La cantidad de glucógeno se determinó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las barras indican la desviación estándar de, al menos, 5 experimentos independientes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Por análisis de *Western Blot* seguimos comprobando que la cantidad de proteína GFP-PTG era ligeramente menor cuando sobreexpresábamos laforina y malina; sin embargo, los niveles de proteína parecían recuperarse

cuando también se expresaba la forma dominante negativa de AMPK (Figura 54).

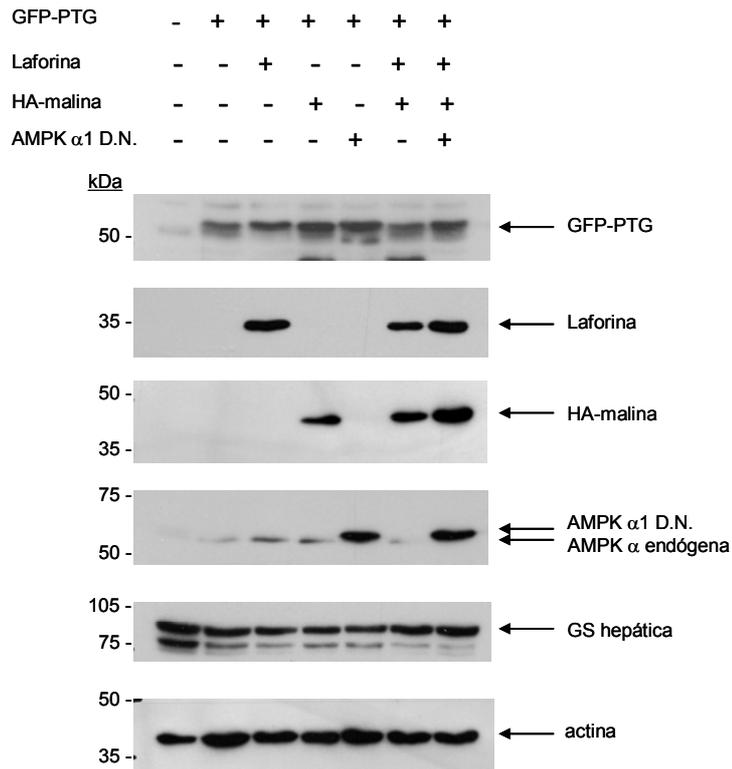


Figura 54: Análisis de la cantidad de la proteína GFP-PTG con la expresión de AMPK D.N., laforina y malina. Células FTO-2B se infectaron con los adenovirus Ad-GFP-PTG, Ad-AMPK α 1 D157A (D.N.), Ad-laforina y Ad-HA-malina. 60 μ g de proteína total se analizó por *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-GFP, anti-laforina A7, anti-HA, anti-AMPK α , anti-GS-L1 y anti-actina.

Ante la posibilidad de que el incremento en las propiedades glucogenogénicas de R5 producidas por AMPK D.N. se debiera a la interrupción de la formación del complejo laforina-malina, nos planteamos testar esta posibilidad en células que carecieran de laforina o malina. Para ello, utilizamos dos cultivos primarios de fibroblastos provenientes de dos

pacientes de la enfermedad de Lafora, los cuales eran portadores de las mutaciones Y86X o R241X en la proteína laforina, respectivamente; así como una línea celular de fibroblastos sanos como control. Como se puede observar en la **Figura 55**, al infectar estos fibroblastos con el adenovirus que expresa GFP-PTG pudimos ver que el incremento que se produce en el glucógeno presente en las células al sobreexpresar R5 es mayor en los fibroblastos que contienen las mutaciones en el gen de laforina que en los fibroblastos control. Sin embargo, y al contrario que ocurre con los fibroblastos control, la coinfección con el adenovirus de AMPK D.N. no incrementó la actividad glucogenogénica de R5 en los fibroblastos derivados de los pacientes de Lafora. Estos resultados sugieren que en ausencia de un complejo laforina-malina funcional (bien porque falta uno de los componentes o bien porque la interacción entre los componentes no está favorecida) la actividad glucogenogénica de R5 es máxima.

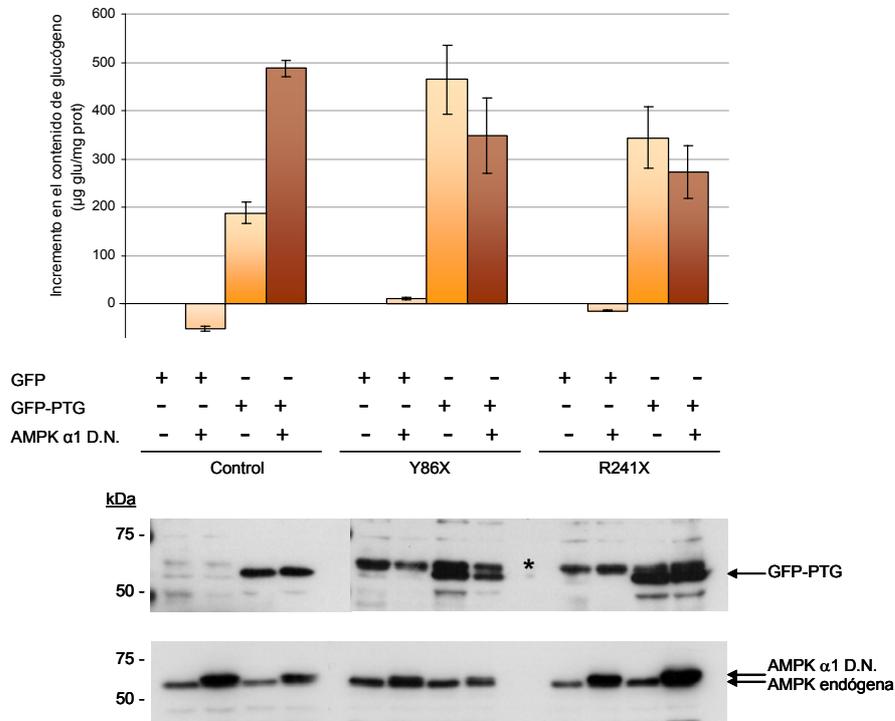


Figura 55: Incremento en la cantidad de glucógeno producido por la expresión de las proteínas GFP-PTG y/o AMPK D.N. respecto al producido por la expresión de GFP en fibroblastos. Se infectaron fibroblastos que contienen la mutación Y86X o R241X en la proteína laforina, así como fibroblastos control, con los adenovirus Ad-GFP, Ad-GFP-PTG y Ad-AMPK α1 D157A (D.N.). La cantidad de glucógeno se determinó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las barras indican la desviación estándar de 4 experimentos independientes. 60 µg de proteína total se analizó por *Western Blot* utilizando los anticuerpos anti-GFP y anti-AMPK α. La posición de una banda inespecífica del anticuerpo anti-GFP se indica con un asterisco.

A continuación quisimos introducir la proteína silvestre de laforina en los fibroblastos que contenían la mutación Y86X en la proteína laforina para comprobar si éramos capaces de obtener niveles de glucógeno similares a los producidos por fibroblastos sanos. Como se ve en la Figura 56, no éramos capaces de obtener un descenso en la producción de glucógeno mediada por la sobreexpresión de R5 simplemente sobreexpresando

Resultados II

laforina. Como ya habíamos visto en experimentos anteriores (Figura 51) necesitamos laforina y malina para poder observar un descenso significativo en la cantidad de glucógeno presente en las células. Por lo tanto, aunque estos fibroblastos únicamente contienen una mutación en el gen de laforina, el hecho de que esta proteína no se encuentre presente o no sea funcional, hace que malina pueda inestabilizarse o pierda también su funcionalidad. Y por eso, necesitamos introducir ambas proteínas silvestres para conseguir una reducción en las propiedades glucogenogénicas de R5.

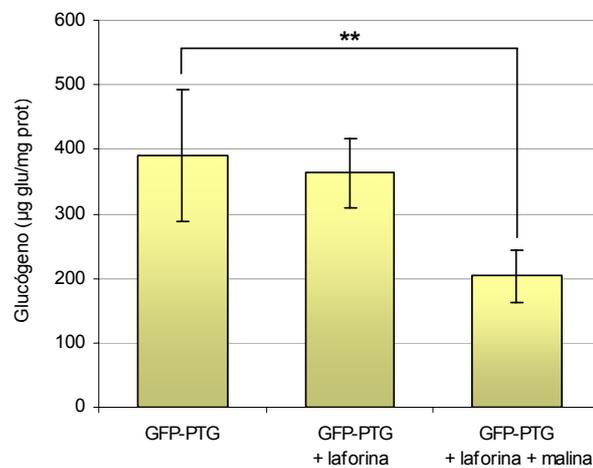


Figura 56: Determinación de la cantidad de glucógeno producido por la expresión de las proteínas GFP-PTG, laforina y malina en fibroblastos. Fibroblastos que contienen la mutación Y86X en la proteína laforina se infectaron con los adenovirus Ad-GFP-PTG y Ad-laforina o Ad-laforina y Ad-HA-malina. La cantidad de glucógeno se determinó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las barras indican la desviación estándar de, al menos, 5 experimentos independientes. ** $p < 0,01$.

También corroboramos los niveles de R5 que se encontraban en las células tras infectar con laforina y malina. Ya habíamos visto en las Figuras 52 y 54 que en células FTO-2B los niveles de R5 eran menores cuando se encontraban las tres proteínas (R5, laforina y malina). También en fibroblastos que contienen la mutación Y86X en la proteína laforina

podimos observar por *Western Blot* una disminución de la proteína R5 que se daba sólo cuando laforina y malina también se sobreexpresaban (Figura 57). También hay que destacar que la isoforma muscular de la glucógeno sintasa (isoforma presente en fibroblastos) sufre una disminución en sus niveles de proteína cuando se expresan R5, laforina y malina (Figura 57).

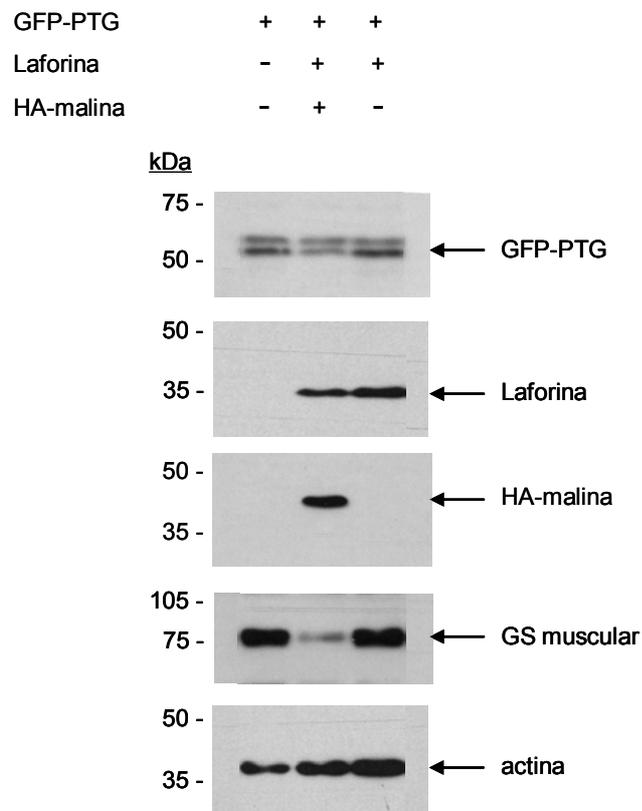


Figura 57: Análisis de la cantidad de la proteína GFP-PTG con la expresión de laforina y/o malina en fibroblastos. Fibroblastos conteniendo la mutación Y86X en la proteína laforina se infectaron con los adenovirus Ad-GFP-PTG, Ad-laforina y/o Ad-HA-malina. 60 µg de proteína total se analizó por *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-GFP, anti-laforina A7, anti-HA, anti-MGS3 y anti-actina.

Discusión

AMPK se detectó por primera vez como una actividad inhibidora en preparaciones de acetil-CoA carboxilasa (Carlson and Kim, 1973) y 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-reductasa (HMGR) (Beg et al., 1978) y más tarde se vió que estaba estimulada por AMP (Ferrer et al., 1985; Yeh et al., 1980). Cuando se comprobó que las quinasas relacionadas con la acetil-CoA carboxilasa y HMGR eran una y la misma, se adoptó el nombre de AMPK (Carling et al., 1987).

Cuando AMPK se purificó de hígado de rata, se descubrió que era un heterotrímero compuesto por una subunidad catalítica α y las subunidades no catalíticas β y γ (Davies et al., 1994; Mitchelhill et al., 1994), con sus correspondientes homólogos en levadura, los cuales pertenecen al complejo SNF1 (Carling et al., 1994; Mitchelhill et al., 1994). Este descubrimiento fue revelador porque ya se sabía que la quinasa Snf1 controlaba la expresión de los genes reprimibles por glucosa en respuesta a la escasez de glucosa (Celenza and Carlson, 1986) y que mutaciones en el gen *SNF1* impedían el crecimiento en fuentes de carbono alternativas como la sacarosa. SNF1 y AMPK están funcionalmente relacionadas y AMPK también inhibe la expresión de genes activada por glucosa (Foretz et al., 1998; Leclerc et al., 1998). Se han encontrado homólogos de AMPK/SNF1 en todos los eucariotas y representan una subfamilia de proteínas quinasa sensible al estrés metabólico muy conservada (Kemp et al., 2003).

AMPK está emergiendo como uno de los principales reguladores del metabolismo ya que es capaz de fosforilar directamente enzimas clave de rutas metabólicas, así como de controlar la expresión de genes. Por lo que la identificación de nuevas dianas sobre las que pueda actuar AMPK es objeto actualmente de numerosos estudios.

I. TRIP6

Una de las aproximaciones más utilizadas a la hora de descubrir interacciones entre proteínas es la técnica de doble híbrido. En el presente trabajo se ha utilizado muy ampliamente esta técnica, no sólo para identificar nuevas relaciones entre proteínas, sino también para cuantificar las interacciones. Además, en la mayoría de las veces, se ha utilizado esta técnica en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que permite una fácil manipulación y los resultados obtenidos son fácilmente extrapolables al sistema de mamíferos por la gran relación que mantienen SNF1 y AMPK.

Por todo ello, realizamos en el laboratorio un escrutinio genético de doble híbrido en levadura con el objetivo de identificar proteínas relacionadas con AMPK que estuvieran implicadas en la expresión génica. Para ello, utilizamos como proteína cebo la subunidad $\alpha 2$ de AMPK e identificamos TRIP6 como una de las proteínas capaces de interactuar.

TRIP6 forma parte de la familia de las zixinas, las cuales desempeñan dos tipos de funciones. Por un lado, se localizan en las placas de adhesión focal en la membrana plasmática regulando entre otras funciones, la migración celular y la organización de los filamentos de actina; por otro lado, viajan al núcleo donde tienen propiedades reguladoras (Wang and Gilmore, 2003).

Con el trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral hemos podido comprobar que TRIP6 es un nuevo sustrato de AMPK (Solaz-Fuster et al., 2006). Hemos visto que TRIP6 interactúa físicamente con la subunidad catalítica $\alpha 2$ del complejo AMPK tanto en levaduras como en células de mamífero (Tabla 3 y Figuras 18, 19 y 20, Resultados I). Como resultado de esta interacción, la quinasa es capaz de fosforilar a TRIP6 *in vitro* (Figura 21, Resultados I). Hemos intentado identificar el posible sitio (o los posibles sitios) de la fosforilación por AMPK, encontrando tres sitios que respondían a los requisitos de la secuencia consenso de fosforilación de AMPK: Ser272, Thr341 y Ser461. Mutagenizamos estos tres sitios a alanina y, sin embargo, estas sustituciones no evitaron la fosforilación *in vitro* por AMPK (Figura 23, Resultados I). Como TRIP6 es una proteína muy rica en Ser y Thr (llegan

a ser el 10% de la composición total de aminoácidos), como siguiente aproximación decidimos generar formas truncadas de la proteína que nos permitieran localizar los dominios donde pudiera recaer la fosforilación de AMPK. Así pudimos concluir que TRIP6 se fosforila preferentemente en su extremo amino-terminal (del aminoácido 1 al 290) (Figura 25, Resultados I). Y aunque hemos abordado otras estrategias para intentar identificar un posible sitio de fosforilación, no hemos obtenido resultados concluyentes.

El siguiente gran punto que quisimos abarcar fue la importancia fisiológica de la interacción entre AMPK y TRIP6. En primer lugar, comenzamos por estudiar si AMPK influía en las interacciones que TRIP6 mantenía con otras proteínas. TRIP6 se describió por primera vez como proteína capaz de unirse al receptor de hormonas tiroideas (Lee et al., 1995), y además, también se describía en ese mismo artículo que era capaz de interactuar con el receptor de retinoides X. Así que decidimos reproducir estas interacciones pero, además, quisimos averiguar si se veían alteradas al cambiar las condiciones en las que SNF1 (el ortólogo de AMPK en levaduras) estaba activo. Según nuestros resultados (Tabla 5, Resultados I), la interacción entre TRIP6 y THR β era bastante débil y el estado de activación de Snf1 no ejercía ningún efecto. Para el caso de RXR α , aunque la interacción con TRIP6 era más importante, la actividad de Snf1 seguía sin influir en ella.

También se había publicado que TRIP6 interactuaba con componentes de placas de adhesión focal: Con la parte C-ter del receptor 2 del ácido lisofosfatídico (LPA) (Xu et al., 2004) y también con CasL/HEF1 (Yi et al., 2002). En este caso, además de comprobar la interacción entre las proteínas descritas, utilizamos otra estrategia para averiguar si AMPK influía en estas relaciones, que fue la de sobreexpresar en *Saccharomyces cerevisiae* una forma constitutivamente activa de AMPK $\alpha 2$. Tampoco pudimos ver en este caso una influencia significativa de AMPK sobre la interacción de estas proteínas de las placas de adhesión focal con TRIP6 (Tabla 6, Resultados I).

Aunque no descartamos que AMPK pueda tener un efecto en la posible función de TRIP6 en las placas de adhesión focal, decidimos centrarnos en la otra función que se le había adjudicado a TRIP6: la de

coactivador transcripcional. Usando la levadura como sistema modelo, hemos comprobado que tanto la activación del ortólogo de AMPK en levadura (SNF1) (Tabla 7, Resultados I) como la expresión heteróloga de una forma constitutivamente activa de AMPK $\alpha 2$ (Tabla 8, Resultados I), conducen a un incremento en las propiedades transactivadoras de TRIP6. Además, cuando usamos formas truncadas de TRIP6, encontramos que la parte amino-terminal de la proteína tenía actividad transcripcional, y que esta actividad aumentaba por la acción de SNF1/AMPK (Tabla 10, Resultados I), sugiriendo que el dominio N-terminal de TRIP6 contiene residuos críticos para su fosforilación dependiente de AMPK y para su activación.

Cuando repetimos el mismo tipo de experimentos en células de mamífero encontramos que la activación de AMPK endógena sólo mejoraba las propiedades transactivadoras de TRIP6 cuando la proteína estaba en el núcleo (TRIP6 S102A), donde se localizan principalmente los complejos AMPK que contienen la isoforma $\alpha 2$. Estos resultados eran consistentes con una publicación reciente donde se observaba que sólo una isoforma nuclear de TRIP6 tiene propiedades transactivadoras (Kassel et al., 2004). Todos estos datos, junto con el resultado de la coimmunoprecipitación que llevamos a cabo para corroborar la interacción entre TRIP6 y AMPK $\alpha 2$, donde sólo pudimos observar interacción en condiciones donde obligábamos a TRIP6 a residir en el núcleo (con leptomicina B) (Figura 20, Resultados I) nos indicaban que el efecto que AMPK ejerce sobre TRIP6 lo hace cuando ambas proteínas se encuentran en el núcleo.

Una de las posibilidades que barajamos fue que AMPK pudiera regular la localización subcelular de TRIP6, permitiéndole entrar al núcleo. Para ello, probamos a activar AMPK con diferentes tratamientos ampliamente utilizados. Sin embargo, no pudimos observar diferencias en la distribución de TRIP6 dentro de la célula (Figura 32, Resultados I).

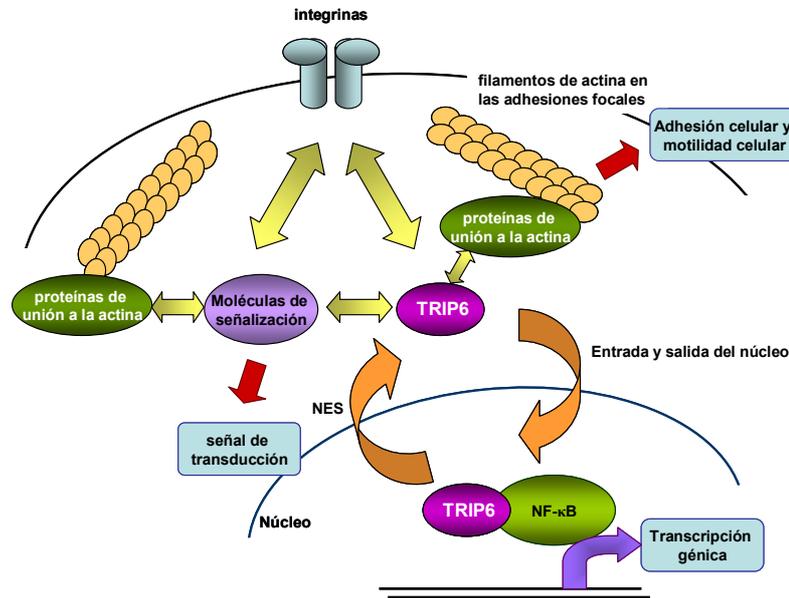
Se han utilizado muchas estrategias para intentar dilucidar el mecanismo por el cual TRIP6 es dirigido al núcleo. Sin embargo, aparte del tratamiento con leptomicina B (que inhibe a la exportina Crm-1), sólo se ha conseguido acumular a TRIP6 en el núcleo inactivando su secuencia de

exportación nuclear (NES). Para conseguir que TRIP6 se mantuviera retenido en el núcleo, modificamos los residuos potencialmente fosforilables (Ser101 y Ser102) presentes en la NES por otro que no pudiera ser fosforilado (Ala) (Figura 27, Resultados I). Hasta el momento, sólo se había descrito que cambios en las leucinas características de este tipo de secuencias de exportación nuclear (Figura 28, Resultados I) impedían su función en TRIP6 (Wang and Gilmore, 2001). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la sustitución de un residuo polar (Ser) por uno apolar (Ala) puede introducir cambios en la estructura de la NES que impiden su función, o que la fosforilación de estas dos serinas (Ser101 y Ser102) por una quinasa desconocida, podría ser responsable de la exportación de la proteína del núcleo al citoplasma. En este último caso, la quinasa tendría que ser distinta de AMPK, ya que las fusiones GST-TRIP6 (1-290) S101A (resultado no mostrado) y GST-TRIP6 (1-290) S102A seguían estando fosforiladas por AMPK *in vitro* (Figura 31, Resultados I), indicando que ninguna de estas dos serinas eran dianas de la acción de AMPK.

No obstante, tanto los datos de la fosforilación *in vitro* (Figuras 25 y 31, Resultados I), como los datos del incremento en la capacidad de transactivación en levaduras (Tabla 10, Resultados I) de la parte amino-terminal de TRIP6, nos indican que en esa región (del aminoácido 1 al 290) debe hallarse algún residuo o residuos donde recaiga la fosforilación de AMPK y, por tanto, la regulación de la actividad transcripcional de TRIP6.

Una vez las proteínas pertenecientes a la familia de las zixinas se encuentran en el núcleo, son capaces de desarrollar sus actividades transactivadoras. Son varias las hipótesis que intentan explicar el papel de estas proteínas en la regulación transcripcional. Se ha propuesto que éstas podrían interactuar directamente con la maquinaria transcripcional mejorando su función, o que podrían modular la actividad de factores transcripcionales, actuando entonces como coactivadores. Alternativamente, y debido a que estas proteínas viajan del citoplasma al núcleo, se ha propuesto que pudieran controlar la distribución subcelular de factores transcripcionales (Petit et al., 1996; Wang and Gilmore, 2001; Wang and Gilmore, 2003). En el caso de TRIP6 pudimos comprobar que actúa como

coactivador de promotores regulados por NF- κ B, y que también en este sistema AMPK puede mejorar las propiedades transactivadoras de la forma nuclear de TRIP6 (TRIP6 S102A). El papel que puede desempeñar TRIP6 en la activación de genes dependientes de promotores regulados por NF- κ B todavía queda por dilucidar. Ya que el factor NF- κ B está relacionado con procesos como la inflamación, angiogénesis o proliferación, tal vez TRIP6 pueda estar vinculando estímulos captados en la membrana plasmática con respuestas en la transcripción génica. A través de sus dominios LIM, TRIP6 es capaz de unirse a muchas proteínas, desde proteínas que se localizan bajo la membrana plasmática componiendo los complejos de las placas de adhesión focal (Xu et al., 2004), hasta componentes de la cascada de señalización de NF- κ B (Li et al., 2005), así que parece evidente que TRIP6 va a desarrollar funciones similares a las que desempeñan proteínas pertenecientes a las familias de la zixina y la paxilina (**Figura 58**), quienes se han propuesto como componentes de una ruta de señalización directa desde la membrana plasmática y el citoplasma hasta el núcleo, ya que muchas de ellas son capaces de formar plataformas para el ensamblaje de complejos proteicos, tanto en las placas de adhesión focal como en el núcleo (Wang and Gilmore, 2003).



Adaptado de Wang and Gilmore, 2003.

Figura 58: Múltiples funciones para las proteínas de las familias de la zixina y la paxilina (en esta Figura se ha representado a TRIP6). Estas proteínas se localizan en placas de adhesión focal, donde interaccionan con integrinas, proteínas de unión a actina y moléculas señalizadoras para interferir en adhesión celular, motilidad y transducción de señales. Además también pueden viajar al núcleo donde interaccionan con factores transcripcionales (aquí se ha representado NF-κB) para estimular la expresión génica.

Respecto al papel que AMPK desempeña en la ruta de NF-κB, parece que AMPK puede inhibir la expresión génica mediada por NF-κB al menos por dos mecanismos distintos: inhibiendo la translocación al núcleo de la subunidad p65 de NF-κB, y aumentando su acetilación en el núcleo, dependiendo del estímulo que lo desencadene (Cacicedo et al., 2004). La relevancia fisiológica de la inhibición en la expresión de genes inducida por NF-κB debido a la activación de AMPK todavía permanece sin resolver. En personas con obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2, se ha observado un incremento de los ácidos grasos libres en plasma, lo cual se ha

relacionado con un estado pro-inflamatorio, disfunción de las células endoteliales y una prediposición a enfermedades vasculares ateroscleróticas. Además, se ha visto que un aumento de los ácidos grasos libres en plasma causan una activación de NF- κ B en músculo y leucocitos humanos y en hígado de rata, sugiriendo que los niveles elevados de ácidos grasos pueden activar a NF- κ B y crear una respuesta inflamatoria *in vivo*. Se ha observado que el ejercicio, la adiponectina y el tratamiento con tiazolidinedionas o metformina (capaces de activar AMPK), disminuyen los procesos pro-inflamatorios y la disfunción endotelial, sugiriendo que AMPK podría ser una diana para prevenir estos cambios (Cacicedo et al., 2004).

Aunque el papel que se le ha adjudicado a AMPK es el de inhibir los procesos inflamatorios desencadenados por la ruta NF- κ B, en los resultados que aquí se presentan AMPK activa la transcripción de genes dependientes de NF- κ B a través de TRIP6. Una posible explicación para esta aparente contradicción puede ser el tiempo de actuación del estímulo. En anteriores publicaciones ya se había visto una dependencia del tiempo en la respuesta de NF- κ B a la activación de AMPK por AICAR. Y, en efecto, como se puede observar en la Figura 33 (Resultados I), a tiempos cortos, la activación de AMPK no es capaz de inhibir la expresión génica dependiente de NF- κ B. Por lo que podría tratarse de una respuesta dependiente de la duración del estímulo. Es decir, cuando llega el estímulo, AMPK, a través de TRIP6, es capaz de activar la transcripción de genes bajo el control de NF- κ B, pero si el estímulo continúa, la respuesta de AMPK es la de inhibir la expresión de esos genes.

Con todo esto, TRIP6 se une a la lista de factores transcripcionales y coactivadores que pueden estar regulados por AMPK, apoyando el papel que AMPK tiene en la regulación a largo plazo del metabolismo celular bajo condiciones energéticas restrictivas.

2. R5

Además de identificar nuevas dianas de AMPK mediante el escrutinio de doble híbrido, en el laboratorio apostamos por estudiar la implicación de AMPK en el metabolismo del glucógeno. Aunque ya se sabía que AMPK ejerce una función en la regulación de la glucógeno sintasa y la toma de glucosa (Halse et al., 2003; Holmes et al., 1999; Young et al., 1996), nosotros nos basamos en el papel que desarrolla SNF1, el ortólogo de AMPK en *S. cerevisiae*, para descubrir nuevas funciones de AMPK en la síntesis y degradación del glucógeno.

Snf1 es la quinasa responsable en las levaduras de activar el complejo proteína fosfatasa PPI (compuesto por la subunidad catalítica Glc7 y la subunidad que la dirige a glucógeno, Gac1), permitiendo así la defosforilación y activación de Gsy2 (la glucógeno sintasa de levadura) (Francois and Parrou, 2001; Hardy et al., 1994). Así que decidimos estudiar si AMPK podría estar regulando complejos PPI en células de mamífero.

Mediante el sistema de doble híbrido cuantificamos las interacciones entre las subunidades de AMPK y las tres subunidades reguladoras de PPI más importantes. Quisimos ver la interacción de GM, GL y R5 no sólo con la subunidad α de AMPK (que es la subunidad catalítica donde reside la actividad quinasa), sino también con la subunidad β (que es la subunidad de andamiaje y donde residen los dominios de unión a glucógeno) y con la subunidad γ (que es la subunidad reguladora). Utilizamos las isoformas $\alpha 2$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ por ser las más abundantes en tejidos glucogenogénicos como el hígado o el músculo esquelético (Thornton et al., 1998; Winder, 2001). La proteína que mostraba una mayor interacción era R5, que además de interactuar con la subunidad $\beta 2$ de AMPK, también lo hacía con $\alpha 2$ (Tabla II, Resultados II). También quisimos corroborar esta interacción por otros métodos, como la coimmunoprecipitación (Figura 36, Resultados II) antes de llevar a cabo un ensayo de fosforilación con AMPK *in vitro*.

No pudimos purificar una fusión GST-R5 completa en bacterias porque resultó ser insoluble. Para solucionar este problema, produjimos una

forma truncada de la proteína [GST-R5 (1-183)] que ya era soluble y que salvo el dominio de unión a la glucógeno sintasa que se localiza en su extremo C-terminal, mantiene los dominios de unión a PPI y a glucógeno (Figura 12, Introducción). Como se puede comprobar en la Figura 38 (Resultados II), GST-R5 (1-183) resultó estar fosforilada *in vitro* por AMPK, así que el siguiente paso fue localizar el posible sitio, o los posibles sitios, donde recayera esa fosforilación.

Buscamos residuos de serina o treonina dentro de los 183 primeros aminoácidos de R5 que respondieran a la secuencia consenso de fosforilación por AMPK y encontramos tres. Cuando mutamos esos tres residuos a alanina, comprobamos que uno de ellos (S35A) se fosforilaba mucho menos que las demás formas ensayadas (Figura 38, Resultados II), así que centramos el trabajo en averiguar cómo influía la fosforilación en la Ser35 en la función de R5. Obtuvimos formas mutadas de R5 donde sustituimos la Ser35 por una Ala o por un Asp, evitando la fosforilación o simulándola, y las utilizamos para comprobar si estas mutaciones alteraban de alguna manera la interacción que mantiene R5 con otras proteínas, como son AMPK, la subunidad catalítica de PPI o laforina (Tablas 12 y 13, Resultados II). El mutante R5 S35D sí que mostraba diferencias en los ensayos de doble híbrido que llevamos a cabo; sin embargo, estos resultados no fueron confirmados cuando quisimos comprobar la pobre interacción entre R5 S35D y la subunidad catalítica $\alpha 2$ de AMPK (Figura 39, Resultados II) o la subunidad catalítica α de PPI (Figura 40, Resultados II). Probablemente esto se deba a que en un ensayo de doble híbrido en levadura estamos viendo la interacción entre dos proteínas rodeadas de un ambiente proteico heterólogo, pero en una coimmunoprecipitación en un sistema homólogo de líneas celulares de mamífero, la existencia de complejos formados por varias proteínas puede hacer que, aunque dos de ellas pierdan la interacción, el resto del complejo las arrastre en la inmunoprecipitación. Para el caso de PPI α con R5 S35D parece que ésta es la explicación, ya que ambas proteínas forman un macrocomplejo proteico en su unión al glucógeno con el resto de enzimas implicadas en su metabolismo.

Aunque la mutación a Ala de la Ser35 no afectara a la interacción con AMPK, PPI o laforina, quisimos seguir estudiando si este residuo era importante para la acción glucogenogénica de R5 (Fong et al., 2000; Printen et al., 1997). Comprobamos que al sobreexpresar R5 en células CHO-IR, y tal y como se había descrito en la bibliografía, obteníamos una mayor producción de glucógeno. Cuando ensayamos los mutantes de la Ser35, vimos que el mutante S35A producía el mismo incremento de glucógeno que la forma silvestre. Tal vez, ante la incapacidad para fosforilarse del residuo 35, pueda fosforilarse un residuo secundario. Sin embargo, el mutante S35D no era capaz de igualar el glucógeno producido por las demás formas de R5 que probamos (Figura 41, Resultados II) para cantidades de proteína equivalentes, lo que nos podría indicar que la presencia de una carga negativa en la Ser35 estaría inhibiendo a R5 en su acción sobre la producción de glucógeno.

A continuación, nos planteamos la posibilidad de que AMPK pudiera estar influyendo en la producción de glucógeno a través de una posible modificación de R5. Para investigar esta hipótesis, sobreexpresamos, además de las distintas formas de R5 con las que estábamos trabajando, una forma constitutivamente activa de AMPK (la subunidad catalítica $\alpha 2$ con la mutación a Asp de la Thr172, que simula fosforilación en ese residuo). Quisimos ver si al restablecer el complejo AMPK completo favorecíamos el efecto que éste pudiera ejercer sobre R5. Cuando cuantificamos el glucógeno que habían producido las células CHO-IR comprobamos que el efecto que producía AMPK era el de disminuir la producción de glucógeno estimulada por R5 (Figura 42, Resultados II), como cabía esperar, ya que AMPK va a inhibir rutas anabólicas que consuman ATP. No observamos diferencias en la cantidad de glucógeno debidas a sobreexpresar sólo AMPK $\alpha 2$ T172D, frente a la obtenida cuando reconstituíamos el complejo completo. Probablemente, aunque la cantidad de subunidades β y γ de AMPK endógenas sea menor que la cantidad de $\alpha 2$ T172D sobreexpresada, sea suficiente para establecer un número de complejos AMPK funcionales cuyo efecto ya sea cuantificable.

Si el efecto inhibitorio de AMPK sobre la producción de glucógeno era llevado a cabo mediante la fosforilación de R5, la sobreexpresión de AMPK no afectaría a la menor producción de glucógeno obtenida con R5 S35D, ya que con esta mutación R5 simularía estar ya fosforilado. Y esos fueron los resultados obtenidos (Figura 42, Resultados II). Siguiendo con nuestra hipótesis, AMPK debería ser incapaz de influir en la producción de glucógeno obtenida por R5 S35A al no poder fosforilar esta proteína. Sin embargo, AMPK seguía ejerciendo su efecto sobre la producción de glucógeno aunque sobreexpresáramos R5 S35A; por lo tanto, el hecho de que R5 no esté fosforilado en ese residuo no afecta a la acción de AMPK.

Llegados a este punto quisimos revisar la fosforilación de R5 y, para ello, recurrimos a otra técnica. Mediante electroforesis bidimensional comprobamos que R5 es una proteína capaz de fosforilarse, ya que aparece como dos manchas separadas por diferente punto isoelectrico (Figura 43, Resultados II). Corroboramos que la proporción de proteína capaz de migrar más hacia el polo positivo era la proteína que se encontraba fosforilada al ver que desaparecía con el tratamiento con λ -fosfatasa. Sin embargo, el mutante S35A de R5 mostraba el mismo patrón, indicando que la proteína seguía fosforilándose en otro residuo. Cuando ensayamos el mutante S35D, obtuvimos un patrón distinto donde sólo se resolvía una mancha, lo cual se podría interpretar como que la introducción de esta mutación hacía que la proteína fuera incapaz de fosforilarse en este segundo sitio, bien porque alterábamos la estructura, o bien porque la nueva carga negativa evita o impide la fosforilación del posible segundo sitio. Se puede observar que cuando tratábamos las células con AICAR (un activador de AMPK) o cuando transfectábamos con la forma constitutivamente activa de AMPK, observábamos un patrón ligeramente distinto del que obteníamos con R5 silvestre o R5 S35A, ya que la forma que migraba más hacia la parte positiva desaparecía y aparecía en su lugar una forma intermedia, que también se correspondía con una forma fosforilada de la proteína. Actualmente nos encontramos intentando identificar por otros métodos el posible residuo fosforilado por AMPK.

A continuación, quisimos estudiar la relación de AMPK y R5 con otras proteínas. R5 se había descrito como una de las proteínas capaces de interactuar con laforina (Fernandez-Sanchez et al., 2003) y esta proteína resulta muy interesante por su implicación en la enfermedad de Lafora, que se caracteriza por presentar acúmulos de glucógeno poco ramificado en distintos tipos celulares (ver Introducción). Por ello, quisimos estudiar si AMPK también podría estar relacionada con el mecanismo que desencadena esta patología. Se había publicado que laforina interactuaba con malina, la otra proteína implicada en la enfermedad de Lafora descrita hasta la fecha (Gentry et al., 2005; Lohi et al., 2005), por lo que quisimos ver exactamente con cuál de las dos proteínas que componen el complejo laforina-malina interactuaba AMPK, y pudimos demostrar que laforina interactuaba con las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ de AMPK (Figuras 44 y 45, Resultados II). Como resultado de esta interacción, laforina además resultaba fosforilada por acción de la quinasa (Figura 46, Resultados II), así que quisimos ver si AMPK influía en la relación existente entre laforina y malina. Efectivamente, la interacción entre laforina y malina estaba positivamente regulada por la escasez de glucosa, por la actividad Snfl y por la expresión de la forma constitutivamente activa de AMPK (Figuras 47, 48 y 49, Resultados II).

Con todos estos datos, pasamos a ver el efecto fisiológico de todas estas proteínas sobre la acumulación de glucógeno. El metabolismo del glucógeno está regulado principalmente mediante la fosforilación de las proteínas implicadas en la síntesis del glucógeno (glucógeno sintasa, GS) y en su degradación (glucógeno fosforilasa, GP y glucógeno fosforilasa quinasa, GPK) (Ferrer et al., 2003; Roach, 2002). Mientras que hay varias quinasas (AMPK, PKA, CKI, GSK3, etc.) que inhiben la síntesis de glucógeno fosforilando a la GS, sólo hay una fosfatasa conocida (PPI) que induce la síntesis de glucógeno activando a la GS e inactivando las enzimas de degradación de glucógeno (GP y GPK) (Ferrer et al., 2003; Roach, 2002). PPI es reclutada al glucógeno por una familia de proteínas que incluyen a GM, GL, R5 y R6, cuya sobreexpresión provoca acumulación de glucógeno (Berman et al., 1998).

Recientemente se ha propuesto que laforina y malina participan en un nuevo mecanismo en la regulación de la síntesis del glucógeno que controla los niveles de la glucógeno sintasa y de R5 en neuronas (Vilchez et al., 2007). En las células neuronales donde no hay GP ni GPK, pero sí que se expresa la GS (Brown, 2004; Vilchez et al., 2007), la función del complejo laforina-malina podría ser la de mantener inactiva a la GS degradando R5 e impidiendo así la activación de la GS, evitando de este modo la síntesis de glucógeno en células que no lo pueden degradar. Los pacientes de la enfermedad de Lafora que carecen de un complejo laforina-malina funcional serían incapaces de degradar R5, así que el holoenzima R5-PPI podría activar a la GS, provocando la acumulación de glucógeno en las neuronas (Figura 59). En la presente Tesis Doctoral hemos demostrado, en colaboración con el laboratorio del Dr. Joan J. Guinovart, que la función reguladora de laforina y malina no se limita a las neuronas, sino que también existe en células FTO-2B de hepatoma (Figura 51, Resultados II). Esto podría explicar la afectación hepática que han mostrado algunos pacientes de Lafora (Gomez-Garre et al., 2007). En los hepatocitos, que contienen GS, GP y GPK y donde ha sido descrito que R5 afecta preferentemente a la GP y a la GPK sobre la GS (Browne et al., 2001; Gasa et al., 2000; Green et al., 2004), la inactivación de R5 dependiente de laforina y malina podría asegurar que GP y GPK permanecieran fosforiladas (activas) (Figura 59). En los pacientes de la enfermedad de Lafora, que no poseen un complejo laforina-malina funcional, R5 estaría siempre defosforilando e inactivando a la GP, lo que impediría la movilización del glucógeno.

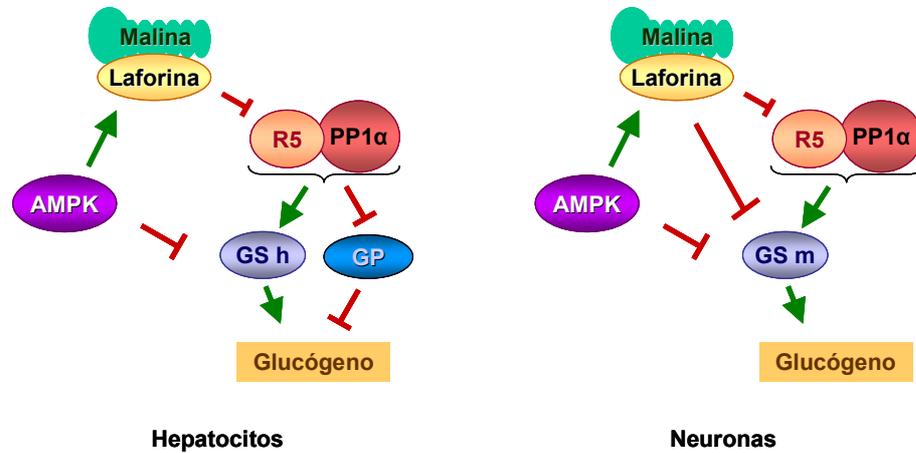


Figura 59: Modelo propuesto para el complejo laforina-malina, R5 y AMPK en la síntesis del glucógeno. GS h: Glucógeno sintasa hepática, GS m: Glucógeno sintasa muscular, GP: Glucógeno fosforilasa.

Con todo esto, la función del complejo laforina-malina es crítica, y por lo tanto, la formación de los complejos debe estar muy regulada. Con nuestros resultados hemos podido comprobar que la formación del complejo está regulada por AMPK y que, si no existe el complejo, laforina o malina no pueden realizar su función de forma independiente (Figura 51, Resultados II). También hemos podido ver que el efecto glucogenogénico de R5 puede ser contrarrestado por el complejo laforina-malina porque este complejo provoca la degradación de R5 (Figura 52, Resultados II). Por lo tanto, estos datos sugerirían un nivel adicional en la regulación de la síntesis del glucógeno a través del complejo laforina-malina, produciendo la degradación de R5.

Además, hemos demostrado que la adición de una forma dominante negativa de AMPK previene la función del complejo laforina-malina sobre la actividad glucogenogénica de R5. Como no observamos ninguna diferencia en la producción de glucógeno al sobreexpresar la forma dominante negativa de AMPK en ausencia de R5 (Figura 53, Resultados II), podemos concluir que el efecto de AMPK recae sobre R5 y que no existe un efecto

cuantificable de AMPK sobre la GS en células FTO-2B. La acción de esta forma dominante negativa de AMPK probablemente se realice interfiriendo en la interacción entre laforina y malina (Figura 53, Resultados II). Como resultado de esta interferencia, malina no es capaz de acceder a sus sustratos laforina y R5 y, por lo tanto, estas dos proteínas no se degradan (Figura 54, Resultados II).

Acabamos de sugerir que el incremento en las propiedades glucogenogénicas de R5 producidas por AMPK D.N. podría deberse a la interrupción de la formación del complejo laforina-malina. Si nuestra hipótesis fuera correcta, la eliminación de laforina o malina de las células prevendría el incremento en la actividad glucogenogénica de R5 mediada por AMPK D.N., y con este fin utilizamos cultivos primarios de fibroblastos derivados de pacientes de la enfermedad de Lafora. De acuerdo con nuestra hipótesis, el efecto de AMPK D.N. sólo era patente en los fibroblastos control, porque en los fibroblastos que carecían de una proteína laforina funcional, no se producía el incremento en la producción de glucógeno. Esto venía a corroborar el modelo propuesto (Figura 59) donde AMPK produce su efecto sobre R5 a través del complejo laforina-malina.

También pudimos comprobar utilizando estos fibroblastos provenientes de pacientes, que la falta de una de las proteínas inestabilizaba el complejo laforina-malina, ya que no fuimos capaces de reconstituir el sistema al introducir solamente la proteína laforina silvestre en células donde la proteína laforina presente se encuentra mutada (Figura 56, Resultados II).

Además de en células FTO-2B de hepatoma, pudimos comprobar que el mecanismo por el cual el complejo laforina-malina degrada a R5 también se da en fibroblastos, ya que pudimos observar un descenso en la cantidad de R5 así como de laforina (Figura 57, Resultados II). Además, también observamos un descenso en la cantidad de la GS muscular presente en fibroblastos cuando se expresaba el complejo laforina-malina. Estos datos venían a corroborar los resultados observados por otros grupos en neuronas, donde también la isoforma muscular de la GS (presente en este tipo celular) se degrada por acción del complejo laforina-malina (Vilchez et al., 2007).

Con este trabajo, hemos visto que AMPK influye en la capacidad glucogenogénica de R5 por dos vías: bien, directamente sobre R5 (como hemos podido comprobar con células CHO-IR), o bien, actuando sobre el complejo laforina-malina (como hemos visto en células FTO-2B). Por lo tanto, y dependiendo del tipo celular, AMPK va a actuar sobre R5 a través de rutas diferentes.

Además de con R5, malina y AMPK, laforina interacciona con otras muchas proteínas (Fernandez-Sanchez et al., 2003; Ganesh et al., 2003; Ianzano et al., 2003; Lohi et al., 2005; Wang et al., 2006), lo que sugiere que debe haber otras funciones reguladoras para el complejo laforina-malina además del metabolismo del glucógeno. Es un campo importante para estudiar porque todavía se desconoce la relación de los cuerpos de Lafora con la epilepsia y la neurodegeneración, o si estas características de la enfermedad de Lafora son consecuencias independientes que resultan de la perturbación de una ruta fisiológica.

Como conclusión, en el presente trabajo hemos aportado evidencias para una relación funcional entre los dos genes responsables de la enfermedad de Lafora, laforina y malina, implicando a AMPK en la regulación de la función de estas proteínas. A partir de ahora se abren nuevas posibilidades terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Lafora que incluyen a AMPK.

Conclusiones

En esta Tesis Doctoral se ha abarcado el estudio de **nuevas dianas de actuación de AMPK**. El conjunto de resultados expuestos en el trabajo permite obtener las siguientes conclusiones:

- 1.- Como resultado de un escrutinio genético de doble híbrido en levadura, identificamos a **TRIP6** (proteína perteneciente a la familia de las zixinas) como proteína capaz de interactuar con la subunidad catalítica $\alpha 2$ de AMPK.
- 2.- **TRIP6** interactúa preferentemente con el dominio quinasa de AMPK $\alpha 2$, siendo fosforilada *in vitro* por AMPK en su extremo N-terminal.
- 3.- AMPK no influye en la interacción de **TRIP6** con los receptores nucleares $\text{THR}\beta$ o $\text{RXR}\alpha$, ni con las proteínas de las placas de adhesión focal LPA2R o CasL/HEF1.
- 4.- AMPK $\alpha 2$ y **TRIP6** interactúan cuando están en el núcleo. Allí, AMPK incrementa la actividad transcripcional de TRIP6.
- 5.- AMPK aumenta la propiedad de coactivador transcripcional de **TRIP6** sobre genes regulados por $\text{NF-}\kappa\text{B}$.
- 6.- AMPK también interactúa con **R5** (una de las subunidades reguladoras de la proteína fosfatasa de tipo 1) y es capaz de fosforilarla *in vitro* en su extremo N-terminal.
- 7.- **R5** es una fosfoproteína *in vivo* cuyo grado de fosforilación se ve afectado por AMPK. Se desconoce todavía el residuo donde reside esta fosforilación, aunque hemos podido descartar la Ser35.

Conclusiones

- 8.- AMPK disminuye el efecto glucogenogénico de R5. Este efecto es dependiente del tipo celular y podría ser directo debido a la fosforilación de R5 por AMPK; o bien indirecto debido a la acción del complejo laforina-malina sobre R5.
- 9.- La formación del complejo laforina-malina está regulado positivamente por AMPK. Laforina interacciona y también puede ser fosforilada *in vitro* por AMPK.
- 10.- El complejo laforina-malina inhibe la producción de glucógeno debida a la sobreexpresión de R5 en células FTO-2B y en fibroblastos, por degradación de R5. La expresión de una forma dominante negativa de AMPK puede prevenir la inhibición de los efectos glucogenogénicos de R5 por parte del complejo laforina-malina.

Bibliografía

Bateman, A. (1997). The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci* 22, 12-3.

Beckerle, M. C. (1986). Identification of a new protein localized at sites of cell-substrate adhesion. *J Cell Biol* 103, 1679-87.

Beg, Z. H., Stonik, J. A. and Brewer, H. B., Jr. (1978). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: regulation of enzymatic activity by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3678-82.

Berkovic, S. F., Andermann, F., Carpenter, S. and Wolfe, L. S. (1986). Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis. *N Engl J Med* 315, 296-305.

Berman, H. K., O'Doherty, R. M., Anderson, P. and Newgard, C. B. (1998). Overexpression of protein targeting to glycogen (PTG) in rat hepatocytes causes profound activation of glycogen synthesis independent of normal hormone- and substrate-mediated regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 273, 26421-5.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

Brady, M. J., Printen, J. A., Mastick, C. C. and Saltiel, A. R. (1997). Role of protein targeting to glycogen (PTG) in the regulation of protein phosphatase-1 activity. *J Biol Chem* 272, 20198-204.

Brady, M. J. and Saltiel, A. R. (2001). The role of protein phosphatase-1 in insulin action. *Recent Prog Horm Res* 56, 157-73.

Brown, A. M. (2004). Brain glycogen re-awakened. *J Neurochem* 89, 537-52.

Browne, G. J., Delibegovic, M., Keppens, S., Stalmans, W. and Cohen, P. T. (2001). The level of the glycogen targeting regulatory subunit R5 of protein phosphatase 1 is decreased in the livers of insulin-dependent diabetic rats and starved rats. *Biochem J* 360, 449-59.

Cacicedo, J. M., Yagihashi, N., Keaney, J. F., Jr., Ruderman, N. B. and Ido, Y. (2004). AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF-kappaB transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 1204-9.

Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29, 18-24.

Carling, D., Aguan, K., Woods, A., Verhoeven, A. J., Beri, R. K., Brennan, C. H., Sidebottom, C., Davison, M. D. and Scott, J. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J Biol Chem* 269, 11442-8.

Carling, D. and Hardie, D. G. (1989). The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* 1012, 81-6.

Carling, D., Zammit, V. A. and Hardie, D. G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223, 217-22.

Carlson, C. A. and Kim, K. H. (1973). Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 248, 378-80.

Celenza, J. L. and Carlson, M. (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* 233, 1175-80.

Cid, E., Cifuentes, D., Baque, S., Ferrer, J. C. and Guinovart, J. J. (2005). Determinants of the nucleocytoplasmic shuttling of muscle glycogen synthase. *Febs J* 272, 3197-213.

Coligan, J. E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. and Wingfield, P.T. (2003). *Current protocols in Protein Science*: John Wiley & sons, Inc., U.S.A.

Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A. and Hardie, D. G. (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 229, 558-65.

Crute, B. E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B. E. and Witters, L. A. (1998). Functional domains of the alpha catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273, 35347-54.

Chan, E. M., Young, E. J., Ianzano, L., Munteanu, I., Zhao, X., Christopoulos, C. C., Avanzini, G., Elia, M., Ackerley, C. A., Jovic, N. J. et al. (2003). Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 35, 125-7.

Chan, T. M. and Exton, J. H. (1976). A rapid method for the determination of glycogen content and radioactivity in small quantities of tissue or isolated hepatocytes. *Anal Biochem* 71, 96-105.

Chen, Z. P., McConell, G. K., Michell, B. J., Snow, R. J., Canny, B. J. and Kemp, B. E. (2000). AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E1202-6.

Davies, S. P., Hawley, S. A., Woods, A., Carling, D., Haystead, T. A. and Hardie, D. G. (1994). Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur J Biochem* 223, 351-7.

Delgado-Escueta, A. V., Ganesh, S. and Yamakawa, K. (2001). Advances in the genetics of progressive myoclonus epilepsy. *Am J Med Genet* 106, 129-38.

Estruch, F., Treitel, M. A., Yang, X. and Carlson, M. (1992). N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics* 132, 639-50.

Fernandez-Sanchez, M. E., Criado-Garcia, O., Heath, K. E., Garcia-Fojeda, B., Medrano-Fernandez, I., Gomez-Garre, P., Sanz, P., Serratos, J. M. and Rodriguez de Cordoba, S. (2003). Laforin, the dual-phosphatase responsible for Lafora disease, interacts with R5 (PTG), a regulatory subunit of protein phosphatase-1 that enhances glycogen accumulation. *Hum Mol Genet* **12**, 3161-71.

Ferrer, A., Caelles, C., Massot, N. and Hegardt, F. G. (1985). Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by adenosine 5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **132**, 497-504.

Ferrer, J. C., Baque, S. and Guinovart, J. J. (1997). Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose. *FEBS Lett* **415**, 249-52.

Ferrer, J. C., Favre, C., Gomis, R. R., Fernandez-Novell, J. M., Garcia-Rocha, M., de la Iglesia, N., Cid, E. and Guinovart, J. J. (2003). Control of glycogen deposition. *FEBS Lett* **546**, 127-32.

Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-6.

Fong, N. M., Jensen, T. C., Shah, A. S., Parekh, N. N., Saltiel, A. R. and Brady, M. J. (2000). Identification of binding sites on protein targeting to glycogen for enzymes of glycogen metabolism. *J Biol Chem* **275**, 35034-9.

Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferre, P. and Foufelle, F. (1998). AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **273**, 14767-71.

Francois, J. and Parrou, J. L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 125-45.

Ganesh, S., Agarwala, K. L., Ueda, K., Akagi, T., Shoda, K., Usui, T., Hashikawa, T., Osada, H., Delgado-Escueta, A. V. and Yamakawa, K. (2000). Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes. *Hum Mol Genet* **9**, 2251-61.

Ganesh, S., Puri, R., Singh, S., Mittal, S. and Dubey, D. (2006). Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *J Hum Genet* **51**, 1-8.

Ganesh, S., Tsurutani, N., Suzuki, T., Ueda, K., Agarwala, K. L., Osada, H., Delgado-Escueta, A. V. and Yamakawa, K. (2003). The Lafora disease gene product laforin interacts with HIRIP5, a phylogenetically conserved protein containing a NifU-like domain. *Hum Mol Genet* **12**, 2359-68.

Garcia-Gimeno, M. A., Munoz, I., Arino, J. and Sanz, P. (2003). Molecular characterization of Ypil, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J Biol Chem* **278**, 47744-52.

Garcia-Rocha, M., Roca, A., De La Iglesia, N., Baba, O., Fernandez-Novell, J. M., Ferrer, J. C. and Guinovart, J. J. (2001). Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem J* **357**, 17-24.

Gasa, R., Jensen, P. B., Berman, H. K., Brady, M. J., DePaoli-Roach, A. A. and Newgard, C. B. (2000). Distinctive regulatory and metabolic properties of glycogen-targeting subunits of protein phosphatase-1 (PTG, GL, GM/RG1) expressed in hepatocytes. *J Biol Chem* **275**, 26396-403.

Gentry, M. S., Worby, C. A. and Dixon, J. E. (2005). Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8501-6.

Gimeno-Alcaniz, J. V. and Sanz, P. (2003). Glucose and type 2A protein phosphatase regulate the interaction between catalytic and regulatory subunits of AMP-activated protein kinase. *J Mol Biol* **333**, 201-9.

Giri, S., Nath, N., Smith, B., Viollet, B., Singh, A. K. and Singh, I. (2004). 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* **24**, 479-87.

Golemis, E. A., Serbriiskii, I., Gyuris, J. and Brent, R. (1997). Interaction trap/two-hybrid systems to identify interacting proteins: Ausubel, F.M. et al., eds. John Wiley and sons, New York.

Gomez-Abad, C., Gomez-Garre, P., Gutierrez-Delicado, E., Saygi, S., Michelucci, R., Tassinari, C. A., Rodriguez de Cordoba, S. and Serratosa, J. M. (2005). Lafora disease due to EPM2B mutations: a clinical and genetic study. *Neurology* **64**, 982-6.

Gomez-Garre, P., Gutierrez-Delicado, E., Gomez-Abad, C., Morales-Corraliza, J., Villanueva, V. E., Rodriguez de Cordoba, S., Larrauri, J., Gutierrez, M., Berciano, J. and Serratosa, J. M. (2007). Hepatic disease as the first manifestation of progressive myoclonus epilepsy of Lafora. *Neurology* **68**, 1369-73.

Gomis, R. R., Cid, E., Garcia-Rocha, M., Ferrer, J. C. and Guinovart, J. J. (2002). Liver glycogen synthase but not the muscle isoform differentiates between glucose 6-phosphate produced by glucokinase or hexokinase. *J Biol Chem* **277**, 23246-52.

Goss, V. L., Lee, K. A., Moritz, A., Nardone, J., Spek, E. J., MacNeill, J., Rush, J., Comb, M. J. and Polakiewicz, R. D. (2006). A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase. *Blood* **107**, 4888-97.

Goyal, R. K., Lin, P., Kanungo, J., Payne, A. S., Muslin, A. J. and Longmore, G. D. (1999). Ajuba, a novel LIM protein, interacts with Grb2, augments mitogen-activated protein kinase activity in fibroblasts, and promotes meiotic maturation of *Xenopus* oocytes in a Grb2- and Ras-dependent manner. *Mol Cell Biol* **19**, 4379-89.

Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**, 536-9.

Green, A. R., Aiston, S., Greenberg, C. C., Freeman, S., Poucher, S. M., Brady, M. J. and Agius, L. (2004). The glycogenic action of protein targeting to glycogen in hepatocytes involves multiple mechanisms including phosphorylase inactivation and glycogen synthase translocation. *J Biol Chem* **279**, 46474-82.

Habinowski, S. A. and Witters, L. A. (2001). The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 852-6.

Halse, R., Fryer, L. G., McCormack, J. G., Carling, D. and Yeaman, S. J. (2003). Regulation of glycogen synthase by glucose and glycogen: a possible role for AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **52**, 9-15.

Hallows, K. R., Raghuram, V., Kemp, B. E., Witters, L. A. and Foskett, J. K. (2000). Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J Clin Invest* **105**, 1711-21.

Hardie, D. G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* **117**, 5479-87.

Hardie, D. G., Carling, D. and Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* **67**, 821-55.

Hardie, D. G., Hawley, S. A. and Scott, J. W. (2006). AMP-activated protein kinase - development of the energy sensor concept. *J Physiol* **574** (Pt 1), 7-15.

Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A. and Hudson, E. R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* **546**, 113-20.

Hardy, T. A., Huang, D. and Roach, P. J. (1994). Interactions between cAMP-dependent and SNF1 protein kinases in the control of glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 27907-13.

Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R. and Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADalpha/beta and MO25alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*2, 28.

Hawley, S. A., Davison, M., Woods, A., Davies, S. P., Beri, R. K., Carling, D. and Hardie, D. G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271, 27879-87.

Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*18, 2195-224.

Holmes, B. F., Kurth-Kraczek, E. J. and Winder, W. W. (1999). Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol*87, 1990-5.

Hong, S. P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D. and Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8839-43.

Horman, S., Browne, G., Krause, U., Patel, J., Vertommen, D., Bertrand, L., Lavoinne, A., Hue, L., Proud, C. and Rider, M. (2002). Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol*12, 1419-23.

Hudson, E. R., Pan, D. A., James, J., Lucocq, J. M., Hawley, S. A., Green, K. A., Baba, O., Terashima, T. and Hardie, D. G. (2003). A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol*13, 861-6.

Ianzano, L., Zhao, X. C., Minassian, B. A. and Scherer, S. W. (2003). Identification of a novel protein interacting with laforin, the EPM2a progressive myoclonus epilepsy gene product. *Genomics* 81, 579-87.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-8.

Jakobsen, S. N., Hardie, D. G., Morrice, N. and Tornqvist, H. E. (2001). 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J Biol Chem* **276**, 46912-6.

Jiang, R. and Carlson, M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev* **10**, 3105-15.

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

Kassel, O., Schneider, S., Heilbock, C., Litfin, M., Gottlicher, M. and Herrlich, P. (2004). A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF- κ B-regulated promoters. *Genes Dev* **18**, 2518-2528.

Kemp, B. E., Stapleton, D., Campbell, D. J., Chen, Z. P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J. J., Katsis, F., van Denderen, B. et al. (2003). AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans* **31**, 162-8.

Kiss, H., Kedra, D., Yang, Y., Kost-Alimova, M., Kiss, C., O'Brien, K. P., Fransson, I., Klein, G., Imreh, S. and Dumanski, J. P. (1999). A novel gene containing LIM domains (LIMD1) is located within the common eliminated region 1 (C3CER1) in 3p21.3. *Hum Genet* **105**, 552-9.

Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M. and Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J Mol Med* **82**, 434-48.

Lafora, G. R. (1911a). Über das Vorkommen amyloider Körperchen im Innern der Ganglienzellen; zugleich Ein zum Studium der amyloiden Substanz im Nervensystem. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* **205**, 295-303.

Lafora, G. R., Glueck, B. (1911b). Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* 6, 1-14.

Lai, Y. J., Chen, C. S., Lin, W. C. and Lin, F. T. (2005). c-Src-mediated phosphorylation of TRIP6 regulates its function in lysophosphatidic acid-induced cell migration. *Mol Cell Biol* 25, 5859-68.

Leclerc, I., Kahn, A. and Doiron, B. (1998). The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett* 431, 180-4.

Leclerc, I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaulont, S., Kahn, A. and Viollet, B. (2001). Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 50, 1515-21.

Lee, J. W., Choi, H. S., Gyuris, J., Brent, R. and Moore, D. D. (1995). Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 9, 243-54.

Leff, T. (2003). AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem Soc Trans* 31, 224-7.

Legrain, P., Dokhelar, M. C. and Transy, C. (1994). Detection of protein-protein interactions using different vectors in the two-hybrid system. *Nucleic Acids Res* 22, 3241-2.

Li, L., Bin, L. H., Li, F., Liu, Y., Chen, D., Zhai, Z. and Shu, H. B. (2005). TRIP6 is a RIP2-associated common signaling component of multiple NF- κ B activation pathways. *J Cell Sci* 118, 555-63.

Lohi, H., Ianzano, L., Zhao, X. C., Chan, E. M., Turnbull, J., Scherer, S. W., Ackerley, C. A. and Minassian, B. A. (2005). Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Genet* 14, 2727-36.

Long, Y. C. and Zierath, J. R. (2006). AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* **116**, 1776-83.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.

Ludin, K., Jiang, R. and Carlson, M. (1998). Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6245-50.

Marsin, A. S., Bouzin, C., Bertrand, L. and Hue, L. (2002). The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem* **277**, 30778-83.

Mayordomo, I. and Sanz, P. (2001). Human pancreatic glucokinase (GlkB) complements the glucose signalling defect of *Saccharomyces cerevisiae* *hvk2* mutants. *Yeast* **18**, 1309-16.

McCartney, R. R. and Schmidt, M. C. (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* **276**, 36460-6.

Milan, D., Jeon, J. T., Looft, C., Amarger, V., Robic, A., Thelander, M., Rogel-Gaillard, C., Paul, S., Iannuccelli, N., Rask, L. et al. (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* **288**, 1248-51.

Minassian, B. A., Lee, J. R., Herbrick, J. A., Huizenga, J., Soder, S., Mungall, A. J., Dunham, I., Gardner, R., Fong, C. Y., Carpenter, S. et al. (1998). Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* **20**, 171-4.

Bibliografía

Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., House, C. M., Stapleton, D., Dyck, J., Gamble, J., Ullrich, C., Witters, L. A. and Kemp, B. E. (1997). Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase beta subunit. *J Biol Chem* 272, 24475-9.

Mitchelhill, K. I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., Witters, L. A. and Kemp, B. E. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem* 269, 2361-4.

Mu, J., Brozinick, J. T., Jr., Valladares, O., Bucan, M. and Birnbaum, M. J. (2001). A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7, 1085-94.

Murthy, K. K., Clark, K., Fortin, Y., Shen, S. H. and Banville, D. (1999). ZRP-1, a zyxin-related protein, interacts with the second PDZ domain of the cytosolic protein tyrosine phosphatase hPTP1E. *J Biol Chem* 274, 20679-87.

Nelson, D. L., and Cox, M.M. (2005). Lehninger. Principles of Biochemistry.

Nielsen, J. N. and Wojtaszewski, J. F. (2004). Regulation of glycogen synthase activity and phosphorylation by exercise. *Proc Nutr Soc* 63, 233-7.

Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635-48.

Petit, M. M., Crombez, K. R., Vervenne, H. B., Weyns, N. and Van de Ven, W. J. (2005). The tumor suppressor Scrib selectively interacts with specific members of the zyxin family of proteins. *FEBS Lett* 579, 5061-8.

Petit, M. M., Mols, R., Schoenmakers, E. F., Mandahl, N. and Van de Ven, W. J. (1996). LPP, the preferred fusion partner gene of HMGIC in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family. *Genomics* **36**, 118-29.

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-33.

Printen, J. A., Brady, M. J. and Saltiel, A. R. (1997). PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism. *Science* **275**, 1475-8.

Roach, P. J. (2002). Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med* **2**, 101-20.

Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Salt, I., Celler, J. W., Hawley, S. A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D. and Hardie, D. G. (1998a). AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J* **334** (Pt 1), 177-87.

Salt, I. P., Johnson, G., Ashcroft, S. J. and Hardie, D. G. (1998b). AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. *Biochem J* **335** (Pt 3), 533-9.

Sanz-Rodriguez, F., Guerrero-Esteo, M., Botella, L. M., Banville, D., Vary, C. P. and Bernabeu, C. (2004). Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* **279**, 32858-68.

Sanz, P. (2007). Yeast as a model system to study glucose-mediated signalling and response. *Front Biosci* **12**, 2358-71.

Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A. and Carlson, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 20, 1321-8.

Scott, J. W., Hawley, S. A., Green, K. A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G. A., Norman, D. G. and Hardie, D. G. (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113, 274-84.

Scott, J. W., Norman, D. G., Hawley, S. A., Kontogiannis, L. and Hardie, D. G. (2002). Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate. *J Mol Biol* 317, 309-23.

Schimmack, G., Defronzo, R. A. and Musi, N. (2006). AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab* 8, 591-602.

Serratos, J. M., Gomez-Garre, P., Gallardo, M. E., Anta, B., de Bernabe, D. B., Lindhout, D., Augustijn, P. B., Tassinari, C. A., Malafosse, R. M., Topcu, M. et al. (1999). A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum Mol Genet* 8, 345-52.

Solaz-Fuster, M. C., Gimeno-Alcaniz, J. V., Casado, M. and Sanz, P. (2006). TRIP6 transcriptional co-activator is a novel substrate of AMP-activated protein kinase. *Cell Signal* 18, 1702-12.

Song, W. and Carlson, M. (1998). Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. *Embo J* 17, 5757-65.

Thornton, C., Snowden, M. A. and Carling, D. (1998). Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J Biol Chem* 273, 12443-50.

Tomas-Cobos, L. and Sanz, P. (2002). Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HXT1 glucose transporter gene. *Biochem J* 368, 657-63.

Van Heycop Ten Ham, M. W. (1974). Lafora disease, a form of progressive myoclonus epilepsy. In *The epilepsies. Handbook of clinical neurology*, vol. 15 (ed. P. J. Vinken, Bruyn, G.W.), pp. 382-422. North-Holland, Amsterdam.

Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Valles, J., Garcia-Fojeda, B., Criado-Garcia, O., Fernandez-Sanchez, M. E., Medraño, I., Dominguez, J. et al. (2007). Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neuroscience* (*In press*).

Vojtek, A. B., Cooper, J.A. and Hollenberg, S.M. (1997). The yeast two hybrid system. Oxford University Press.

Wang, J., Stuckey, J. A., Wishart, M. J. and Dixon, J. E. (2002). A unique carbohydrate binding domain targets the lafora disease phosphatase to glycogen. *J Biol Chem* **277**, 2377-80.

Wang, Y., Dooher, J. E., Koedood Zhao, M. and Gilmore, T. D. (1999). Characterization of mouse Trip6: a putative intracellular signaling protein. *Gene* **234**, 403-9.

Wang, Y. and Gilmore, T. D. (2001). LIM domain protein Trip6 has a conserved nuclear export signal, nuclear targeting sequences, and multiple transactivation domains. *Biochim Biophys Acta* **1538**, 260-72.

Wang, Y. and Gilmore, T. D. (2003). Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. *Biochim Biophys Acta* **1593**, 115-20.

Wang, Y., Liu, Y., Wu, C., Zhang, H., Zheng, X., Zheng, Z., Geiger, T. L., Nuovo, G. J., Liu, Y. and Zheng, P. (2006). Epm2a suppresses tumor growth in an immunocompromised host by inhibiting Wnt signaling. *Cancer Cell* **10**, 179-90.

Wilson, W. A., Hawley, S. A. and Hardie, D. G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol* **6**, 1426-34.

Winder, W. W. (2001). Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **91**, 1017-28.

Woods, A., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Stein, S. C., Lemarchand, P., Ferre, P., Foulle, F. and Carling, D. (2000). Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* **20**, 6704-11.

Worby, C. A., Gentry, M. S. and Dixon, J. E. (2006). Laforin, a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates. *J Biol Chem* **281**, 30412-8.

Wu, X., Hart, H., Cheng, C., Roach, P. J. and Tatchell, K. (2001). Characterization of Gac1p, a regulatory subunit of protein phosphatase type I involved in glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **265**, 622-35.

Xu, J., Lai, Y. J., Lin, W. C. and Lin, F. T. (2004). TRIP6 enhances lysophosphatidic acid-induced cell migration by interacting with the lysophosphatidic acid 2 receptor. *J Biol Chem* **279**, 10459-68.

Yang, X., Hubbard, E. J. and Carlson, M. (1992). A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* **257**, 680-2.

Yeh, L. A., Lee, K. H. and Kim, K. H. (1980). Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge. *J Biol Chem* **255**, 2308-14.

Yi, J. and Beckerle, M. C. (1998). The human TRIP6 gene encodes a LIM domain protein and maps to chromosome 7q22, a region associated with tumorigenesis. *Genomics* **49**, 314-6.

Yi, J., Kloeker, S., Jensen, C. C., Bockholt, S., Honda, H., Hirai, H. and Beckerle, M. C. (2002). Members of the Zyxin family of LIM proteins interact with members of the p130Cas family of signal transducers. *J Biol Chem* **277**, 9580-9.

Young, M. E., Radda, G. K. and Leighton, B. (1996). Activation of glycogen phosphorylase and glycogenolysis in rat skeletal muscle by AICAR--an activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 382, 43-7.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N. et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108, 1167-74.

