

EFFECTO DE PIASy SOBRE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA ENFERMEDAD DE LAFORA

Memoria presentada por M^a Teresa Rubio López para optar al grado de
Doctora en Bioquímica.

Valencia 2011



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS





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. **Santiago Vernia Miralles**, Doctor en Farmacia y Contratado Superior con grado de Doctor en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICAN:

Que Dña. **María Teresa Rubio López**, licenciada en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título ***“Efecto de PIASy sobre proteínas implicadas en la enfermedad de Lafora”***.

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 16 de Septiembre de 2011.

Dr. Pascual F. Sanz Bigorra

Dr. Santiago Vernia Miralles

Para la realización de esta Tesis, la autora ha disfrutado de una beca “lanzadera” (lanzadera CIBER -2007) del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) y una Beca “JAE predoctoral” (JAE-2009) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

El trabajo se ha enmarcado dentro del proyecto “Regulación y Función del complejo laforina-malina: Implicaciones en la Fisiopatología de la epilepsia mioclónica progresiva de tipo Lafora” (SAF2008-01907), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

A mis padres

Y a mi hermana

Escribir los agradecimientos de una tesis es casi el final de un largo y costoso trabajo que en mi caso no hubiese tenido sentido sin el apoyo incondicional de mi familia, especialmente de mis padres quienes siempre me han transmitido lo importante que es dedicarse a aquello que nos hace felices y gracias a sus esfuerzos, a su ayuda, sus sacrificios y sus buenos consejos puedo decir que he encontrado mi camino. Y a mi hermana Sonia, por escucharme, por tener tanta paciencia y por compartirlo todo conmigo. Y por supuesto a mi tía que me ha cargado las pilas muchas mañanas en los desayunos.

También quiero agradecer a mi abuelo Francisco que siempre me inculcó lo importante que es la dedicación, el trabajo y la constancia para poder llegar a una meta y por creer tanto en mí.

Mi motivación y ganas por iniciar una tesis doctoral he de agradecerlas a Emilio Varea, por aquel verano que me dejó jugar a ser científica en el departamento de Biología celular y confiar en mí aunque todavía no sabía usar una micropipeta y mucho menos un microtomo. Para mí siempre has sido un ejemplo a seguir.

Sobretudo debo agradecer a mis directores. A Pascual por darme un voto de confianza y la oportunidad de hacer la Tesis en este laboratorio y por brindarme su ayuda en todo momento.

Y a Santi, con quien he aprendido a trabajar en un laboratorio recibiendo todo su apoyo científico, pero también humano. Gracias por confiar en mí, por transmitirme todo tu positivismo, energía y entusiasmo también ahora desde la distancia y sobretudo por darme un empujoncito cuando lo necesitaba. Para mí has sido mi hermano mayor en la bancada.

La "Teresis" no hubiese sido posible sin la ayuda de mis compañeros con los que hoy comparto bancada, pero también a los que ya no están y con los que tuve la suerte de pelear por el reducido espacio del laboratorio del tercero. Con todos ellos he compartido muy buenos momentos tanto en el

Agradecimientos

laboratorio como fuera y he encontrado buenos amigos que me han ayudado y apoyado en los momentos bajos.

Y por último quiero agradecer a mis “quimicoloks” con quienes no solo comparto profesión y los montaditos de los miércoles, sino muchas otras ilusiones en el plano personal. Gracias por estar siempre que os he necesitado, por los comités de crisis, por nuestras largas tertulias y por ser parte de mi vida y dejarme estar en las vuestras.

Introducción.

1. Enfermedad de Lafora. Genes implicados.	3
1.1 Laforina.	5
1.2 Malina.	6
1.2.1 Ubicuitinación de proteínas.	7
1.3 Mecanismo de la enfermedad de Lafora.	9
2. PIASy.	15
2.1 Familia de proteínas PIAS.	16
2.2 Sumoilación de proteínas.	16
2.3 Mecanismos de regulación mediados por la familia PIAS.	22
A) Mecanismos de regulación negativa.	22
B) Mecanismos de regulación positiva.	23
2.4 Estructura de las proteínas PIAS.	24
2.5 Modificaciones post-traduccionales en las proteínas PIAS.	27
2.5.1 TRIM32.	30
2.6 Actividad de las proteínas PIAS en la señalización de citoquinas.	33
A) Señalización mediada por NF- κ B.	33
B) Señalización JAK-STAT.	37
3. Funciones fisiológicas de la leptina.	41
3.1 La leptina y sus receptores.	41
3.2 Efecto de la leptina en el sistema nervioso central.	45
3.3 Función de la leptina en el control energético en tejidos periféricos.	48
3.4 Resistencia a la leptina como causa de obesidad.	50
4. AMPK.	51

Índice general

4.1	Estructura de AMPK.	51
4.2	Regulación de AMPK.	56
4.2.1	Regulación alostérica de AMPK.	56
4.2.2	Quinasas que fosforilan y activan a AMPK.	56
4.2.3.	Fosfatasas que desfosforilan e inactivan a AMPK.	58
4.3	Situaciones que producen la activación de AMPK.	59
4.4	Reconocimiento de proteínas dianas por AMPK.	60
4.5	Efectos fisiológicos de la activación de AMPK.	62
4.6	AMPK y laforina en el metabolismo de glucógeno.	63
Material y Métodos.		
1.	Reactivos.	85
2.	Material Biológico y condiciones de crecimiento.	85
2.1	Bacterias.	85
2.2	Levaduras.	85
2.3	Cultivos celulares de mamíferos.	86
2.3.1	Tratamientos realizados en células de mamífero.	89
3.	Vectores de expresión y construcciones.	89
3.1	Vectores de expresión y construcciones de levadura.	89
3.2	Vectores de expresión y construcciones para bacterias.	90
3.3	Vectores de expresión y construcciones para células de mamífero.	90
4.	Análisis de proteínas por <i>western blot</i>.	92
5.	Expresión y purificación de proteínas recombinantes.	95
5.1	Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E.coli</i> .	95
5.1.1	Purificación de 8xHis-PIASy.	96

5.1.2	Purificación de GST-PIASy y GST-PIASy S71A.	96
5.2	Expresión y purificación de proteínas recombinantes en células de mamífero, Hek293.	97
6.	Ensayo de doble híbrido: medida de actividad β-galactosidasa.	98
7.	Ensayos de coimmunoprecipitación en líneas celulares de mamífero.	89
8.	Ensayos de actividad luciferasa.	100
9.	Análisis <i>in vivo</i> de ubiquitinación y sumoilación.	102
10.	Inmunofluorescencia y microscopía confocal.	104
11.	Ensayos de desfosforilación de PIASy.	105
11.1	Ensayo λ fosfatasa.	105
11.2	Desfosforilación <i>in vitro</i> de PIASy con laforina.	106
12.	Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> de PIASy.	106
13.	Obtención de extractos celulares de ratones <i>Epm2a</i>^{-/-} y controles.	107
14.	PCR cuantitativa a tiempo real	108
15.	Procedimientos analíticos en ratones <i>Epm2a</i>^{-/-} y controles.	109
16.	Análisis histológico.	110
17.	Análisis estadístico.	111

Resultados I.

1.	PIASy interacciona con el complejo laforina-malina.	115
1.1	Doble y triple híbrido en levadura.	115
1.2.	Interacción de PIASy con laforina en células de mamífero.	117
2.	Regulación del complejo laforina-malina por PIASy.	118
2.1	Sumoilación de Laforina por PIASy.	119

Índice general

2.2	Localización subcelular de laforina en presencia de PIASy.	121
3.	Regulación de PIASy por el complejo laforina-malina.	112
3.1	Ensayos de ubiquitinación de PIASy.	123
3.2.	Ensayos de desfosforilación de PIASy por laforina.	127
3.3.	Actividad de PIASy en condiciones de sobreexpresión de laforina y malina.	130
A)	Actividad de PIASy sobre la ruta de NF- κ B.	130
B)	Actividad de PIASy sobre la ruta de JAK2/STAT3.	133

Resultados II.

1.	Efecto de la sobreexpresión del complejo laforina-malina en la señalización mediada por leptina JAK2/STAT3.	141
2	El hipotálamo de ratones <i>Epm2a</i>^{-/-} presenta un incremento de marcadores de estrés de retículo endoplásmico y neuroinflamación.	147
3.	Los ratones <i>Epm2a</i>^{-/-} son sensibles a la obesidad inducida por dieta grasa.	150
4.	Estudio del estado de esteatosis en los ratones <i>Epm2a</i>^{-/-} alimentados con dieta grasa.	154

Resultados III.

1.	PIASy interacciona con AMPK.	159
1.1	Doble híbrido en levadura.	159
1.2.	Interacción de PIASy con AMPK en células de mamífero.	160
2.	Regulación de AMPK por sumoilación mediada por PIASy.	161
2.1	Ensayos de sumoilación de AMPK.	161
2.2	AMPK β 2 se modifica específicamente por SUMO2.	164

3. Caracterización de las lisinas dianas de sumoilación en AMPKβ2.	166
3.1 Ensayos de sumoilación de los mutantes de AMPK β 2.	166
4. Función fisiológica de la sumoilación específica de AMPKβ2 por SUMO2.	171
4.1 Regulación de la actividad del complejo de AMPK por sumoilación de la subunidad AMPK β 2.	172
4.2 Efecto de la sumoilación en la estabilidad de de AMPK β 2.	174
4.3 Localización subcelular de AMPK β 2 en condiciones de sumoilación.	175
5. Regulación de PIASy por fosforilación.	180
5.1 Caracterización de aminoácidos fosforilados en PIASy.	181
5.2 Búsqueda de la quinasa implicada en la fosforilación de PIASy.	184
5.3 Función de la fosforilación del residuo Ser71 en la actividad de PIASy.	187
5.3.1 Función de la fosforilación del residuo Ser71 en la actividad de PIASy como represor transcripcional.	187
5.3.2 Función de la fosforilación del residuo Ser71 en la actividad E3-SUMO ligasa de PIASy.	190
 Discusión.	
1. Interacción entre PIASy y el complejo laforina-malina.	195
2. Regulación de la señal de leptina por el complejo laforina-malina.	197
3. Interacción entre PIASy y AMPK.	199
Conclusiones.	207
Bibliografía.	211
Anexo.	239

Introducción

Figura 1: Representación de 38 mutaciones conocidas en el gen de laforina y 34 mutaciones conocidas en el gen de malina.	4
Figura 2: Vista simplificada de los dominios de laforina.	5
Figura 3: Vista simplificada de los dominios de malina.	6
Figura 4: Representación de la estructura terciaria de la ubiquitina.	7
Figura 5: Esquema en tres pasos del proceso de ubiquitinación.	8
Figura 6: Cuerpos de Lafora.	10
Figura 7: Representación esquemática de la regulación de autofagia por laforina.	13
Figura 8: Esquema de la estructura terciaria de SUMO1 comparada con ubiquitina.	17
Figura 9: Esquema del proceso de sumoilación y desumoilación de proteínas.	19
Figura 10: Funciones catalíticas de las enzimas desumoilasas.	21
Figura 11: Mecanismos de regulación transcripcional mediada por proteínas PIAS.	24
Figura 12: Esquema de los dominios de la familia PIAS.	27
Figura 13: Esquema de los dominios conservados de la familia TRIM.	31
Figura 14: Comparación esquemática de los dominios de la estructura de malina y TRIM32.	32
Figura 15: Esquema del efecto de PIASy en la ruta de señalización NF- κ B (p65) en respuesta a diferentes estímulos.	37
Figura 16: Esquema de la ruta de señalización JAK/STAT y los diferentes mecanismos de regulación negativa de esta ruta.	39
Figura 17: Esquema de la estructura de las diferentes isoformas del receptor de leptina.	43
Figura 18: Esquema de las diferentes acciones fisiológicas de la leptina.	45
Figura 19: Esquema de las diferentes rutas moduladas por la activación del receptor de leptina en el hipotálamo.	47

Figura 20: Efectos de la activación del receptor de leptina sobre AMPK en músculo.	49
Figura 21: Esquema de los dominios típicos de AMPK.	54
Figura 22: Alineamiento de secuencias parciales de 6 proteínas fosforiladas por AMPK.	61
Figura 23: Esquema de los procesos clave en el metabolismo energético regulados por AMPK.	63
Figura 24: Representación esquemática de la síntesis y degradación de glucógeno.	66
Figura 25: Esquema de la participación de AMPK, el complejo laforina-malina y R5/PTG en la regulación de la síntesis de glucógeno.	68
Tabla 1: Características de las diferentes isoformas de las subunidades que componen el complejo AMP.	53

Material y métodos.

Figura 26: Reacciones bioluminiscentes catalizadas por la Firefly luciferasa y por la Renilla luciferasa.	102
Figura 27: Esquema del procedimiento empleado para el análisis de ubiquitinación y sumoilación <i>in vivo</i> .	104
Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas analizadas por <i>Western Blot</i> .	93
Tabla 3: Oligos empleados para PCR cuantitativa.	109

Resultados I

Figura 28: Representación esquemática de los ensayos de doble híbrido empleados para analizar las interacciones con PIASy.	116
Figura 29: Medida de la actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) para cuantificar la interacción de PIASy con laforina y malina.	117

Índice de tablas y figuras

Figura 30: Coinmunoprecipitación de myc-PIASy y Flag-laforina en células Hek293.	118
Figura 31: Ensayos de sumoilación de laforina por PIASy.	120
Figura 32: Efecto de la sobreexpresión de PIASy en la localización subcelular de laforina.	122
Figura 33: Degradación de PIASy en condiciones de sobreexpresión de diferentes E3-ubiquitina ligasa.	124
Figura 34: Ensayos de ubiquitinación de PIASy por laforina-malina.	125
Figura 35: Estudio de los niveles totales de PIASy al expresar cantidades crecientes de HA-malina.	126
Figura 36: Ensayo fosfatasa λ .	128
Figura 37: Ensayo fosfatasa con laforina purificada de bacteria y PIASy.	129
Figura 38: Actividad de PIASy en la ruta de NF- κ B.	131
Figura 39: Efecto de la sobreexpresión de laforina y malina en la inhibición de la expresión de NF- κ B mediada por PIASy.	132
Figura 40: Activación del promotor de SOCS3 por leptina.	134
Figura 41: PIASy inhibe la transcripción de SOCS3 dependiente de la señalización por leptina.	135
Figura 42: Actividad represora del complejo laforina-malina en la ruta JAK2/STAT3.	136
Resultados II	
Figura 43: Efecto de la sobreexpresión de laforina y malina en la transcripción de SOCS3.	143
Figura 44: La acción represora del complejo laforina-malina no requiere la actividad fosfatasa de laforina.	144
Figura 45: Efecto de la sobreexpresión de laforina y malina en la ruta JAK2/STAT3 y NF- κ B.	146
Figura 46: Análisis bioquímico del hipotálamo de ratones <i>Epm2a</i> ^{-/-} .	149
Figura 47: Los ratones <i>Epm2a</i> ^{-/-} presentan hiperfagia y aumento de peso en condiciones de alimentación con dieta grasa.	151

Figura 48: Inducción de la expresión de marcadores de estrés de RE y de SOCS3 en hipotálamo de ratones alimentados con dieta grasa. 153

Figura 49: Los ratones Epm2a^{-/-} presentan hepatomegalia e hígado graso en condiciones de alimentación con dieta grasa. 155

Figura 50: Contenido lipídico y actividad en ratones Epm2a^{-/-} alimentados con dieta grasa. 156

Resultados III

Figura 51: Medida de la actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) para cuantificar la interacción de PIASy con AMPK. 160

Figura 52: Ensayo de interacción de PIASy con AMPK en células de mamífero. 161

Figura 53: Ensayos de sumoilación de AMPK α 2 y β 2 con SUMO2. 162

Figura 54: La isoforma AMPK β 1 no se sumoila por PIASy. 163

Figura 55: Ensayos de sumoilación de AMPK α 2 y β 2 con SUMO1. 165

Figura 56: Ensayos de sumoilación de los mutantes de AMPK β 2. 167

Figura 57: Ensayos de sumoilación de las formas truncadas de AMPK. 169

Figura 58: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las isoformas AMPK β 1 y β 2 humana. 170

Figura 59: Estudio de los niveles endógenos de AMPK β 1 y β 2, en diferentes líneas celulares. 171

Figura 60: Actividad de AMPK en condiciones de sumoilación de AMPK β 2. 173

Figura 61: La sumoilación no acelera la degradación de AMPK β 2. 175

Figura 62: La sumoilación de AMPK β 2 induce la formación de agregados en el citoplasma. 178

Figura 63: Colocalización de SUMO2 y AMPK β 2. 179

Índice de tablas y figuras

Figura 64: Esquema de Iso sitios consenso de fosforilación por AMPK, en la secuencia de PIASy.	180
Figura 65: Espectro de la purificación de PIASy.	182
Figura 66: Resultados obtenidos por espectrometría de masas revelaron que el residuo Ser71 de PIASy está fosforilado. .	183
Figura 67: Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> por las quinasas AMPK, PKA y CDK1.	186
Figura 68: La fosforilación en Ser71 no es necesaria para la actividad represora de PIASy sobre la ruta NF- κ B.	188
Figura 69: La fosforilación en el residuo Ser71 promueve la actividad represora de PIASy en la ruta de señalización inducida por leptina JAK2/STAT3.	189
Figura 70: PIASy S71A sumoila con menor rendimiento a p53.	191

ACC:	Acetil-CoA Carboxilasa
ALT	Alanina transaminasa
AMP:	Adenosín monofosfato
AMPK:	Proteína quinasa activada por AMP
AST	Aspartato transaminasa
ATP:	Adenosín trifosfato
BSA:	Albúmina de suero bovino
C.I:	Catalíticamente inactivo
CaMK:	Proteína quinasa calcio/calmodulina-dependiente
CaMKK:	Proteína quinasa de CaMK
cAMP:	AMP cíclico
CBD:	Dominio de unión a carbohidratos
CDK1	Quinasa dependiente de ciclina
cDNA:	DNA complementario
CHX:	Cicloheximida.
DMEM:	Medio para cultivo de células de mamífero (<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>)
DMSO:	Dimetilsulfóxido
D.O.:	Densidad óptica
DSPD:	Dominio fosfatasa de especificidad dual
DTT:	DL-Ditiotreitol
EC:	Extracto crudo
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético
EPM2A/2B:	Gen A/B de la epilepsia mioclónica progresiva tipo 2
FAS:	Ácido graso sintasa
FBS:	Suero bovino fetal
FT:	Factor de transcripción
GAD:	Dominio de activación de Gal4
GBD:	Dominio de unión a DNA de Gal4
GP:	Glucógeno fosforilasa
GPK:	Glucógeno fosforilasa quinasa
GS:	Glucógeno sintasa
GSK3:	Glucógeno sintasa quinasa 3
GST:	Glutation-S-Transferasa
HA:	Hepitopo hemaglutinina del virus humano de influenza
HEK:	Células embrionarias de riñón humano
H&E:	Hematoxilina- eosina.
HFD:	Dieta con alto contenido en grasas

Abreviaturas

HIS3:	Gen que codifica para la Imidazolglicerol-fosfato deshidratasa en levaduras (cataliza la sexta reacción en la biosíntesis de la histidina)
HRP:	Peroxidasa de rábano
IP:	Inmunoprecipitación
IPTG:	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
kDa:	kiloDalton
KIS:	Secuencia de interacción con quinasas
<i>lacZ</i>:	Gen que codifica para la enzima β -galactosidasa
LB:	Medio de cultivo para bacterias Luria-Bertani
LEU2:	Gen que codifica para la Beta-isopropilmalato deshidrogenasa en levaduras (cataliza la tercera reacción en la ruta de la biosíntesis de la leucina)
mRNA:	RNA mensajero
U:	Unidad de actividad enzimática
u.a:	Unidades arbitrarias
NF-κB:	<i>Factor nuclear-kappa B</i>
ONPG:	o-nitrofenil β -D-galactopiranosido
PBS:	Tampón fosfato
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG:	Polietilenglicol
PFU:	ADN polimerasa de alta fidelidad procedente de <i>Pyrococcus furiosus</i>
pFlagΦ:	Plásmido Flag vacío.
PKA:	Proteína quinasa A
PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PP1:	Proteína fosfatasa de tipo 1
PTP:	Proteína fosfatasa de tirosinas
r.p.m:	Revoluciones por minuto
SC:	Medio de cultivo Sintético Completo
TBS:	Tampón salino Tris
TNFα:	Factor de necrosis α
Tween-20:	<i>Polioxyetileno sorbitan monolaurato</i>
UDP-Glu:	Uridina-5'-difosfato-glucosa
URA3:	Gen que codifica para la Orotidina-5'-fosfato (OMP) decarboxilasa en levaduras (cataliza la sexta reacción enzimática en la biosíntesis <i>de novo</i> de las pirimidinas)
UV:	Radiación Ultra Violeta

Abreviaturas

WT:	Silvestre
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YNB:	<i>Base nitroge</i>
YPD:	<i>Medio compuesto de Extracto de levadura -Peptona-Dextrosa</i>

Aminoácidos y Bases Nitrogenadas

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)	Asparragina
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

1 Enfermedad de Lafora. Genes implicados.

La epilepsia mioclónica progresiva de tipo Lafora (LD; OMIM: 254780) es una enfermedad neurodegenerativa de herencia autosómica recesiva, descrita por primera vez en 1911 por el neurólogo español Gonzalo Rodríguez Lafora (Lafora, 1911a; Lafora, 1911b). La enfermedad se manifiesta durante la adolescencia como una epilepsia mioclónica asociada a demencia progresiva, apraxia, afasia y pérdida visual, llevando a los pacientes a un estado vegetativo y a la muerte, que se suele producir en la primera década desde que se manifiestan los primeros síntomas (Delgado-Escueta et al., 2007).

Hasta la fecha se han identificado dos genes implicados en la enfermedad, *Epm2a* que codifica para laforina, una fosfatasa dual, y *Epm2b* que codifica para malina, una proteína con actividad E3 ubiquitina ligasa.

Un 48% de los pacientes presentan mutaciones en el gen *Epm2a*, mientras que el 40% de los casos se deben a mutaciones en *Epm2b*. En un 12 % de los pacientes no se han identificado mutaciones en ninguno de estos dos genes, lo cual sugiere la existencia de un tercer locus (Chan et al., 2004).

Los pacientes con mutaciones en laforina o malina son histológica y neurológicamente indistinguibles, sugiriendo que ambas proteínas participan en las mismas rutas. Sin embargo, los pacientes asociados a mutaciones en el 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).

Por el momento 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* (Figura 1, superior). Destaca la prevalencia de la mutación R241X dentro de la población española (Ganesh et al., 2006). También se han descrito hasta 34 mutaciones y varios polimorfismos en el gen de malina (un solo exón), siendo la mutación P69A, en el dominio RING, la más prevalente (Figura 1, inferior).

Introducción

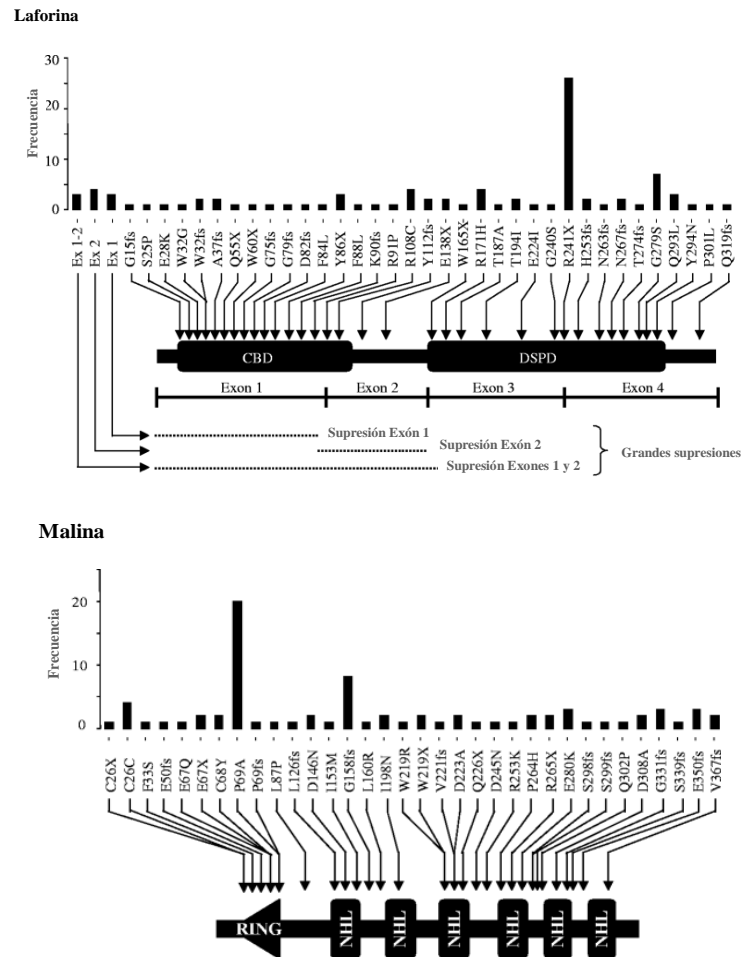


Figura 1: Representación de 38 mutaciones conocidas en el gen de laforina (parte superior) y de 34 mutaciones conocidas en el gen de malina (parte inferior). Los diagramas muestran la organización en dominios de las proteínas, la posición de las distintas mutaciones encontradas en las familias con enfermedad 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. Adaptado de Ganesh et al., 2006.

1.1 Laforina.

Laforina es una proteína de 331 aminoácidos con un dominio de unión a carbohidratos en su región N-terminal (CBD), el cual promueve la unión de la proteína al glucógeno. En la región C-terminal presenta un dominio fosfatasa de especificidad dual, capaz de desfosforilar serinas, treoninas y tirosinas (Figura 2). Es la única fosfatasa humana conocida que contiene un dominio de unión a carbohidratos (Gentry et al., 2009). Además es capaz de formar homodímeros.

Laforina se encuentra, mayoritariamente en el citosol asociada a poliribosomas y retículo endoplásmico (RE). Sin embargo se han identificado dos isoformas con dominio C-terminal divergente y distinta localización subcelular. La isoforma A se localiza en el retículo endoplásmico, mientras que la isoforma B lo hace en el núcleo de la célula.

Aunque se ha caracterizado como una fosfatasa dual, por el momento se desconoce la identidad de sus sustratos. Además de su capacidad fosfatasa, la laforina también ejerce como molécula de andamiaje dirigiendo a malina a sus sustratos.

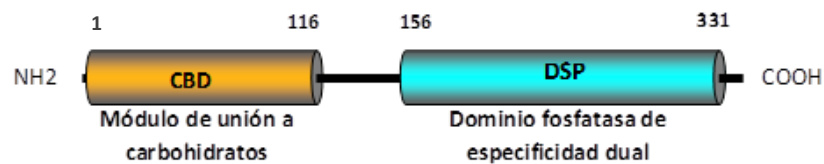


Figura 2: Vista simplificada de los dominios de laforina (gen *Epm2a*). CBD: dominio de unión a carbohidratos; DSP: dominio fosfatasa dual.

1.2 Malina.

Malina es la segunda proteína que se conoce implicada en la enfermedad de Lafora. Es una proteína de 395 aminoácidos, que contiene un dominio RING (*Really Interesting New Group of Proteins*) y seis dominios NHL (definido por homología entre las proteínas *Ncl-1*, *HT2A* y *Lin-41*) (Slack and Ruvkun et al., 1998) (Figura 3). Los dominios RING son característicos 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 et al., 2001)

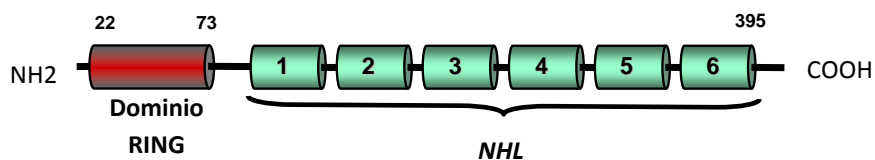


Figura 3: Vista simplificada de los dominios de malina (gen *Epm2b*). RING: dedo de Zinc (*Really Interesting New Gene*); NHL dominio implicado en las interacciones proteína-proteína.

Se ha descrito que malina es capaz de unirse, ubiquitinar y promover la degradación de Laforina (Gentry et al., 2005), aunque paradójicamente laforina es necesaria para la acción de malina como E3-ubiquitina ligasa. Ambas forman un complejo funcional en el que laforina recluta sustratos para ser ubiquitinados por malina. Algunos de los sustratos de malina están implicados en el metabolismo del glucógeno como la isoforma muscular de GS (Glucógeno sintasa), que se expresa también en neuronas, AGL/GDE (Enzima desramificante de glucógeno) (Cheng et al., 2007) y R5/PTG

(Subunidad reguladora de PP1)(Gentry et al., 2005; Solaz-Fuster et al., 2008; Vernia et al., 2009a).

1.2.1 Ubicuitinación de proteínas.

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona que consiste en la unión covalente de una o varias moléculas de ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína sustrato. La ubiquitina es una proteína de 8.5 KDa cuya secuencia presenta siete residuos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) y una glicina 76 (G76) importantes para la unión al sustrato y formación de cadenas de poliubiquitinas (Pickart and Fushman et al., 2004) (Figura 4).

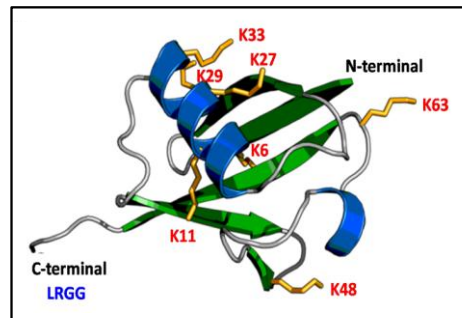


Figura 4: Representación de la estructura terciaria de la ubiquitina. En rojo se han señalado las lisinas (K) y en azul el tetrapéptido C-terminal (LRGG) con la Glicina 76.

El proceso de ubiquitinación transcurre en tres pasos discretos, cada uno catalizado por un grupo de enzimas diferentes (Figura 5). La primera etapa de activación de la ubiquitina es llevada a cabo por la enzima E1-activante; en esta etapa se consume ATP. En la segunda etapa participa la E2-conjugasa, que se une temporalmente a la ubiquitina e interacciona con la E3-ligasa que en el caso de las E3-ligasas de tipo RING, finalmente

Introducción

promueve la transferencia de la ubiquitina desde la E2-conjugasa hasta el sustrato. La unión de la primera ubiquitina se produce entre el residuo de glicina de la ubiquitina (G76) y la cadena lateral de un residuo de lisina del sustrato (Glickman and Ciechanover et al., 2002).

Por último, esta modificación puede ser revertida en un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas deubiquitinasas (DUBs) (Figura 5)

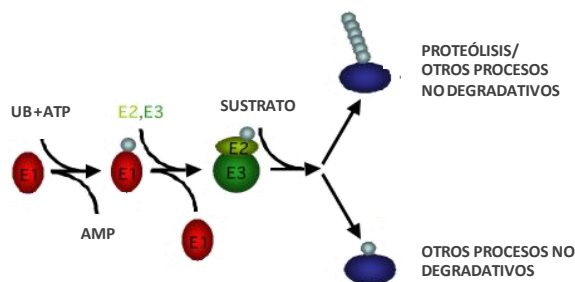


Figura 5: Esquema en tres pasos del proceso de ubiquitinación 1) **Activación**, participa la enzima E1-activante y se consume una molécula de ATP; 2) **Conjugación**, mediada por la E2-conjugasa; 3) **Ligación** del grupo ubiquitina (UB) al sustrato (azul), por medio de la E3-ligasa. El sustrato puede ser monoubicuitinado (parte inferior) o poliubucitinado (parte superior). Ambas modificaciones tienen funciones diferentes.

Inicialmente se identificó el proceso de ubiquitinación como un proceso para etiquetar proteínas destinadas a degradación por el proteasoma.

Después, se observó que puede tener otras funciones no degradativas, dependiendo del tipo de ubiquitinación. En este sentido se han descrito monoubicuitinaciones o multiubucitinas (varias ubiquitinas en varias lisinas de un mismo sustrato) y poliubucitinas (cadena de ubiquitinas enlazadas entre sí). Además las poliubucitinas pueden tener funciones diferentes dependiendo de la lisina implicada en el enlace entre

unas ubiquitinas y otras. En este sentido las cadenas mayoritarias son en K48 y K63. Las primeras dirigen a la proteína a degradación por proteasoma; sin embargo las cadenas K63 están implicadas en otros procesos como reparación de ADN, tráfico y localización intracelular, respuesta inflamatoria, función ribosomal, regulación de cascadas de señalización y degradación por autofagia (Glickman and Ciechanover et al., 2002; Pickart and Fushman et al., 2004).

1.3 Mecanismo de la enfermedad de Lafora.

Histológicamente, la enfermedad de Lafora se caracteriza por la presencia de acúmulos intracelulares de poliglucosanos, también llamados cuerpos de Lafora (Lafora Bodies, LB) (Figura 6). Estos cuerpos se encuentran en numerosos tejidos, principalmente en órganos como hígado, piel, riñón, músculo esquelético y cardíaco, retina, medula espinal y en las dendritas de las neuronas, (Harriman et al., 1955), sugiriendo que la enfermedad puede ser debida a un desorden generalizado relacionado con la síntesis o degradación de glucógeno.

Los cuerpos de Lafora contienen alrededor de un 90% de polímeros de poliglucosano y un 6% de proteínas (Sakai et al., 1968 ; Yokoi et al., 1975).

Estos cuerpos aberrantes se asemejan a la amilopectina de plantas más que al glucógeno de los animales (Gentry et al., 2009), ya que tienen la misma estructura de polímero formado por residuos de glucosa unidos entre sí 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 los hace más insolubles (Worby et al., 2006).

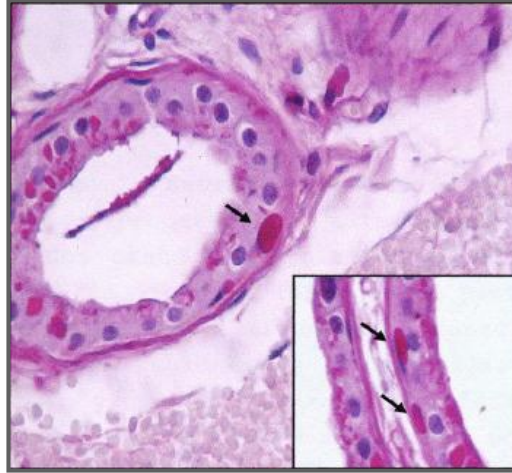


Figura 6: Cuerpos de Lafora. Tinción PAS (*Periodic Acid Shift*) sobre una biopsia de piel axilar, las flechas señalan los característicos cuerpos de inclusión en las células mioepiteliales de los acini de las glándulas apocrinas. Adaptado de (Van heycop Ten ham et al., 1974).

A pesar de la presencia característica de los cuerpos de Lafora en numerosos tejidos, por el momento se desconoce el proceso por el cual se producen éstos, así como su relación causal con la enfermedad. Podrían ser los causantes de los síntomas que desencadena la enfermedad o consecuencia de una neurodegeneración previa en el paciente.

Actualmente existen dos hipótesis que pretenden explicar el mecanismo de la enfermedad.

A) La primera se centra en el estudio de la actividad fosfatasa de laforina. Aunque se desconoce la identidad de un posible sustrato proteico, se ha demostrado que laforina es capaz de desfosforilar carbohidratos complejos como el glucógeno (Worby et al., 2006). Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se propone un mecanismo para explicar el

proceso por el cual se incorporan moléculas de fosfato en el polímero de glucógeno. En este estudio se demuestra que la enzima glucógeno sintasa (GS) es capaz de introducir no sólo moléculas de glucosa a su sustrato sino que también incorpora un fosfato cada diez mil glucosas, aunque éste es un componente minoritario del polímero (Tagliabracci et al., 2011), y se sugiere que laforina es la fosfatasa encargada de eliminar los fosfatos presentes en el glucógeno. Por tanto en ausencia de laforina, el glucógeno se encuentra hiperfosforilado y el exceso de moléculas de fosfato impediría la acción normal de la enzima ramificante, produciéndose un glucógeno menos ramificado.

Algunos estudios han sugerido que laforina es capaz de desfosforilar a GSK3 β , una proteína quinasa inhibidora de la glucógeno sintasa, lo cual explicaría que en ausencia de laforina se produzca una síntesis de glucógeno desregulada y ello facilita la formación de los cuerpos de Lafora, pero esta hipótesis no se ha podido confirmar por otros autores.

Basándose en estos datos, algunos grupos defienden que la formación de un glucógeno “aberrante”, en ausencia de laforina, es la causa de la muerte neuronal del paciente y de la enfermedad de Lafora.

No obstante en este contexto el papel de malina como E3-ubiquitina ligasa no queda claro. Sin embargo defectos en ésta producen un fenotipo neurológica e histológicamente indistinguible con los pacientes con defectos en laforina, por lo que es necesaria una segunda hipótesis para explicar la función de malina en el mecanismo molecular de la enfermedad.

B) La segunda hipótesis se centra en la capacidad de laforina y malina para formar un complejo funcional en el que laforina actúa como “andamiaje” llevando a malina a sus sustratos, que generalmente son proteínas implicadas en el metabolismo del glucógeno, para que ésta los poliubiquitine y sean degradados por el proteasoma.

En este contexto, se ha demostrado que los cuerpos de Lafora (LB) contienen materias ubiquitinadas y productos glicosilados (Mittal et al.,

Introducción

2007), sugiriendo la presencia de proteínas mal plegadas y destinadas a degradación.

En ausencia de laforina o malina el sistema de degradación de proteínas por el proteasoma se encuentra alterado, produciéndose una acumulación de material no degradado que produce un efecto tóxico para la célula desencadenando estrés de retículo endoplásmico (RE) y eventualmente apoptosis celular.

De acuerdo con esta hipótesis, recientemente se ha descrito que diferentes modelos carentes de laforina presentan estrés de retículo endoplásmico (RE) y disminución de la actividad proteasomal (Vernia et al., 2009a), sugiriendo que ambos fenómenos juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Lafora.

También existen otras rutas proteolíticas independientes de la actividad del proteasoma que participan en la homeostasis de proteínas como la autofagia.

La autofagia se inicia por la formación de vesículas (autofagosomas) que secuestran lípidos, proteínas mal plegadas, ácidos nucleicos y carbohidratos que deben de ser eliminados de la célula. Una vez se han cargado de este material, se fusionan con el lisosoma donde residen las enzimas necesarias para la degradación de estos productos.

De este modo, un defecto en autofagia puede ser debido a un fallo en la formación de los autofagosomas, a la incapacidad de estos para cargar el sustrato o para fusionarse con el lisosoma o a defectos en la actividad lisosomal.

Recientemente se ha demostrado que la ausencia de laforina afecta a la formación de los autofagosomas. Además se ha observado que la sobreexpresión de laforina aumenta la actividad autofagocítica. Aunque se desconoce el mecanismo molecular, los resultados sugieren que laforina podría actuar modulando la ruta de señalización controlada por mTOR, una quinasa que reconoce el estado energético de la célula y actúa como inhibidor de autofagia, (Aguado et al., 2010; Knecht et al., 2010) (Figura 7).

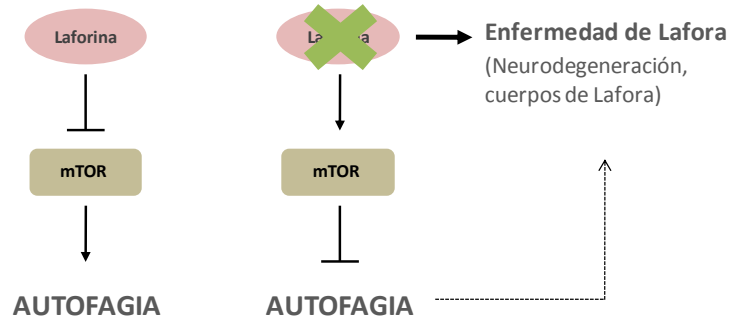


Figura 7: Representación esquemática de la regulación de autofagia por laforina. Laforina induce autofagia mediante la inhibición de mTOR. La pérdida de laforina en los pacientes de la enfermedad de Lafora activa a mTOR e inhibe la autofagia contribuyendo a la patogeneidad de la enfermedad. Adaptado de (Aguado et al., 2010)

Resumiendo esta segunda hipótesis, laforina modula diferentes rutas de degradación de proteínas. Por una parte la degradación dependiente de proteasoma, actuando de andamio para que malina reconozca y ubiquitine a sus sustratos para ser degradados y, en otro sentido, favoreciendo la degradación por autofagia.

De modo que la ausencia de laforina produce un defecto en la homeostasis proteica y en consecuencia induce la acumulación de proteínas y material destinado a degradación. Esta acumulación ejerce un efecto tóxico para la célula y desencadena fenómenos como el estrés del RE, aumentando la síntesis de chaperonas que puedan revertir la acumulación de proteínas mal plegadas y la activación de otras rutas degradativas, como la autofagia, para eliminar el exceso de material degradable. Sin embargo, en ausencia de laforina, esta última alternativa degradativa también está comprometida por lo que la acumulación de este material degradable lleva

Introducción

a la célula a un estado de toxicidad que es incapaz de revertir, iniciándose la muerte celular por apoptosis.

No obstante, ambas hipótesis o funciones de laforina no son mutuamente excluyentes siendo posible que laforina ejerza ambas actividades.

Por el momento se desconoce el mecanismo molecular exacto por el que laforina modula los diferentes procesos descritos en ambas hipótesis. Este mecanismo depende de la identificación de los sustratos de laforina. Con esta finalidad, diferentes grupos han realizado estudios de interactómica que revelan la existencia de interacciones de laforina con diversas proteínas implicadas en el metabolismo energético, así como también en otros procesos celulares. Algunas de ellas son:

- (i) Malina, una E3 ubiquitin ligasa, implicada en la enfermedad de Lafora, que interacciona con laforina promoviendo su ubiquitinación y degradación dependiente de proteasoma (Gentry et al., 2005).
- (ii) HIRIP5 (HIRA interacting protein 5), proteína citosólica implicada en la homeostasis del hierro. (Ganesh et al., 2003)
- (iii) GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3*) (Lohi et al., 2005; Wang et al., 2006) componente crucial en la ruta de Akt/PKB y Wnt y de la síntesis de glucógeno.
- (iv) R5/PTG (*Protein Targeting to Glycogen*) (Fernandez-Sanchez et al., 2003; Solaz-Fuster et al., 2008; Vernia et al., 2009b), una de las subunidades reguladoras de la proteína fosfatasa de tipo 1 (PP1). R5 favorece la unión de PP1 a sus sustratos, glucógeno sintasa (GS), fosforilasa (Ph) y fosforilasa quinasa (PhK), e inicia la acumulación de glucógeno.
- (v) EPM2AIP1 (*EPM2A interacting Protein 1*), es una proteína de función desconocida. Esta proteína interacciona con laforina por doble híbrido (Lanzano et al., 2003) y además se ha

.observado que ambas colocalizan en cuerpos de poliglucosanos (Chan et al., 2004).

- (vi) RanBP (*Ran binding protein*), (Fernández-Sánchez et al., 2004) proteína que participa en el transporte intracelular núcleo-citoplasma, el ensamblaje microtubular y en la formación de la membrana nuclear, entre otros procesos.
- (vii) AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Recientemente se ha descrito que laforina interacciona con las subunidades AMPK α y AMPK β del complejo AMPK también conocido como el sensor energético de la célula (Solaz-Fuster et al., 2008).
- (viii) PIASy [*Protein Inhibitor of Activated STAT* (S*ignal* T*ransductor* A*ctivator of* T*ranscription*) y] (Fernández-Sánchez, 2004). Participa en la regulación de rutas de señalización mediadas por Jak2/STAT3.

En el contexto de la interactómica uno de los objetivos de la presente tesis doctoral ha sido demostrar la existencia de la interacción de PIASy con laforina y caracterizar dicha interacción, con el fin de estudiar la posible implicación de PIASy en la patogeneidad de la enfermedad de Lafora.

2 PIASy.

PIASy es una proteína que posee actividad E3-SUMO ligasa y se expresa mayoritariamente en cerebro y testículos, con niveles más bajos en bazo, ovarios, colon y leucocitos de sangre periférica.

Esta proteína pertenece a la familia PIAS (*Protein Inhibitor of Activated STAT*), con actividad E3-SUMO ligasa confiriéndoles la capacidad de sumoilar a otras proteínas, modulando la estabilidad, localización subcelular o actividad de sus sustratos sumoilables, así como también la interacción entre proteínas.

2.1 Familia de proteínas PIAS.

El término de proteínas inhibidoras de la actividad STAT (PIAS) deriva de la identificación de dos miembros de esta familia como inhibidores de STAT1 y STAT3 (transductores de señal y activadores de la transcripción 1 y 3 respectivamente) (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998).

Más tarde se observó que la actividad de estas proteínas no es exclusiva para la regulación de la señalización por citoquinas a través de STAT, sino que se han identificado otras funciones en la regulación de procesos celulares como el ciclo celular, apoptosis o inflamación entre otros (Shuai and Liu et al., 2005).

Existen cuatro miembros en esta familia, PIAS1, PIAS2 o PIASx, PIAS3 y PIAS4 o PIASy. Además de éstas, se conocen también dos variantes para PIAS2 (PIAS2a y PIAS2b), para PIAS3 (PIAS3L y PIAS3) y para PIAS4 (PIAS4 y PIAS4E6), en las que se ha perdido por *splicing* alternativo alguna región característica de la proteína (Rytinki et al., 2009).

Estas cuatro proteínas se expresan de forma ubicua, pero PIASx y PIASy son más abundantes en testículo que en otros tejidos humanos. Se han encontrado ortólogos de estas proteínas en animales invertebrados, en plantas y en levaduras. En *Saccharomyces cerevisiae* existen dos ortólogos de la familia PIAS denominados Siz1 y Siz2.

2.1 Sumoilación de proteínas.

La sumoilación consiste en la unión covalente y reversible de un miembro de la familia SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) a un residuo de lisina de la proteína diana por un proceso análogo a la ubiquitinación.

A diferencia de la ubiquitinación, la unión del SUMO a la lisina ocurre frecuentemente dentro de un motivo de aminoácidos conservados, $\psi\kappa xE$ (donde ψ es I, L o V; y x puede ser cualquier residuo), aunque estudios recientes han demostrado que SUMO también puede unirse a residuos de

lisina que no se encuentran localizados entre estos motivos (Shuai and Liu et al., 2005).

SUMO es una proteína similar a la ubiquitina en su estructura tridimensional, sin embargo difieren en su secuencia de aminoácidos, la distribución de cargas y tamaño, 11 KDa, en vez de los 8,5 kDa de la ubiquitina (Figura 8).

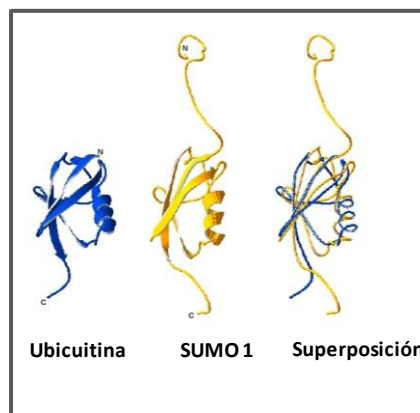


Figura 8: Esquema de la estructura terciaria de SUMO1 comparada con ubiquitina. Adaptado de www.genetik.uni-koeln.de

En mamíferos la familia SUMO está compuesta por tres miembros: SUMO1, SUMO2 y SUMO3. Se ha identificado un cuarto gen en el genoma humano que codifica para SUMO4, pero no se ha descrito que pueda conjugarse a proteínas (Zlatanou and Stewart et al., 2010) .

SUMO2 y 3 se consideran idénticos, por ello se les nombra como SUMO2/3, mientras que SUMO1 sólo presenta un 50% de identidad con SUMO2/3.

El proceso de sumoilación ocurre en tres pasos: activación, conjugación y ligación. Cada uno de ellos está catalizado por una enzima específica E1-

Introducción

activante, E2-conjugasa y E3-ligasa, respectivamente (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007; Kerscher et al., 2006) (Figura 9)

Antes del paso de activación, es necesaria la eliminación de la extensión carboxilo terminal de SUMO por proteasas específicas para generar un extremo con dos residuos de glicina. Después SUMO es activado por la enzima activante E1, un heterodímero compuesto de SAE1 (*SUMO Activating Enzyme subunit 1*) y SAE2 (*SUMO Activating Enzyme subunit 2*), en un proceso dependiente de ATP.

En esta etapa, se forma un enlace tioéster entre la glicina en posición C-terminal de SUMO y el residuo cisteína de SAE2.

En la segunda etapa SUMO es transferido al residuo de cisteína de la E2-conjugasa, UBC9 (*Ubiquitin Conjugating Enzyme 9*).

Por último la E3 SUMO ligasa promueve la transferencia de SUMO desde la E2 al sustrato, formando un enlace isopeptídico entre el extremo C-terminal de SUMO y el grupo ϵ -amino de una lisina en la proteína diana.

A diferencia de la ubiquitinación, donde la especificidad de sustrato está determinada por el elevado número de combinaciones E2-E3 posibles, en la sumoilación sólo se conoce una E2-conjugasa, UBC9. Además no siempre es requerida la acción de la E3-SUMO ligasa y se ha observado que UBC9, al menos *in vitro*, es capaz de dirigir la sumoilación de un sustrato en ausencia de la E3-SUMO ligasa (Shuai and Liu et al., 2005).

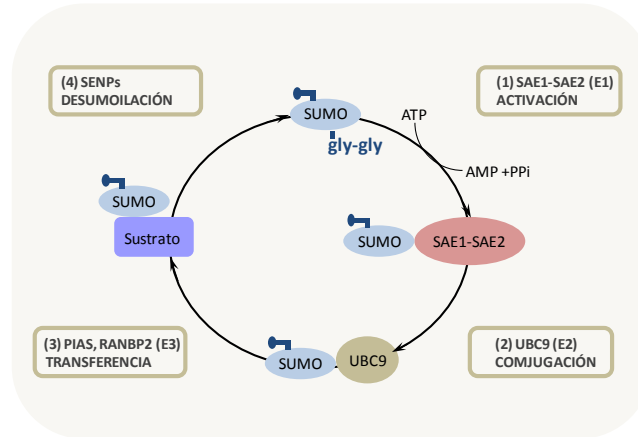


Figura 9: Esquema del proceso de sumoilación y desumoilación de proteínas. (1) **Activación** del grupo SUMO, en este paso se consume una molécula de ATP y se une el SUMO al complejo SAE1-SAE2 (E1), por medio de la glicina en C-terminal de SUMO; (2) **Conjugación**, mediada por la E2-conjugasa, UBC9; (3) **Transferencia** del SUMO al sustrato por medio de la E3-ligasa. (4) La sumoilación es un proceso reversible por la acción de las SENPs (*SUMO-especific proteases*).

Sorprendentemente, SUMO2/3 y no SUMO1 contienen un motivo de sumoilación alrededor de la lisina 11, (Ψ kXE, donde Ψ representa un aminoácido hidrofóbico y X puede ser cualquier aminoácido), que le permite formar cadenas de polisumo cuya función se desconoce. Sin embargo SUMO1 no presenta esta capacidad y suele encontrarse en monosumolaciones o al final de una cadena de SUMOS 2/3 (Tatham et al., 2001).

Por último, también se han observado que las ubiquitinas pueden unirse a los SUMO formándose cadenas mixtas de SUMO y ubiquitinas, cuya función es desconocida (Zlatanou and Stewart). Otra de las diferencias descritas para las modificaciones por SUMO1 o por SUMO2/3, es que se ha

Introducción

observado que la conjugación de SUMO2/3 y no de SUMO1, se activa en respuesta a diferentes tipos de estrés celular (Rytinki et al., 2009).

Del mismo modo que la ubiquitinación, la sumoilación de proteínas es un proceso dinámico y reversible. La desconjugación del SUMO en la proteína sustrato es llevada a cabo por desumoilasas, en mamíferos llamadas proteínas SENPs (*SUMO-especific proteases*) (Hay et al., 2007; Kim and Baek et al., 2009). Esta familia de proteínas se compone de seis miembros, mientras que en levaduras se han definido dos miembros Ulp1 y Ulp2 (Kim and Baek, 2009).

Las funciones catalíticas que se conocen para las proteínas desumoilasas son dos: el procesamiento de precursores SUMO generando un monómero de SUMO libre que se puede conjugar a una proteína; revertir la sumoilación por desconjugación de SUMO en proteínas modificadas por monosumoilaciones y polisumoilaciones (Figura 10) (Kim and Baek et al., 2009).

Cada una de estas proteasas presenta especificidad de sustrato y preferencia por una determinada isoforma SUMO (Kim and Baek et al., 2009).

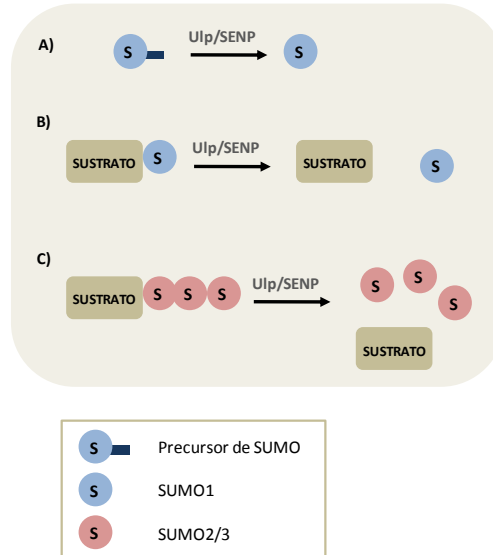


Figura 10: Funciones catalíticas de las enzimas desumoilasas. A) Procesamiento de precursores SUMO; **B)** Desconjugación de SUMO en proteínas monosumoiladas; **C)** Editado de SUMO en el extremo de cadenas poliSUMO2/3 conjugadas al sustrato.

A pesar de las diferencias entre la sumoilación y la ubiquitinación de proteínas, ambos procesos celulares están íntimamente relacionados. La misma lisina de una proteína diana puede ser modificada por ubiquitina o por SUMO, sugiriendo que la sumoilación puede estar implicada en la regulación de procesos dependientes de ubiquitinas, como la estabilidad de proteínas. Los SUMO podrían competir con las ubiquitinas e impedir la ubiquitinación y posterior degradación a través del proteasoma, o por el contrario favorecerla.

De este modo la modificación por SUMO1 o SUMO2/3 es un proceso selectivo con funciones diferentes. Mientras que la sumoilación por SUMO2/3 puede potenciar la degradación de proteínas, SUMO1 puede modular la actividad de una proteína, su localización subcelular o la interacción con otras proteínas (Rytinki et al., 2009). Además SUMO2/3 y

no SUMO1, se conjuga a proteínas en respuesta a estrés celular como choque térmico, estrés oxidativo o exposición a etanol (Vertegaal et al., 2006).

Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual un sustrato es modificado específicamente por SUMO1 y no por SUMO2/3 y viceversa.

2.2 Mecanismos de regulación mediados por la familia PIAS.

Las proteínas PIAS se describieron inicialmente como inhibidores de la ruta de señalización por citoquinas, JAK/STAT. Más tarde se demostró que estas proteínas no solo inhiben a estos factores de transcripción sino que también pueden regular otros procesos celulares, activando o inhibiendo la transcripción de diversos genes, en algunos casos sumoilando a factores de transcripción y en otros de manera independiente a la sumoilación. Se han descrito diferentes modelos para explicar el mecanismo por el cual las proteínas PIAS son capaces de modular la transcripción (Shuai and Liu et al., 2005). Estos mecanismos se describen en la Figura 11:

A) Mecanismos de regulación negativa.

Existen cuatro mecanismos moleculares diferentes por los que las proteínas PIAS pueden reprimir la transcripción (Shuai and Liu et al., 2005).

- i. El primer mecanismo consiste en la sumoilación del factor de transcripción, impidiendo su unión al ADN o su actividad como activador de la transcripción (Figura 11 C).
- ii. Independientemente de sumoilación las proteínas PIAS pueden bloquear la unión al ADN de factores de transcripción (Figura 11A).
- iii. Las proteínas PIAS también pueden reclutar correpresores de la transcripción (Figura 11 B).
- iv. Por último, esta familia de proteínas puede reprimir la actividad transcripcional secuestrando factores de transcripción en

estructuras subnucleares donde quedan retenidos también correpresores de la transcripción (Figura 11 D).

B) Mecanismos de regulación positiva.

Las proteínas PIAS además de actuar como represores transcripcionales, también pueden regular positivamente la actividad de diversos factores de transcripción por dos mecanismos (Shuai and Liu et al., 2005):

- i. Reclutando coactivadores transcripcionales (Figura 11 E).
- ii. Por sumoilación de factores de transcripción, activándolos (Figura 11 F).

Por tanto, la sumoilación mediada por las proteínas PIAS de un factor de transcripción, puede resultar en la inhibición o activación de su actividad transcripcional. Es posible que el efecto de la sumoilación en la actividad de un factor de transcripción dependa del contexto químico en el que se encuentra el promotor de cada gen diana individualmente, de modo que la sumoilación del factor de transcripción puede favorecer su capacidad para inducir a unos genes o impedir la transcripción de otros (Shuai and Liu et al., 2005).

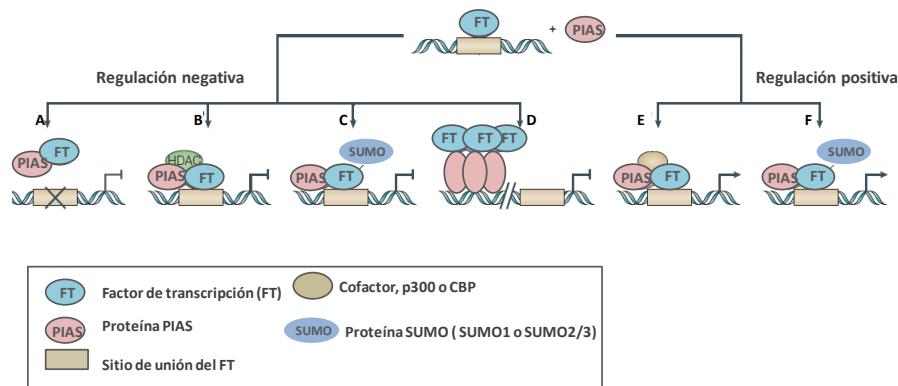


Figura 11: Mecanismos de regulación transcripcional mediada por proteínas PIAS. Mecanismos de regulación negativa: **A)** Las proteínas PIAS bloquean la unión del factor de transcripción al ADN. **B)** Reclutando correpresores transcripcionales como la Histona desacetilasa (HDAC) inhibiendo la transcripción. **C)** Sumoilación del factor de transcripción mediada por las proteínas PIAS, impidiendo que ejerza su actividad. **D)** Reclutando factores de transcripción en estructuras subnucleares e impidiendo que ejerzan su función. Mecanismos de regulación positiva. **E)** Las proteínas PIAS pueden reclutar coactivadores de la transcripción. **F)** Por sumoilación de un factor de transcripción. Adaptado de (Shuai and Liu et al., 2005).

2.3 Estructura de las proteínas PIAS

Los cuatro miembros de la familia PIAS poseen un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos. Sus tamaños varían desde 510 aminoácidos presentes en PIASy (la más pequeña) hasta 651 aminoácidos de PIAS1 (Rytinki et al., 2009).

Se han identificado 5 dominios o motivos en estas proteínas (Figura 12):

Dominio SAP: (*Scaffold- attachment factor-A (SAFA) and B (SAFB), Apoptotic chromatin-condensation inducer in the nucleus (ACINUS) and PIAS*

domain) localizado en el fragmento N-terminal de esta familia. Este dominio se encuentra en proteínas asociadas a la cromatina y es el responsable de la unión a regiones y estructuras específicas del ADN (Aravind and Koonin et al., 2000).

Dentro de este dominio se encuentra el motivo LXXLL donde X puede ser cualquier aminoácido (Shuai and Liu et al., 2005). Este motivo media la interacción con receptores nucleares y sus correguladores y se ha observado que es necesario para que PIASy ejerza su función como represor de STAT1 y del receptor de andrógenos (Liu et al., 2001).

Motivo PINIT: es el siguiente después del dominio SAP; es un motivo muy conservado y determina la localización subcelular de estas proteínas. Como ejemplo, se ha demostrado que este dominio es esencial para que PIAS3 se localice en el núcleo (Duval et al., 2003).

Otras de las funciones asignadas a este motivo es la capacidad para dictar la modificación de proteínas preferentemente por un determinado parólogo de SUMO. En este sentido, se ha observado que un producto de splicing alternativo de PIASy en el que se ha eliminado el dominio PINIT es capaz de promover la modificación por SUMO2/3, mientras que ha perdido su capacidad de modificación por SUMO1 (Wong et al., 2004).

Dominio SP-RING: Junto con el dominio SAP es la región más conservada de esta familia. Es una región rica en cisteínas que forman un anillo de tipo dedo de zinc llamado Siz/PIAS RING. También es conocido como dominio RLD (*RING-finger-like zinc-binding domain*). Se encuentra en la parte central de la estructura y es necesario para la actividad E3- SUMO ligasa de estas proteínas, además de mediar interacciones proteína-proteína (Hochstrasser et al., 2001).

Los dominios clásicos tipo RING contienen ocho residuos de cisteína o histidina que les permiten coordinar dos iones de zinc, creando un dominio globular que media la interacción entre proteínas (Weissman et al., 2001). Muchas de las proteínas que contienen un dominio RING actúan como E3-

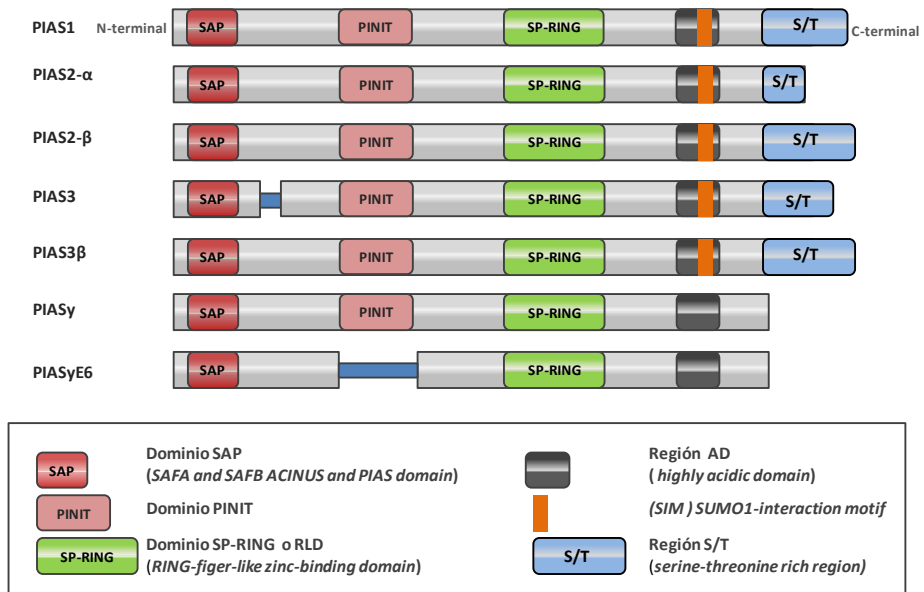
Introducción

ubiquitina ligasa y median la transferencia de la ubiquitina desde la E2-conjugasa al sustrato. Se piensa que esto ocurre sin la formación de un intermediario covalente. Probablemente el dominio SP-RING de la familia PIAS ejerce la misma función que el dominio RING de las E3-ubiquitina ligasas, aunque carece de las cisteínas capaces de coordinar dos iones de zinc (Rytinki et al., 2009).

En PIASy, el dominio SP-RING está comprendido entre los aminoácidos 311 y 388 y la mutación de los aminoácidos cisteína 342 y cisteína 347 a alanina resulta en la pérdida de su actividad E3-SUMO ligasa (Liu et al., 2001; Gross et al., 2001). Esta forma mutada de PIASy se empleó como control negativo en los ensayos de actividad realizados en el presente trabajo.

Motivo SIM: (*SUMO interacting motif*), se encuentra en la región C-terminal de estas proteínas y se encarga de la interacción no covalente con proteínas sumoiladas (Rytinki et al., 2009). Este motivo es variable entre los miembros de la familia PIAS pero al menos todos contienen una secuencia consenso, formada por un núcleo de naturaleza hidrofóbica, $\psi\chi\psi\psi$ o $\psi\psi\chi\psi$ (donde ψ suele ser V o I) (Minty et al., 2000) y seguido de una región rica en residuos con carga negativa (región ácida E/D). Curiosamente esta región ácida es muy grande en PIASy respecto el resto de miembros de la familia (16 residuos E/D respecto de 4 en otros miembros PIAS) (Hannich et al., 2005; Hecker et al., 2006; Song et al., 2004; Song et al., 2005).

Región S/T: Se encuentra en la región C-terminal de esta familia de proteínas. Es una región rica en serinas y treoninas. Es la región menos conservada y por el momento se desconoce su función (Shuai and Liu et al., 2005).



B)

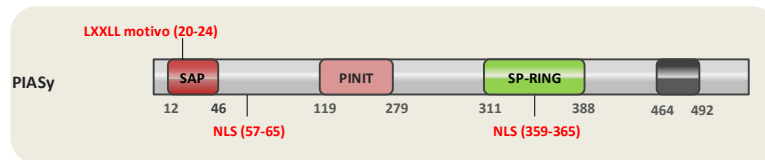


Figura 12: Esquema de los dominios de la familia PIAS. A) Comparación de la estructura de los diferentes miembros que componen la familia de proteínas PIAS. PIASy y PIASyE6 no contienen la región ST ni el motivo de interacción con SUMO1 (SIM). **B)** Esquema de los dominios de PIASy. Se ha detallado la posición exacta de cada uno de los dominios (número de aminoácido marcado en gris), la posición del motivo LXXXLL y las señales de localización nuclear (rojo).

A pesar de que el dominio SP-RING, de la familia PIAS presenta actividad catalítica E3-SUMO ligasa, por el momento se desconoce la importancia fisiológica de esta actividad.

En este contexto se ha observado que existen otras proteínas que carecen de este dominio y son capaces de ejercer como E3-SUMO ligasas, por ejemplo la proteína RanBP2 (Ran Binding protein 2) (Pichler et al., 2004), Pc2 (polycomb protein 2) (Kagey et al., 2003), o TOPORS (*topoisomerase I-binding, arginine/serine-rich*) (Weger et al., 2005).

Por otra parte se ha observado que un mutante de PIASy, en el que se han mutado las cisteínas 342 y 347 del dominio SP-RING a alanina, mantiene su capacidad para sumoilar y reprimir al receptor de andrógenos (Gross et al., 2004). Sin embargo otros estudios indican que la actividad E3-SUMO ligasa de PIAS1 y PIAS α es necesaria para la regulación de este receptor (Nishida and Yasuda et al., 2002).

Estos datos contradictorios han llevado a poner en duda la actividad SUMO ligasa de estas proteínas y se ha propuesto que estas proteínas promueven la sumoilación actuando como adaptadores que estabilizan la interacción de Ubc9 (cargado de SUMO) y la proteína aceptora (Rytinki et al., 2009).

2.4 Modificaciones post-traduccionales en las proteínas PIAS.

Se han observado diversas modificaciones post-traduccionales en PIASy y en otros miembros de la familia PIAS con el fin de modular su actividad, localización o estabilidad. Entre ellas están la sumoilación, fosforilación y ubiquitinación. Además, debe tenerse en cuenta que la ubiquitinación, la fosforilación, y otras modificaciones post-traduccionales como la sumoilación, pueden ejercer una acción combinada en la regulación de la actividad de un mismo sustrato (Hunter et al., 2007).

Fosforilación: Es la modificación postraduccional más estudiada en las proteínas PIAS y enlaza la actividad de esta familia con otras rutas de señalización.

Curiosamente no se han identificado fosforilaciones en la secuencia de PIASy pero sí en otros miembros de esta familia. Por ejemplo, se ha descrito que PIAS2 se fosforila en los aminoácidos Ser113 y Ser116, en una reacción catalizada por la MAP quinasa p38, favoreciendo su actividad como regulador transcripcional (Yang and Sharrocks et al., 2006).

En el contexto de las fosforilaciones de PIAS, se ha identificado la fosforilación en el residuo Ser90 del dominio SAP de PIAS1 mediada por IKK α (Liu et al., 2005). Esta fosforilación se inicia en respuesta a estímulos inflamatorios y es necesaria para que PIAS1 reprima la actividad transcripcional de STAT1 y de NF- κ B. Sorprendentemente, para que PIAS1 se fosfore en este residuo es necesaria su actividad E3-SUMO ligasa, bien para mediar su autosumoilación o la sumoilación de otras proteínas implicadas en este proceso, indicando la existencia de una relación directa entre sumoilación y fosforilación de proteínas (Rytinki et al., 2009).

Sumoilación: Además de fosforilación también se han identificado sumoilaciones en algunos miembros de la familia PIAS y en algunos casos se produce una reacción intramolecular denominada autosumoilación cuyo mecanismo molecular se desconoce. Así, se ha descrito que PIASy se modifica por SUMO1 en los aminoácidos Lys 35 y Lys 128 y se piensa que se trata de autosumoilación. Se ha observado que la sumoilación en la Lys 35 es necesaria para que PIASy sumoile a Tcf-4 un factor de transcripción de la ruta Wnt. Este factor se activa por sumoilación mediada por PIASy. Sin embargo, el mutante K35R de PIASy (no sumoilable en este residuo) no es capaz de iniciar la sumoilación de Tcf-4 pero sí de otros sustratos (Yamamoto et al., 2003; Ihara et al., 2005).

Ubicuitinación: Por último, también se han observado ubicuitinaciones en esta familia. En este contexto se ha descrito que PIAS1 y PIASy son

ubiquitinadas y enviadas a degradación por las E3-ubiquitina-ligasas hSiah2 (*seven in absentia homologue2*) y Trim32 (*Tripartite motif-containing protein 32*), respectivamente (Albor et al., 2006; Depaux et al., 2007)

2.4.1 TRIM32.

TRIM32 es una E3-ubiquitina ligasa de tipo RING que pertenece a la familia de proteínas TRIM, formada en humanos por 68 miembros.

La familia de proteínas TRIM (*tripartite motif*) también se conocen por el nombre de RBCC (*Ring/B-Box/Coiled-coil*) por contener un motivo compuesto por el dominio RING que permite la unión de estas proteínas con la E2-ubiquitina conjugasa, una o dos cajas B (cuya función se desconoce) y una región coiled-coil que participa en la oligomerización de estas proteínas (Nisole et al., 2005).

Seguido del motivo TRIM o RBCC, se encuentra el fragmento C-terminal que difiere entre los diferentes miembros de la familia TRIM. En el caso de TRIM32 presenta cuatro repeticiones NHL similares a las descritas anteriormente en malina (Figura 13) (Nisole et al., 2005). Dentro de estas repeticiones NHL, la mutación en TRIM32 humano de un aspártico conservado a asparagina (D487N) es la causa del desarrollo de una enfermedad denominada Distrofia muscular de *Limb-girdle* de tipo 2H (LGMD2H) (Albor et al., 2006). Una mutación en malina (D233N) en una posición similar se ha descrito en pacientes de Lafora (Chan et al., 2003a).

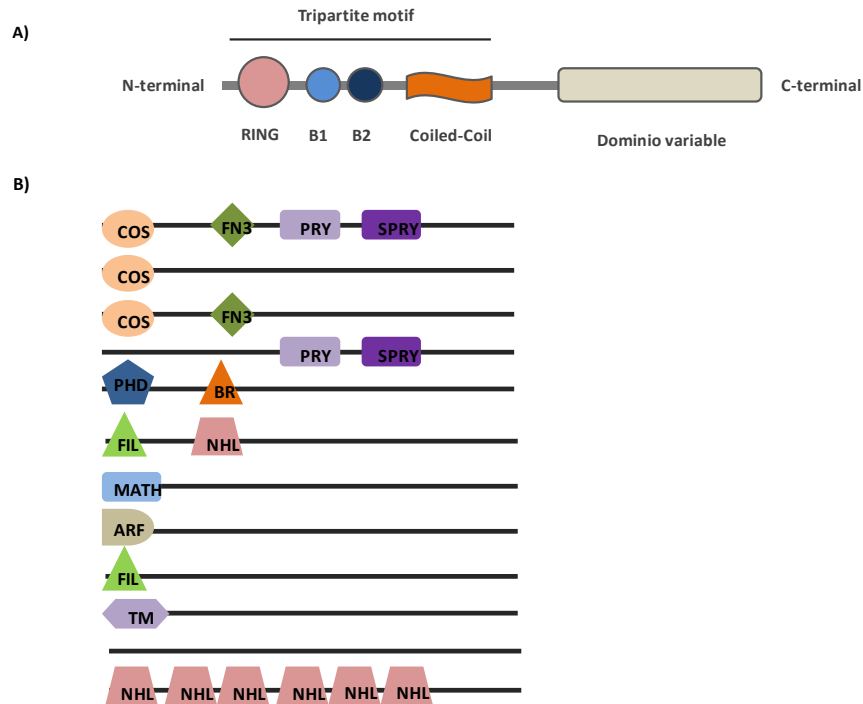


Figura 13: A) Esquema de los dominios conservados de la familia TRIM: motivo tripartito formado por el dominio RING, una o dos cajas B y un coiled coil. **B)** Esquema de la región variable (C-terminal) de la familia TRIM. ARF, *ADP ribosylation factor like*; BR, *bromo domain*; COS *C-terminal subgroup one signature*; FIL, *filamine type immunoglobulin*; FN3, *fibronectin type 3*; MATH *Meprin and tumour necrosis factor receptor-associated factor homology*; PHD, *plant homeodomain*; TM dominio transmembrana; NHL (definido por homología entre las proteínas Ncl-1, HT2A y Lin-41).

Se ha descrito que TRIM32 es una E3-ubiquitina ligasa de actina. Además, se ha observado que es capaz de ubiquitinar a PIASy marcándolo para ser degradado por el proteasoma. Además, esta ubiquitinación de PIASy dependiente de TRIM32 se produce en condiciones apoptóticas para la célula, inducidas por radiación UV y TNF- α (factor de necrosis tumoral

Introducción

que activa al factor de transcripción NF- κ B) (Albor et al., 2006). Por tanto, TRIM32 es un inhibidor de la actividad de PIASy en la ruta de apoptosis mediada por NF-KB.

Se ha observado que otros miembros de la familia TRIM, como TRIM27 (RFP), interaccionan con otros miembros de la familia PIAS. Sin embargo no se ha observado que medie la ubiquitinación y degradación de las proteínas PIAS con las que interacciona (Matsuura et al., 2005).

Dado que existe un alto grado de similitud entre la estructura de dominios de TRIM32 y malina, una E3-ubiquitina ligasa también de tipo RING (Figura 14), decidimos analizar la posible interacción entre PIASy y malina, así como la posible ubiquitinación y degradación de PIASy mediada por malina. Esta hipótesis se explicará y analizará en el apartado de “Resultados”.

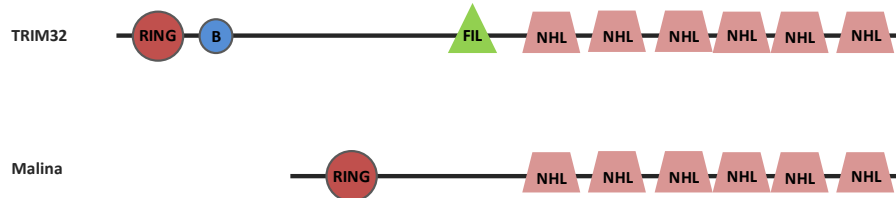


Figura 14: Comparación esquemática de los dominios de la estructura de Malina y TRIM32. Ambas proteínas poseen un dominio RING en el extremo N-terminal y seis repeticiones NHL en el extremo C-terminal.

2.6 Actividad de las proteínas PIAS en la señalización de citoquinas.

Estudios bioquímicos y genéticos revelan que las proteínas PIAS están implicadas en la regulación de diferentes rutas de señalización mediadas por citoquinas.

Las citoquinas son pequeños polipéptidos o glicoproteínas secretadas por una gran variedad de células con la finalidad de modular el crecimiento celular y diferenciación así como la respuesta inmune y antiinflamatoria.

En este contexto son diferentes factores de transcripción los encargados de regular la activación de un amplio rango de genes en respuesta a citoquinas. Estos factores pertenecen a las familias de proteínas STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*), NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) y SMAD (MADH: Mothers against decapentaplegic homolog).

Inicialmente se identificaron a las proteínas PIAS como inhibidores de la actividad transcripcional STAT, pero después se ha observado que también participan en la regulación de la familia NF- κ B y SMAD, además de regular a otras proteínas implicadas en ciclo celular y apoptosis (Bischof et al., 2006) como las proteínas p53 (Wu and Chiang, 2009; Bischof et al., 2006), p73 (Zhang et al. 2010), MDM2, STAB2, MITF, C/EBP- ϵ o a la topoisomerasa II (Azuma et al., 2005). Por tanto las proteínas PIAS regulan un amplio rango de procesos celulares modulando diferentes vías de señalización.

En el presente trabajo se ha estudiado la participación de PIASy en las rutas de señalización NF- κ B y STAT, por lo que serán analizadas con detalle, a continuación.

A) Señalización mediada por NF- κ B

La familia de proteínas NF- κ B son factores de transcripción diméricos compuestos por las proteínas de unión a ADN, Rel. En mamíferos se han identificado cinco miembros de la familia de proteínas NF- κ B/Rel: NF- κ B1

Introducción

(p50 y su precursor p105), NF- κ B2 (p52 y su precursor p105), cRel, RelA (p65) y Rel-B (Shuai et al., 2006; Karin and Ben-Neriah et al., 2000).

Estos factores de transcripción pueden ser activados por numerosas señales, tales como citoquinas proinflamatorias como TNF (factor de necrosis tumoral), IL-1 (interleuquina 1), lipopolisacáridos bacterianos, virus y estreses celulares como la radiación ultravioleta, radiación y e hipoxia. Por tanto NF- κ B está implicado en la regulación de un gran número de procesos celulares, incluyendo inflamación, proliferación celular, apoptosis y respuesta a infecciones (Viatour et al., 2005; Karin et al., 2004).

Todos los miembros de esta familia contienen una señal de localización nuclear (NLS), además de una región altamente conservada de 300 aminoácidos, RHR (Rel homology región), que es la responsable de la dimerización, unión a ADN e interacción con la proteína inhibidora I κ B (Shuai et al., 2006).

En condiciones basales para la célula, los factores de transcripción NF- κ B son secuestrados en el citoplasma por un grupo de proteínas inhibitoras, I κ Bs (I κ B α e I κ B β), que se unen a NF- κ B enmascarando su señal de localización nuclear (NLS).

En respuesta a un estímulo extracelular las proteínas inhibitoras I κ B son rápidamente fosforiladas por la quinasa IKK. Esta quinasa es un complejo compuesto por dos subunidades catalíticas IKK α /1 e IKK β /2 y una subunidad reguladora NEMO/IKK γ .

La fosforilación de I κ B desencadena su ubiquitinación y degradación dependiente de proteasoma, liberándose el factor de transcripción NF- κ B que se transloca al núcleo donde activa la transcripción de diversos genes (Shuai et al., 2006).

En este contexto se ha demostrado que PIAS1 y PIAS3 pueden interactuar con p65. Mientras que PIAS1 se une al extremo N-terminal (Liu et al., 2005), PIAS3 lo hace en C-terminal (Jang et al., 2004). Sin embargo hasta la fecha se desconoce el mecanismo molecular por el que PIAS3 actúa como represor de p65, si bien existen evidencias de que PIAS1

inhibe la transcripción mediada por p65, impidiendo la unión de p65 al ADN (Shuai and Liu et al., 2005) .

Se ha descrito que PIASy también participa en la regulación de la ruta de NFκB, en este caso mediando la sumoilación de NEMO con SUMO1 en respuesta a estrés genotóxico (condiciones en las que la célula está expuesta a agentes que dañan al ADN), formándose el complejo IKK activo. Finalmente, IKK fosforila a IκB desencadenando su ubiquitinación y degradación. Por tanto el efecto final de la sumoilación de NEMO es la activación de NF-κB (Mabb et al., 2006; McCool and Miyamoto et al., 2009).

La sumoilación de NEMO constituye un ejemplo de cooperación entre sumoilación y ubiquitinación (Ulrich et al., 2005). La proteína NEMO se sumoila en K277 y K309 lo que retiene a la proteína en el núcleo donde se fosforila por la quinasa ATM (Huang et al., 2003). Esta fosforilación es necesaria para que la proteína se ubiquitine y pueda translocarse al citoplasma para unirse a IKK formando un complejo activo. La ubiquitinación se produce en los mismos residuos en los que se sumoila (K277 y K309). Por ello se piensa que en la secuencia de modificaciones es necesaria la desumoilación antes de la poliubiquitinación (Huang et al., 2003). Sin embargo se desconoce el mecanismo de cooperación entre la sumoilación, desumoilación y ubiquitinación de NEMO.

A pesar de estas evidencias, el papel de PIASy en la regulación de NF-κB todavía es objeto de debate. Aunque se ha descrito que ejerce como activador de NF-κB en respuesta a estrés genotóxico, otros grupos han observado que en respuesta a citoquinas proinflamatorias como TNF-α e IL-1β, PIASy interacciona e inhibe directamente a NF-κB/p65 (Tahk et al., 2007) (Figura 15).

Recientemente se ha propuesto que las proteínas PIAS ejercen como inhibidoras o activadoras de la transcripción de un mismo grupo de genes en función de la citoquina que inicia la señalización (Tahk et al., 2007).

Aunque por el momento se requieren más estudios para entender las bases moleculares de esta especificidad, la descripción de PIASy como

activador de NF- κ B en respuesta a estrés genotóxico e inhibidor de esta misma ruta en condiciones señalización por TNF- α refuerzan esta hipótesis.

En otro sentido, se ha demostrado que la regulación mediada por las proteínas PIAS de la transducción de la señal de citoquinas es un proceso complejo observándose que existe cooperación entre PIAS1 y PIASy para regular la ruta de NF- κ B y STAT1 en respuesta a TNF- α . En este contexto estudios realizados con modelos que no expresan PIASy o PIAS1 indican que, en respuesta a TNF- α , estas proteínas activan la transcripción mediada por NF- κ B de un grupo de genes diferentes (Tahk et al., 2007). Por ejemplo, en estas condiciones se ha observado que PIASy activa la expresión de Cxcl1 y no de otros genes que se activan en respuesta a TNF- α , como JunB, Nos2 o Mip2. Sin embargo PIAS1 favorece la expresión de Mip2 en estas mismas condiciones (Tahk et al., 2007) y se cree que debe de existir cooperación con otros miembros de la familia PIAS que posiblemente regulan a otros subgrupos de genes diferentes en respuesta a una misma citoquina.

Este fenómeno ocurre también en la regulación de los factores STAT y sugiere que la actividad específica de los diferentes miembros de la familia PIAS depende del entorno químico del promotor de los genes regulados. De modo que los genes inducidos por citoquinas pueden ser regulados en subgrupos (Shuai et al., 2006).

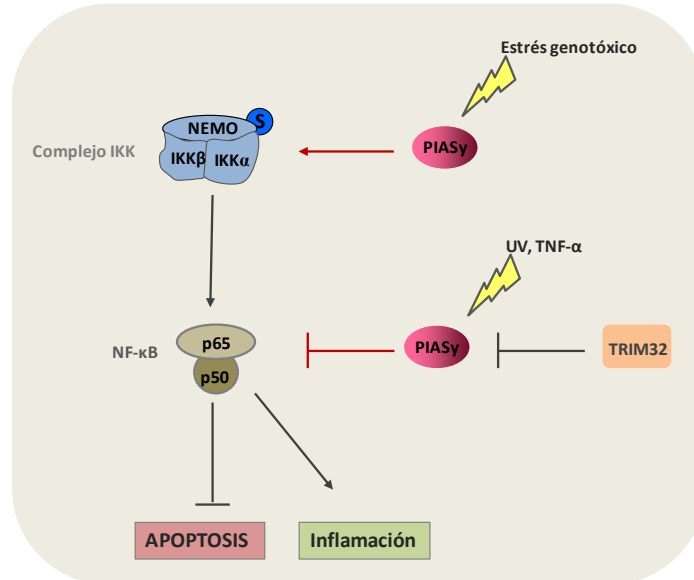


Figura 15: Esquema del efecto de PIASy en la ruta de señalización NF-κB (p65) en respuesta a diferentes estímulos.

B) Señalización JAK-STAT.

La familia STAT (*Signal Transducer Activator of Transcription*) consta de siete miembros, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6. Los factores STAT son activados por citoquinas y factores de crecimiento, incluyendo IL-2,3,4,5,6,7,10,12, GM-CSF,EPO, prolactina, hormona de crecimiento, EGF, PDGF, IFN α , β , γ u hormonas como la leptina.

La cascada de activación de estos factores se inicia cuando las citoquinas son reconocidas por sus receptores en la superficie celular. La unión de las citoquinas al receptor inicia la dimerización y activación de JAK (Janus Kinase), las tirosina quinasas asociadas con el receptor.

Existen cuatro miembros de esta familia de tirosina quinasas, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 (*tyrosine kinase-2*). Estas quinasas fosforilan residuos de

Introducción

tirosinas específicos en los receptores, iniciando el reclutamiento de unos factores de transcripción latentes en el citoplasma, denominados STAT.

Las proteínas JAK activas fosforilan a los factores de transcripción STAT, lo que induce a la formación de homo o heterodímeros por medio de la interacción entre un dominio conservado (SH2), lo que activa su translocación al núcleo donde activan la transcripción de un amplio rango de genes (Figura 16).

Además de los componentes principales de la vía JAK/STAT, en esta ruta de señalización participan otras proteínas adaptadoras. Hasta el momento se conocen tres familias de adaptadores de la ruta JAK/STAT: (i) Las proteínas STAMs (*signal-transducing adapter molecules*) que facilitan la transcripción de genes específicos como Myc; (ii) Las proteínas STAPTIP, que pueden asociarse con las proteínas JAKs y STAT no fosforiladas, que posiblemente sirven de andamiaje para que JAK fosforile a STAT; (iii) La familia SH2B/Lnk/APS que son sustratos de las proteínas JAK.

La ruta JAK/STAT está regulada a distintos niveles y se conocen tres mecanismos de regulación negativa de estas proteínas (Figura 16):

- i. El primer mecanismo está mediado por las proteínas SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) que inhiben la actividad tirosina quinasa de las proteínas JAK. La expresión de estas proteínas se induce por la ruta JAK/STAT, ejerciendo un feed-back negativo.
- ii. La señalización STAT también puede ser regulada negativamente por fosfatasa de tirosinas, PTPasas, inactivando a JAK o STAT. Por ejemplo la proteína fosfatasa de tirosinas TC45 es responsable de la desfosforilación de STAT1 en el núcleo.
- iii. Por último las proteínas PIAS son capaces de inhibir la actividad transcripcional de los factores STAT.

Se ha demostrado que cada miembro de la familia PIAS puede interactuar *in vivo* con un miembro de la familia STAT. Por ejemplo PIAS1,

PIAS3 y PIASx interaccionan con STAT1, STAT3 y STAT4, respectivamente y PIASy interacciona con STAT1.

Además, la interacción entre las proteínas PIAS y STAT requiere la estimulación por citoquinas y sólo interaccionan cuando las proteínas STAT se encuentran en forma dimérica y activa.

Se ha observado que cada miembro de la familia PIAS regula la actividad de la proteína STAT con la que interacciona, por un mecanismo diferente. PIAS1 y PIAS3 funcionan bloqueando la unión a ADN de STAT1 y STAT3 respectivamente. Sin embargo PIASy y PIASx reprimen la actividad transcripcional de STAT1 y STAT4 respectivamente, reclutando correpresores como HDACs.

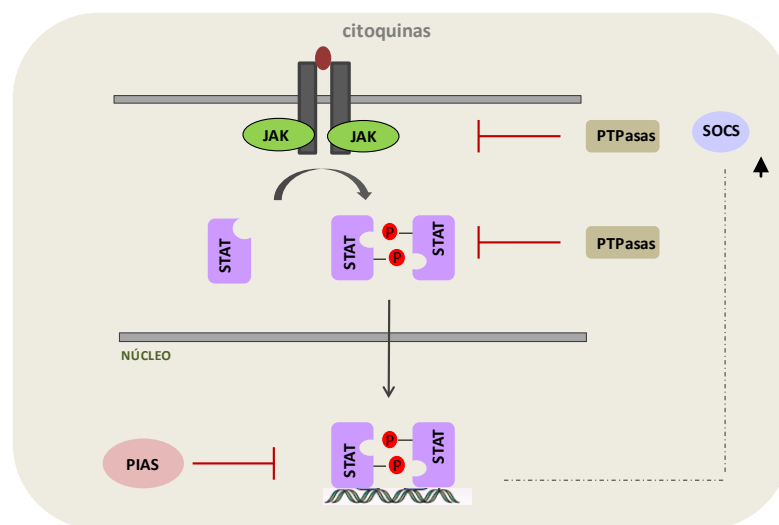


Figura 16: Esquema de la ruta de señalización JAK/STAT y los diferentes mecanismos de regulación negativa de esta ruta.

Introducción

Se han realizado un amplio número de estudios genéticos para estudiar el papel de las proteínas PIAS en la regulación de los factores de transcripción STAT, siendo la actividad de PIAS1 sobre STAT1 la más estudiada por el momento.

Estudios de PCR cuantitativa en macrófagos derivados de medula ósea (BMDMs) y en cultivo primario de fibroblastos de embriones (MEFs) de ratones *Pias1*^{-/-}, han revelado un aumento de actividad transcripcional STAT1 en respuesta a IFN- β o IFN- γ . Pero lo más interesante de estos experimentos es que la eliminación de PIAS1 afecta sólo a un grupo de genes estimulados por IFN γ no a todos.

Estas observaciones refuerzan la hipótesis (descrita en el apartado 2.6 a) que sostiene que las proteínas PIAS regulan la expresión de genes inducidos por citoquinas en subgrupos, existiendo una cooperación entre los diferentes miembros de la familia PIAS.

Para entender las bases moleculares de la especificidad de las proteínas PIAS en la regulación de la actividad de los factores de transcripción STAT, se han realizado ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). En ese trabajo se ha observado que PIAS1 se une a los promotores de sólo un subgrupo discreto de genes inducidos por STAT1 y no otros dependiendo del microambiente químico en estos promotores (Liu et al., 2004).

Del mismo modo que para la ruta de NF- κ B, se ha observado que existe cooperación entre PIAS1 y PIASy en la regulación de la actividad transcripcional de STAT1, siendo imprescindible la presencia de PIASy en células en las que no se expresa PIAS1, como las células dendríticas. Además, en estas mismas células se ha observado que la actividad de los factores de transcripción STAT o NF- κ B no está afectada cuando se silencia PIASy. Este efecto puede ser debido a la presencia de otros miembros de la familia PIAS que ejercen una función redundante, por lo que es necesario el silenciamiento de más de un miembro PIAS para eliminar por completa la actividad de estas proteínas.

En resumen, las proteínas PIAS participan en la regulación de los factores de transcripción inducidos por citoquinas, STAT y NF- κ B,

posiblemente de forma cooperativa entre varios miembros de esta familia. De modo que los genes inducidos por cada uno de estos factores de transcripción se regularían en subgrupos y cada miembro PIAS participaría en la regulación de unos determinados genes u otros.

En este contexto, la ruta de señalización JAK2/STAT3 mediada por leptina, es de amplio interés para el presente trabajo, debido a que existen evidencias de una posible implicación de laforina en la regulación de la señal de leptina.

La vía JAK2/STAT3 se activa por diferentes estímulos por ejemplo, GH (hormona de crecimiento), Epo (Eritropoietina), Tpo (Trombopoietina), leptina, IL6 (interleuquina 6) y estrés oxidativo (Gorina et al., 2005 ; Planas et al., 2006).

Recientemente se ha observado que ratones *Epm2a*^{-/-} presentan una mayor ingesta de comida y ganancia de peso corporal (Vernia et al.), que puede ser debido a un desajuste en la regulación de la señal de leptina, debida a la ausencia de laforina en el hipotálamo (hipótesis analizada en el apartado “Resultados II”).

3. Funciones fisiológicas de la leptina

3.1 La leptina y sus receptores.

La leptina es una hormona de 167 aminoácidos que contiene un motivo de cuatro hélices similar al de las citoquinas (Zhang et al., 1997). Se produce mayoritariamente en tejido adiposo, pero se expresa en una gran variedad de tejidos como en placenta, ovarios, epitelio mamario, médula ósea (Margetic et al., 2002) y tejido linfoide (Matarese et al., 2005; Dardeno et al., 2010).

El patrón de secreción de leptina es pulsátil y sigue los ritmos circadianos, detectándose altos niveles entre la medianoche y por la mañana temprano y más bajos a medio día y por la tarde (Blüher and

Introducción

Mantzoros, 2009; Dardeno et al., 2010.; Licinio et al., 1997; Sinha et al., 1996).

Los niveles de leptina circulante son directamente proporcionales a la cantidad de grasa corporal y fluctúan con los cambios en la ingesta de calorías (Boden et al., 1996; Chan et al., 2003b), siendo un sistema sensible a la privación energética (Dardeno et al., 2010). Las mujeres presentan niveles más altos de leptina que los hombres, aunque estos niveles disminuyen durante la menopausia. Esta diferencia entre hombres y mujeres se debe a las diferencias en hormonas sexuales así como a la diferente distribución de la grasa corporal, ya que se ha observado que la grasa subcutánea (mayoritaria en mujeres) expresa mayores niveles de mRNA de leptina (Kiess et al., 2008; Saad et al., 1997).

La leptina ejerce sus efectos metabólicos mediante la unión a sus receptores específicos que se localizan en el sistema nervioso central (SNC) y en tejidos periféricos, presentando un amplio rango de acción.

Se conocen al menos seis variaciones de estos receptores (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe y ObRf). La estructura de estos receptores es similar a la de los receptores de citoquinas y están compuestos por una región extracelular a la que se unirá la leptina (aunque se desconoce la estequiometría de unión de la leptina a sus receptores), una región transmembrana, a excepción de la forma soluble ObRe, y por último un dominio intracelular de unión a JAK (Figura 17).

Las diferentes isoformas difieren en los dominios intracelulares que varían en tamaño y secuencia debido al fenómeno de *splicing* alternativo (Tartaglia, 1997; Lee et al., 1996; Fei et al., 1997), distinguiéndose dos tipos de receptores, las formas cortas (ObRa, ObRc, ObRd, y ObRf) cuyo dominio intracelular presenta un tamaño de 34 aminoácidos, y las formas largas del receptor (ObRb), que contienen un dominio intracelular de 303 aminoácidos.

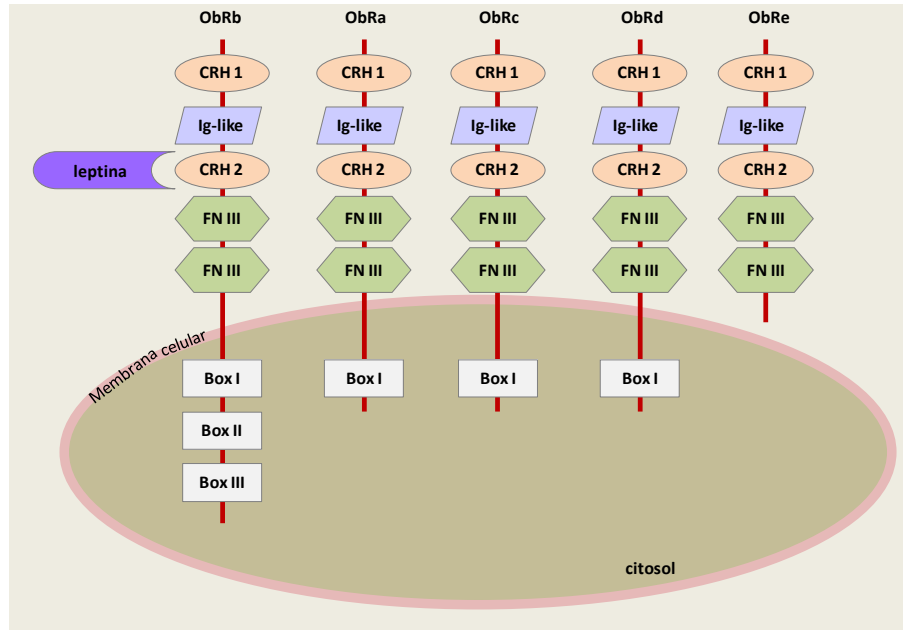


Figura 17: Esquema de la estructura de las diferentes isoformas del receptor de leptina. ObRb contiene el dominio intracelular más largo, ObRa, ObRc y ObRd contienen un dominio intracelular corto, por lo que se denominan isoformas cortas. Por último ObRe es la isoforma soluble y no presenta dominio transmembrana. El sitio de unión a leptina es el módulo CHR y todas las isoformas contienen dos de estos dominios, aunque sólo el dominio CHR-2 parece tener capacidad para unir leptina. El dominio Ig-like (*immunoglobulin-like fold*) y FN-III (*fibronectin type III domain*) son críticos para la activación del receptor. Adaptado de (Bernotiene et al., 2006).

Las formas cortas median la acción de la leptina en tejidos periféricos y se expresan mayoritariamente en pulmón, riñón, hígado, páncreas, corteza adrenal, ovarios, testículos, músculo esquelético, células hematopoyéticas, tejido adiposo y tracto gastrointestinal. En cambio, la forma larga ObRb se

Introducción

expresa en cerebro, concretamente en los plexos coroideos y en regiones hipotalámicas como el núcleo arcuato, las regiones para-ventricular y ventro-medial, (Tartaglia, 1997; Lee et al., 1996), donde ejerce un papel regulador de la homeostasis de energía y una función neuroendocrina (Fei et al., 1997; Dardeno et al., 2010). También se expresa en el hipocampo, cerebelo, corteza cerebral y endotelio capilar.

Por tanto, la leptina secretada a la sangre por los adipocitos o por otras células puede: **a)** atravesar la barrera hematoencefálica y en el cerebro desencadenar mecanismos relacionados con la inhibición de la ingesta (pérdida del apetito), la activación del gasto energético (pérdida de grasa) y la regulación de diversos procesos metabólicos y funciones endocrinas, o **b)** unirse a sus receptores en diversos tejidos periféricos, participando en procesos como la angiogénesis, inmunidad, reproducción, absorción o respuesta inflamatoria entre otros (Figura 18).

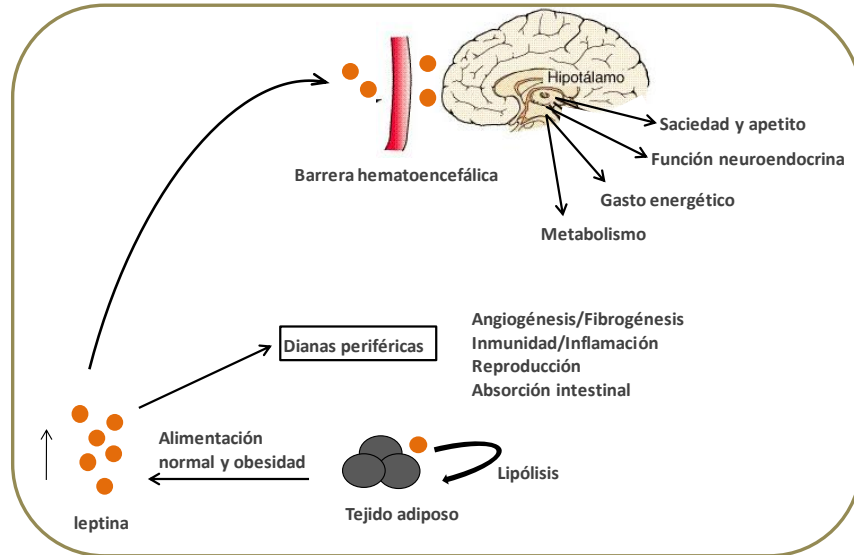


Figura 18: Esquema de las diferentes acciones fisiológicas de la leptina. La leptina es secretada por el tejido adiposo y otras células y puede unirse a sus receptores en tejidos periféricos o atravesar la barrera hematoencefálica, ejerciendo la mayoría de sus acciones en el hipotálamo.

3.2 Efecto de la leptina en el sistema nervioso central.

La unión de la leptina a su receptor ObRb activa diferentes vías de transducción de señales (Figura 19) con la finalidad de mantener la homeostasis energética. De todas ellas la ruta más estudiada es la de JAK2/STAT3, (Dardeno et al., 2010). La unión de la leptina inicia la dimerización del receptor y activación de JAK2 (quinasa asociada al receptor). La quinasa JAK2 activada fosforila al receptor de la leptina en dos sitios clave, Tyr985 y Tyr1138, que sirven como sitios de reclutamiento del factor de transcripción STAT3. JAK2 fosforila a STAT3, que dimeriza y entonces se transloca al núcleo iniciando la transcripción de genes específicos (Shuai et al., 2006).

Introducción

La activación de la ruta JAK2/STAT3 por leptina en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo induce la transcripción de proopiomelanocortina (POMC), un neuropeptido anorexigénico que suprime el apetito (Ernst et al., 2009). Además de estimular la acción de agentes anorexigénicos la leptina también inhibe la producción de los neuropeptidos orexigénicos AgRP (*agouti-related peptide*) y NPY (*neuropeptide Y*) cuya función es aumentar el apetito y reducir el gasto de energía (Bates et al., 2003; Hamrick et al., 2005).

Aunque se ha demostrado que la leptina activa la fosforilación de STAT3 en tejidos y células humanas *ex vivo e in vitro* (Kim et al., 2000) se desconocen los efectos *in vivo* de la leptina en humanos lo que podría ayudar a encontrar terapias para el tratamiento de la obesidad (Dardeno et al., 2010).

Además de activar la ruta JAK2/STAT3, la leptina también activa otras rutas en el sistema nervioso central como la ruta de la MAPK ERK1/2 (Figura 19) o la ruta de la PI3K que activa el metabolismo de la glucosa. En hipotálamo la leptina también ejerce un papel inhibitor del complejo AMPK y en consecuencia se produce una disminución de la oxidación de ácidos grasos (Figura 19).

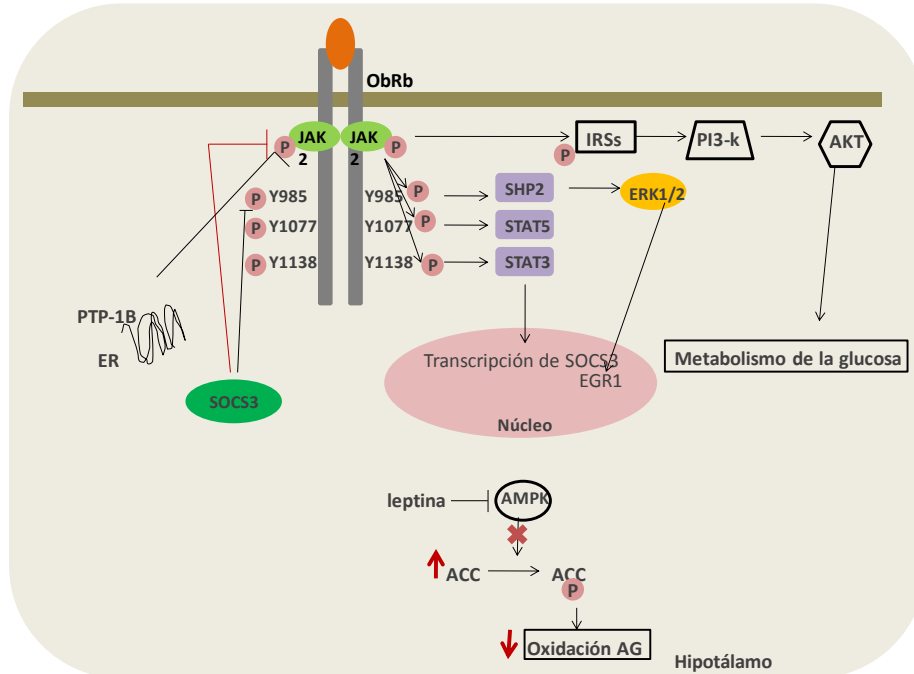


Figura 19: Esquema de las diferentes rutas moduladas por la activación del receptor de leptina en el hipotálamo. En respuesta a leptina se activan diferentes rutas en el hipotálamo, todas ellas con la finalidad de regular la ingesta de comida y gasto energético. Como se observa en el esquema, además de la ruta JAK2/STAT3, encargada de la estimulación de neuropeptidos anorexigénicos e inhibir neuropeptidos orexigénicos, se activan las rutas de la PI3K, que activa el metabolismo de la glucosa y la ruta de la MAP ERK1/2. La leptina en hipotálamo también inhibe al complejo AMPK

3.3 Función de la leptina en el control energético en tejidos periféricos.

La leptina contribuye al mantenimiento de la homeostasis energética activando diferentes rutas en el hipotálamo que regulan el apetito y el consumo de energía, pero también regula el metabolismo energético a nivel de tejidos periféricos.

En este sentido, diferentes estados deficientes de leptina, como lipodistrofia o la deficiencia completa de leptina, se han asociado a resistencia a insulina y diabetes. Se ha observado que la leptina estimula el metabolismo de la glucosa (Brennan and Mantzoros et al., 2006) y aumenta la sensibilidad a insulina, en primer lugar disminuyendo la masa grasa ectópica e intraabdominal (Moran et al., 2004). Por otra parte, estimula la activación por insulina de tejidos sensibles a la hormona incluyendo tejido adiposo y hepático (Kim et al., 2000). Además, la leptina activa diferentes vías de señalización implicadas en el metabolismo energético que solapan con la señalización de la insulina, como STAT3, la vía de las MAPK (ERK1/2), PI3K, (Kim et al., 2000) y AMPK, no solo en el hipotálamo sino también en otros tejidos.

La acción de la leptina en tejido periférico, en parte es debida a su efecto sobre AMPK que junto con p38 contribuyen al efecto final de la leptina en la oxidación de ácidos grasos y consumo de glucosa (Ahima, 2006; Lim et al.; Minokoshi et al., 2002).

En el hipotálamo la leptina inhibe a AMPK resultando en una disminución de la ingesta de comida y de la ganancia de peso (Figura 19) (Minokoshi et al., 2004; Morris and Rui, 2009). Sin embargo, en músculo esquelético el efecto es contrario y la leptina activa a AMPK que fosforila a ACC (*acetyl co-enzyme A carboxylase*) inactivándola, estimulándose la oxidación de ácidos grasos (Minokoshi et al., 2002; Steinberg et al., 2006) (Figura 20). La capacidad de la leptina para estimular la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético puede prevenir la lipotoxicidad y la resistencia a insulina.

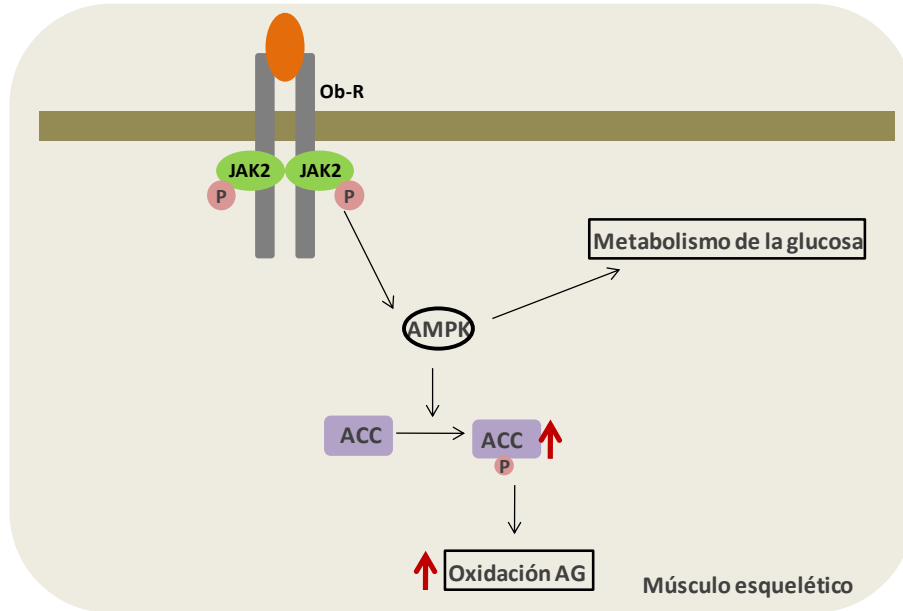


Figura 20: Efectos de la activación del receptor de leptina sobre AMPK en músculo esquelético. En músculo esquelético, a diferencia del efecto observado en el hipotálamo, la leptina activa a AMPK induciendo la oxidación de ácidos grasos.

En resumen, la leptina participa en el control del balance energético total y del peso corporal, inicialmente uniéndose a su receptor en el hipotálamo y promoviendo la activación de la ruta JAK2/STAT3 entre otras, así como controlando diferentes rutas metabólicas en tejidos periféricos, favoreciendo la oxidación de ácidos grasos por medio de la activación de AMPK, reduciendo la grasa ectópica, estimulando tejidos sensibles a insulina y favoreciendo la actividad de rutas glicolíticas.

3.4 Resistencia a la leptina como causa de obesidad.

Se ha observado que individuos obesos presentan elevados niveles de leptina y son resistentes al efecto de la leptina en el hipotálamo (Considine et al., 1996).

Inicialmente se asoció la resistencia a la leptina como consecuencia de mutaciones en el receptor de la leptina y otros síndromes monogénicos más raros, como mutaciones en el neuropeptido POMC. Sin embargo, la mayoría de los casos de obesidad en humanos se deben a fenómenos multifactoriales (Farooqi et al., 2007).

En primer lugar, se ha observado que el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica se encuentra dañado en individuos obesos, en parte debido a la saturación de los transportadores por hiperleptinemia e hipertrigliceridemia asociada con obesidad, que disminuye la actividad de los transportadores de leptina (Banks, 2001; Banks et al., 2002; Burguera et al., 2000). Además, el transportador soluble de la leptina ObRe también antagoniza el transporte de la leptina por inhibición de la superficie de unión y endocitosis de la leptina (Tu et al., 2008).

Por último, existen diferentes mecanismos de feedback negativo que regulan la señal de la leptina y están aumentados en individuos obesos, contribuyendo a la hiperleptinemia (Oswal and Yeo). Uno de los principales inhibidores de la señal de la leptina es SOCS3, cuya expresión se induce por JAK2/STAT3. SOCS3 actúa inhibiendo la fosforilación y activación de JAK2 y la fosforilación del receptor ObRb en el residuo Tyr985, (Myers et al., 2008) (Figura 19).

Existen otros mecanismos de feedback negativo, como la proteína PTP1B (*protein-tyrosine phosphatase 1B*) que inhibe la señal de leptina por desfosforilación de JAK2 (Dardeno et al., 2010). Todos estos mecanismos de regulación negativa se encuentran aumentados en individuos obesos contribuyendo a la resistencia a leptina (Dardeno et al., 2010).

Recientemente se ha descrito que el estrés de retículo endoplásmico (RE) participa en la resistencia a leptina. Se ha observado en modelos

animales y en humanos obesos y diabéticos la presencia de elevados niveles de marcadores de estrés de RE en el hígado, tejido adiposo y en células β -pancreáticas (Ozcan et al., 2004; Marchetti et al., 2007; Boden et al., 2008; Sharma et al., 2008).

El incremento de estrés de RE en ratones obesos inhibe al receptor de la leptina en el hipotálamo y el tratamiento con chaperonas químicas que disminuyen el estrés de RE aumenta la sensibilidad a la leptina (Ozcan et al., 2009). Además la administración intracerebroventricular de un inductor de estrés de RE, thapsigargina, resulta en un aumento de la ingesta de comida y de ganancia de peso corporal en estos ratones (Won et al., 2009). El efecto negativo del estrés de RE en la sensibilidad a leptina contribuye también a la resistencia a insulina (Dardeno et al. 2010). Todos estos resultados indican que el RE participa también en el fenómeno de resistencia a leptina, observado en individuos obesos.

4. AMPK.

AMPK es una quinasa de Ser/Thr de mamíferos que controla el metabolismo de la glucosa y de lípidos, e integra circuitos de señalización entre tejidos periféricos y el hipotálamo regulando la ingesta y el gasto energético de todo el organismo (Hardie and Sakamoto et al., 2006). Esta quinasa se activa en respuesta al aumento en la relación AMP: ATP por lo que actúa como el sensor energético de la célula.

4.1 Estructura de AMPK.

AMPK es un complejo heterotrimérico formado por una subunidad catalítica α ($\alpha 1$ ó $\alpha 2$) y dos subunidades reguladoras, β ($\beta 1$ ó $\beta 2$) y γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ ó $\gamma 3$) (Hardie et al., 2007). Cada isoforma está codificada por un gen diferente, y algunos de los mRNAs están sujetos a variantes de procesamiento "splicing" y la utilización de promotores alternativos. Además todas las isoformas pueden combinarse para formar el complejo

Introducción

heterotrimérico, existiendo así una enorme variedad de complejos de AMPK (Tabla 1 y Figura 20).

Aunque la quinasa de mamíferos es la mejor caracterizada a nivel bioquímico se han observado ortólogos de las tres subunidades en todas las especies de eucariotas cuyo genoma ha sido secuenciado (Hardie et al., 2004).

Subunidad α

Las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (con un 75% de identidad y un 84% de similitud de secuencia) contienen un dominio quinasa convencional de Ser/Thr protein quinasas en su extremo amino-terminal (N-terminal). La región carboxilo-terminal (*C-terminal*) contiene una secuencia autoinhibidora (AID, “*autoinhibitory domain*”) que reprime la actividad quinasa, (Pang et al., 2007). Esta secuencia presenta similitud de secuencia con los dominios de asociación a ubicuitinas que se encuentran en la misma posición en varios miembros de la familia relacionada con AMPK (Jaleel et al., 2006). El extremo C-terminal (CTD, “*carboxilo terminal domain*”) se requiere para la formación del complejo con las subunidades β y γ (Crute et al., 1998).

La isoforma $\alpha 2$ predomina en músculo esquelético, corazón e hígado, mientras que AMPK $\alpha 1$ se expresa de forma ubicua (Woods et al., 2000). Además, ambas isoformas difieren en su localización subcelular y en la especificidad del sustrato. Así, la isoforma $\alpha 2$ se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo mientras que la isoforma $\alpha 1$ se localiza principalmente en el citoplasma (Salt et al., 1998). Estas diferencias sugieren que $\alpha 1$ y $\alpha 2$ desarrollan funciones distintas (Schimmack et al., 2006).

En la subunidad α (AMPK α) reside el aminoácido conservado Thr172, que se encuentra en el lazo de activación característico de muchas quinasas, siendo su fosforilación necesaria para la activación de la enzima (Hawley et al., 1996).

Además del sitio de activación, la subunidad α de AMPK puede ser fosforilada por PKA en la Ser485 (α 1)/Ser491 (α 2) y existen evidencias de que esta fosforilación atenúa la actividad de AMPK, aunque no parece suficiente para inhibirla (Hurley et al., 2006). Recientemente se han descrito dos nuevos sitios de fosforilación por PKA en la subunidad α 1: la Ser173 y la Ser497 (Djouder et al. 2010) y existen evidencias de que esta fosforilación podría dificultar la activación de AMPK sugiriendo un nuevo mecanismo de regulación negativa mediada por PKA.

Tabla 1: Características de las diferentes isoformas de las subunidades que componen el complejo de AMPK.

Subunidad	Gen	Tamaño (aa)	Masa Molecular (KDa)
α 1	PRKAA1	550	63
α 2	PRKAA2	552	63
β 1	PRKAB1	270	38
β 2	PRKAB2	272	34
γ 1	PRKAG1	331	37
γ 2	PRKAG2	569	63
γ 3	PRKAG3	489	55

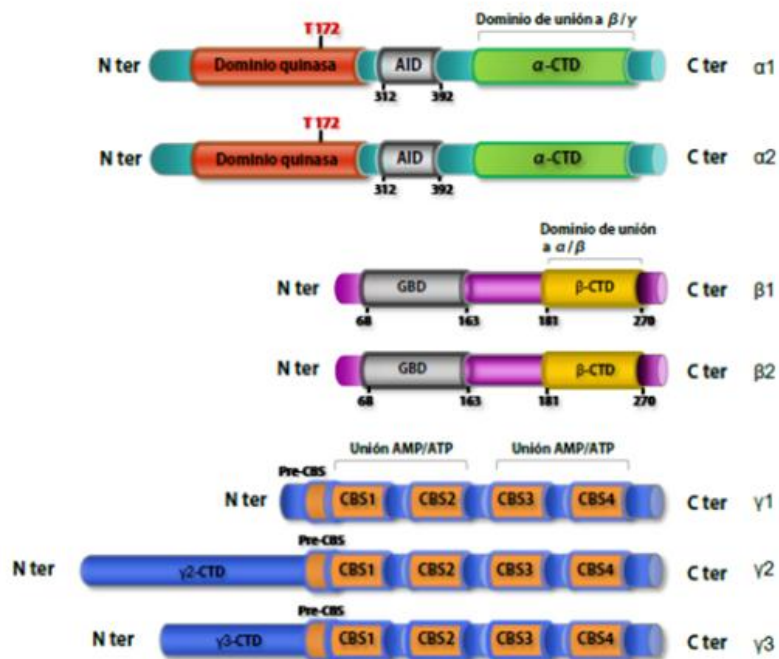


Figura 21. Esquema de los dominios de AMPK. A) Dominios característicos de las subunidades α , β y γ de AMPK. T172, sitio de activación por fosforilación de AMPK; AID, dominio autoinhibitorio; CTD, dominio C-terminal; GBD, dominio de unión a glucógeno; CBS, dominios de Bateman. Adaptado de (García-Haro et al., 2010).

Subunidad β

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"*). Algunos trabajos recientes indican que, en mamíferos, el dominio ASC (β -CTD; extremo C-ter de β) es suficiente para la formación del complejo con las subunidades α y γ , mientras que el

dominio KIS, no está implicado como previamente se postulaba en la interacción con las otras dos subunidades. En realidad es un dominio de unión a glucógeno (GBD, "*Glycogen-Binding Domain*") (Hudson et al., 2003). Estos dominios GBD no catalíticos se encuentran normalmente en enzimas que catalizan las ramificaciones $\alpha 1 \rightarrow 6$ de los poliglucosanos, como el glucógeno o el almidón (Hardie et al., 2004).

Las dos isoformas de β , $\beta 1$ y $\beta 2$, poseen un 70.3 % de identidad y un 81.7 % de similitud y ambas sufren miristoilación en la glicina 2. Esta modificación post-traducciona permite la localización de AMPK β en la membrana (Witczak et al., 2008) y su eliminación genera una distribución intracelular de AMPK β mucho más homogénea, así como un incremento de su actividad (Sanz et al., 2008). Asimismo, se ha descrito que ambas isoformas se fosforilan en los aminoácidos Ser108 y Ser182 y además la subunidad $\beta 1$ también es susceptible de fosforilarse en los aminoácidos Ser24 y Ser25 (Sanz et al., 2008; Witczak et al., 2008).

Ambas isoformas pueden encontrarse tanto en el núcleo como en el citoplasma, aunque la fosforilación de $\beta 1$ en la Ser24, Ser25 y Ser182 evita su presencia en el núcleo. Por otro lado, la fosforilación de la Ser108 incrementa la actividad de AMPK (Sanz et al., 2008). Se ha observado igualmente que, en distintas situaciones de estrés, las dos isoformas se translocan al núcleo.

Recientemente se ha descrito que el complejo laforina-malina ubicuitina a la subunidad β ($\beta 1$ y $\beta 2$) de AMPK, con cadenas de topología K63, no degradativas modificando su localización subcelular (Moreno et al., 2011).

Subunidad γ

La subunidad reguladora γ contiene un motivo de 4 repeticiones en tándem de un motivo denominado dominio CBS ("*Cystathionine β -Synthase*") (Bateman et al., 1997). Los veinticinco aminoácidos anteriores al primer dominio CBS, Pre-CBS, están implicados en la interacción con β y en la formación de un complejo AMPK activo y estable (Viana et al., 2007). La

estructura formada por dos motivos CBS en tándem (denominada dominio Bateman) es la unidad básica funcional. Por cada dos dominios CBS se une, de forma excluyente, una molécula de AMP o de ATP, (Scott et al., 2004), aunque esta última lo hace con una afinidad cinco veces menor (Kobe and Kemp et al., 1999).

4.2 Regulación de AMPK

4.2.1 Regulación alostérica de AMPK

AMPK se activa en respuesta a un aumento en la relación de AMP/ATP en la célula, pero se ha observado que la activación de este complejo es cinco veces mayor cuando se fosforila el residuo Thr172 de la subunidad catalítica α (Hawley et al., 1996).

Dicha fosforilación aumenta su actividad hasta doscientas veces (Hardie and Sakamoto, 2006), aunque la combinación del efecto alostérico del AMP y la fosforilación de la subunidad α tiene un efecto sinérgico, provocando un aumento de hasta 1000 veces en la actividad de la quinasa (Suter et al., 2006).

Además de la regulación alostérica, se han descrito dos posibles mecanismos por los que la unión del AMP podría activar a AMPK. El primero mediando la fosforilación y activación del residuo Thr172 (Hawley et al., 1995) y el segundo dificultando la acción de las fosfatasa que la desfosforilan e inactivan al complejo de AMPK (Davies et al., 1995).

4.2.2 Quinasas que fosforilan y activan a AMPK.

La identificación en *Saccharomyces cerevisiae* de tres quinasas capaces de fosforilar al ortólogo de AMPK en levaduras, SNF1, denominadas Pak1, Tos3 y Elm1, (Hong et al., 2003), permitió identificar en mamíferos a las quinasas que participan en la fosforilación de la Thr172 de AMPK α , LKB1 (Jenne et al., 1998; Woods et al., 2003a) y las proteínas quinasa quinasa

calcio/calmodulina-dependientes CaMKK α y CaMKK β (Hawley et al., 2005; Woods et al., 2005). Recientemente también se ha descrito que la quinasa TAK1 cumple esta función (Xie et al., 2006).

LKB1: es la principal quinasa que actúa sobre AMPK, sobre todo en músculo esquelético e hígado (Sanz et al., 2008). En mamíferos, LKB1 forma 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. Sólo cuando LKB1 forma parte de este complejo ternario está estabilizada y es capaz de activar a AMPK por fosforilación del residuo treonina 172 de la subunidad AMPK α . 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.

CaMKK: (*Ca²⁺/calmodulin-dependent Protein kinase kinase*) presenta dos isoformas con un 70% de homología de secuencia aminoacídica, CaMKK α y CaMKK β . Aunque se ha observado la expresión muscular de CaMKK α (Witczak et al., 2008), las CaMKK se expresan principalmente en tejido neuronal, y responden a incrementos en la concentración de Ca²⁺ intracelular tras la despolarización de la membrana para la conducción del impulso nervioso, que no altera la relación AMP/ATP. Se ha observado que el aumento de Ca²⁺ en células deficientes en LKB1 produce la activación de AMPK por fosforilación de la treonina 172, y que esta activación es impedida por inhibidores de las CaMKK como STO-609 y siRNA de CaMKK β (Sanz et al., 2008).

TAK1: (*transforming growth factor- β -activated kinase 1*) se activa por autofosforilación tras la unión de TAB1 (*TAK1-binding protein 1*) y es capaz de fosforilar AMPK α en la Thr172. En mamíferos, se expresa en varios tejidos incluido el músculo esquelético y es activada por citoquinas y

también por agentes químicos que aumentan la relación AMP/ATP. El tratamiento con citoquinas de células HeLa o la sobreexpresión de TAK1 y TAB1 induce la fosforilación de la treonina 172 de AMPK (Momcilovic et al., 2006).

Recientemente se ha descrito que el AMP no estimula la fosforilación de la Thr172 por parte de LKB1 (Witczak et al., 2008) o de CaMKK β . Estos resultados apoyan la hipótesis de que la activación de AMPK por fosforilación es debida, principalmente, a una disminución de la actividad de las fosfatasas que actúan sobre ella (Suter et al., 2006).

4.2.3. Fosfatasas que desfosforilan e inactivan a AMPK

Existen evidencias de que la presencia de AMP impide la desfosforilación de la Thr172 de AMPK (Sanders et al., 2007; Fogarty et al.2010). De modo que la desfosforilación e inactivación tendría lugar cuando los niveles de AMP volvieran a ser basales.

Los estudios sobre las fosfatasas posiblemente implicadas en la regulación de AMPK son menos numerosos y discrepan entre ellos, por lo que el tema es objeto de debate.

En este contexto se han identificado tres fosfatasas (todas ellas fosfatasas de Serinas y treoninas) capaces de desfosforilar el residuo Thr172 de AMPK α *in vitro*, PP2C, PP1 y PP2A (Woods et al., 2003b), pero se desconoce cuál de ellas tiene el papel más importante *in vivo*.

Mientras que algunos grupos defienden que es PP2C (Clark et al., 2004) en otros trabajos se ha observado que PP2A es la principal fosfatasa de AMPK, (Wu et al., 2007).

En este contexto, el tratamiento de hepatocitos primarios con diferentes inhibidores de fosfatasas y con el flavonoide naringina (antagonista del ácido okadaico) ha sugerido la existencia de dos mecanismos independientes de inactivación de AMPK. Uno dependiente de naringina, que estaría asociado a PP2A, y otro resistente a la naringina, asociado a la actividad de PP1 (Samari et al., 2005).

Por último, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio, se ha observado que la fosfatasa PP1 y una de sus subunidades reguladoras, R6, participan en la desfosforilación e inactivación del complejo AMPK inducida por glucosa en células β -pancreáticas (García-Haro et al.2011).

En resumen, parece que podrían existir distintos mecanismos de inhibición de AMPK por desfosforilación y dependiendo del tipo de señal y/o tejido, se activarían unas u otras fosfatasas que desfosforilarían a AMPK.

4.3 Situaciones que producen la activación de AMPK

AMPK es activada por diferentes situaciones de estrés metabólico 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). De modo que los venenos metabólicos que producen disminución de los niveles de ATP también son activadores de AMPK, como por ejemplo los 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.

Una situación fisiológica asociada a la activación de AMPK 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 la toma de glucosa (Kahn et al., 2005).

Por último, el estudio de la ruta de señalización mediada por AMPK es interesante en el tratamiento de la diabetes tipo 2, dado que AMPK se activa indirectamente por metformina y tiazolidinedionas, compuestos ampliamente usados en el tratamiento de este tipo de diabetes. Tanto la metformina como las tiazolidinedionas activan a AMPK. No obstante, mientras las tiazolidinedionas producen un aumento en la razón AMP: ATP celular, todavía es objeto de debate el mecanismo por el cual la metformina activa a AMPK.

En este sentido se ha observado que la activación de AMPK por metformina podría depender de la presencia de especies reactivas de nitrógeno (RNS: *reactive nitrogen species*), dado que la sobreexpresión de superóxido dismutasa y la inhibición de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS: *endothelial nitric- oxide synthase*) evitan la activación de AMPK por metformina (Sanz et al., 2008). Por otra parte, la fenformina (otra biguanida como la metformina) sí aumenta la relación AMP: ATP, y tiene un efecto mucho más rápido sobre AMPK (Witczak et al., 2008). Sin embargo, no es usada como antidiabético porque produce acidosis láctica.

4.4 Reconocimiento de proteínas dianas por AMPK

Las primeras proteínas diana de AMPK 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 22). 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 con AMPK. El motivo de reconocimiento por AMPK definido en estos estudios es *Hid-(Bas,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 and Carling et al., 1997) (Figura 22)

Acetil-CoA carboxilasa α de rata (Ser79)	HMRSSMSGLHLV
Acetil-CoA carboxilasa α de rata (Ser1200)	PTLNRMSFASNL
Acetil-CoA carboxilasa α de rata (Ser1215)	GMTHVASVSDVL
HMG-CoA reductasa de hámster chino (Ser871)	HMVHNRSKINLQ
Lipasa sensible a hormona de rata (Ser565)	SMRRSVSEAALA
Glucógeno sintasa muscular de rata (Ser7)	PLSRSLSMSLPL
Consenso:	XM \underline{R} XXS \underline{S} XXXL
	\underline{I} R \underline{X} \underline{T} \underline{M}
	\underline{L} \underline{K} \underline{I}
	\underline{F} \underline{H} \underline{F}
	\underline{V} \underline{V}

Figura 22: 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. Adaptado de (Hardie and Carling et al., 1997).

4.5 Efectos fisiológicos de la activación de AMPK.

Una vez que AMPK es activada, inhibe rutas anabólicas (biosintéticas) y otros procesos que consuman ATP (Figura 23), mientras que activa aquellas rutas catabólicas que generan ATP, todo ello con el objetivo de restablecer y mantener el balance energético celular. Estos efectos se alcanzan tanto por fosforilación rápida y directa de enzimas metabólicas como a través de efectos a largo plazo en la expresión de genes. Por todo ello, AMPK coordina, tanto a corto como a largo plazo, la activación de diversas enzimas y rutas metabólicas que controlan la toma, almacenamiento y utilización de glucosa y lípidos en músculo esquelético, corazón, tejido adiposo, hígado, células β pancreáticas y cerebro (Kahn et al., 2005).

AMPK también es responsable de regular la expresión de numerosos genes.

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) y genes 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 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 et al., 2001).

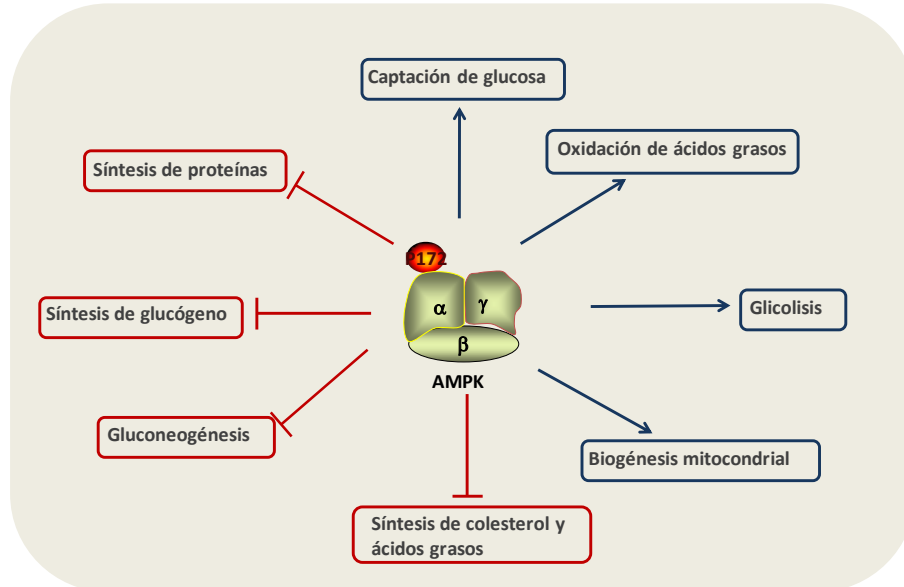


Figura 23: Esquema de los procesos clave en el metabolismo energético regulados por AMPK. Las flechas azules indican activación y las rojas inhibición.

4.6 AMPK y laforina en el metabolismo de 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 produce tras una ingesta de comida.

El glucógeno es muy abundante en músculo esquelético e hígado y es un polímero crucial para la homeostasis de glucosa. El glucógeno muscular se utiliza como fuente de glucosa-6-fosfato para generar ATP de manera rápida por glicolisis anaeróbica, mientras que el glucógeno hepático se utiliza como fuente de glucosa liberada al torrente sanguíneo para prevenir la hipoglucemia durante el ayuno (McBride and Hardie et al., 2009).

Introducción

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 glucógeno se inicia sobre la glicogenina (proteína que constituye el núcleo del polímero de glucógeno), 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 participa 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 ramificaciones α -1,6. 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 (McBride and Hardie et al., 2009).

Tradicionalmente, la glucógeno sintasa (GS) ha sido considerada como la enzima clave en el control de la activación de la síntesis de glucógeno.

La GS se activa por desfosforilación y se inactiva por fosforilación. Por tanto, la activación de la GS se produce por inactivación de las quinasas que la fosforilan y activación de las fosfatasas que la desfosforilan (Figura 24).

En este contexto AMPK es una de las quinasas que participa en la fosforilación e inactivación de la GS, inhibiendo la síntesis de glucógeno.

La proteína GS está sujeta a fosforilación en nueve o más residuos. Dos residuos (sitios 2 y 2a) están localizados cerca del extremo N-terminal y al menos siete residuos (sitios 3a-c, 4, 5, 1a-b) localizados en los 100 últimos residuos del extremo C-terminal.

Se ha observado que 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

de GS. Este fenómeno se denomina fosforilación jerárquica y también se ha demostrado que ocurre con los sitios del extremo N-terminal de la GS, donde la fosforilación mediada por AMPK y otras quinasas, es un prerrequisito para la fosforilación del sitio 2a por la caseína quinasa 1 (Nielsen and Wojtaszewski et al., 2004). Además diferentes estudios sugieren que AMPK puede fosforilar directamente el sitio 2a de la GS (uno de los sitios claves para la fosforilación e inactivación de esta enzima) (McBride and Hardie et al., 2009). Por tanto existe una participación directa de AMPK en la regulación de la síntesis de glucógeno.

La señalización por insulina provoca la fosforilación e inactivación de la quinasa GSK3 por Akt/PKB activando así la síntesis de glucógeno (Nelson and Alkon et al., 2005).

Al igual que la GS, la glucógeno fosforilasa (GP), encargada de la degradación de glucógeno, está regulada tanto por su unión a ligando como por fosforilación, y de forma alostérica por AMP.

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 et al., 2002).

La fosfatasa de serinas y treoninas de tipo 1 (PP1) es una proteína clave en la regulación hormonal del metabolismo del glucógeno, catalizando la desfosforilación de la glucógeno sintasa (GS), de la glucógeno fosforilasa (GP) y de la fosforilasa quinasa (GPK). Estas reacciones de desfosforilación promueven la síntesis neta de glucógeno activando la glucógeno sintasa e inhibiendo la fosforilasa (Fong et al., 2000) (Figura 24).

La proteína PP1 es dirigida a las partículas de glucógeno por asociación con una familia de proteínas reguladoras que incluyen PP1R3 o GM (*muscle glycogen targeting subunit*), PP1R4 o GI (*liver glycogen-targeting subunit*), PP1R5 o PTG (*protein-targeting-to-glycogen*) y PP1R6. Estas proteínas reguladoras difieren por su expresión en tejidos específicos y por su regulación por fosforilación y efectores alostéricos (Cohen et al., 2002).

Introducción

La subunidad β de AMPK contiene un dominio de unión a glucógeno o modulo de unión a carbohidratos (CBM), que permite que el complejo AMPK se una al glucógeno (Hudson et al., 2003; Polekhina et al., 2005). Se ha observado la presencia de este dominio CBM también en laforina, siendo la única fosfatasa dual conocida que presenta este dominio. Por tanto ambas proteínas pueden estar implicadas en procesos de regulación de la homeostasis de glucógeno.

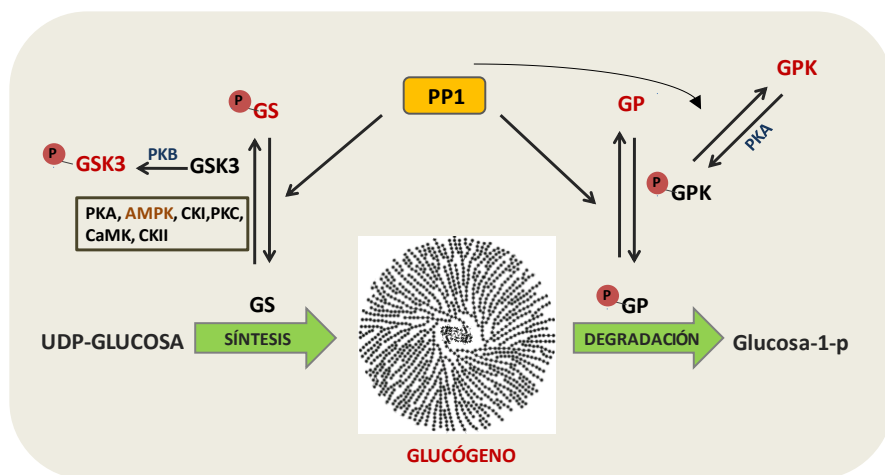


Figura 24. Representación esquemática de la síntesis y degradación de glucógeno.

Se han representado en rojo las enzimas en estado inactivo y en negro las formas activadas. AMPK participa en la fosforilación de la Glucógeno sintasa (GS) y por tanto en su inactivación, inhibiendo la síntesis de glucógeno. GP (glucógeno fosforilasa), PKB (proteína quinasa B), PKA (proteína quinasa A), GPK (glucógeno fosforilasa quinasa), GSK3 (glucógeno sintasa quinasa 3).

Recientemente se ha propuesto que laforina puede ser la fosfatasa encargada de eliminar los grupos fosfato que existen en el glucógeno (Tagliabracci et al.2011). Estos resultados coinciden con un trabajo previo

en el que se observó que los ratones knockout de laforina presentan un aumento de glucógeno hiperfosforilado en musculo esquelético (Tagliabracci et al., 2007). Reforzando esta hipótesis se piensa que el fosfato de la amilopectina en plantas puede ser eliminado por la proteína SEX4, un ortólogo de laforina en plantas (Gentry et al., 2009).

Sin embargo, otros trabajos han descrito que laforina puede actuar como una fosfatasa de GSK3 activándola, de modo que ésta fosforilaría e inactivaría a la GS inhibiéndose la síntesis de glucógeno. Esta hipótesis no ha sido demostrada en modelos animales que no expresan laforina (Lohi et al., 2005; Puri et al., 2009).

Ambas teorías implican la participación de laforina en la regulación de la homeostasis de glucógeno, no sólo por medio de su actividad fosfatasa sino también por su capacidad para dirigir a malina a sus sustratos y mediar la degradación de proteínas.

En este sentido, se ha observado que el complejo laforina-malina participa en la ubiquitinación y degradación de proteínas implicadas en el metabolismo del glucógeno, como la isoforma muscular de GS (mGS) o la enzima desramificante AGL/GDE (Cheng et al., 2007).

En este contexto, un trabajo realizado en nuestro laboratorio ha demostrado que una de las subunidades reguladoras de PP1, R5/PTG (*Glycogen Targeting subunit of PP1*), es un sustrato de degradación para el complejo laforina-malina, en células de hepatoma FTO2B (Solaz-Fuster et al., 2008). En este tipo celular, la actividad de R5/PTG sobre Ph y PhK es mayor que sobre GS. Más tarde se confirmó la participación de AMPK en la regulación negativa de R5/PTG. AMPK fosforila a R5/PTG en las Ser268 y Ser8. La fosforilación del residuo Ser8 acelera su degradación, dependiente de la ubiquitinación por el complejo laforina-malina (Vernia et al., 2009b) (Figura 25).

Estos resultados coinciden con otro trabajo realizado en paralelo en el que se describió que en neuronas (dónde se expresa la isoforma mGS pero no Ph ni PhK), el complejo laforina-malina media la degradación de R5/PTG

Introducción

con la finalidad de mantener silenciada la síntesis de glucógeno en este tipo celular (Vilchez et al., 2007).

Estas observaciones en conjunto sugieren un nuevo papel de AMPK en la homeostasis de glucógeno a través del complejo laforina-malina.

Recientemente se ha descrito que AMPK fosforila a laforina en la Ser25 (Roma-Mateo et al.2011). Esta fosforilación es necesaria para la correcta actividad fosfatasa de laforina, además de modular su propia dimerización así como la interacción entre laforina y malina. Por tanto, AMPK modula la formación del complejo laforina-malina (Roma-Mateo et al., 2011; Solaz-Fuster et al., 2008) y la regulación de este complejo es necesaria para el correcto funcionamiento de la síntesis de glucógeno.

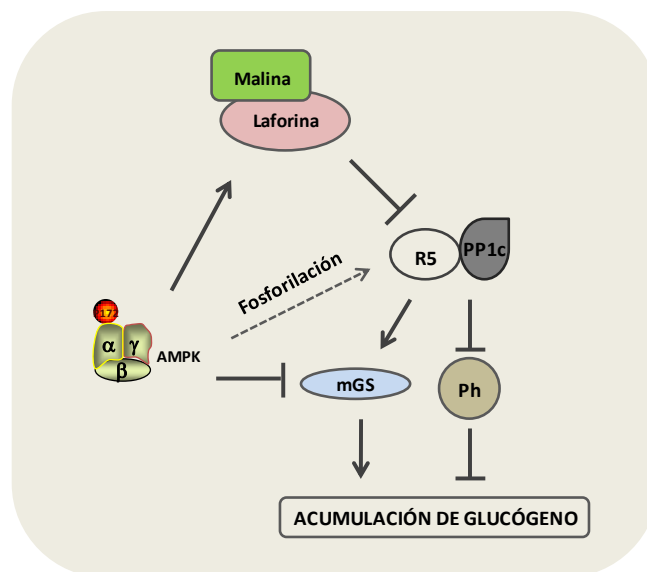


Figura 25: Esquema de la participación de AMPK, el complejo laforina-malina y R5/PTG en la regulación de la síntesis del glucógeno. PP1c corresponde a la subunidad catalítica de la fosfatasa, mGS isoforma muscular de la Glucogeno sintasa (muscle Glycogen Synthase), Ph Glucogéno fosforilasa. Adaptado de (Solaz-Fuster et al., 2008).

Estos estudios sugieren que el complejo laforina-malina, AMPK y R5/PTG podrían formar un macrocomplejo implicado en la regulación de la síntesis de glucógeno, en el que laforina podría estar desfosforilando al glucógeno y en colaboración con malina y AMPK participaría en la homeostasis de proteínas implicadas en esta ruta metabólica.

OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido el estudio de la posible implicación de PIASy en la regulación de proteínas implicadas en la enfermedad de Lafora.

Este objetivo general se subdivide en tres objetivos parciales:

I.- Confirmar y caracterizar la interacción entre PIASy y Laforina, y estudiar la importancia fisiológica de esta interacción.

Durante la realización de este trabajo se observó la actividad, independiente de PIASy, del complejo laforina-malina sobre la ruta dependiente de leptina, JAK2/STAT3, surgiendo un nuevo objetivo:

II.- Estudio de la participación del complejo laforina-malina en la señal de leptina

III.- Estudiar el papel de PIASy en la regulación de otras proteínas relacionadas con el complejo laforina-malina como AMPK.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Reactivos.

Ver Anexo 1.

2. Material Biológico y condiciones de crecimiento.

2.1 Bacterias.

Las cepas utilizadas en este trabajo han sido DH5 α y BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RIL (Stratagene), ambas de *Escherichia coli* (E.coli). La cepa DH5 α se utilizó para la clonación y amplificación de los plásmidos mientras que la cepa BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RIL para la expresión y posterior purificación de proteínas heterólogas. Esta última, además de un gen de resistencia al cloramfenicol, contiene copias extra de los genes argU, ileY y leu. Estos genes codifican tRNAs capaces de reconocer determinados codones (argU: AGA/AGG, ileY: AUA, leuW: CUA) que, en su defecto, podrían limitar la expresión de proteínas heterólogas en *E.coli*.

Las bacterias se crecieron en medio LB (peptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1% a pH a 7.5) a 37^o C en agitación. Las DH5 α transformadas se crecieron en LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina y en el caso de las BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RIL, además de la ampicilina se les añadió 33 μ g/ml de cloramfenicol.

Las bacterias competentes se transformaron por electroporación a 1700 V. Tras recuperarse durante 1 h en LB a 37 $^{\circ}$ C, fueron sembradas en placas de LB con los antibióticos necesarios para la selección de los plásmidos.

2.2 Levaduras.

Las cepas de levadura utilizadas fueron:

- **TAT7:** MATa *ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80 LYS2::LexAop-HIS3, URA3::LexAop-lacZ*, cedida por R. Sternglanz (State University of New York, Stony Brook, USA).

Material y Métodos

- **CTY10.5d:** *MATa ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80 URA3:: LexAop-lacZ*, cedida por R. Sternglanz (State University of New York, Stony Brook, USA).

Los cultivos de levadura se crecieron en medio rico YPD (peptona 2%, extracto de levadura 1% y glucosa 2% pH 6) ó en medio sintético completo (SC) a 30° C en agitación. El medio SC contiene YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco™) al 0.67% y una mezcla de aminoácidos al 0.095%. Con el fin de mantener la selección de los plásmidos, el medio no contenía alguno de estos aminoácidos leucina, triptófano, histidina ó uracilo (Sanz et al., 2000).

La transformación de levadura se realizó por el método de acetato de litio (Ito et al., 1983). Para ello, las levaduras se crecieron en YPD 2% glucosa hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de entre 0.4 - 0.8 y se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min. Tras dos lavados con tampón TE-LiAc (acetato de litio 0.1 M pH 7.5, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), se resuspendieron en un volumen 1/100 del cultivo inicial con el mismo tampón TE-LiAc indicado antes. A 50 µl de esta suspensión celular se le añadieron 2 µl de DNA de esperma de salmón 100 mg/ml desnaturalizado (SIGMA), 3-5µl de cada uno de los plásmidos y 300 µl de PEG-TE-LiAc (TE-LiAc con PEG al 40 %). Tras incubar las células a 30° C durante 30 min las células fueron sometidas a un choque térmico de 5 min a 42° C en presencia de DMSO al 10%. Tras dos lavados con agua estéril se sembraron las células en placas de SC sin los aminoácidos correspondientes a los plásmidos a seleccionar. Las células se dejaron crecer durante 3 días en una estufa a 30° C.

2.3 Cultivos celulares de mamíferos.

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 de CO₂ (5%) y en atmósfera húmeda. Los pases necesarios para el mantenimiento de los cultivos celulares se han realizado mediante tripsinización con Tripsina-EDTA.

Para conservar durante largo tiempo las células, éstas se resuspendieron en un 50% (v/v) del correspondiente medio de cultivo completado con un 40% de suero fetal bovino inactivado (FBS) y 10% (v/v) de DMSO y se pasaron a un criotubo donde se congelaron a -80° C. Posteriormente se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido.

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

- **HEK293:** Células de riñón humano embrionario. Fueron cedidas por la Dra. Marta Casado (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC).
- **HeLa:** Línea de células epiteliales humanas inmortalizadas procedentes de un carcinoma cervical. Fueron cedidas por el Dr. Vicente Andrés (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC).
- **COS7:** Células procedentes de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Fueron cedidas por la Dra. Marta Casado (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC).

Todas ellas se crecieron en placas de 60 (p60) o 100 mm (p100) en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) completo, conteniendo 4,5 g/L de glucosa, 10% (v/v) de FBS inactivado y suplementado con glutamina 2 mM, 100 µ/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina.

- **CHO:** Células de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*). 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

Material y Métodos

μg /mL de estreptomina y glutamina 2 mM, además de con Hepes 10 mM y 10% (v/v) de FBS inactivado.

- **SH-SY5Y:** Células de neuroblastoma humano. La línea original, denominada SK-N-SH, procedía de una biopsia de médula ósea de un neuroblastoma metastásico de una mujer de cuarenta años de edad y fue subclonado tres veces con el fin de seleccionar las células que expresaban un determinado fenotipo.

Fueron cedidas por el Dr. Domingo Barentino (Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV) CSIC).

Esta línea celular se creció en medio DMEM F12 (*Dulbecco's modified Eagle's medium Nutrient Mixture F-12*, Lonza bioscience) completo y 15% (v/v) de FBS inactivado.

En todos los casos las células fueron sembradas a razón de $1 \cdot 10^6$ de células en placas p60 (60mm) y $3 \cdot 10^6$ en p100 (100mm), ó en placas de 24 pocillos a razón de 150.000 células/pocillo y crecidas durante 24 h antes de la transfección con LIPOFECTAMINA 2000TM. Se utilizó una mezcla de 1 μg /p60 y 3 μg /p100 de DNA con 2 μl /p60 y 6 μl /p60 de LIPOFECTAMINA 2000TM, siguiendo las instrucciones del proveedor. La mezcla de transfección se dejó actuar durante 3,5 h. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de transfección y se crecieron las células durante 24 h más en DMEM completo. Transcurrido este tiempo se lisaron las células en tampón de lisis [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM EDTA, 0.6M de sacarosa, 50 mM NaF, 5 mM $\text{Na}_2 \text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 0,5% de NP40, 1 μM de microcistina y 1 mM de ortovanadato e inhibidores de proteasas]. Los lisados se retiraron con un rascador y se homogeneizaron con una jeringuilla de 0.5 x16 mm (volumen, 1 mL).

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Dc Protein Assay, Bio-Rad).

2.3.1 Tratamientos realizados en células de mamífero:

Cicloheximida: Para los ensayos con cicloheximida, 24 h después de la transfección se incubaron las células con 100 μ M de cicloheximida (SIGMA) y se congelaron las placas correspondientes a los distintos tiempos de incubación. La obtención de los extractos celulares se realizó como se ha descrito anteriormente y se analizaron las proteínas por *western blot*.

MG132: Inhibidor del proteasoma. 24 h después de la transfección se cambió el medio a cada placa y se añadió el mismo medio de crecimiento conteniendo 25 μ M de MG132. Por último se congelaron las placas 8 h después de iniciar el tratamiento.

Fenformina: Activador de AMPK. 24 h después de la transfección se cambió el medio a cada placa, se añadió el mismo medio de crecimiento conteniendo 5 mM de fenformina y después de 1 h se congelaron las placas.

3. Vectores de expresión y construcciones.

3.1 Vectores de expresión y construcciones de levadura.

pACT2 (GAD)-Piasy fue cedido por el Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba (Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid CIB-CSIC).

Otros plásmidos que se han usado en este trabajo han sido; **pBTM116-AMPK α 2**, **pBTM116-AMPK β 2**, **pEG202-AMPK γ 1** (Gimeno-Alcaniz and Sanz et al., 2003) **pEG202-laforina** (BamHI/SalI de pGBT9-laforina), y **pBTM-Malina** (SmaI/BamHI pGBT9-malina) fueron subclonadas previamente en nuestro laboratorio.

3.2 Vectores de expresión y construcciones para bacterias.

El plásmido **pPROEXHB-PIASy** fue subclonado a partir de la construcción pACT2-Piasy, por digestión con EcoRI/XhoI.

pGEX6P1-PIASy fue subclonado a partir de pPROEXHB-PIASy con BamHI/XhoI y el mutante fosfomimético **pGEX6P1-PIASyS71A** se subclonó a partir de **pCMV-myc PIASy S71A** por digestión con Sall/XhoI.

3.3 Vectores de expresión y construcciones en células de mamífero.

La región codificante de TRIM32 fue amplificada por PCR a partir de DNA genómico humano usando los siguientes oligonucleótidos:

TRIM32_{for} 5´-CCCGGATCCCAATGGCTGCAGCAGCAGCTTC -3´

TRIM32_{rev} 5´-CCCCTATGGGGTGGGAATATCTTCTCAG-3´

El amplificado se clonó en pGEMT-easy y posteriormente fue subclonado, EcoRI/EcoRI en EcoRI de pFlag CMV6c (**pFLAG-TRIM32**).

pFLAG-PIASy fue cedido por el Dr. Santiago Rodriguez de Cordoba (Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid CIB-CSIC).

Las proteínas de fusión, **pCMV-HA** y **pCMV-myc Piasy** fueron subclonadas a partir de pACT2-PIASy por digestión con EcoRI/XhoI.

pCMV-HA-8His-Piasy se obtuvo a partir de la construcción pCMV-HA-Piasy, digiriendo con Accl y posterior tratamiento con polimerasa Klenow, hibridación con oligonucleótidos específicos que introducen un epítipo de 8x His y un sitio de restricción Sfil, el cual fue utilizado para clonar Piasy en el nuevo vector.

Los mutantes fosfomiméticos de Piasy **pCMV-myc PIASy S71A/ S71D** se obtuvieron por mutagénesis dirigida, a partir de pCMV-myc-Piasy, empleando los oligonucleótidos:

S71Afor 5´-ACCCGCTACGCCAAGAAGAAC**GCG**GAGCCTGCCCCACAGCCGCAC-3´

S71Arev 5´-GTGCGGCTGTGGGGCAGGCTC**CGC**GTTCTTCTTGGCGTAGCGGGT-3´

S71Dfor 5´-ACCCGCTACGCCAAGAAGAAC**GAC**GAGCCTGCCCCACAGCCGCAC-3´

S71Drev 5´-GTGCGGCTGTGGGGCAGGCTC**GTC**GTTCTTCTTGGCGTAGCGGGT-3´

La construcción que contiene PIASy catalíticamente inactivo (C342/347A), (**pCDNA3-6myc-PIASyCI**), fue cedido por Shigeki Miyamoto (*Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University*). Se clonó en pUC18 a partir de la construcción pCDNA3-6myc-PIASy CI (EcoRI/XbaI) y posteriormente se subclonó en pFLAG CMV6a (SIGMA) (EcoRI/SalI) para dar, **pFLAG CMV6a-PIASy CI**.

Los plásmidos **pCDNA3-6his-SUMO1/2/3** fueron cedidos por el Dr. RT.Hay (College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, Scotland, UK).

El plásmido **pBSK-ubiquitinas** fue cedido por la Dra. Carmen Aguado (Centro de investigaciones Principe Felipe de Valencia).

Los plásmidos empleados para los ensayos de luciferasa [**pRenilla**, **pNF-κB-luciferasa** (5x UAS p_{NF-κB}-luciferasa)], fueron cedidos por la Dra. Marta Casado del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV CSIC). **pSOCS3-luciferasa** fue cedido por el Dr.J Barclay (The school of Biomedical Sciences, University of Queensland, Queensland, Australia).

El plásmido que expresa la forma larga del receptor de leptina **pObRb** fue cedido por el Dr. J. Friedman (Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY, USA).

pBP-p53 fue cedido por el Dr. Ignacio Perez-Roger (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, escuela de ciencias de la salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Moncada, Valencia, Spain).

Material y Métodos

Los mutantes **pCMV-myc AMPK β 2 K71R/ K167R/K262R** se obtuvieron por el método de PCR de círculo rodante a partir de la construcción pCMV-myc AMPK β 2 y con los oligos:

K71Rfor 5'-CAGGATTTGGAGGACTCCGTAAGGCCACACAGCAGGCCCGGCC-3'

K71Rrev 5'-GGGCCGGGCCTGCTGTGTGGGCCTTACGGAGTCCTCCAAATCCTG-3'

K167Rfor 5'-TTTGAGGTGTTTCGATGCTTTAAGGTTAGATTCTATGGAAAGTTCT-3'

K167Rrev 5'-AGAACTTCCATAGAATCTAACCTTAAAGCATCGAACACCTCAAA-3'

K262Rfor 5'-GCAACCCATCGCTACAAGAAGAGGTATGTTACTACTCTGCTATAC-3'

K262Rrev 5'-GTATAGCAGAGTAGTAACATACCTCTTCTTGTAGCGATGGGTTGC-3'

4. Análisis de proteínas por *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 hirvieron durante 3 min. La electroforesis se realizó en un sistema *mini-protean Electrophoresis System* (Bio-Rad) a una resistencia constante de 15-20 miliamperios 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 Membranes*, Millipore) durante una hora (para geles de 0,75 mm de grosor) o 90 min (para geles de 1,5 mm de grosor) a una diferencia de potencial de 100 voltios en tampón compuesto por glicina 0,1 M, Tris 12,5 mM, metanol 20% (v/v).

El bloqueo de la membrana se hizo con 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. La inmunodetección se hizo incubando las membranas con el correspondiente anticuerpo primario (tabla 2) durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados con TBS-T de 10 min cada uno, las membranas se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado a HRP durante 1 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados más con TBS-T, las membranas se revelaron con ECL o ECL plus (GE Healthcare) y se procesaron con un equipo de Fuji LAS 3000 (Fujifilm).

Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas analizadas por *Western blot*. Se ha especificado la procedencia, la dilución de uso, el tipo de anticuerpo y el anticuerpo secundario que necesitan.

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Tipo	Anticuerpo Secundario
Anticuerpos primarios				
Anti-AMPKα	Cell Signaling	1:1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-AMPKα pThr172	Cell Signaling	1:1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-ACCpSer79	Cell Signaling	1:1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-ACC	Cell Signaling	1:1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-AMPKpanβ	Cell Signaling	1:1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-HA	Roche	1:5000	monoclonal	Anti-ratón
Anti-Laforina A7	Santiago Rodriguez	1:1000	monoclonal	Anti-ratón
Anti-myc	SIGMA	1:10000	monoclonal	Anti-ratón
Anti-p53	Exbio	1:6000	Monoclonal	Anti-ratón

Material y Métodos

Anti-Tubulina	Santa Cruz	1:3000	Monoclonal	Anti-ratón
Anti-PIASy	Abcam	1/1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-Actina	SIGMA	1/3000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-Bip/grp78	Cell Signaling	1/1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-Flag	SIGMA	IP: 1/500 WB:1/2000	Monoclonal	Anti-ratón
Anti-CHOP/GADD 153	Santa Cruz	1/1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-ObRb pTyr985	R.D System	1/1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-Jak2 total	Cell Signaling	1/1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-Jak2 pTyr1007- pTyr1008	Santa cruz	1/1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-IKβ	Santa cruz	1/1000	Policlonal	Anti-conejo
Anti-STAT3 total	Cell Signalling	1/1000		Anti-conejo
Anti-STAT3 pTyr705	Cell Signalling	1/1000	Policlonal	Anti- conejo
Anti-SOCS3	Santa Cruz	1/1000	Policlonal	Anti- conejo
Anti-TRIM 32	Abnova	1/1000	Monoclonal	Anti-ratón
Anti-p65 NFκB total	Santa cruz	1/1000	Policlonal	Anti- conejo
Anti-p65 NFκB pSer536	Cell Signaling	1/1000	Policlonal	Anti- conejo
Anti-PDI	Cell Signaling	1/1000	Policlonal	Anti- conejo
Anti-ERO1b	Protentech	1/1000	Policlonal	Anti- conejo
Anticuerpos secundarios				
Alexa-fluor 488 rabbit	Invitrogen	1:500		
Texas Red mouse	Invitrogen	1:500		
Anti-Mouse-HRP TrueBot ULTRA	Ebiosciencie	1:3000	Policlonal	

Anti-Rabbit-HRP TrueBot ULTRA	Ebiosciencie	1:3000	Policlonal	
Anti-Rabbit-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:5000	Policlonal	
Anti-Mouse-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:5000	Policlonal	

5. y purificación de proteínas recombinantes.

5.1 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E.coli*.

Las proteínas de fusión 8xHis-PIASy, GST-PIASy y GST-PIASy S71A fueron expresadas y purificadas en células *E. Coli* BL21 Ril. Para cada proteína de fusión se creció un pre-inóculo en 50 mL en LB, suplementado con 33µg/mL de cloramfenicol y 100 µg/mL de ampicilina, a 37°C en agitación durante toda la noche. Después se realizó una dilución 1/100 de este cultivo y se creció a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5 unidades. En este momento se indujo la expresión de la proteína añadiendo al medio de cultivo 0.3 mM de IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galacopiranósido) y se dejó crecer a 20°C durante toda la noche.

Al día siguiente, las células de 1 L de cultivo fueron recogidas a 3000 r.p.m, 30 min y resuspendidas en 30 mL de tampón de suspensión [PBS 1X con inhibidores de proteasas (Roche), 400 µL de PMSF y 0,2% de Triton X100] y posteriormente se lisaron con un total de 25 ciclos de sonicación de 20 seg y 11 micrones cada uno. Entre ciclo y ciclo las células se mantuvieron durante 40 seg en hielo. El extracto se clarificó centrifugando 10 min a 10.000 r.p.m y filtrando el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 µm.

5.1.1 Purificación de 8xHis-PIASy.

Para la purificación de la proteína de fusión 8xHis-PIASy a partir del clarificado, se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución FPLC (Fast Protein liquid chromatography). El equipo utilizado fue un AKTA PURIFIER (GE Healthcare) y una columna de Niquel (GE Healthcare). La elución se realizó empleando concentraciones crecientes de imidazol (desde 0.15 M hasta 0.5 M).

Las diferentes fracciones recogidas se analizaron en geles de poliacrilamida del 10% que se tiñeron con tinción Coomassie [Coomassie 0,25% (p/v), metanol 5% (v/v), ácido acético 10% (v/v)] y los lavados se realizaron con metanol 5% (v/v), ácido acético 10% (v/v), y en paralelo por *western blot* con anticuerpo anti PIASy 1/10.000.

5.1.2 Purificación de GST-PIASy y GST-PIASy S71A.

Las proteínas de fusión GST-PIASy y GST-PIASy S71A se purificaron en *batch* incubando el clarificado con 500 μ L de resina de glutatión-sepharosa (Amersham Bioescience) durante 2 h en rotación a 4°C. Después de este tiempo se centrifugaron las muestras durante 2 min a 400 r.p.m y a 4°C. El sobrenadante obtenido tras esta centrifugación corresponde con la fracción no retenida. El "pellet" se lavó con 10 mL de PBS 1x tres veces centrifugando en las mismas condiciones. Entre un lavado y otro, la suspensión se mantuvo en rotación 10 min a 4°C. La suspensión final se incubó con 500 μ L de tampón de elución [150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT y 10 μ L *preScission Protease* (dilución 1/50 o 1 unidad de proteasa/ 100 μ g de glutatión-sefarosa)] durante toda la noche en rotación y 4°C. Por último se centrifugaron las muestras 2 min a 1200 r.p.m y a 4°C. El sobrenadante resultante de esta centrifugación corresponde a la fracción eluida, constituida por la proteína PIASy o PIASyS71A purificadas y la enzima *preScission protease*.

Las proteínas purificadas se concentraron con un centricon (AMICON ULTRA *centrifugal filter devices* 30K, de Millipore).

Del mismo modo que con la construcción 8xHis-PIASy se analizaron las muestras purificadas en geles de poliacrilamida del 10% que se tiñeron con tinción Coomassie y en paralelo por *western blot* con anticuerpo anti PIASy 1/10.000.

5.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en células de mamífero, Hek293.

Doce placas p100 de diámetro con 3 millones de células Hek293 cada una, fueron transfectadas con el plásmido pCMV-HA 8His-PIASy por el método de lipofectamina 200TM. 24 h después de la transfección se trataron las células con 5 mM de fenformina durante 1 h para inducir la activación de AMPK.

Después de este tratamiento se lisaron las células en un tampón sin detergente [0.15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM EDTA, 0.6M de sacarosa, 50 mM NaF, 5 mM Na₂ P₂O₇, 1 mM de PMSF e inhibidores de proteasas].

Las células se recogieron centrifugando 10 min a 8000 r.p.m y 4°C, y se resuspendieron en tampón A [8 M Urea, 250 mM NaCl, 100mM Tris HCl pH 7.5, 0.1% Nonidet P40]. La proteína se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución FPLC (*Fast Protein liquid chromatography*) del mismo modo que la purificación a partir de células E.Coli BL21 Ril. La elución se realizó a concentraciones crecientes de Imidazol. Se recogieron 9 fracciones, y se observó la elución de 8His-PIASy a 150 mM de imidazol.

Las diferentes fracciones recogidas se analizaron por *western blot* y tinción con comassie coloidal (Invitrogen) realizando los lavados con agua desionizada.

La proteína purificada fue digerida *in situ* con tripsina y los péptidos resultantes fueron analizados por MALDI-TOF/ MS y HPLC-MS/MS. Este

análisis fue realizado por el servicio de proteómica del Centro de Investigaciones Príncipe Felipe CIPF-Valencia.

6. Ensayo de doble híbrido: medida de actividad β -galactosidasa.

La técnica de doble híbrido permite identificar asociaciones entre proteínas en un sistema *in vivo*. 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 ADN y un dominio de activación de la transcripción. El dominio de unión a ADN 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.

En el presente trabajo, la cepa CTY10.5d de *Saccharomyces cerevisiae* fue cotransformada con diferentes parejas de plásmidos. Uno de ellos contenía la proteína de estudio fusionada al dominio de activación de la transcripción, GAD, (proteína presa, GAD-PIASy). El segundo contenía el dominio de unión a ADN, LexA, fusionado a la proteína de interés (proteína cebo). Las proteínas fusionadas a este dominio fueron proteínas implicadas en la biología molecular de la enfermedad de Lafora, como malina, laforina, y las subunidades de AMPK (AMPK α 2, AMPK β 2/1 y AMPK γ 1).

La asociación física entre las dos proteínas, cebo y presa, permite la reconstitución del factor de transcripción. Este factor activa la transcripción del gen *lacZ*, que codifica para una enzima cuya actividad es cuantificable (β -galactosidasa).

Los transformantes se crecieron en condiciones selectivas [SC, 2% (p/v) glucosa y en ausencia de los aminoácidos esenciales Leu y Trp o His] y, posteriormente, se determinó la actividad β -galactosidasa tanto en filtro como en líquido.

Para los ensayos en filtro (Yang et al., 1992), se crecieron clones individuales en las condiciones de selección requeridas en cada caso. Las células se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (Millipore) y se

congelaron a -80°C para su permeabilización durante 1 h. Posteriormente se puso el filtro en contacto con una solución de 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 un sustrato artificial X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, de Roche) 1 mg/mL. La reacción se realizó a 30°C , observándose la aparición de color azul.

Tras realizar los análisis cualitativos en filtro, se realizó un estudio cuantitativo en líquido (Ludin et al., 1998). Estos ensayos 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:

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

Por último se analizó la expresión de las proteínas por *western blot*. Los extractos de proteínas totales se obtuvieron rompiendo las células mediante agitación con perlas de vidrio.

7. Ensayos de coimmunoprecipitación en líneas celulares de mamífero.

Se sembraron dos placas p100 con 3×10^6 células Hek293 y al día siguiente fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes para cada interacción. 24 h después de la transfección con lipofectamina 2000, se recogieron las células en tampón de lisis [Tris 25 mM pH 8, NaF 5 mM,

Material y Métodos

Na₂P₂O₇ 5 mM, tabletas de inhibidores de proteasas (Roche), KCl 100 mM, Triton X100 0.5 %, PMSF 1 mM, NaVO₄ 1 mM].

Las células fueron permeabilizadas utilizando una jeringuilla de 0.5 x16 mm (V 1 mL) y se dejaron en hielo 10 min para favorecer la solubilización de las proteínas. Después se centrifugó 5 min a 5.000 r.p.m a 4°C. 1200 µg de proteínas totales de la fracción soluble se incubaron durante 30 min a 4°C con I.P.A 300 (Repligen), previamente lavadas con PBS1X (1 min X 1000 r.p.m). La inmunoprecipitación se realizó con 2 µL de anticuerpo anti Flag monoclonal, 2 h a 4°C y sobre esa mezcla se añadieron 50 µL de proteína A/G plus (Santa Cruz Biotechnology), incubándose la mezcla 2 h más a 4°C. La proteína A/G plus, previamente fue lavada con PBS1X (dos lavados de 1 min X 1000 r.p.m).

Los complejos fueron analizados por *western blot* en geles del 10% de poliacrilamida y los anticuerpos específicos que reconocen las proteínas inmunoprecipitadas y coimmunoprecipitadas en combinación con los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón (ebioscience), especiales para inmunoprecipitación que no reconocen las IgG desnaturalizadas.

8. Ensayos de actividad luciferasa.

El “*Dual-Luciferase Reporter Assay System*” permite identificar, en células de mamífero, la actividad de un promotor en respuesta a distintas condiciones experimentales (tratamientos farmacológicos, sobreexpresión o silenciamiento de proteínas, etc). Este sistema utiliza la actividad de dos luciferasas distintas: La *firefly* luciferasa es una proteína monomérica de 61 kDa proveniente de la luciérnaga *Photinus pyralis* que no necesita modificaciones post-traduccionales 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 (Figura 26). 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. La

actividad de esta luciferasa puede normalizarse directamente respecto a la concentración total de proteína, aunque normalmente para corregir diferencias debidas a la eficiencia de la transfección se suele cotransfectar un plásmido control que exprese otra proteína cuya expresión no esté condicionada por los tratamientos empleados para el ensayo y que además sea fácilmente cuantificable sin interferir en la actividad de la *firefly* luciferasa (Ejemplos: GFP, β -galactosidasa o renilla luciferasa).

La renilla luciferasa es una proteína monomérica de 36KDa proveniente de la medusa *Renilla reniformis*. Esta proteína también cataliza una reacción luminiscente (Figura 26B) diferente a la de la *firefly* luciferasa en cuanto a requerimiento de sustrato y estructura de las moléculas participantes, debido a su distinto origen evolutivo. Estas diferencias permiten discriminar fácilmente entre la señal de una luciferasa y otra, de forma que se puede cuantificar la actividad de la *firefly* luciferasa y posteriormente bloquear esta actividad y medir la de renilla en el mismo ensayo.

Para estos ensayos se sembraron placas de 24 pocillos con 150.000 células Hek293 por pocillo y 24 h después se cotransfectaron con la combinación de plásmidos correspondiente, 750 ng de los plásmidos pNF- κ B-luciferase (5x UAS_{NF- κ B}-luciferasa) o pSOCS3-luciferasa que expresan la *firefly luciferase* fusionada a promotores con elementos de respuesta a NF- κ B o al promotor de SOCS3 y 100 ng del plásmido pRenilla como control endógeno, en el que el gen de la renilla está bajo control del promotor de la timidina quinasa, de expresión constitutiva.

24 h tras la transfección, las células fueron tratadas con 5 ng/mL de TNF- α (SIGMA) (activador de NF- κ B) durante 4 h a 37°C o 250 ng/mL de leptina (SIGMA) durante 20 h para activar al promotor de SOCS3.

Después del tratamiento se recogieron las células con el tampón de lisis proporcionado por el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* de Promega y se procedió a la cuantificación de la actividad de ambas luciferasa, empleando un luminómetro VICTOR (WALLAC), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

Material y Métodos

La medida se realizó en dos pasos, primero añadiendo sobre el extracto celular el reactivo LAR II, el cual contiene el sustrato de *firefly luciferase*. En el segundo se añadió sobre la mezcla anterior, el reactivo STOP& GLO, permitiendo la medida de la luminiscencia producida por *renilla luciferase* y bloqueando la actividad de la enzima *firefly luciferase*.

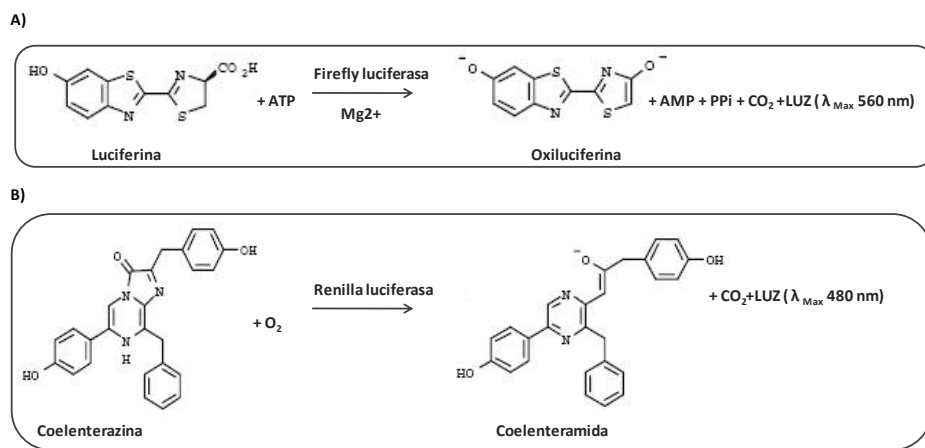


Figura 26. Reacciones bioluminiscentes catalizadas por la Firefly luciferasa (A) y por la Renilla luciferasa (B).

9. Análisis *in vivo* de ubiquitinación y sumoilación.

Para estudiar la ubiquitinación y sumoilación de proteínas se realizó un ensayo basado en la sobreexpresión, en células de mamífero Hek293, de la construcción 6xHis-UB (Kaiser and Tagwerker et al., 2005) para la ubiquitinación o las construcciones 6xHis-SUMO1 y 6xHis-SUMO2/3 para sumoilación. El epítipo de histidinas fusionado al extremo N-terminal de la ubiquitina o del grupo SUMO permite la purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas ubiquitinadas o sumoiladas. Para ello se emplean resinas de cobalto (TALON, resina Clontech) (Figura 27).

Se sembraron 3×10^6 células Hek293 en placas de p100, y 24 h después se transfectaron por el método de lipofectamina 2000 con la combinación de plásmidos correspondiente en cada experimento.

Las células de dos placas se recogieron en un medio desnaturalizante para evitar la acción de las deubiquitinasas y desumoilasas, tampón A [Cloruro de Guanidinio 6 M, Na_3PO_4 0.1 M, Tris-HCl 0.1 M pH 8]. El lisado fue retirado de las placas con un rascador y homogeneizado con jeringas de 0.5 x16 mm (V 1 mL).

Los lisados se clarificaron por centrifugación a 10.000 r.p.m durante 15 min y la fracción soluble se recogió y se cuantificó por el método de Protein Assay (Bio-Rad). 1.5 mg de proteínas del extracto total se incubaron con 100 μL de la matriz de cobalto (TALON), durante 3 h a temperatura ambiente y en rotación. Cada muestra contenía un volumen total de 1 mL y 10 mM de imidazol. Tras la incubación se realizó un lavado de 15 min con tampón B [Cloruro de Guanidinio 6 M, Na_3PO_4 0.1 M, Tris-HCl 0.1 M pH 8 y 10 mM de Imidazol] y cuatro lavados de 15 min con tampón C [Urea 8 M, Na_3PO_4 0.1 M, Tris-HCl 0.1 M pH 8 y 10 mM de Imidazol].

Finalmente las proteínas retenidas en la resina se solubilizarón con tampón de carga y se analizaron por *western blot* con anticuerpos específicos que reconocen las proteínas objeto de estudio.

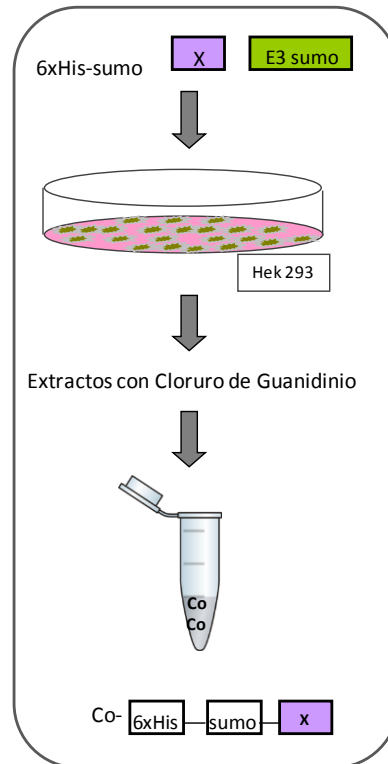


Figura 27: Esquema del procedimiento empleado para el análisis *in vivo* de ubiquitinación y sumoilación. X representa la proteína objeto de estudio y se coexpresa con las construcciones 6xHis-Ub o 6xHis-SUMO y una E3-ubiquitina ligasa o E3-SUMO ligasa. Las proteínas sumoiladas o ubiquitinadas quedan retenidas en la resina de cobalto (Co).

10. Inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Se sembraron células HeLa o Hek293 sobre placas p60 que contenían varios cubres de vidrio. 24 h después de la transfección con las combinaciones de plásmidos indicados en cada experimento se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS 1X a temperatura ambiente. Después se fijaron las células con PFA (paraformaldehído) 4% en PBS 1X

durante 10 min y la fijación fue bloqueada con glicina 10 mM durante 5 min. A continuación las células fueron permeabilizadas con Triton X100 0,5% en PBS 1X durante 30 min y se lavaron dos veces más con PBS 1X. Posteriormente se incubaron las preparaciones con solución de bloqueo [10% FBS (Suero Fetal Bovino), 5% leche, 0,5% BSA y 0,1 Triton X100 en PBS 1X] durante 1 h y se incubaron durante toda la noche a 4°C con Anti-panAMPK β 1/200 o anti laforina A7 1/200 en combinación con anti FLAG 1/200 o anti SUMO 1/200 en solución de bloqueo. 24 h después se efectuaron tres lavados con PBS 1X a temperatura ambiente y se incubaron las preparaciones durante 1 h a temperatura ambiente, con anticuerpos secundarios fluorescentes *Texas red* (anti-ratón, excitación máxima a 543 nm) y Alexa-fluor 488 (anti-conejo, excitación máxima a 488 nm) a dilución 1/500. A continuación se procedió a la tinción de núcleos con la sonda fluorescente Topro 3 (excitación máxima a 600 nm) 1/1000 en PBS 1X durante 30 min y se lavaron las preparaciones tres veces con PBS 1X. Por último se procedió al montaje de las preparaciones en portas de vidrio con Fluoromount G.

Las imágenes de microscopia fueron tomadas en un microscopio confocal Leica TCS/SP2, con un objetivo de inmersión 63X, mediante capas de 2 μ m y zoom de 2,50. Para asegurar la ausencia de interferencias en la señal de emisión de los fluoróforos, se efectuaron dos series de toma de imagen por campo (la primera, imagen de Alexa-fluor a 488 nm y Topro 3 a 600 nm, y la segunda Texas Red a 543 nm). Se obtuvieron más de 25 campos entre 2 experimentos independientes y se analizaron más de 50 células en cada condición.

11. Ensayos de desfosforilación de PIASy.

11.1 Ensayo λ fosfatasa.

Dos placas p60, con 1,5 millones de células Hek293 cada una, fueron transfectadas con pCMV-HA PIASy y posteriormente lisadas en ausencia de

Material y Métodos

inhibidores de fosfatasa en tampón de lisis [Tris-HCl pH 8, inhibidores de proteasas, sacarosa (0,6 M), NaCl (150 mM) y NP40 0.25 %]

La reacción de defosforilación se llevó a cabo con 10 µg de proteínas totales del extracto crudo, en volumen final de mezcla de reacción de 20 µL, conteniendo 2 mM de MnCl₂, 50 unidades de λ-fosfatasa (New England Biolabs) y se incubó a 30°C durante 30 min. En el control negativo se realizó la misma mezcla de reacción, añadiendo inhibidores de fosfatasa (EDTA 50 mM pH 8.0, NaF 50 mM, Na₂ P₂O₇ 6 mM).

Por último se analizaron las proteínas por western blot, en geles del 8% de poliacrilamida y con anticuerpo anti-PIASy de Abcam.

11.2 Desfosforilación *in vitro* de PIASy con laforina.

Para los ensayos fosfatasa *in vitro* con laforina, previamente se realizaron pruebas para determinar la composición óptima del tampón de reacción y se comprobó la correcta actividad fosfatasa de laforina (purificada a partir de *E. Coli*) en un ensayo con OMFP (*O*-methyl fluorescein phosphate) (Gottlin et al., 1996).

Las células Hek293 se transfectaron con pCMV-myc PIASy y 24 h después se lisaron en un tampón compuesto de [0,1 M de Tris-HCl pH 8, 40 mM de NaCl y 10 mM DTT]. 10 µg de extracto total de proteínas fue incubado 30 min a 30°C, con laforina purificada, en presencia o no de 1 mM de ortovanadato (inhibidor de fosfatasa de tirosina). La reacción se detuvo con tampón de carga SB2x y posteriormente se analizaron las muestras por *western blot* con anticuerpos específicos anti-PIASy.

12. Ensayos de fosforilación *in vitro* de PIASy.

Para los ensayos de fosforilación *in vitro* de PIASy con AMPK se utilizó un tampón compuesto por Hepes-NaOH 20 mM pH 7.0, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, AMP 100 mM y 5 µL de una mezcla compuesta por 2,5 µCi/µL γ³²P-ATP (Amersham Biosciences), 500 µM de ATP “frío” y se adicionaron 10 mU de

AMPK (Cell Signaling) y las proteínas purificadas en un volumen final de 30 μL . Como control positivo de la reacción se ensayó la fosforilación de un fragmento de ACC (que contiene la Ser79) por AMPK en las mismas condiciones de ensayo que se han descrito y la proteína GST purificada como control negativo.

En la fosforilación *in vitro* de PIASy por PKA (SIGMA), se utilizó un tampón compuesto de Tris HCl pH8 50 mM, MgCl_2 16 mM, DTT 10 mM, 200 mU de PKA y 5 μL de una mezcla compuesta por 2,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Amersham Biosciences), 500 μM de ATP “frío”. En este experimento el control positivo fue la proteína YPI (Yeast phosphatase inhibitor) purificada en nuestro laboratorio y como control negativo GST.

Por último la reacción de fosforilación de PIASy con CDK1 se realizó en un volumen final de reacción de 30 μL que contenía un tampón compuesto de Tris HCl pH7.5 25 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 2 mM, 200mU de CDK1 (Cell Signaling) y 5 μL de una mezcla compuesta por 2,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Amersham Biosciences) y 500 μM de ATP “frío”.

Todas las reacciones se incubaron 1 h a 30 $^\circ$ C. La reacción se detuvo añadiendo 10 μL de tampón SB4x y calentando las muestras a 95 $^\circ$ C durante tres min. A continuación, las proteínas se analizaron por *western blot* y se secó el gel con bomba de vacío a 80 $^\circ$ C y por último se analizó por autorradiografía.

Como control de carga también se analizaron cantidades equivalentes de las mismas diluciones de las proteínas utilizadas como sustrato, en geles de poliacrilamida que 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) y ácido acético 10% (v/v).

13. Obtención de extractos celulares de ratones *Epm2a*^{-/-} y controles.

Los ratones deficientes en laforina *Epm2a*^{-/-} fueron cedidos por el Dr. Antonio V. Delgado-Escueta (Ganesh et al., 2000). Estos animales contienen el fondo genético C57BL/6J y han sido utilizados como modelos de la

Material y Métodos

enfermedad de Lafora por diversos laboratorios (Tagliabracci et al., 2007; Tagliabracci et al., 2008; Puri et al., 2009).

Los ratones C57BL/6J control (Jackson laboratorios, Maine, USA) y los *Epm2a*^{-/-} se han mantenido con ciclos de 12/12 h de luz y oscuridad y temperatura constante de 23°C con acceso libre de agua y dieta equilibrada (65% carbohidratos, 11% de grasas y 24% de proteínas) o dieta grasa (42% de grasa).

Los ratones fueron sacrificados por el método de dislocación cervical, y se diseccionaron hígado, músculo esquelético, hipotálamo y corazón.

Los lisados de tejido se obtuvieron por homogeneización con un tampón compuesto de: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 15 mM EDTA pH8.0, 0.6 M de sacarosa, 0,5% de NP40, 50 mM de NaF, 5 mM de Na₂P₂O₇, 1 µg de aprotinina, 1 µg de leupeptina, 1 µg benzamida, 1 µgDTT, 1 mM PMSF e inhibidores de proteasas.

Las proteínas totales contenidas en los extractos se cuantificaron por el método de Bradford (Bio-Rad).

14. PCR cuantitativa a tiempo real.

Los tejidos de hígado e hipotálamo diseccionados de ratones control y *Epm2a*^{-/-} se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C. Los tejidos descongelados fueron homogeneizados en 2 mL de reactivo Tripure (Roche Diagnostics), para aislar el RNA total siguiendo las indicaciones del kit comercial.

La primera cadena de cDNA fue sintetizada a partir de 1 µg de RNA total, utilizando 50 pmoles de hexámeros aleatorios y 15 mU de transcriptasa reversa Expand (Roche) en un tampón que contenía: DTT 10 mM, dNTPs 1 mM y 0.5 U de RNasa. La reacción fue de 10 min a 30 °C y 45 min más a 42 °C. El cDNA producto de dicha reacción fue utilizado como molde para la PCR cuantitativa. Los oligos y sondas fluorogénicas TaqMan de cada uno de los genes fueron diseñadas utilizando el servicio Universal

probe library (Roche Molecular Biochemicals, Barcelona, Spain). Las sondas fueron sintetizadas con un reportero marcado con el fluoróforo 6-FAM (6-carboxyfluorescein) unido covalentemente al extremo final 5' y un fluoróforo *quencher* TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) en el extremo 3' de la sonda. La Tabla 3 indica los oligos y sondas utilizadas en cada caso.

Cada PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l de PCR Master Mix (Applied Biosystems), conteniendo 200 nM de cada primer y 40 nM de cada sonda fluorescente específica. Las condiciones de cada ciclo fueron de 20 seg a 95°C para una desnaturalización inicial, seguida de 35 ciclos a 95°C durante 3 seg y 30 seg a 60°C en un sistema de 7500 Fast Real-time PCR (Applied biosystems). Como estándar interno se utilizó el gen GAPDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa). Cada reacción fue hecha por duplicado. La cantidad relativa de cada RNA mensajero fue calculada usando la segunda derivada comparativa del método Ct.

Tabla 3: Oligos empleados para PCR cuantitativa:

PROTEÍNA	DIRECTO	REVERSO	SONDA
LAFORIN/EPM2A	CGTGGACACGTTCTGGTACA	CGGTCATGATGAGGTCCATT	#52
GAPDH	CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC	ACGACCAAATCCGTTGACTC	#60
CHOP	AGCTGGAACCTGAGGAGAGA	TGGATCAGTCTGGAAAAGCA	#9
BiP/GRP78	AGCCTGGCGACAAGACTG	TCCTTGGGCATATTGGATT	#39
MALIN	GGGCTGAGCCTCTACTTTCC	CCTGGTGATCAAAGGTCACA	#16
SOCS3	ATTCGCTTCGGGACTAG	AACTTGCTGTGGGTGACC	#83

15. Procedimientos analíticos en ratones *Epm2a*^{-/-} y controles.

Para la determinación del contenido de colesterol y triglicéridos en hígado se homogeneizaron las muestras de tejido hepático de ratones *Epm2a*^{-/-} y controles, a temperatura ambiente en un tampón compuesto de 0,2 M de acetato sódico a pH 4,5. Sobre los homogeneizados se

Material y Métodos

midieron los niveles de colesterol y triglicéridos siguiendo las instrucciones de los correspondientes kits comerciales (Wako Chemicals Neuss, Germany).

La medida de las transaminasas hepáticas aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa se realizó mediante un ensayo enzimático (Randox; Country Antrim, UK).

16. Análisis Histológico.

Para la detección de lípidos en tejidos hepáticos de ratones control y *Epm2a*^{-/-}, se realizó la tinción con hematoxilina-eosina y Rojo de Nilo.

La tinción hematoxilina-eosina es un método en el que se aplica sobre cortes histológicos la tinción de hematoxilina que, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) como los núcleos celulares en tonos azul y púrpura; el uso de eosina de naturaleza aniónica o ácida, tiñe componentes básicos (acidófilos) como el citoplasma en tonos de color rosa.

Por otra parte el Rojo de Nilo es una molécula sin carga, hidrofóbica y fotoestable que presenta fluorescencia roja cuando se encuentra en un ambiente hidrofóbico, por lo que se usa para la detección de lípidos intracelulares por microscopia de fluorescencia.

Para la tinción con hematoxilina-eosina, se fijaron los tejidos hepáticos obtenidos de ratones control y *Epm2a*^{-/-} en un tampón neutro con 10% de formalina integrado en parafina y se realizaron cortes de 7µm de sección. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (SIGMA) y se analizaron en un microscopio LEICA DMRXA2 a 63x aumentos y con el programa de análisis de imagen Leica FW4000. Para la tinción con Rojo de Nilo (SIGMA), después de la fijación de los tejidos con formalina, se incubaron toda la noche con 30% de sacarosa, se congelaron en isopentano y se conservaron a -80°C. Después se realizaron los cortes de 7 µm de sección y se procedió a la tinción.

17. Análisis estadístico.

Los valores están expresados como media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias entre los grupos han sido analizadas aplicando el test de la t student de dos colas. Se ha considerado la significatividad como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, indicado en cada caso.

RESULTADOS I

1. PIASy interacciona con el complejo laforina-malina.

En un escrutinio genético de doble híbrido en levadura para identificar nuevos interactores de laforina, se observó la interacción de esta proteína con malina, GS (Lohi et al., 2005), GSK3 β (Lohi et al., 2005; Liu et al., 2006; Puri et al., 2009), R5/PTG, RanBP y PIASy, así como su propia dimerización (Fernández-Sánchez, 2004).

Estos resultados sugieren que PIASy podría estar implicada en la misma ruta que laforina. Por ello quisimos confirmar y caracterizar la interacción de PIASy con laforina y analizar si existe una relación funcional entre ambas.

1.1 Doble y triple híbrido en levadura.

Para llevar a cabo nuestro objetivo, se realizó un ensayo de doble híbrido en levadura empleando la cepa CTY10.5d de *Saccharomyces cerevisiae* (ver apartado "Materiales y Métodos"), la construcción de PIASy fusionada al dominio de activación GAD del factor de transcripción Gal 4 y el resto de proteínas fusionadas al dominio de unión al ADN Lex A (Figura 28).

Resultados I

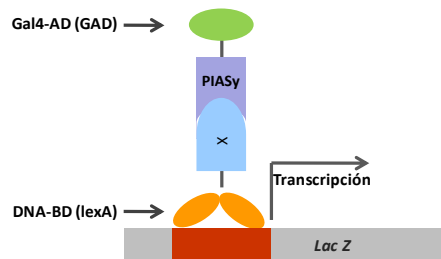


Figura 28. Representación esquemática de los ensayos de doble híbrido empleados para analizar las interacciones con PIASy. PIASy se fusionó al dominio de activación (GAD), X corresponde a laforina o malina fusionadas al dominio de unión al ADN (dominio LexA). Cuando se produce la interacción entre las dos proteínas se reconstituye el activador transcripcional y se expresa la enzima β -galactosidasa.

En este ensayo se confirmó que existía interacción física entre laforina y PIASy. La especificidad de la interacción se verificó utilizando un vector vacío LexA que dio negativo para la interacción entre PIASy y LexA (Figura 29).

El mismo ensayo fue realizado con malina; sin embargo, la interacción entre PIASy y malina es mucho menor que con laforina (Figura 29 A y B). Dado que se ha descrito que laforina y malina forman un complejo funcional en el que laforina recluta sustratos para malina (Gentry et al., 2005), quisimos comprobar si laforina media la interacción entre PIASy y malina, realizando un ensayo de triple híbrido con la cepa TAT7 de *Saccharomyces cerevisiae* (ver apartado “Material y Métodos”). En este ensayo se sobreexpresó laforina en levaduras que expresan a su vez LexA-malina y GAD-PIASy.

El resultado de este ensayo confirmó que la interacción entre PIASy y malina es siete veces mayor en presencia de laforina (Figura 29 C y D), sugiriendo que estas proteínas son capaces de formar un complejo trimérico.

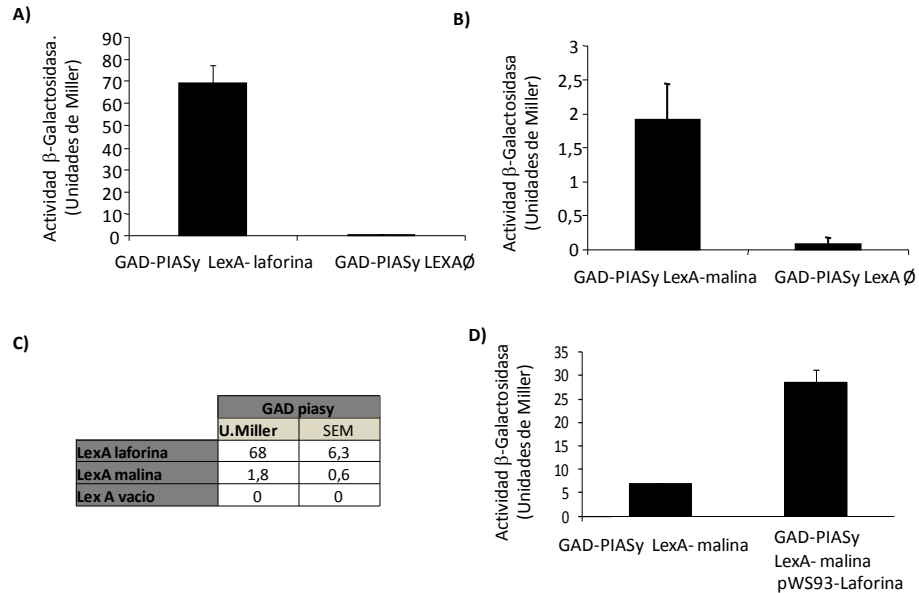


Figura 29. Medida de la actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) para cuantificar la interacción de PIASy con laforina y malina. La cepa CTY10.5d de *Saccharomyces cerevisiae* fue transformada con las combinaciones de plásmidos indicados en las abscisas de cada una de las gráficas. **A)** Interacción laforina y PIASy. **B)** Interacción malina y PIASy. **C)** Resumen de los valores obtenidos para cada interacción en la cepa de levadura CTY10.5d. Los valores representados, para cada interacción, corresponden a la media \pm SEM de cuatro transformantes (desviación estándar < 15% en todos los casos). **D)** Triple híbrido laforina, malina y PIASy en la cepa TAT7 de *Saccharomyces cerevisiae*. Se sobreexpresaron las tres proteínas, GAD-PIASy, LexA-malina y laforina sin epítipo.

1.2. Interacción de PIASy con laforina en células de mamífero.

La interacción entre PIASy y laforina se confirmó también con ensayos de coimmunoprecipitación en células de mamífero.

Estos ensayos presentaban como inconveniente que laforina posee un dominio de unión a carbohidratos, debido al cual quedaba retenida

Resultados I

inespecíficamente en el lecho de proteína A/G-sepharosa utilizado en las inmunoprecipitaciones. Para evitar falsos positivos se realizó el ensayo inmunoprecipitando FLAG-laforina con un anticuerpo anti FLAG. La inmunoprecipitación de laforina permitió la coinmunoprecipitación de PIASy, aunque el rendimiento de la coinmunoprecipitación fue muy bajo (Figura 30).

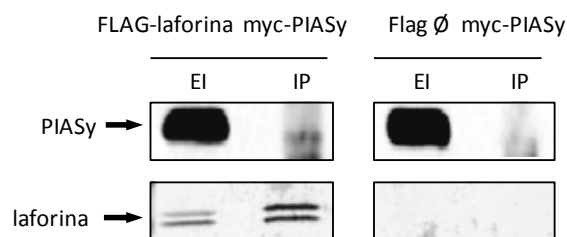


Figura 30. Coinmunoprecipitación de myc-PIASy y Flag-laforina en células Hek293. Ensayo de coinmunoprecipitación (ver Material y Métodos) en células Hek293 transfectadas con pCMV-myc PIASy y pCMV-FLAG-laforina o pCMV-FLAG vacío. Se utilizó anti-Flag en los coinmunoprecipitados. La detección de las proteínas, en el extracto crudo (EC) y en el inmunoprecipitado (IP) se realizó con anticuerpos específicos anti laforina A7 y anti PIASy.

Con el fin de validar la interacción entre PIASy y el complejo laforina-malina, investigamos la función fisiológica de estas posibles interacciones, inicialmente estudiando si PIASy participa en la regulación del complejo laforina-malina.

2. Regulación del complejo laforina-malina por PIASy.

PIASy pertenece a la familia de proteínas PIAS con actividad E3-SUMO ligasa. Se ha descrito que la sumoilación regula la actividad, estabilidad,

localización y las interacciones proteína-proteína del sustrato (Rytinki et al., 2009).

En la presente tesis doctoral se ha observado que PIASy interacciona con el complejo laforina-malina, por lo tanto podría participar en la sumoilación de laforina y/o malina modulando la interacción entre estas dos proteínas.

Para analizar esta hipótesis se realizaron ensayos de sumoilación *in vivo* por la técnica de TALÓN METAL AFFINITY (detallada en el apartado “Material y Métodos”).

2.1 Sumoilación de Laforina por PIASy.

En un estudio bioinformático preliminar se observó que existen sitios consenso de sumoilación en los aminoácidos Lys90 (dominio de unión a carbohidratos) y Lys181 (dominio fosfatasa dual) de laforina. En cambio, no existen sitios consenso de sumoilación en la secuencia de malina. Estas predicciones se correlacionan con los resultados de doble híbrido en levadura, en los que se observó que la interacción entre PIASy y laforina es más fuerte que con malina.

Para confirmar esta predicción se realizaron ensayos de sumoilación de laforina sobreexpresando PIASy y un vector que codifica para la proteína SUMO2 fusionada a un epítipo de polihistidinas que permite la purificación de las proteínas sumoiladas por cromatografía de afinidad en resinas de cobalto. Las proteínas retenidas en la resina de cobalto se analizaron por *western blot* con un anticuerpo específico anti laforina (A7).

En paralelo se realizaron dos controles negativos sobreexpresando un vector vacío o un mutante de PIASy catalíticamente inactivo (PIASy CI), en el que se han mutado las cisteínas 342 y 347 a alanina (C342A, C347A) del dominio SP-RING (Mabb et al., 2006), perdiendo su capacidad como E3-SUMO-ligasa, y un control positivo en el que se ensaya la sumoilación de p53 por PIASy (Bischof et al., 2006).

Como se muestra en la figura 31 se observó sumoilación en p53 (bandeado superior a 53KDa) cuando se sobreexpresó PIASy y no con el

Resultados I

mutante catalíticamente inactivo (Figura 31 A). Sin embargo no se detectó sumoilación de laforina en estas condiciones (Figura 31 B).

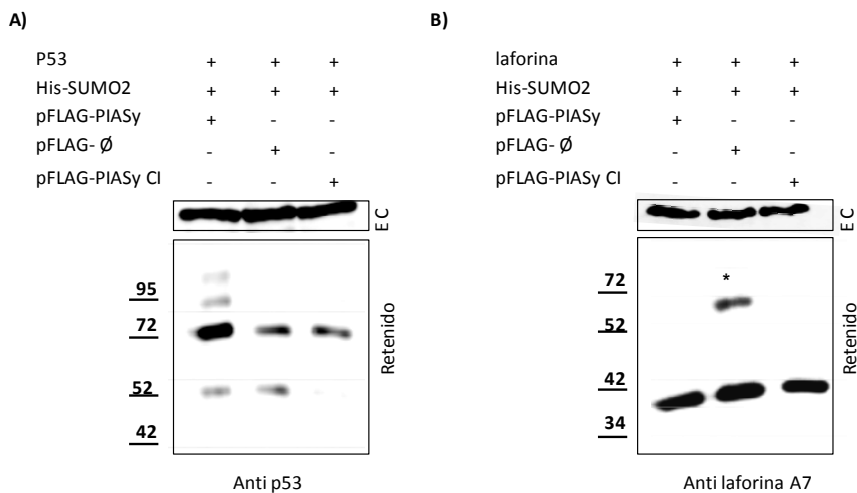


Figura 31. Ensayos de sumoilación de laforina, por PIASy. A) PIASy sumoila a p53. **B)** PIASy no sumoila a laforina. En células Hek293 se sobreexpresaron 6xHis-SUMO2, pCINEO laforina o p53 y pFLAG PIASy, o los controles pFLAG PIASy CI o pFLAG vacío. Las células fueron lisadas en presencia de cloruro de guanidinio 6M y las proteínas sumoiladas con la construcción 6xHis-SUMO2 se purificaron por cromatografía de afinidad en una resina de cobalto y se analizaron por *western blot* con anticuerpos anti-laforina y anti p53. En la sumoilación de laforina se observa una banda inespecífica (*). RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 µg del extracto crudo.

Estos resultados indican que PIASy no sumoila a laforina. Se ha descrito que la familia de proteínas PIAS son capaces de retener a otras proteínas en estructuras subnucleares en un proceso independiente de sumoilación. Laforina se distribuye por toda la célula tanto en el núcleo como en

citoplasma (Ianzano et al., 2004; Sachdev et al., 2001; Shuai and Liu et al., 2005). Dado que en otros trabajos se ha observado que PIASy es una proteína nuclear (Yamamoto et al., 2003; Liu et al., 2001), estudiamos si PIASy podría retener a laforina en el núcleo impidiéndole ejercer su función en el citoplasma.

2.2 Localización subcelular de laforina en presencia de PIASy.

Para analizar si PIASy regula la localización subcelular de laforina se realizó un ensayo de inmunofluorescencia y microscopía confocal, en células Hela transfectadas con laforina y FLAG-PIASy o un vector vacío.

En este ensayo se observó que laforina (rojo) se localiza en el citoplasma, independientemente de la sobreexpresión de PIASy y por el contrario PIASy (verde) se localiza en el núcleo de acuerdo con la bibliografía (Figura 32).

Resultados I

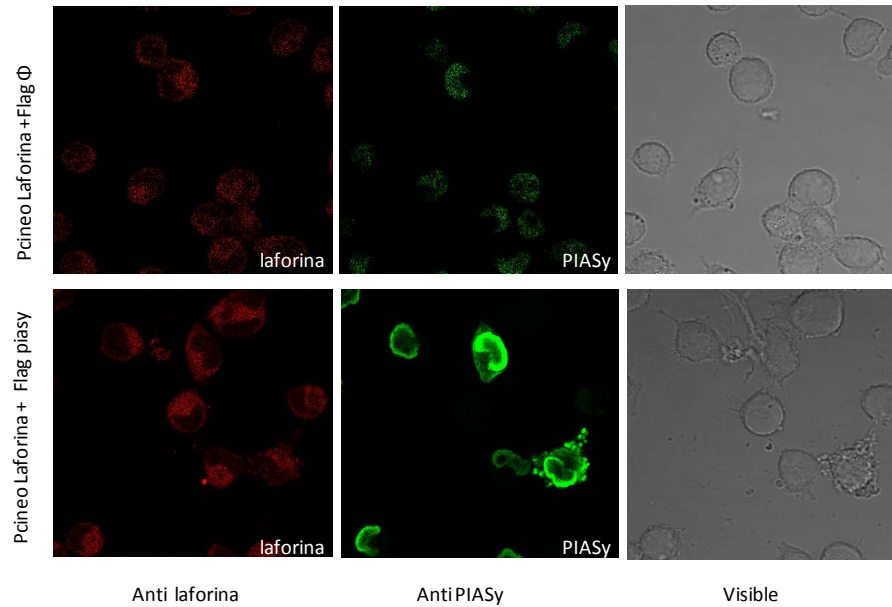


Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de PIASy en la localización subcelular de laforina. Células HELA fueron transfectadas con pCINEO laforina, pFLAG-PIASy o pFLAG vacío. La inmunofluorescencia se realizó con los anticuerpos específicos anti PIASy y anti laforina A7 en combinación con los anticuerpos secundarios Alexa-fluor 488 (anti conejo) y Texas Red 534 (anti ratón), respectivamente.

Los resultados obtenidos en los ensayos de TALON y en la inmunocitoquímica sugieren que PIASy no participa en la regulación de laforina.

Con el fin de seguir estudiando la posible importancia fisiológica de la interacción entre PIASy y el complejo laforina-malina se investigó la posible regulación de PIASy por este complejo.

3. Regulación de PIASy por el complejo laforina-malina

Estudios previos en nuestro laboratorio describieron que el complejo laforina-malina participa en la ubiquitinación y degradación de distintos sustratos como la subunidad reguladora de PP1, R5/PTG (Vilchez et al., 2007; Solaz-Fuster et al., 2008; Vernia et al., 2009b). Este trabajo y nuestros resultados de doble híbrido sugieren que PIASy podría ser un sustrato de ubiquitinación para el complejo laforina-malina.

Reforzando esta hipótesis, estudios bioinformáticos señalan una alta identidad estructural entre malina y TRIM32, una E3 ubiquitina ligasa implicada en la ubiquitinación y degradación de PIASy (Albor et al., 2006).

Además un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, demostró que TRIM32 es capaz de ubiquitinar a sustratos de malina como R5/PTG y a las subunidades AMPK α y AMPK β , aunque con cadenas de poliubiquitinas de diferente topología (Carlos Romá-Mateo et al., 2011). Por lo que el complejo laforina-malina, también podría promover la ubiquitinación de PIASy del mismo modo que TRIM32.

3.1 Ensayos de ubiquitinación de PIASy

Para comprobar si el complejo laforina-malina participa en la ubiquitinación y degradación de PIASy, se realizó un ensayo preliminar en células Hek293 coexpresando PIASy y una de las siguientes E3-ubiquitina ligasa: malina, TRIM32 o MDM2 (encargada de la ubiquitinación de p53 (Brooks et al., 2004) y que no se ha relacionado con PIASy). Las células fueron tratadas con MG132 (agente químico que bloquea la actividad del proteasoma) para producir la acumulación de proteínas ubiquitinadas.

Como se muestra en la figura 33, sólo cuando se coexpresó TRIM32 con PIASy se observó una mayor acumulación de PIASy y de sus productos de degradación (Figura 33). Estos resultados sugieren que el complejo laforina-malina no participa en la degradación de PIASy.

Resultados I

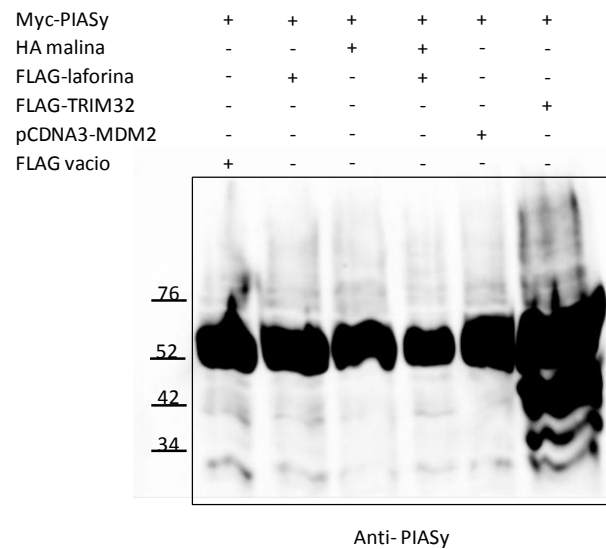


Figura 33. Degradación de PIASy en condiciones de sobreexpresión de diferentes E3-ubiquitina ligasas. Se cotransfectaron células Hek293 con myc-PIASy y las diferentes E3-ubiquitina ligasas. 24 h después se trataron con un inhibidor químico del proteasoma, MG132 (25 μ M) durante 8 h. 40 μ g del extracto total de proteínas se analizaron por *western blot* con anticuerpo anti PIASy.

Para comprobar esta hipótesis se realizó un ensayo de ubiquitinación *in vivo* por la misma técnica de TALON empleada para analizar la sumoilación de laforina. Para ello se sobreexpresó myc-PIASy (sustrato), una E3-ubiquitina ligasa (malina, TRIM32, o MDM2) y un plásmido que expresa ubiquitinas fusionadas a un epítipo de polihistidinas, 6xHis-UB.

Con la finalidad de reproducir las condiciones en las que se ha descrito que TRIM32 ubiquitina a PIASy, las células fueron sometidas o no a radiación UV y TNF- α (condiciones apoptóticas) (Albor et al., 2006) (Figura 34). Sólo se observó ubiquitinación de PIASy cuando se coexpresó con TRIM32, pero no con laforina y malina o MDM2.

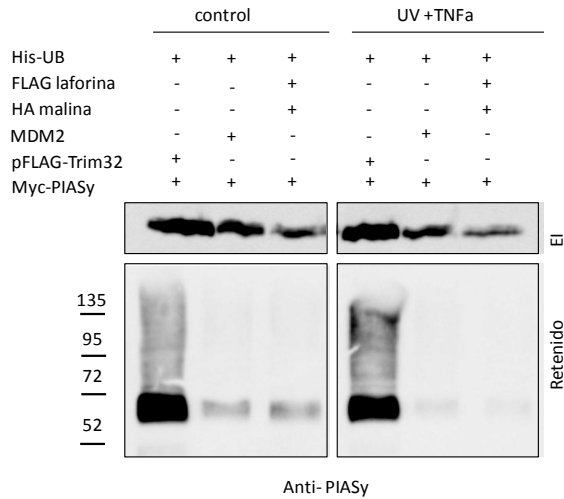


Figura 34. Ensayos de ubiquitinación de PIASy por laforina-malina. En células Hek293 se sobreexpresaron 6xHis-UB, pCMV-myc PIASy, y una E3-ubiquitina ligasa (pCDNA3-HA malina, pCDNA3-MDM2 o pFlag-cmv TRIM32). Las células fueron lisadas en presencia de cloruro de guanidinio 6 M y las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB se purificaron por cromatografía de afinidad en una resina de cobalto y se analizaron por *western blot* con anticuerpos anti-myc. RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

Finalmente, para comprobar si el complejo laforina-malina modificaba la vida media de PIASy, se transfectaron células Hek293 con myc-PIASy, laforina y cantidades crecientes del plásmido de HA-malina y se valoró la cantidad total de PIASy por *western blot* con anticuerpo anti PIASy, observándose que los niveles de PIASy no cambian drásticamente cuando se sobreexpresan cantidades crecientes de malina (Figura 35). El descenso observado en los niveles de PIASy puede ser debido a efectos generales de la traducción de proteínas por sobreexpresión de diferentes construcciones.

Resultados I

Estos resultados confirman que el complejo laforina-malina, en las condiciones analizadas, no participa en la degradación de PIASy.

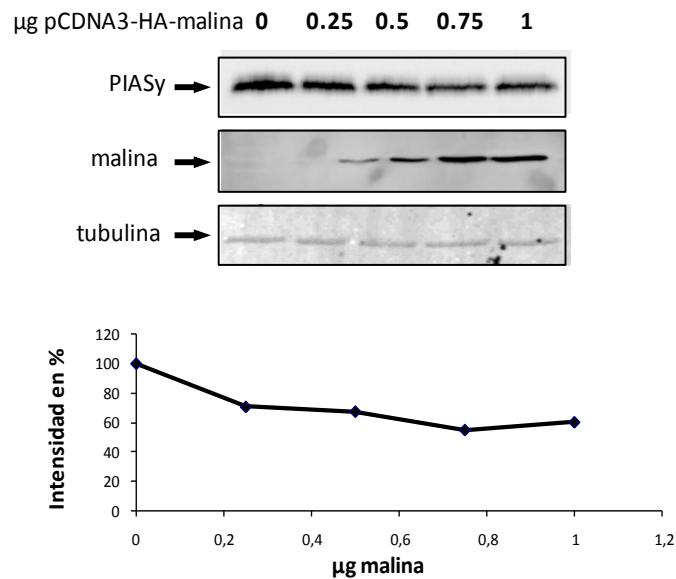


Figura 35 Estudio de los niveles totales de PIASy al expresar cantidades crecientes de HA-malina. Células Hek293 fueron transfectadas con FLAG-PIASy, pCINEO laforina y cantidades crecientes de pCDNA3-HA malina. 30 µg de extracto total de proteínas se analizaron por *western blot* con anticuerpo específico anti-PIASy. La cuantificación de las bandas se realizó con el programa *ImageGauge V 4.0* y se han expresado en porcentaje respecto al valor obtenido en ausencia de laforina y malina (100%).

Estos resultados demuestran que PIASy, un sustrato de TRIM32, no es ubiquitinado recíprocamente por malina, aunque TRIM32 sí es capaz de ubiquitinar a sustratos de malina (Carlos Romá-Mateo et al., 2011).

3.2. Ensayos de desfosforilación de PIASy por laforina.

Ya que se ha descrito que laforina presenta actividad fosfatasa de especificidad dual (Ser/Thr fosfatasa y tirosina fosfatasa) (Ganesh et al., 2000) quisimos investigar si PIASy podría ser un sustrato de laforina.

Reforzando esta hipótesis, los resultados del ensayo de triple híbrido sugieren que PIASy, laforina y malina forman un complejo trimérico en el que la interacción entre PIASy y laforina es más fuerte que con malina. Estos resultados sugieren que laforina podría desfosforilar a PIASy activándola o inactivándola y malina formaría parte de este complejo para eliminar a laforina y revertir su efecto sobre PIASy.

Para confirmar esta hipótesis investigamos el estado de fosforilación de PIASy en células de mamífero.

En un ensayo preliminar por *western blot* se observó que PIASy migra como una banda dispersa, sugiriendo que la banda más lenta (de mayor tamaño molecular) corresponde a la proteína modificada postraduccionalmente (Figura 36).

Para confirmar si esta banda retardada es el resultado de una fosforilación en PIASy realizamos un ensayo con fosfatasa λ (capaz de eliminar todos los fosfatos de la proteína), sobre extractos de células Hek293 previamente transfectadas con myc-PIASy. Se observó que la migración electroforética de PIASy se resumía en una única banda, tanto en la proteína sobreexpresada como la endógena. Este resultado refuerza la hipótesis de que PIASy está fosforilada *in vivo* (Figura 36).

Resultados I

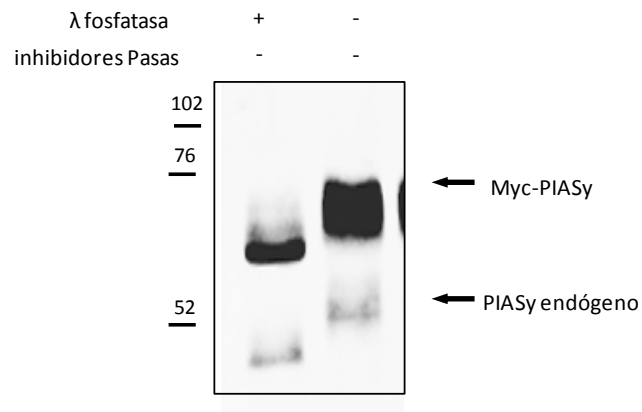


Figura 36. Ensayo fosfatasa λ : Células Hek293 fueron transfectadas con pCMV-*myc* PIASy. 10 μ g del extracto total de proteínas se incubaron con 1 U de fosfatasa λ , 30 min a 30°C y se analizaron las muestras por *western blot* con anticuerpo específico anti-PIASy. La migración de PIASy (sobreeexpresado y endógeno) se reduce a una única banda, cuando tratamos los extractos con fosfatasa λ .

Los ensayos con fosfatasa λ muestran que PIASy es una fosfoproteína en células de mamífero. Además, se ha observado que existe una interacción física entre PIASy y la fosfatasa laforina. Estos resultados en conjunto, sugieren que PIASy podría ser un sustrato para laforina.

Para estudiar esta hipótesis se realizó un ensayo fosfatasa *in vitro* con laforina purificada en *E. coli* y PIASy como sustrato.

Previamente se comprobó que laforina purificada mantenía su actividad fosfatasa empleando un sustrato artificial (OMFP), cuyo producto puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 490 nm (Figura 37B).

Como se muestra en la figura 37A, la movilidad electroforética de PIASy no cambió cuando se incubaron los extractos celulares con laforina purificada, en comparación con el control positivo con fosfatasa λ .

No obstante, con los resultados obtenidos en este ensayo no podemos concluir que PIASy no sea un sustrato de laforina, puesto que en este ensayo la fosfatasa λ elimina todos los fosfatos accesibles de PIASy mientras

que laforina podría estar desfosforilando específicamente un único aminoácido, pudiendo no detectarse pequeñas diferencias en el tamaño de PIASy por *western blot*.

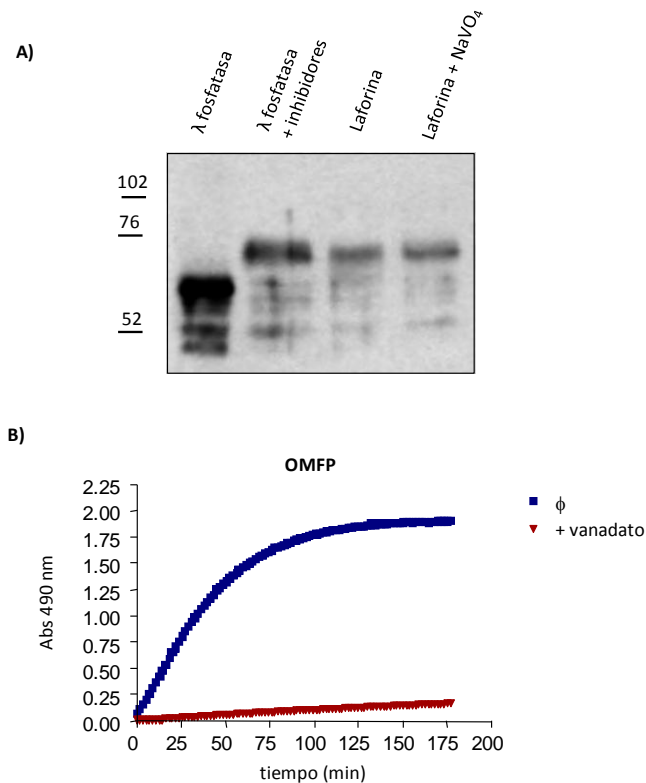


Figura 37. A) Ensayo fosfatasa con laforina purificada de bacteria y PIASy. Células Hek293 fueron transfectadas con pCMV-myc PIASy. 10 μg de extracto total de proteínas fue incubado 30 min a 30°C con fosfatasa λ en presencia o no de inhibidores de fosfatasas o con laforina en presencia o no de ortovanadato (inhibidor de fosfatasa de tirosina). Posteriormente se analizaron las muestras por *western blot* con anticuerpos específicos anti-PIASy. **B) Cuantificación de la actividad fosfatasa de laforina sobre el sustrato OMFP.** La curva azul muestra la aparición de producto (medida de A490 nm) en función del tiempo de reacción. La misma actividad fue cuantificada en presencia de vanadato, curva roja.

El ensayo de desfosforilación *in vitro* con laforina no permitió concluir si PIASy es un sustrato de ésta. Sin embargo la fosforilación y desfosforilación es un mecanismo de activación e inactivación de proteínas que permite regular múltiples procesos celulares. En este contexto se ha descrito que otros miembros de la familia PIAS se regulan por este mecanismo. Por ejemplo, PIAS1 se activa por fosforilación en la Ser90 y en respuesta a estímulos inflamatorios (Liu et al., 2007).

Por tanto laforina podría desfosforilar un aminoácido específico de PIASy modulando su actividad. Para confirmar esta hipótesis se analizó la actividad de PIASy en condiciones de sobreexpresión de laforina y malina.

3.3. Actividad de PIASy en condiciones de sobreexpresión de laforina y malina.

Se ha descrito que PIASy regula negativamente a factores de transcripción como STAT o NF- κ B (Rytinki et al., 2009). Por tanto se analizó si el complejo laforina-malina modula la actividad de PIASy en estas rutas.

A) Actividad de PIASy sobre la ruta de NF- κ B.

El mecanismo por el cual PIASy modula la actividad transcripcional de NF- κ B continua siendo objeto de debate. Contradictoriamente, grupos diferentes han descrito que la modificación por SUMO1 de los componentes de la cascada de activación de NF- κ B, NEMO e I κ B α , produce activación (Mabb et al., 2006) e inhibición (Desterro et al., 1998) de esta ruta.

Para estudiar el efecto que ejerce el complejo laforina-malina sobre la actividad de PIASy en la ruta de NF- κ B, disponíamos de un reportero transcripcional en el que la transcripción del gen de la luciferasa está bajo control de un promotor con cinco repeticiones en tándem del elemento de unión a NF- κ B (TGGGGACTTTCCGC), pNF- κ B-luciferasa. De modo que la activación de este promotor y transcripción del gen de la luciferasa

dependen de la actividad del factor de transcripción NF- κ B, que se activa en respuesta a TNF- α (factor de necrosis tumoral) (Figura 38 B).

Como se muestra en la figura 38 C la expresión del gen de la luciferasa aumenta cuando las células son tratadas con TNF α , indicando que estas células contienen los elementos necesarios para la activación de la ruta proinflamatoria de NF- κ B. En este mismo ensayo se confirmó que PIASy, y no el mutante catalíticamente inactivo (PIASy CI), es un regulador negativo de NF- κ B (Figura 38 A).

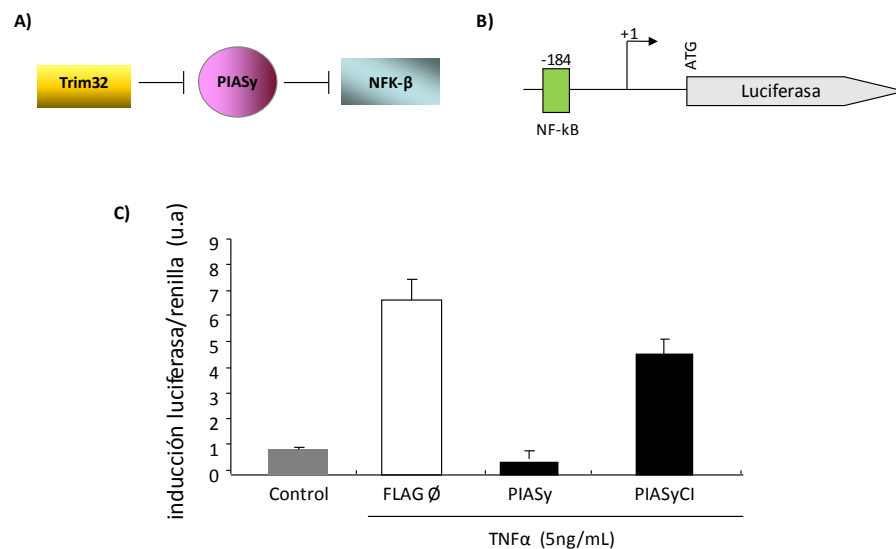


Figura 38. Actividad de PIASy en la ruta de NF- κ B **A)** Esquema de la actividad de PIASy en la ruta de NF- κ B. **B)** Esquema de la construcción pNF- κ B-luciferasa. **C)** Cuantificación de la activación del promotor de respuesta a NF- κ B con ensayos luciferasa (ver apartado Material y Métodos). Células Hek293 fueron cotransfectadas con pNF- κ B-luciferasa y Flag PIASy o Flag PIASy CI o Flag vacío. Para cada una de estas condiciones se ha representado la actividad luciferasa normalizada con la de renilla. Las células fueron tratadas con TNF α (5ng/mL) durante 4 h. Los resultados se han representado como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes y se han referenciado al control sin inducir (gris).

Resultados I

Este mismo ensayo se realizó coexpresando PIASy con laforina y malina o con TRIM32. En este caso se utilizaron cantidades del plásmido FLAG-PIASy diez veces menores que en el ensayo anterior, para evitar que el efecto represor de PIASy sobre la expresión de NF- κ B fuera máximo, ya que de lo contrario, se registrarían valores muy bajos de actividad luciferasa dificultando la observación de cualquier diferencia en la actividad de PIASy cuando se sobreexpresen laforina y malina.

De acuerdo con los resultados de ubiquitinación, laforina y malina no alteraron la actividad represora de PIASy en esta ruta. Sin embargo cuando se sobreexpresó TRIM32 se observó un aumento de la actividad transcripcional (Figura 39), consistente con el papel inhibitor que tiene TRIM32 sobre PIASy (Figura 39 A).

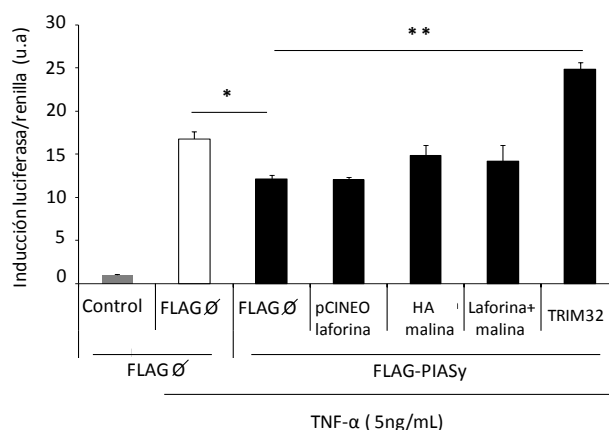


Figura 39. Efecto de la sobreexpresión de laforina y malina en la actividad de PIASy sobre la ruta de NF- κ B. Ensayo luciferasa en células Hek293 cotransfectadas con la construcción pNF κ B-luciferasa y Flag PIASy o Flag vacío y la combinación de plásmidos indicada en abscisas. En las ordenadas se han representado los valores de actividad luciferasa, para cada combinación de plásmidos, normalizada con la actividad de la renilla. Los resultados se han representado como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes y se han referenciado al control sin inducir con TNF- α (gris). La comparación estadística entre grupos se realizó utilizando el valor t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

B) Actividad de PIASy sobre la ruta de JAK2/STAT3.

La familia de proteínas PIAS participa en la regulación negativa de la actividad transcripcional de la familia STAT.

Los miembros de la familia STAT son factores de transcripción que se localizan en el citoplasma. La fosforilación de STAT3 por la quinasa JAK2, en respuesta a citoquinas, como IL-6 (interleuquina 6) o leptina, produce su dimerización y translocación al núcleo, donde activa la transcripción de genes diana, entre ellos SOCS3. Esta proteína al mismo tiempo es un inhibidor de esta ruta, impidiendo que la señalización por permanezca constantemente activa (Figura 40 A).

La señalización por leptina se inicia cuando esta hormona es reconocida por sus receptores. Por tanto, para que las células Hek293 respondiesen a leptina fue necesaria la sobreexpresión de este receptor (Li and Friedman et al., 1999).

En un ensayo preliminar, se transfectaron células Hek293 con el plásmido de expresión del receptor de leptina (pOb-R) y un reportero transcripcional en el que el gen de la luciferasa está bajo control del promotor de SOCS3 (pSOCS3-luc) (Figura 40 B).

Como se observa en la figura 40 C la expresión de la luciferasa aumenta cuando las células son tratadas con leptina, indicando que contienen los elementos necesarios para inducir la expresión, dependiente de leptina, de SOCS3.

Resultados I

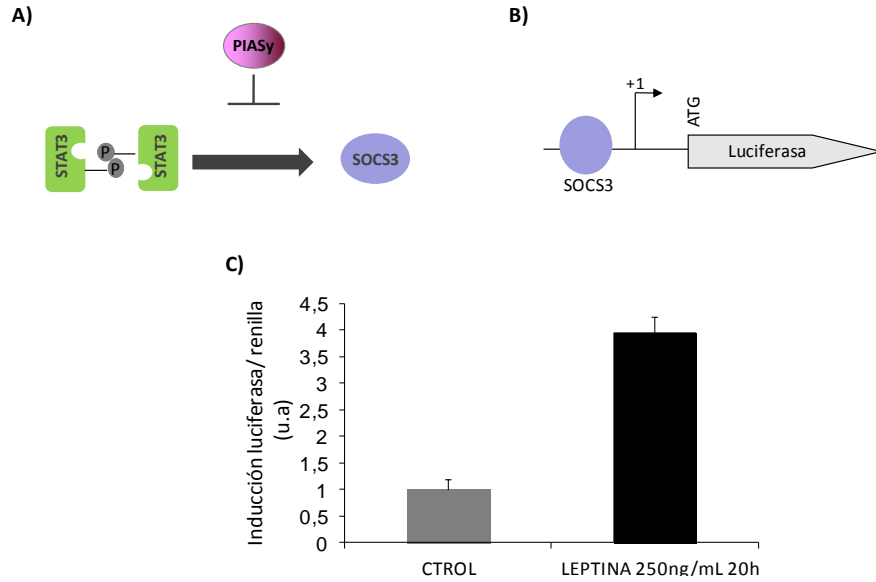


Figura 40. Activación del promotor de SOCS3 por leptina. A) Esquema de la actividad de PIASy en la regulación de la expresión de SOCS3 **B)** Esquema del promotor de SOCS3 fusionado al gen de la luciferasa. **C)** Activación del promotor de SOCS3 por leptina. Células Hek293 fueron transfectadas con 100 ng de pRenilla, 300 ng del receptor de leptina y 750 ng de SOCS3-luciferasa y se trataron con 250ng/mL de leptina durante 20 h. En las ordenadas se ha representado la actividad luciferasa normalizada con la de renilla. Los resultados se representan como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes referenciados al control sin tratar (gris).

De acuerdo con los resultados ya publicados, la sobreexpresión de PIASy en este sistema produjo una disminución de la expresión de SOCS3, dependiente de la dosis de plásmido (Figura 41)

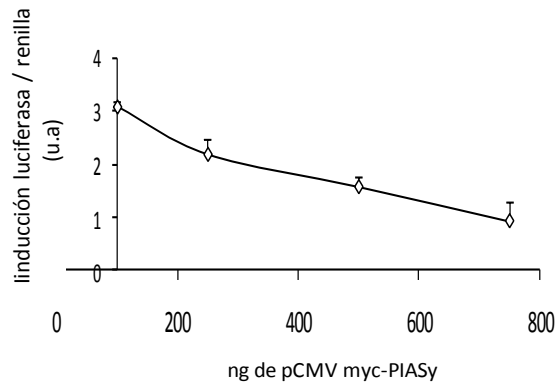


Figura 41. PIASy inhibe la transcripción, dependiente de la señalización por leptina, de SOCS3. Células Hek293 fueron transfectadas con 100 ng de pRenilla y 750 ng de SOCS3-luciferasa y cantidades crecientes de pCMV-myc PIASy, y tratadas con leptina 250 ng/mL durante 16 h. En las ordenadas se ha representado la actividad luciferasa normalizada con la de renilla en unidades arbitrarias y en las abscisas la cantidad de plásmido pCMV-myc transfectado. Los resultados se representan como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Para analizar si el complejo laforina-malina modula la actividad de PIASy sobre esta ruta, se sobreexpresaron cantidades crecientes de los plásmidos de expresión de laforina y malina y una cantidad fija de FLAG-PIASy.

Como se muestra en la figura 42 A la coexpresión del complejo laforina-malina en estas células redujo la expresión de SOCS3, de manera dependiente de la dosis de plásmidos. Sin embargo, en un experimento en paralelo (sobreexpresando un vector vacío en lugar de FLAG-PIASy) se observó que la inhibición de la expresión de SOCS3 mediada por el complejo laforina-malina, es independiente de la sobreexpresión de PIASy (Figura 42 B). Aunque no podemos descartar que esta actividad represora podría estar mediada por la proteína PIASy endógena.

Resultados I

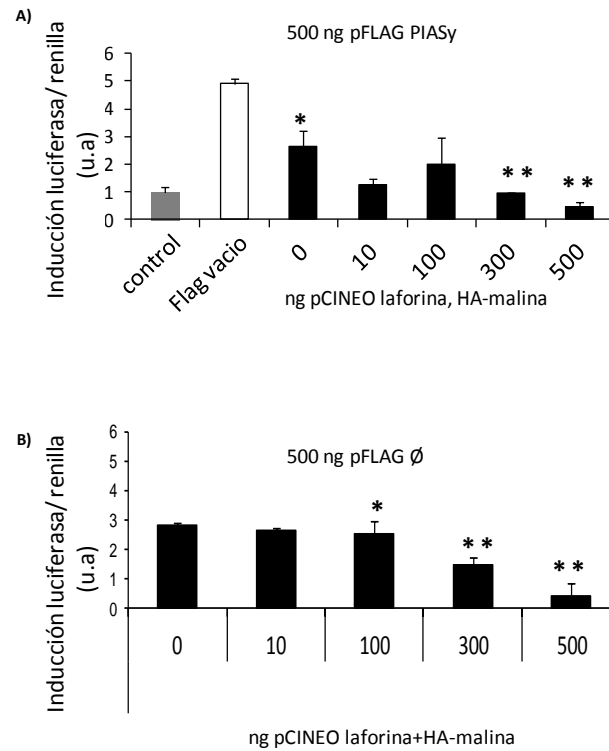


Figura 42. Actividad represora del complejo laforina-malina en la ruta JAK2/STAT3. Ensayos de luciferasa en células Hek293 (ver apartado Material y Métodos) sobreexpresando cantidades crecientes de pCINEO laforina y pCDNA3-HA, las cantidades indicadas en las abscisas corresponden a la cantidad de total de los dos plásmidos a partes iguales. Las células se trataron con 250 ng/mL de leptina, durante 16 h. Los resultados se representan como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. En ambas condiciones se observa represión de la ruta JAK2/STAT3 por laforina y malina. **A)** En condiciones de sobreexpresión de PIASy (500 ng de pFLAG-PIASy). **B)** Sin sobreexpresar PIASy (500 ng de pFLAG vacío).

Como resumen de este capítulo, hemos identificado la existencia de una interacción física entre PIASy y el complejo laforina-malina. Sin embargo no hemos podido observar que PIASy module la localización subcelular de laforina o la modifique por sumoilación.

Tampoco se ha observado que el complejo laforina-malina module la estabilidad, actividad o estado de fosforilación de PIASy, por lo que hasta el momento, desconocemos el significado biológico de estas interacciones. Sin embargo se observó un efecto del complejo laforina-malina en la ruta de señalización por leptina, JAK2/STAT3, independiente de PIASy por lo que quisimos profundizar en el estudio del efecto del complejo laforina-malina sobre esta ruta.

RESULTADOS II

La leptina ejerce la mayoría de sus efectos metabólicos mediante la interacción con sus receptores específicos. Existen múltiples formas del receptor de leptina incluyendo formas largas (OB-RL) y cortas (OB-RS).

Las formas cortas del receptor se expresan en tejidos periféricos; sin embargo las formas largas se encuentran en el cerebro, mayoritariamente en las neuronas del hipotálamo, pero también en los plexos coroideos, en el hipocampo, cerebelo, corteza cerebral y endotelio capilar. (Ver Introducción).

En el hipotálamo, la leptina se une a sus receptores, cuya activación inhibe la ingesta (pérdida de apetito), activa el gasto energético (pérdida de grasa), de modo que la leptina participa en el control a medio y largo plazo del balance energético y se han relacionado defectos genéticos en esta ruta con la aparición de un fenotipo de obesidad.

Para estudiar la participación del complejo laforina-malina en la señalización mediada por leptina y JAK2/STAT3, se utilizó la línea celular de neuroblastoma, SH-SY5Y, con la finalidad de reproducir con mayor exactitud la acción de la leptina en el hipotálamo.

Estas células no están diferenciadas y por ello no expresan el receptor de la leptina de forma endógena, por lo que, del mismo modo que con las células Hek293 en los experimentos descritos en el capítulo anterior, fue necesaria la sobreexpresión del receptor humano de leptina para que se inicie la transducción de la señalización inducida por leptina en estas células.

1. Efecto de la sobreexpresión del complejo laforina-malina en la señalización mediada por leptina JAK2/STAT3.

En un ensayo preliminar se cotransfectaron células SH-SY5Y con la construcción pSOCS3-luc, el receptor humano de leptina y cantidades crecientes de los plásmidos de expresión de laforina y malina. En este experimento se confirmó que el complejo laforina-malina inhibe la

Resultados II

transcripción mediada por leptina de SOCS3 de manera dependiente de la dosis de plásmidos de laforina y malina (Figura 43 A).

Sorprendentemente no se observó disminución de la expresión de SOCS3 en las células transfectadas con los plásmidos de expresión laforina o malina por separado, sugiriendo que la actividad represora es dependiente de la formación del complejo laforina-malina (Figura 43 B)

Paralelamente se realizó el mismo ensayo con células sin tratar con leptina, observándose que la represión de la transcripción de SOCS3 es dependiente de la presencia de leptina, ya que en ausencia de esta hormona el complejo laforina-malina no ejerce ningún efecto en la expresión de SOCS3 (Figura 43C).

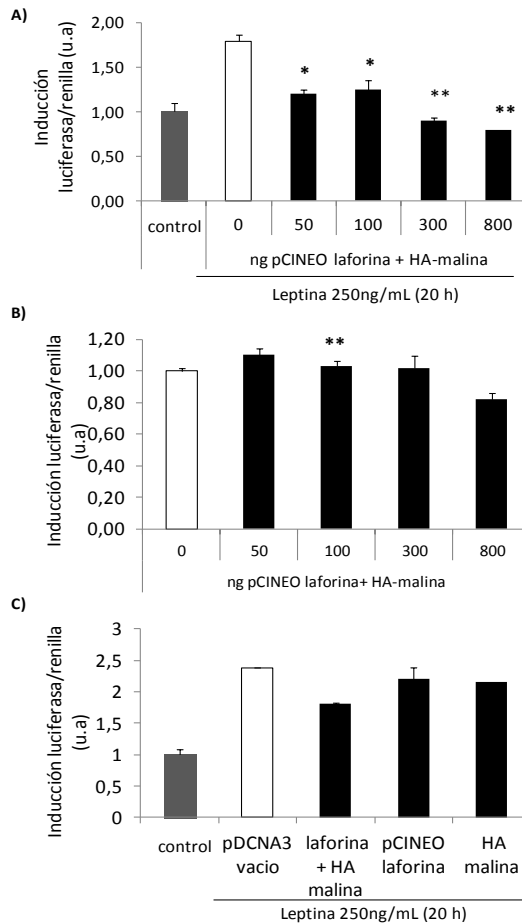


Figura 43. Efecto de la sobreexpresión de laforina y malina en la transcripción de SOCS3. Ensayo luciferasa en células SH-SY5Y sobreexpresando el receptor de leptina, la construcción SOCS3-luciferasa y cantidades crecientes de pCINEO laforina y pDNA3-HA malina. En las ordenadas se ha representado la actividad luciferasa normalizada con la de renilla y en las abscisas las diferentes combinaciones de plásmidos para cada condición. Los resultados se representan como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. La comparación estadística de cada punto respecto al control (punto 0), se realizó utilizando el valor t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **A)** Células tratadas con leptina. **B)** En ausencia de leptina. **C)** Efecto de la sobreexpresión de laforina y malina por separado (300ng), o ambas proteínas (150 ng de pCINEO laforina y 150 ng de HA malina).

Resultados II

Por último se analizó si el efecto represor del complejo laforina-malina en la expresión de SOCS3 es dependiente de la actividad fosfatasa de laforina. Para ello se realizaron ensayos de luciferasa sustituyendo laforina por un mutante catalíticamente inactivo (laforina C266S) en el que se ha mutado el residuo Cys266 del centro activo de la proteína a serina, perdiendo su capacidad como fosfatasa dual.

Sorprendentemente la sobreexpresión de la forma catalíticamente inactiva de laforina mantiene la capacidad del complejo para inhibir la expresión, inducida por leptina, de SOCS3. (Figura 44).

Estos resultados coinciden con un estudio reciente en el que se ha demostrado que la regulación negativa de R5/PTG (subunidad reguladora de la fosfatasa de tipo1 PP1) por el complejo laforina-malina, es independiente de la actividad fosfatasa de laforina (Vilchez et al., 2007).

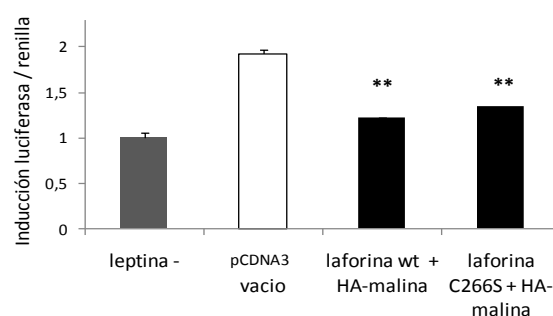


Figura 44. La acción represora del complejo laforina-malina no requiere la actividad fosfatasa de laforina. Ensayo luciferasa en células SH-SY5Y, sobreexpresando el receptor de leptina, la construcción pSOCS3-luciferasa, 400 ng de pCDNA3-HA malina y 400ng de pCINEO laforina o el mutante pCINEO laforina C266S. Los resultados se representan como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. La comparación estadística de cada punto respecto al control (punto 0), se realizó utilizando el valor t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Con el fin de profundizar en las bases moleculares del efecto represor del complejo laforina-malina en la señalización mediada por leptina se estudiaron los niveles de cada uno de los componentes de la ruta JAK2/STAT3 por *western blot* con anticuerpos específicos.

Ya que se ha descrito que la ruta de NF- κ B puede inducir la expresión de SOCS3 en respuesta a infecciones víricas, (Pauli et al., 2008). En un ensayo inicial comprobamos si la disminución de la expresión de SOCS3 producida por el complejo laforina-malina estaba afectando a la ruta de NF- κ B.

Para ello se investigaron las diferencias en el estado de activación de NF- κ B en condiciones de sobreexpresión de laforina y malina. Para realizar el ensayo fue necesario ajustar la cantidad de plásmidos transfectados al número de células, empleándose cantidades diez veces mayores pero equivalentes de HA-malina y pCNIEO-laforina respecto a los ensayos de luciferasa

No se observaron cambios en los niveles de la proteína fosforilada pNF- κ B en estas condiciones (Figura 45 A), indicando que el efecto represor del complejo laforina-malina en la expresión de SOCS3 en las células SH-SY5Y no es debido a alteraciones en la ruta de NF- κ B y confirmándose que este complejo es un regulador negativo de la ruta JAK2/STAT3.

Se analizaron entonces los niveles totales de las proteínas JAK2 y STAT3, así como las formas fosforiladas y activas p-JAK2 y p-STAT3 y del receptor de leptina pOb-Rb en condiciones de sobreexpresión de laforina y malina.

Como se muestra en la figura 45 no se observaron diferencias en el estado de fosforilación, inducido por leptina, de pOb-Rb, pJAK2 y pSTAT3, ni en los niveles totales de JAK2 y STAT3 cuando se sobreexpresó laforina y malina. Por lo tanto la inhibición mediada por el complejo laforina-malina no afecta a los pasos iniciales de esta ruta.

Resultados II

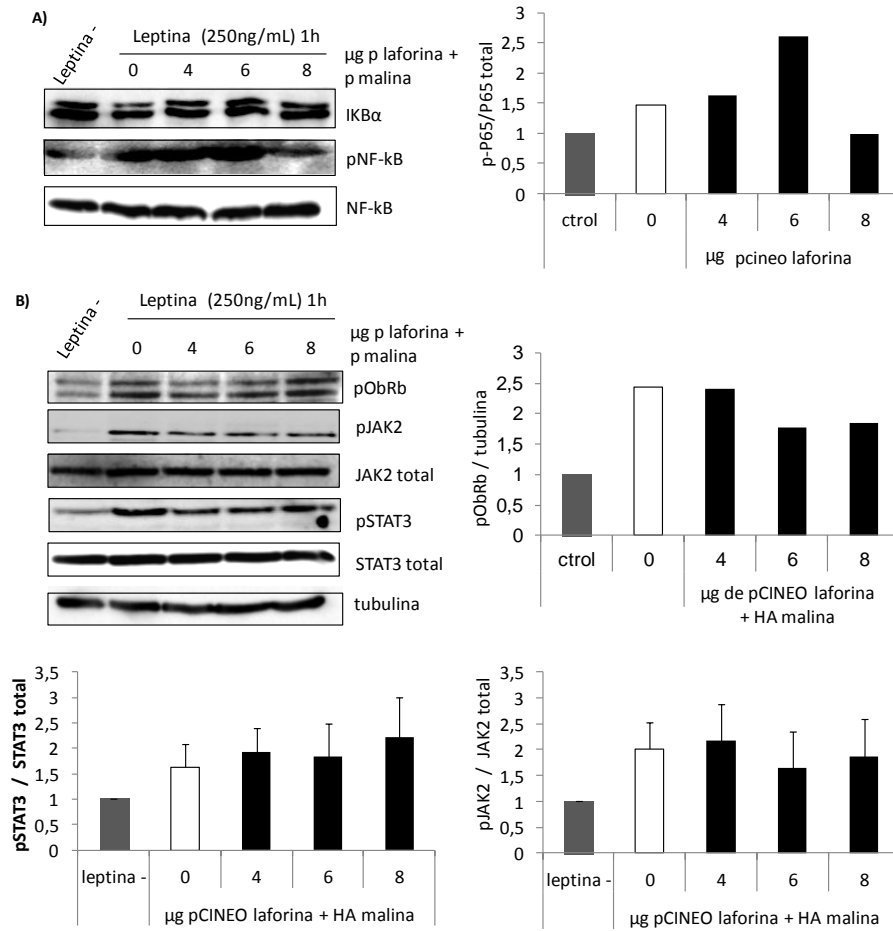


Figura 45. Efecto de la sobreexpresión de laforina y malina en la activación de las rutas JAK2/STAT3 y NF-κB. Células SH-SY5Y fueron transfectadas con el receptor de la leptina, pCINEO laforina y pCINA3-HA malina o un vector vacío, y se trataron con 250ng/mL de leptina durante 1h. La activación de cada ruta de señalización se ha evaluado detectando la forma fosforilada de: **A)** pNF-κB y **B)** pObRb, pJAK2 y pSTAT3 referida a la cantidad total de cada una de estas proteínas. La señal fue cuantificada con un aparato de quimioluminiscencia (ver apartado Material y Métodos).

Para confirmar la actividad represora del complejo laforina-malina en la expresión, mediada por leptina, de SOCS3, se analizó la regulación de la señalización por leptina en modelos animales que no expresan laforina, ratones *Epm2a*^{-/-} (Ganesh et al., 2002), comparada con ratones control.

2. El hipotálamo de ratones *Epm2a*^{-/-} presenta un incremento de marcadores de estrés de retículo endoplásmico y neuroinflamación.

Se ha descrito que el hipotálamo es altamente sensible a estrés de retículo endoplásmico y neuroinflamación y estos fenómenos pueden perjudicar a la vía de señalización mediada por leptina (Ozcan et al., 2009; Zhang et al., 2008).

Dado que en el laboratorio habíamos observado que los ratones *Epm2a*^{-/-}, presentan elevados niveles de marcadores de estrés de RE en hígado (Vernia et al., 2009a), analizamos si estas alteraciones también se producen en el sistema nervioso central, explicando así el fenotipo de hiperfagia observado en estos ratones (Vernia et al. 2011).

Para confirmar esta hipótesis inicialmente se estudió la expresión de marcadores de estrés de RE por *western blot* a partir de extractos de hipotálamo de ratones *Epm2a*^{-/-}, observándose un incremento de las proteínas Bip/grp78, ERO1 β y CHOP sugiriendo que los ratones *Epm2a*^{-/-} presentan estrés de RE también en hipotálamo (figura 46 A). Además se observó una menor expresión de I κ B α y elevados niveles de p-NF- κ B comparado con los ratones control (Figura 46 A), sugiriendo que existe neuroinflamación en el hipotálamo de ratones *Epm2a*^{-/-}.

En el hipotálamo, la ruta de NF- κ B media la inducción de la expresión de SOCS3, relacionando los fenómenos de estrés de RE y neuroinflamación con el fenotipo de obesidad inducida por la dieta, dado que SOCS3 es un inhibidor de la ruta JAK2/STAT3 dependiente de leptina (Zhang et al., 2008).

De acuerdo con el aumento observado en la activación de NF- κ B, se detectaron niveles elevados de la proteína SOCS3 en hipotálamo de ratones *Epm2a*^{-/-} (figura 46 A).

Resultados II

La expresión de SOCS3 se induce, también por la ruta JAK2/STAT3 en respuesta a leptina, por tanto se analizó el estado de activación de esta ruta en el hipotálamo de ratones *Epm2a*^{-/-}, valorando los niveles de las proteínas fosforiladas y activas, p-JAK y p-STAT3. Confirmando los resultados previos observados en las células SH-SY5Y, no se detectaron diferencias en los niveles de pJAK2 y pSTAT3 en relación a los ratones control (figura 46 A).

Por último, se realizó una PCR cuantitativa detectándose un aumento en los niveles de mRNA de CHOP, Bip/grp78 y SOCS3 en hipotálamo de ratones *Epm2a*^{-/-} (figura 46 B).

En resumen, en modelos animales que no expresan laforina se observa inducción de la expresión de marcadores de estrés de RE en el hipotálamo desencadenando la activación de la ruta proinflamatoria NF-κB que finalmente induce la expresión de SOCS3, proteína inhibidora de la señal de leptina. El aumento de la expresión de SOCS3 podría desencadenar resistencia a leptina en estos modelos, explicando así el fenotipo de hiperfagia observado en condiciones de dieta equilibrada (Vernia et al., 2011).

El aumento de la expresión de SOCS3 en ausencia de laforina, se correlaciona con los resultados obtenidos en los ensayos de luciferasa con células SH-SY5Y, donde la sobreexpresión de laforina y malina disminuía la inducción de la expresión de SOCS3. Estos resultados en conjunto sugieren que el complejo laforina-malina podría ser un regulador negativo de la ruta mediada por leptina, JAK2/STAT3.

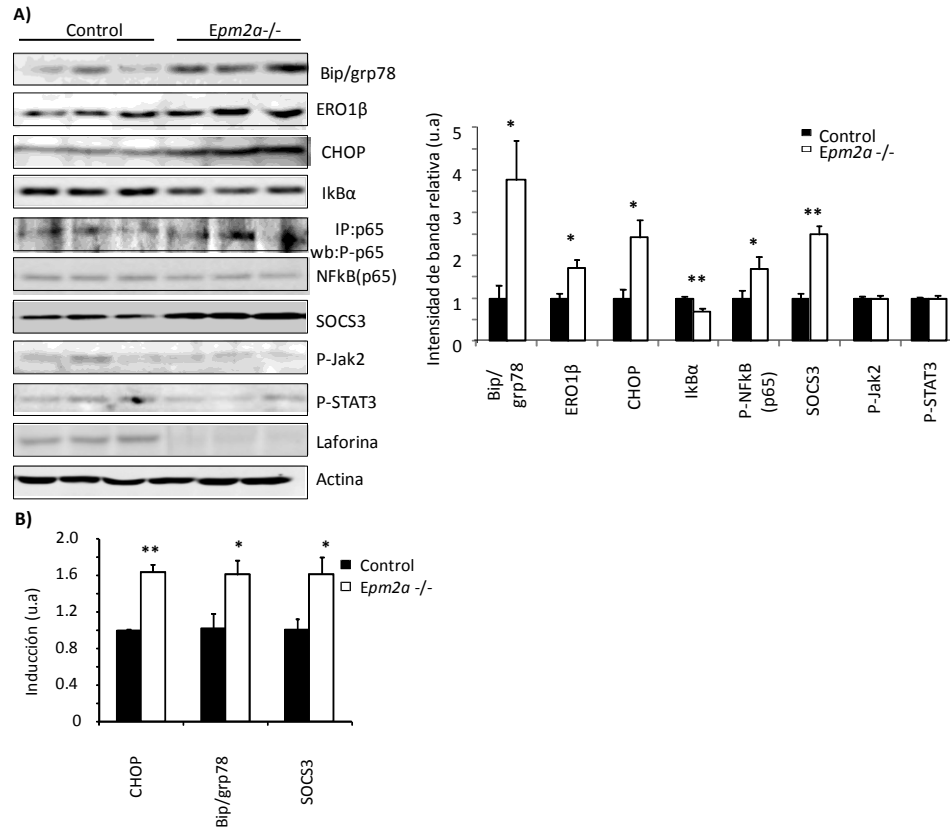


Figura 46. Análisis bioquímico del hipotálamo de ratones *Epm2a*^{-/-}. **A)** 30 μ g de extractos de hipotálamo de ratones control y *Epm2a*^{-/-}, fueron analizados por *Western blot* con los anticuerpos anti-CHOP, anti -PDI, anti-ERO1 β , anti-pNF- κ B, anti-NF- κ B, anti-I κ B α y anti-actina. A la derecha se muestra una representación de la intensidad de banda de cada una de las proteínas detectadas en relación a los niveles de actina. Los resultados corresponden a la media \pm SEM de cinco a seis experimentos independientes. **B)** Extractos de hipotálamo fueron analizados por qRT-PCR (apartado material y métodos) para estudiar la expresión de los genes BIP y CHOP y SOCS3. Los resultados para los ratones *Epm2a*^{-/-} (columnas blancas) se han representado como diferencias respecto a los ratones control (columnas negras) y cada muestra se ha correlacionado respecto a la expresión del gen GAPDH. Los valores corresponden a la media \pm SEM de cinco experimentos independientes. Significado estadístico: *p<0,05; **p<0,01.

3 Los ratones *Epm2a*^{-/-} son sensibles a la obesidad inducida por dieta grasa.

El estrés de RE se ha asociado con una reducción en la señalización mediada por leptina (Ozcan et al., 2009) y un incremento en la sensibilidad a obesidad inducida por dieta grasa (Scarpace and Zhang et al., 2009). Dado que los ratones *Epm2a*^{-/-} presenta estrés de RE en hígado e hipotálamo, se analizó si estos modelos son más sensibles a obesidad inducida por dieta grasa. Para ello se alimentaron ratones *Epm2a*^{-/-} de tres meses de edad durante catorce semanas con dieta grasa (42% de grasas) o equilibrada (dieta control) y se procedió del mismo modo con los ratones control. Después de cuatro semanas de adaptación a dieta grasa, se observó mayor ingesta de comida en los ratones *Epm2a*^{-/-} (hiperfagia) y en consecuencia mayor aumento de peso corporal (figura 47 A y B).

La hiperfagia puede reflejar alteraciones en la señalización de leptina en el hipotálamo, que comúnmente es compensada con hiperleptinemia, por lo que se cuantificaron los niveles de leptina en plasma de estos animales, detectándose mayores niveles de leptina plasmática en los ratones *Epm2a*^{-/-} alimentados con dieta equilibrada respecto a los animales control y siendo esta diferencia mucho mayor en ratones *Epm2a*^{-/-} alimentados con dieta grasa (Figura 47 C).

Estos resultados sugieren que en ausencia de laforina, los ratones presentan resistencia a la acción anorexigénica de la leptina y por tanto no se inhibe el apetito (hiperfagia). La ingesta continua de grasas produce un aumento en número y tamaño de las células adipocíticas productoras de leptina pudiendo explicar el fenotipo de hiperleptinemia.

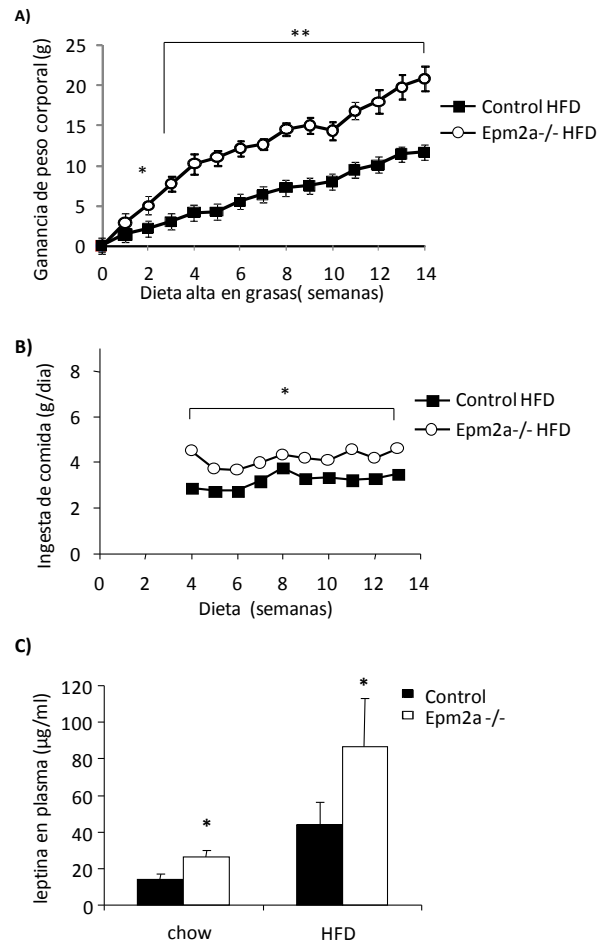


Figura 47. Los ratones *Epm2a*^{-/-} presentan hiperfagia y aumento de peso en condiciones de alimentación con dieta grasa. A) Ratones control y *Epm2a*^{-/-} fueron alimentados durante catorce semanas con dieta grasa y se determinó el peso corporal cada semana desde el inicio de esta dieta hasta la semana catorce. **B)** Ingesta de comida (g/día) en ratones control y *Epm2a*^{-/-}, desde la semana cuatro hasta la semana catorce alimentados con dieta grasa. **C)** Cuantificación de leptina en plasma (µg/ml) en ratones control (columnas negras) y *Epm2a*^{-/-} (columnas blancas), alimentados con dieta equilibrada (Chow) o dieta grasa (HFD). Los valores corresponden a la media \pm SEM de cinco a seis ratones por grupo. Significado estadístico de las diferencias observadas entre los ratones *Epm2a*^{-/-} y controles * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Resultados II

Para determinar si el elevado estrés de RE y activación de la vía mediada por NF- κ B observada en los ratones *Epm2a*^{-/-}, participan en la resistencia a leptina, analizamos la expresión de SOCS3 y marcadores de estrés de RE como CHOP y Bip/ grp78 en el hipotálamo de ratones *Epm2a*^{-/-} y ratones control alimentados con dieta grasa o equilibrada.

Como se esperaba, en estos ensayos de PCR cuantitativa se observó una inducción de la expresión de marcadores de ER (CHOP y Bip/grp78) en ratones controles alimentados con dieta grasa respecto de los controles alimentados con dieta equilibrada. Sin embargo la expresión de estos marcadores de ER en ratones *Epm2a*^{-/-} ya era elevada en condiciones de dieta estándar y no se observaron cambios cuando se alimentaron estos animales con dieta grasa.

Sorprendentemente, la expresión del inhibidor de la señal de leptina SOCS3, no se induce en ratones control cuando son alimentados con dieta grasa (figura 48). Sin embargo su expresión es elevada en ratones *Epm2a*^{-/-} alimentados con dieta equilibrada y aumenta en estos ratones alimentados con dieta grasa. Por tanto, los ratones *Epm2a*^{-/-} tendrán mayor predisposición a obesidad en condiciones de dieta grasa.

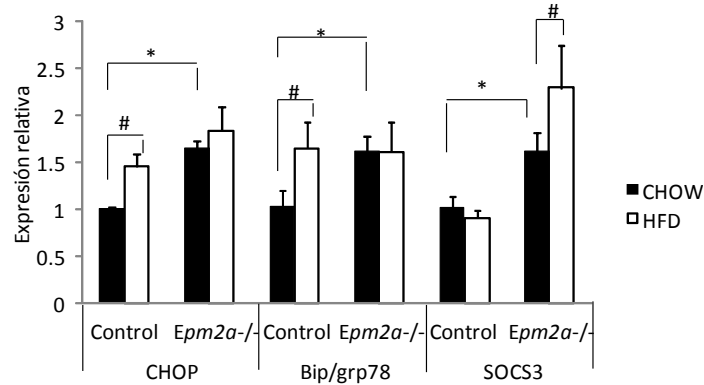


Figura 48. Inducción de la expresión de marcadores de estrés de RE y de SOCS3 en hipotálamo de ratones alimentados con dieta grasa. Extractos de hipotálamo ratones control y *Epm2a*^{-/-} fueron analizados por qRT-PCR (apartado material y métodos) para estudiar la expresión de los genes BIP, CHOP y SOCS3. Los resultados para los ratones alimentados con dieta dieta grasa (columnas blancas, HFD) se han representado como diferencias respecto a dieta equilibrada (columnas negras, chow) y cada muestra se ha correlacionado respecto a la expresión del gen GAPDH. Los valores corresponden a la media \pm SEM de cinco experimentos independientes. Estadística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. # Correlación entre dieta grasa y equilibrada. * Correlación entre *Epm2a*^{-/-} y control en dieta equilibrada.

En resumen, en los ratones *Epm2a*^{-/-} alimentados con dieta grasa de observa una mayor inducción de la expresión de SOCS3, confirmándose que en ausencia de laforina existe una desregulación de la señal mediada por leptina y en consecuencia estos modelos son sensibles a obesidad inducida por dieta grasa.

Recientemente se ha descrito que la resistencia a leptina en el hipotálamo es un factor que agrava las consecuencias metabólicas de una dieta grasa (Scarpace and Zhang et al., 2009).

Resultados II

Dado que en el presente trabajo se han detectado elevados niveles de marcadores de estrés de ER y marcadores proinflamatorios en el hígado de ratones *Epm2a*^{-/-} y resistencia a leptina, quisimos profundizar en el fenotipo hepático de estos animales.

4 Estudio del estado de esteatosis en los ratones *Epm2a*^{-/-} alimentados con dieta grasa.

Para estudiar la posible disfunción hepática de los ratones *Epm2a*^{-/-} como consecuencia de una dieta grasa, inicialmente se analizó el tamaño de hígado de estos animales alimentados con dieta grasa o equilibrada. Como se muestra en la figura 49 A y B, el hígado de los ratones *Epm2a*^{-/-} sometidos a dieta grasa presenta hepatomegalia (aumento del tamaño del hígado) respecto a los ratones control.

Para confirmar el estado de esteatosis hepática (hígado graso) de estos animales se realizó una tinción con hematoxilina-eosina y rojo de Nilo a partir de biopsias hepáticas de estos animales observándose una mayor acumulación de gotas lipídicas (Figura 49 C) y aumento de colesterol intrahepático en los ratones *Epm2a*^{-/-} alimentados con dieta grasa (figura 50 A y B).

Por último se analizó la funcionalidad hepática en estas condiciones de lipotoxicidad, detectándose un aumento de los niveles de transaminasas hepáticas (alanina aminotransaminasa y aspártico transaminasa) en plasma de ratones *Epm2a*^{-/-} (Figura 50 C). Estos resultados sugieren que la dieta grasa empeora la disfunción hepática de los ratones *Epm2a*^{-/-}.

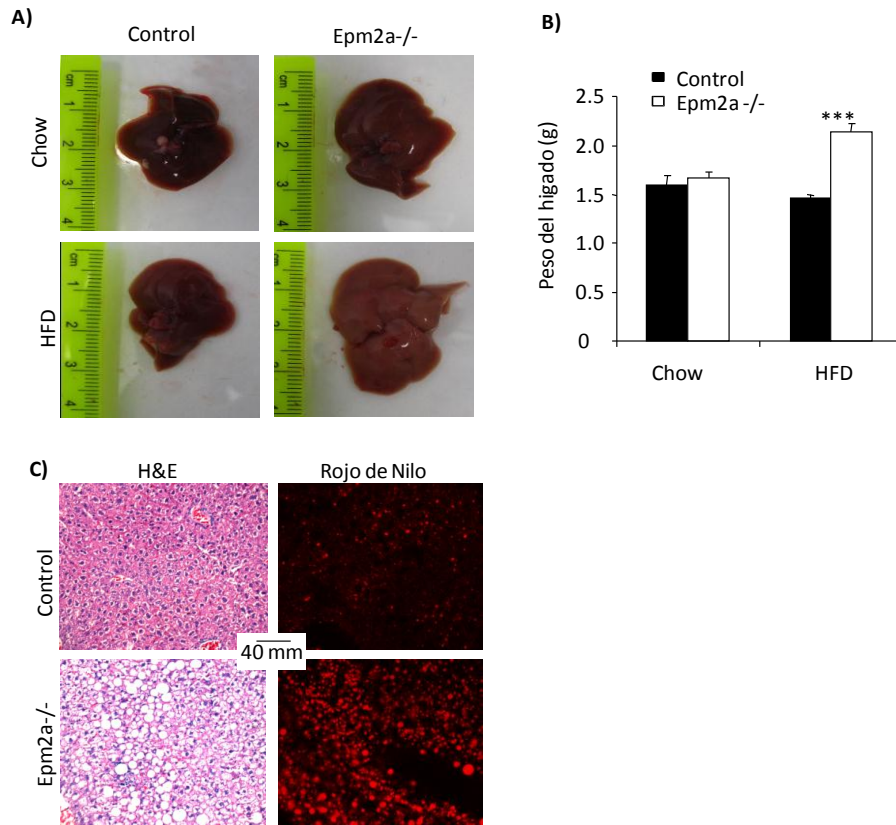


Figura 49. Los ratones *Epm2a*^{-/-} presentan hepatomegalia e hígado graso en condiciones de alimentación con dieta grasa. Análisis **A) del tamaño en milímetros y **B)** del peso en gramos del hígado de ratones *Epm2a*^{-/-} alimentados con dieta grasa (HFD) o equilibrada (chow), comparado con ratones control. Se observa hepatomegalia en ratones *Epm2a*^{-/-} alimentados con dieta grasa. **C)** Secciones de tejido de hígado fueron teñidas con hematoxilina-eosina y rojo de Nilo como se describe en el apartado “material y métodos” y se analizaron por microscopia confocal con 40 aumentos.**

Resultados II

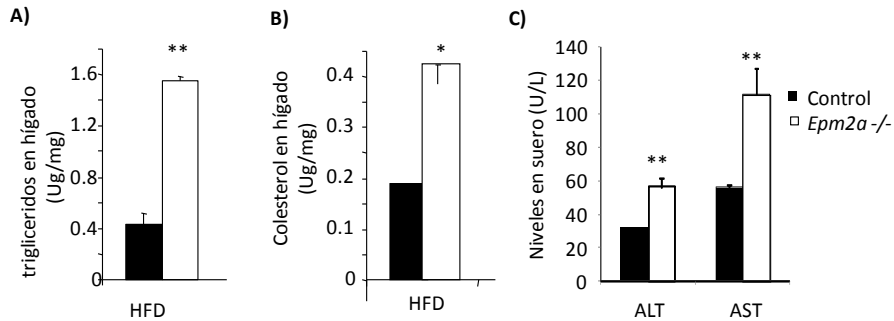


Figura 50. Contenido lipídico y actividad hepática en ratones *Epm2a*^{-/-} alimentados con dieta grasa. A) Medida del contenido de triglicéridos, B) colesterol en hígado y C) transaminasas en suero, en ratones control (columnas negras) y *Epm2a*^{-/-} (columnas blancas) alimentados con dieta grasa (HDF). Los valores corresponden a la media \pm SEM de cinco o seis ratones de cada grupo. Significado estadístico de la correlación entre ratones *Epm2a*^{-/-} y controles * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En conclusión los resultados obtenidos con la línea celular SH-SY5Y y en modelos animales, sugieren que el complejo laforina-malina es un regulador negativo de la señal de leptina. En ausencia de laforina (ratones *Epm2a*^{-/-}) se pierde esta regulación observándose un aumento en la expresión de SOCS3 y resistencia a leptina. Como consecuencia, se observa un fenotipo de hiperfagia, hiperleptinemia en plasma y sensibilidad a obesidad inducida por dieta grasa en estos ratones.

Estos resultados en conjunto implican al complejo laforina-malina en la regulación de la señal mediada por leptina, aunque por el momento desconocemos el mecanismo molecular de esta regulación.

RESULTADOS III

Recientemente, se ha demostrado que el complejo laforina-malina participa en la homeostasis del glucógeno ubicuitinando y favoreciendo la degradación por proteasoma de R5/PTG (una de las subunidades reguladoras de PP1 (Solaz-Fuster et al., 2008; Vernia et al., 2009b; Worby et al., 2008; Vilchez et al., 2007). Esta degradación de R5/PTG por el complejo laforina-malina está modulada por AMPK que fosforila a R5/PTG en la Ser8 acelerando su degradación (Vernia et al., 2009b).

En la presente tesis doctoral se ha confirmado que PIASy interacciona con el complejo laforina-malina aunque desconocemos cual puede ser el significado biológico de esta interacción, de modo que se investigó la posibilidad de que PIASy interaccionara también con otras proteínas relacionadas con este complejo. Reforzando esta hipótesis, estudios previos realizados en nuestro laboratorio indicaban una interacción por doble híbrido entre PIASy y R5/PTG.

Dado que se ha observado que AMPK participa en la homeostasis de glucógeno a través de R5/PTG y del complejo laforina-malina, investigamos si existe una interacción física entre PIASy y AMPK.

1. PIASy interacciona con AMPK.

Como se ha comentado en la introducción AMPK es un complejo trimérico formado por tres subunidades, la subunidad catalítica AMPK α (α 1 ó α 2) y las subunidades reguladoras AMPK β (β 1 ó β 2) y AMPK γ (γ 1, γ 2 ó γ 3) (Hardie et al., 2007).

Por tanto se analizaron las posibles interacciones entre PIASy y cada una de estas tres subunidades por separado.

1.1 Doble híbrido en levadura.

Utilizando el sistema de doble híbrido en levadura se cuantificó la interacción entre las distintas subunidades de AMPK y PIASy, empleando las construcciones GAD-PIASy y el resto de proteínas fusionadas a Lex A.

Resultados III

Este ensayo reveló la existencia de una interacción física entre PIASy y las subunidades $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ de AMPK pero no con la subunidad $\gamma 1$ (Figura 51)

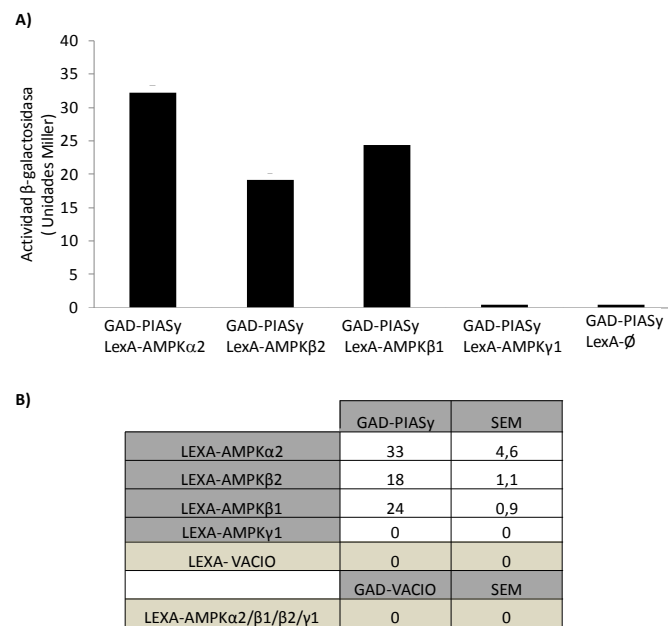


Figura 51. Medida de la actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) para cuantificar la interacción de PIASy con AMPK. La cepa CTY10.5d de *Saccharomyces cerevisiae* fue transformada con las combinaciones de plásmidos indicados en las abscisas de cada una de las gráficas. **A)** Interacción entre PIASy y AMPK $\alpha 2/\beta 2/\beta 1/\gamma 1$. **B)** Resumen de las medidas de las interacciones entre PIASy y las tres subunidades de AMPK en Unidades Miller. Los valores representados, para cada interacción, corresponden a la media \pm SEM de cuatro transformantes (desviación estándar < 15% en todos los casos).

1.2 Interacción de PIASy con AMPK en células de mamífero.

Estas interacciones se confirmaron por coimmunoprecipitación en células Hek293, sobreexpresando myc-AMPK $\alpha 2$ o myc-AMPK $\beta 2$ y FLAG-PIASy. La

inmunoprecipitación de FLAG-PIASy con anti FLAG permitió la coimmunoprecipitación de AMPK α 2 y β 2 (Figura 52 B y C), confirmándose que existe una interacción física entre PIASy y estas dos subunidades de AMPK.

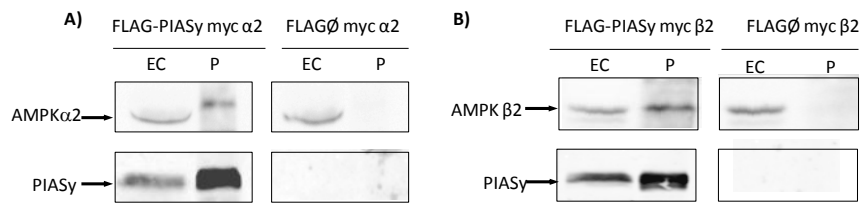


Figura 52. Ensayos de interacción de PIASy con AMPK en células de mamífero. Ensayo de coimmunoprecipitación (ver apartado Material y Métodos) en células cotransfectadas con pCMV myc-AMPK α 2 ó β 2 y pFLAG-PIASy y coimmunoprecipitadas con anti-FLAG. La detección de estas proteínas en el extracto crudo y en la fracción precipitada se hizo con anticuerpos específicos anti -AMPK α total, anti-pan AMPK β y anti-PIASy. **A)** Interacción PIASy y AMPK α 2. **B)** Interacción PIASy y AMPK β 2.

Para profundizar en la importancia fisiológica de estas interacciones, investigamos si AMPK es un sustrato de la actividad E3-SUMO ligasa de PIASy.

2. Regulación de AMPK por sumoilación mediada por PIASy.

2.1 Ensayos de sumoilación de AMPK.

En un estudio bioinformático preliminar, se observó que existen sitios consenso de sumoilación en los aminoácidos Lys62 y Lys141 de AMPK α 2 y en las Lys71 y Lys167 de AMPK β 2. Para comprobar esta hipótesis se

Resultados III

realizaron ensayos de sumoilación sobreexpresando el trímero de AMPK ($\alpha 2$, $\beta 2$, $\gamma 1$), SUMO2 y FLAG-PIASy o el mutante PIASy CI (catalíticamente inactivo).

Como se observa en la figura 53 B, la sobreexpresión de PIASy induce la sumoilación por SUMO2 de la subunidad AMPK $\beta 2$ en células Hek293, aunque no de la subunidad AMPK $\alpha 2$.

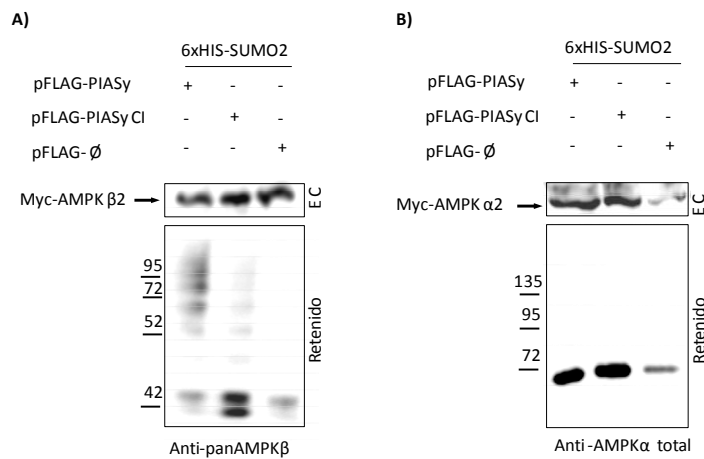


Figura 53. Ensayos de sumoilación de AMPK $\alpha 2$ y $\beta 2$, con SUMO2. En células Hek293 se sobreexpresaron 6xHis-SUMO2, pCMV-myc AMPK $\alpha 2/\beta 2/\gamma 1$ y pFLAG PIASy, o los controles pFLAG PIASy CI o pFLAG vacío. Las células fueron lisadas en presencia de cloruro de guanidinio 6M y las proteínas sumoiladas con la construcción 6xHis-SUMO2 se purificaron por cromatografía de afinidad en una resina de cobalto y se analizaron por *western blot* con anticuerpos anti-AMPK α total y anti-pan AMPK β . RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo. **A)** PIASy sumoila a AMPK $\beta 2$. **B)** PIASy no es capaz de sumoilar a AMPK $\alpha 2$.

Los ensayos de doble híbrido revelaban que PIASy interacciona tanto con la isoforma AMPK β 2 y con AMPK β 1. Dado que estas dos isoformas presentan un 70.3% de identidad, se analizó si PIASy podía sumoilar también a la isoforma AMPK β 1.

Sorprendentemente se observó que esta isoforma no se modifica por sumoilación en condiciones de sobreexpresión de PIASy y SUMO2 (Figura 54).

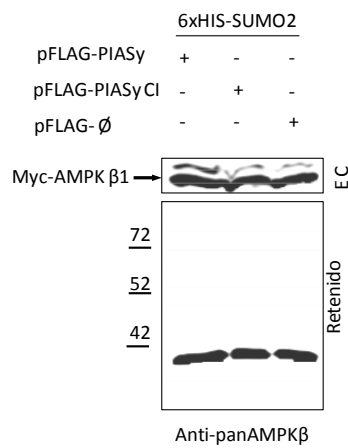


Figura 54. La isoforma AMPK β 1 no se sumoila por PIASy. En células Hek293 se sobreexpresaron 6xHis-SUMO2, pCMV-myc AMPK α 2/ β 1/ γ 1 y pFLAG PIASy, o los controles pFLAG PIASy CI o pFLAG vacio. Las células fueron lisadas en presencia de cloruro de guanidinio 6 M y las proteínas sumoiladas por esta construcción y retenidas en la resina de cobalto se analizaron por *western blot* con anticuerpo anti-panAMPK β . RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

Resultados III

Estos resultados sugieren que la sumoilación de AMPK β es un proceso altamente específico ya que sólo se modifica la isoforma AMPK β 2.

Para seguir investigando la especificidad de la sumoilación de AMPK, se analizó si se incorpora preferentemente un determinado miembro de la familia SUMO.

2.2 AMPK β 2 se modifica específicamente por SUMO2.

Se ha descrito que existen dos tipos de sumoilación con funciones diferentes dependiendo del miembro SUMO que se incorpore al sustrato. monosumoilaciones por SUMO1 o cadenas de polisumo mediadas por SUMO2/3 (Rytinki et al., 2009).

Para analizar si la sumoilación de AMPK β 2 se produce preferentemente por SUMO1 o por SUMO2/3, se realizaron ensayos de sumoilación, sobreexpresando la construcción 6xHIS SUMO1 en lugar de SUMO2.

Estos ensayos revelaron que la sumoilación de AMPK β 2 es específica para SUMO2 y no se modifica con SUMO1. Además se confirmó que la subunidad AMPK α 2 tampoco se sumoila por SUMO1 (Figura 55).

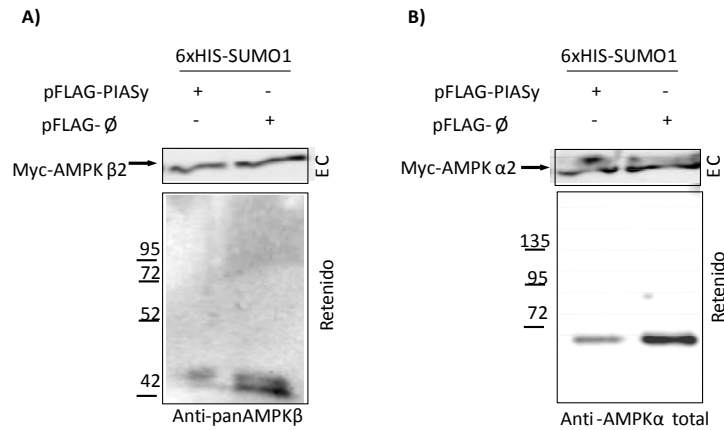


Figura 55. Ensayos de sumoilación de AMPK α 2 y β 2, con SUMO1. En células Hek293 se sobreexpresaron 6xHis-SUMO2, pCMV-myc AMPK α 2/ β 2/ γ 1 y pFLAG PIASy, o el control pFLAG vacío. Las células fueron lisadas en presencia de cloruro de guanidinio 6 M y las proteínas sumoiladas con la construcción 6xHis-SUMO1 se purificaron por cromatografía de afinidad en una resina de cobalto y se analizaron por *western blot* con anticuerpos anti-AMPK α total y anti-panAMPK β . RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo. **A)** La sumoilación de AMPK β 2 es exclusiva de SUMO2 y no se modifica por SUMO1. **B)** AMPK α 2 tampoco se modifica por SUMO1.

En resumen la sumoilación mediada por PIASy de AMPK β es específica para la isoforma β 2 y sólo se modifica por SUMO2, sugiriendo que PIASy incorpora una cadena de polisumo a la lisina o lisinas sumoiladas en la secuencia de AMPK β 2.

Para profundizar en el mecanismo molecular de esta modificación, quisimos caracterizar las lisinas sumoiladas en AMPK β 2.

3. Caracterización de las lisinas dianas de sumoilación en AMPK β 2.

Los estudios de predicción bioinformática con el programa “SUMOSp sumoylation sites prediction versión 2.0” indican la existencia de tres aminoácidos candidatos para sumoilarse en la secuencia de AMPK β 2, Lys71, Lys167 y Lys262. Curiosamente las tres lisinas están altamente conservadas en la secuencia de AMPK β 2 de diferentes especies sugiriendo que pueden ejercer una función importante para la proteína.

Para analizar si estos residuos son las dianas de sumoilación se realizó mutagénesis dirigida de estas lisinas a arginina (Yamamoto et al., 2003) (construcciones: myc-AMPK β 2 K71R, K167R y K262R) por la técnica de PCR de círculo rodante descrita en el apartado “Material y Métodos”.

De modo que si alguna de estas lisinas es la diana de sumoilación el correspondiente mutante dejaría de sumoilarse y serviría como herramienta para analizar la importancia fisiológica de esta modificación.

3.1 Ensayos de sumoilación de los mutantes de AMPK β 2.

Para comprobar si alguno de estos mutantes había perdido su capacidad para sumoilarse se realizaron ensayos de sumoilación por la técnica de TALON sobreexpresando estas construcciones.

Sorprendentemente, se observó una mayor sumoilación de los mutantes (K \rightarrow R) respecto a la proteína AMPK β 2 sin mutar, mostrando que ninguna de estas tres lisinas son las dianas de sumoilación (Figura 56).

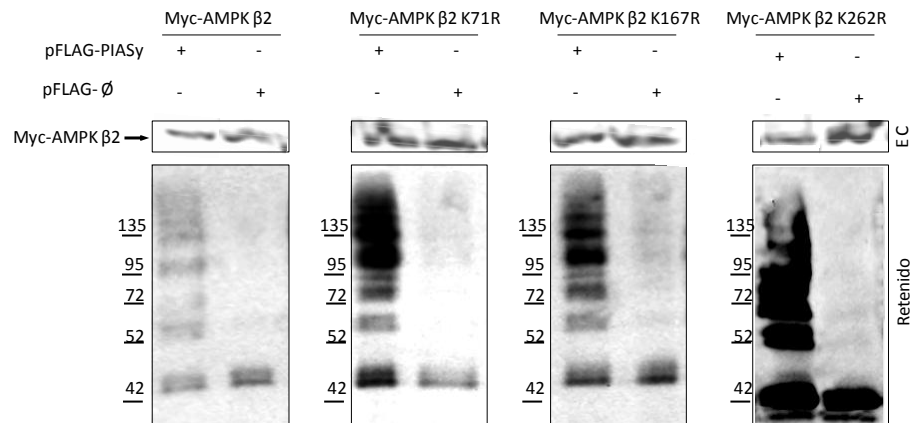


Figura 56. Ensayos de sumoilación de los mutantes de AMPK β 2. En células Hek293 se sobreexpresaron AMPK α 2/ γ 1, 6xHis-SUMO2, pFLAG PIASy o pFLAG vacío y las construcciones pCMV-myc AMPK β 2/ β 2 K71R/ β 2 K167R/ β 2 K262R. Las células fueron lisadas en presencia de cloruro de guanidinio 6M y las proteínas retenidas en la resina de cobalto se analizaron por *western blot* con anticuerpos anti-panAMPK β . RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo.

La secuencia de aminoácidos de AMPK β 2 presenta un total de 20 lisinas. Debido a que frecuentemente la modificación por SUMO ocurre en lisinas que no se encuentran en una secuencia consenso, cualquiera de ellas podría ser la lisina sumoilada, pudiendo haber más de una.

En estudios previos realizados en el laboratorio se habían construido dos formas truncadas de AMPK β 2: AMPK β 2 (1-185) y AMPK β 2 (186-270). Por tanto, para simplificar la búsqueda analizamos la sumoilación de estos fragmentos por separado.

Los ensayos de sumoilación con estas construcciones revelaron que el fragmento C-terminal de AMPK β 2 (186-270), se sumoila en condiciones de

Resultados III

sobreexpresión de PIASy y SUMO2 (Figura 57 A). Sugiriendo que la lisina diana de sumoilación podría estar en el fragmento 186-270 de AMPK β 2.

En cambio no pudimos confirmar si el fragmento N-terminal, AMPK β 2 (1-185), se sumoila ya que el anticuerpo anti-pan AMPK β no es capaz de reconocer esta región de la proteína (resultados no mostrados) y al utilizar un anticuerpo alternativo (anti myc) se genera un bandeo inespecífico que se observa tanto en el control negativo (vector vacío) como en el control positivo (sumoilación de AMPK β 2 completa) (Figura 57 B).

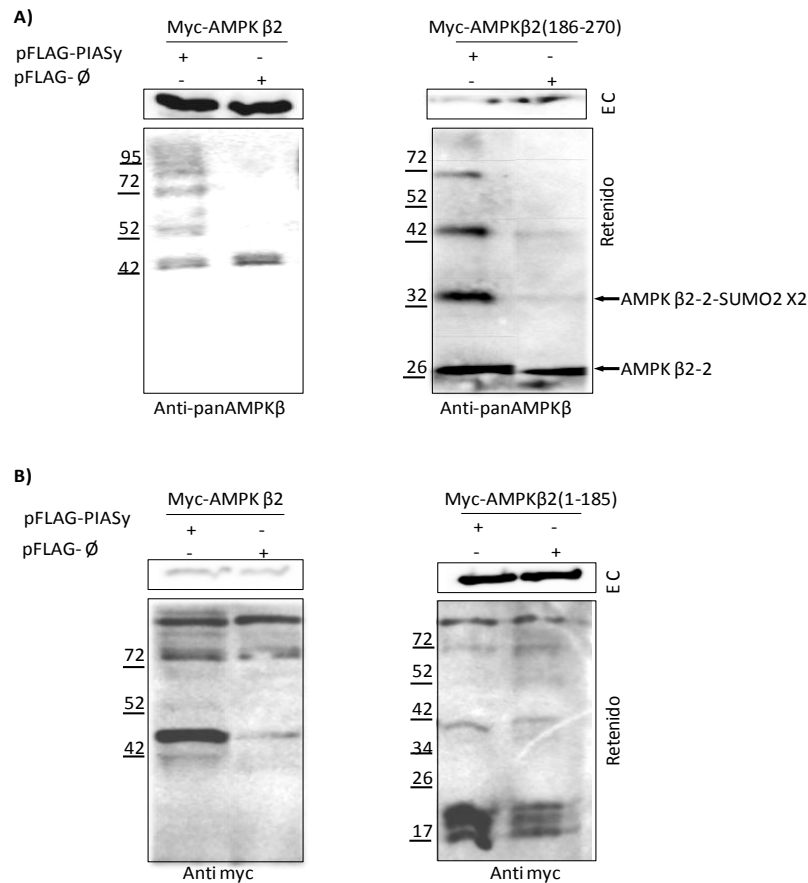


Figura 57. Ensayos de sumoilación de las formas truncadas de AMPK. Células Hek293 sobreexpresadas con 6xHis-SUMO2, pFLAG PIASy o pFLAG vacío y las construcciones pCMV-myc AMPK β 2 y los fragmentos AMPK β 2 (1-185)/ β 2 (186-270). Las proteínas retenidas en la resina de cobalto se analizaron por *western blot* con anticuerpos anti-panAMPK β o anti myc RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 μ g del extracto crudo. **A)** Ensayo de sumoilación del fragmento C-terminal AMPK β 2 (186-270). **B)** Ensayo de sumoilación del fragmento N-terminal AMPK β 2 (1-185).

herramienta para analizar la función de esta modificación postraduccional en AMPK β 2.

4. Función fisiológica de la sumoilación específica de AMPK β 2 por SUMO2.

Se ha descrito que la sumoilación modula la actividad y las interacciones proteína-proteína del sustrato. (Rytinki et al., 2009). Recientemente se han atribuido otras funciones como modificar la estabilidad del sustrato (Schimmel et al., 2008) o su localización subcelular (Sachdev et al., 2001).

Para profundizar en la importancia y función de la sumoilación de AMPK β 2, se analizó la actividad, estabilidad y localización subcelular de esta proteína en las mismas condiciones en las que se observó sumoilación.

Uno de los principales problemas que se nos han planteado en este estudio ha sido la identificación de la sumoilación de AMPK β 2 endógena, dado que en las diferentes líneas celulares de las que disponíamos en nuestro laboratorio, la expresión endógena de la isoforma AMPK β 2 es minoritaria respecto a la isoforma no sumoilable AMPK β 1 (Figura 59). Por tanto fue necesario realizar los ensayos de actividad, estabilidad y localización, en condiciones de sobreexpresión de la isoforma minoritaria AMPK β 2.

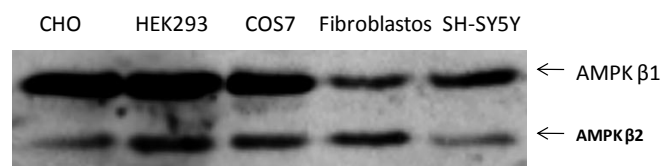


Figura 59. Estudio de los niveles endógenos de AMPK β 1 y AMPK β 2, en diferentes líneas celulares. Se crecieron las distintas líneas en el correspondiente medio de crecimiento y 24 h después se lisaron. 40 μ g del extracto total de proteínas se analizaron por western blot con anticuerpo anti-pan AMPK β .

4.1 Regulación de la actividad del complejo de AMPK por sumoilación de la subunidad AMPK β 2.

Para elucidar la función fisiológica de la sumoilación de AMPK β 2, se estudió la actividad del complejo de AMPK en condiciones de sobreexpresión de PIASy, SUMO2 y el mutante hipersumoilable. Para ello se midió la actividad del complejo AMPK por su capacidad para fosforilar a uno de sus sustratos, *Acetyl-CoA carboxylase* (ACC) y además se cuantificó el estado de fosforilación de la subunidad catalítica pAMPK α Thr172.

Cómo se observa en la figura 60 A, en células que expresan AMPK β 2 silvestre el tratamiento con fenformina aumenta la actividad del complejo AMPK (mayores niveles de pACC y pThr172). En cambio en las células en las que coexpresamos AMPK β 2 K262R hipersumoilable, Flag PIASy y SUMO2 (condiciones en las que forzamos la sumoilación) esta actividad ya es elevada en condiciones basales (Figura 60 A).

Con el fin de comprobar que el aumento observado en la activación de AMPK es debido a la sobreexpresión de PIASy y SUMO2 y no a la mutación introducida en AMPK β 2, realizamos el mismo experimento descrito en la figura 60 A comparando la activación de AMPK en condiciones de sobreexpresión de AMPK β 2 silvestre o el mutante AMPK β 2 K262R (Figura 60 B). En este ensayo se observó que la activación de AMPK es la misma en ambas situaciones, confirmándose que es la sobreexpresión de PIASy y SUMO2, condiciones favorables para la sumoilación de AMPK β 2, favorece la activación del complejo AMPK.

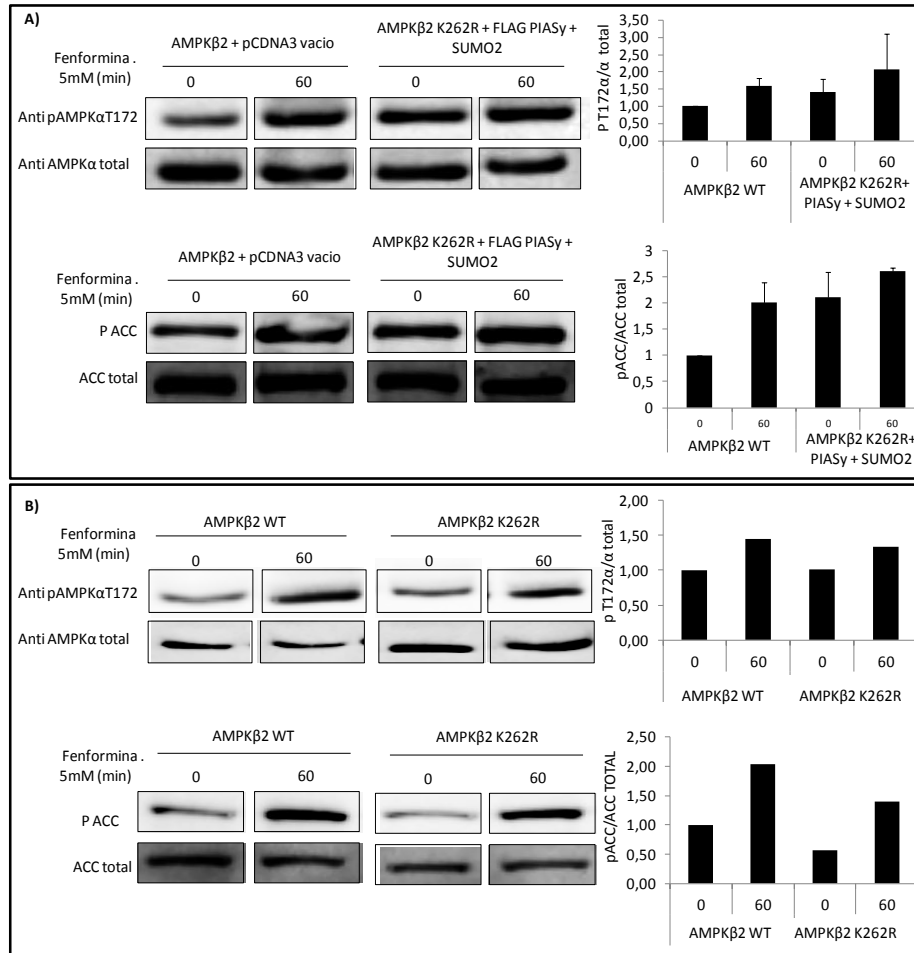


Figura 60. Actividad de AMPK en condiciones de sumoilación de AMPKβ2. Las células Hek293 fueron transfectadas con pCMV-myc AMPKβ2 K262R, FLAG PIASy y SUMO2 o pCMV-myc AMPKβ2 y un vector vacio y fueron tratadas con fenformina 5mM, 1 h. La actividad de AMPK fue valorada por *western blot* con anti-pαThr172 y anti-pACC. La señal se cuantificó y relativizó respecto AMPK α total y ACC total. **A)** Actividad de AMPK en condiciones favorables para la sumoilación de la subunidad AMPKβ2. **B)** Activación de AMPK sobreexpresando el mutante AMPKβ K262R o la proteína silvestre.

En resumen, estos resultados sugieren que la activación de AMPK podría regularse por sumoilación en la subunidad AMPK β 2. Sin embargo desconocemos el mecanismo molecular de este proceso. Una posible hipótesis es que la sumoilación de AMPK β 2 podría forzar un cambio conformacional en el trímero de AMPK, quedando más accesible la Thr172 de la subunidad catalítica y favoreciendo su fosforilación, o por contra impidiendo el acceso de las fosfatasas encargadas de revertir el proceso, de modo que la Thr172 permanecería fosforilada y AMPK activa.

4.2 Efecto de la sumoilación en la estabilidad de de AMPK β 2.

Se ha descrito que la sumoilación de tipo SUMO2/3 puede competir con la ubiquitinación o en otros casos potenciarla modificando la estabilidad de la proteína (Schimmel et al., 2008, Ulrich et al., 2005).

Para comprobar el efecto de la sumoilación sobre la estabilidad de AMPK β 2, las células Hek293 fueron tratadas con cicloheximida (agente químico que inhibe la síntesis de proteínas pero no su degradación), en condiciones de sobreexpresión de PIASy y SUMO2.

En estos ensayos se observó que a las ocho horas de tratamiento con cicloheximida AMPK β 2 comienza a degradarse observándose una disminución de los niveles totales de ésta, sin embargo la vida media de la proteína no cambió en condiciones de sobreexpresión de PIASy y SUMO2 (Figura 61).

Este resultado sugiere que la sumoilación de AMPK β 2 no modifica su estabilidad proteica.

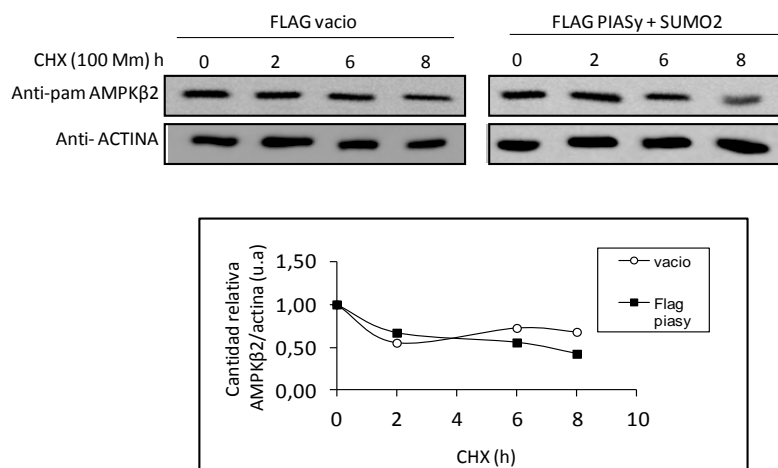


Figura 61. La sumoilación no acelera la degradación de AMPKβ2. En células Hek293 se sobreexpresaron las construcciones myc-AMPKα2/β2/γ1, SUMO2 y FLAG-PIASy o un plásmido vacio. 24 h después de la transfección se trataron las células con cicloheximida (100 μM) y se analizó por *western blot* la expresión de la subunidad AMPKβ2, a los tiempos indicados y hasta un máximo de 8 h. La cantidad total de AMPKβ2 se cuantificó y relativizó respecto a actina.

4.3 Localización subcelular de AMPKβ2 en condiciones de sumoilación.

Para analizar si la sumoilación de AMPKβ2 modula su localización subcelular, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal (detallados en el apartado "Material y Métodos").

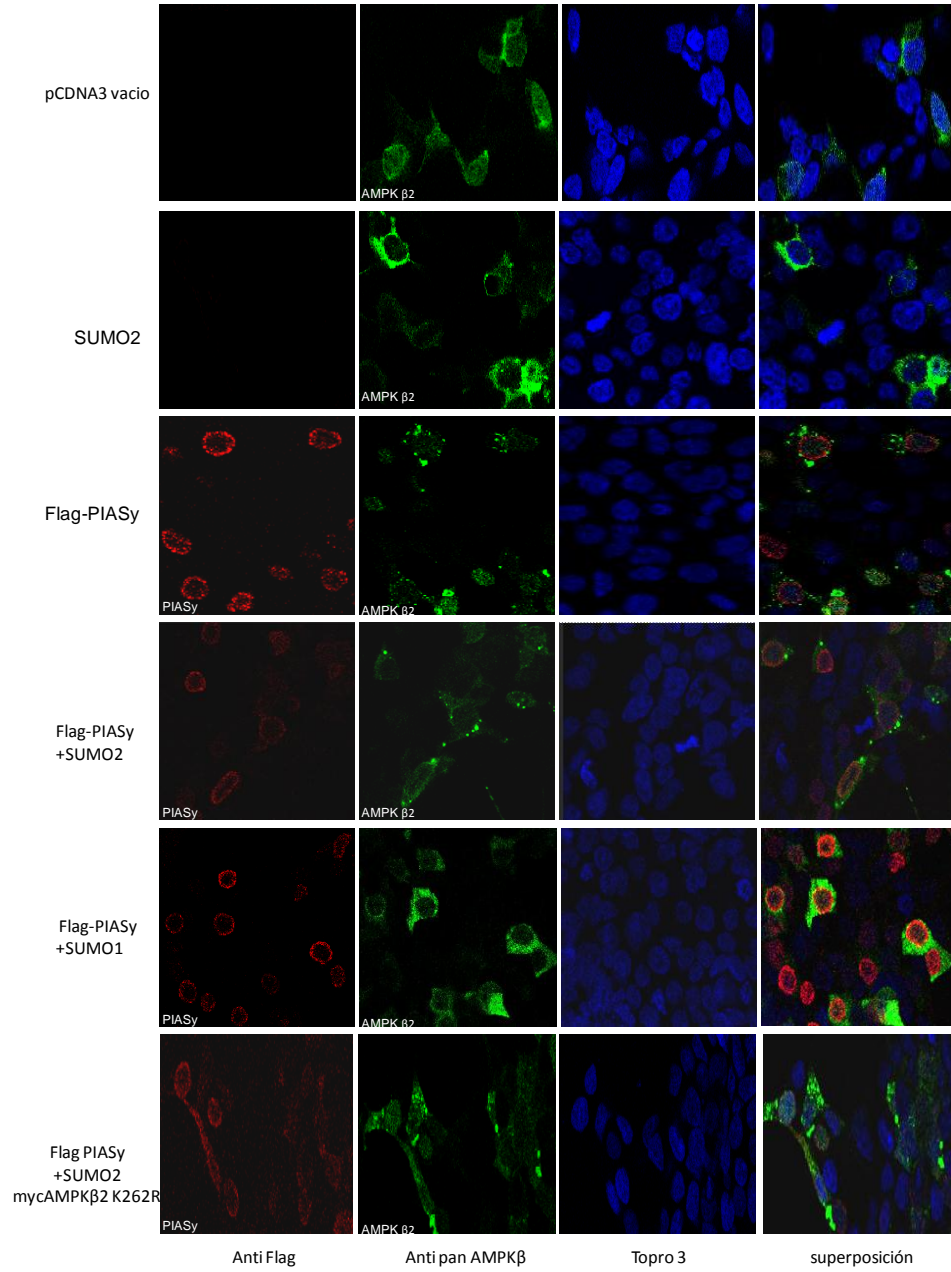
Como se observa en la figura 62, la sobreexpresión de AMPKβ2 (verde) resultó en una distribución con patrón punteado de la proteína en el citoplasma. En este ensayo, se confirmó que PIASy (rojo) se localiza en el núcleo. Además, la coexpresión de FLAG-PIASy y SUMO2 produce la agregación de AMPKβ2, que deja de tener un patrón punteado y se distribuye en forma de granos localizados mayoritariamente en la cara externa del núcleo.

Resultados III

Para investigar la importancia de estos agregados, se cuantificó el número de células que presentaban una distribución granular de AMPK β 2, respecto al total de células y en diferentes condiciones.

Como se muestra en la gráfica de la figura 62 B, la agregación de AMPK β 2 aumentó cuando se sobreexpresó PIASy y SUMO2, tanto en presencia de AMPK β 2 silvestre o del mutante AMPK β 2 K262R. La sustitución de SUMO2 por SUMO1 redujo el número de agregados de AMPK β 2 a la mitad, confirmándose que AMPK β 2 se modifica sólo por SUMO2 y no por SUMO1.

El cambio en el número de agregados también se observó cuando solo se sobreexpresaba PIASy, quizás debido a que las células expresan suficientes niveles de SUMO2 endógeno.



Resultados III

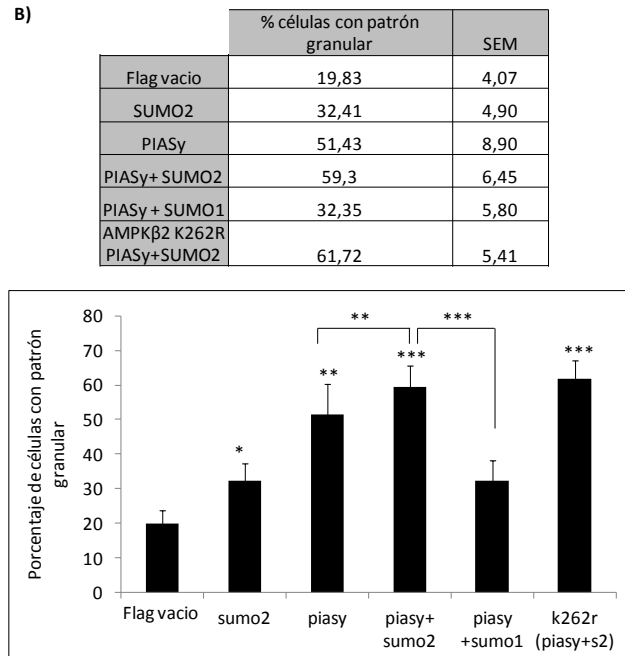


Figura 62. La sumoilación de AMPKβ2 induce la formación de agregados en el citoplasma. A) Células Hek293 fueron transfectadas con las construcciones pCMV myc-AMPKα2/β2/γ1 o el mutante myc-AMPKβ2 K262R y los plásmidos indicados en la parte izquierda de la figura. La inmunofluorescencia se realizó con los anticuerpos primarios anti myc y anti PIASy, en combinación con los anticuerpos secundarios *Texas red* (anti-ratón, excitación máxima a 543 nm) y Alexa-fluor 488 (anti-conejo, excitación máxima a 488 nm), respectivamente y la tinción de núcleos con la sonda Topro 3 (excitación máxima a 600 nm). **B)** Cuantificación del porcentaje de células con agregados ricos en AMPKβ2 respecto al total de células que expresan AMPKβ2. Los resultados mostrados representan la media de tres experimentos independientes. La significación estadística se ha realizado respecto al control con un vector vacío empleando la prueba T: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0.001.

Por último se analizó si estos agregados de AMPK β 2 colocalizan con SUMO2. Se observó que AMPK β 2 (rojo) y SUMO2 (verde) colocalizan en los agregados citoplasmáticos (amarillo) y no cuando AMPK β 2 se distribuye con un patrón punteado por todo el citoplasma (Figura 63), sugiriendo que la sumoilación promueve la formación de agregados de AMPK β 2 en el citoplasma.

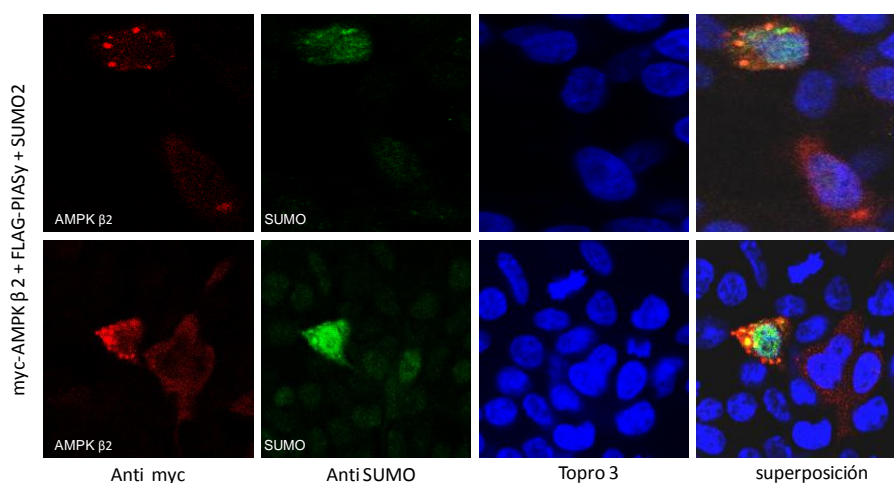


Figura 63. Colocalización de SUMO2 y AMPK β 2. Células Hek293 fueron transfectadas con las construcciones pCMV HA AMPK α 2/ γ 1, pCMV myc AMPK β 2, FLAG-PIASy y SUMO2. La inmunofluorescencia se realizó con los anticuerpos anti SUMO2/3 y anti myc combinados con los anticuerpos secundarios Alexa-fluor 488 (anti-conejo, excitación máxima a 488nm) y Texas Red (anti-ratón, excitación máxima a 543 nm), respectivamente y la tinción de núcleos con la sonda Topro 3 (excitación máxima a 600 nm).

En resumen, PIASy media la sumoilación de AMPK β 2 por SUMO2, modulando su localización subcelular y la actividad del trímero de AMPK, aunque no su estabilidad.

5. Regulación de PIASy por fosforilación.

En los experimentos con fosfatasa λ (descritos en el apartado “Resultados I”) se observó que PIASy está fosforilada en células de mamífero. Para profundizar en el estado de fosforilación de PIASy se procedió a la caracterización de los aminoácidos susceptibles de ser fosforilados en la secuencia de PIASy.

En el presente trabajo también se ha observado que PIASy interacciona con la subunidad catalítica AMPK α 2, sugiriendo que PIASy podría ser un sustrato para la actividad quinasa de AMPK α .

Reforzando esta hipótesis, en un estudio bioinformático se identificó la existencia de sitios consenso de fosforilación por AMPK en la secuencia de PIASy (Figura 64).

A la vista de estos resultados analizamos también si AMPK podía modular la actividad de PIASy mediante su fosforilación.

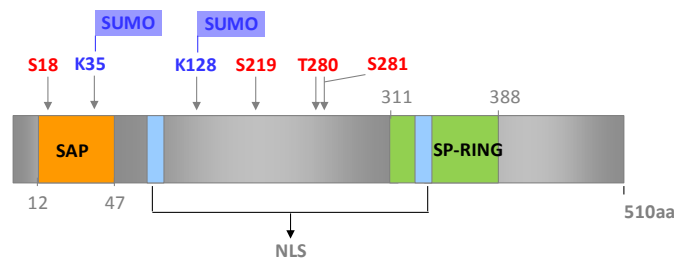


Figura 64. Esquema de los sitios consenso de fosforilación por AMPK en la secuencia de PIASy. Existen cuatro sitios que por análisis bioinformático podrían ser fosforilados por AMPK. Estos sitios se han marcado en rojo. Además, dos sitios de sumoilación marcados en azul.

5.1 Caracterización de aminoácidos fosforilados en PIASy.

Para confirmar el estado de fosforilación de PIASy e identificar el residuo o residuos fosforilados, células Hek293 fueron transfectadas con PIASy fusionada a un epítipo de polihistidinas (HA-8xHIS-PIASy) que permitió la purificación de la proteína en columnas de níquel y cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) (Figura 65). Las células fueron tratadas con fenformina, antes de la purificación, con la finalidad de enriquecer fosforilaciones mediadas por AMPK.

Resultados III

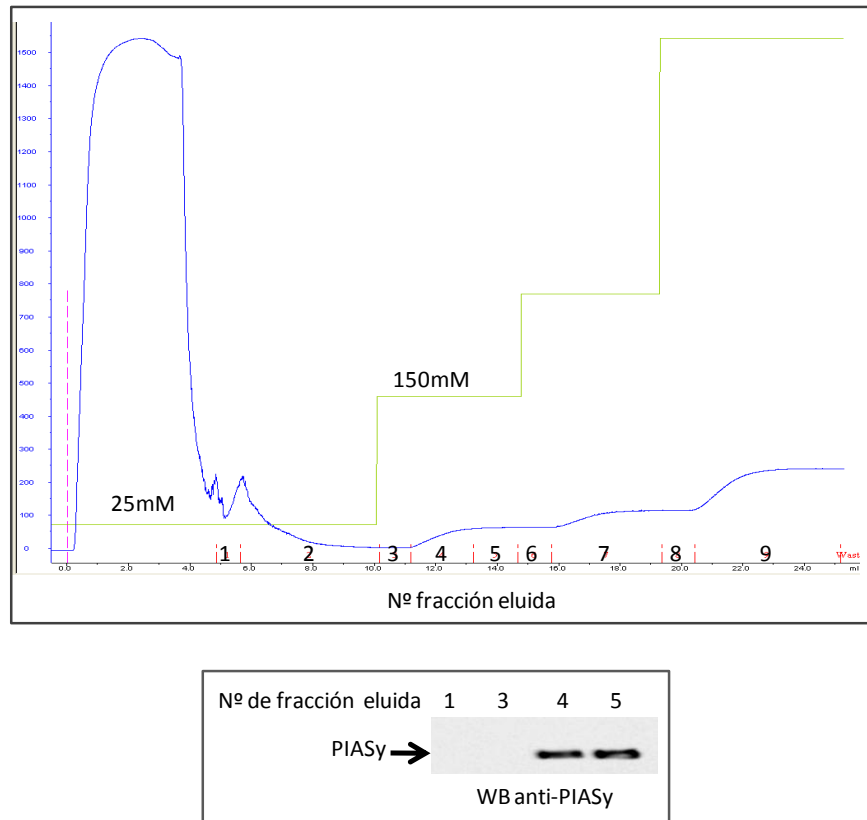
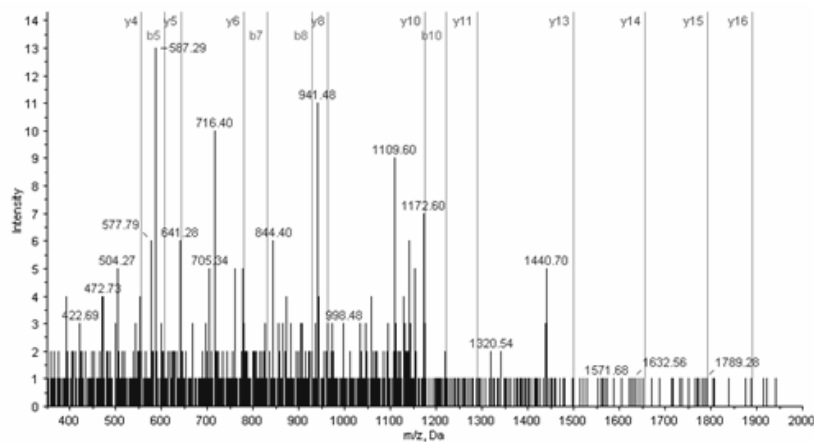


Figura 65. Espectro de la purificación de PIASy. Células Hek293 se transfectaron con la construcción HA-8XHIS-PIASy y 24 h después se trataron con 5mM de fenformina durante 1 h. Posteriormente se purificó la proteína por cromatografía de afinidad en columnas de níquel (ver apartado “Material y Métodos”). La elución se realizó a concentraciones crecientes de imidazol cuyo gradiente está representado en la línea de color verde. Las fracciones se analizaron por *western blot* con anticuerpo anti PIASy, observándose la elución de la proteína en las fracciones 4 y 5 (150 mM Imidazol).

La muestra obtenida de las fracciones 4 y 5 fue posteriormente digerida con tripsina y analizada por cromatografía líquida y espectrometría de masas en el servicio de proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia. En este análisis se identificó la fosforilación en el aminoácido Ser71 de PIASy, no identificada hasta el momento (Figura 66).



Ser-71

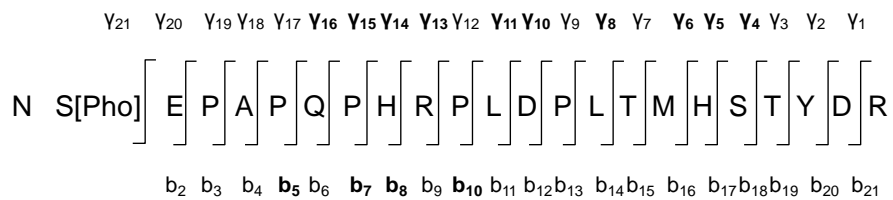


Figura 66. Resultados obtenidos por espectrometría de masas revelaron que el residuo Ser71 de PIASy está fosforilado.

A pesar de haber realizado la purificación en células tratadas con fenformina para favorecer la actividad de AMPK, el residuo Ser71 no corresponde a ninguno de los sitios consenso de fosforilación por AMPK presentes en la secuencia de PIASy (Figura 64). Esta observación no descarta que sea AMPK la quinasa que fosforila el residuo Ser71 de PIASy, pero también podría ser otra quinasa. Por tanto decidimos investigar cual es la quinasa implicada en esta fosforilación.

5.2 Búsqueda de la quinasa implicada en la fosforilación de PIASy.

En un estudio bioinformático preliminar empleando el método “*NetPhosK without ESS filtering*” se predijo la fosforilación de la Ser71 por las quinasas PKA y CDK1 con más de un 50% de probabilidad. Además, en el presente trabajo se ha observado la interacción física entre PIASy y la subunidad catalítica AMPK α 2.

Para comprobar si alguna de estas tres quinasas es la responsable de la fosforilación del residuo Ser71 de PIASy se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro*. Inicialmente se construyó el correspondiente mutante a alanina (S71A), incapaz de fosforilarse en este aminoácido.

Las proteínas PIASy y PIASy S71A fusionadas a GST se purificarán a partir de su expresión en la cepa BL21 RIL de E. Coli (como se describe en el apartado “Material y Métodos”) y posteriormente se digirieron con *PreScission protease* para eliminar la etiqueta de GST.

Con estas proteínas purificadas se realizaron los correspondientes ensayos de fosforilación *in vitro*, utilizando las quinasas CDK1, PKA y AMPK recombinante de origen comercial y ATP marcado radiactivamente con ^{32}P . De modo que si alguna de estas quinasas es la encargada de fosforilar al aminoácido Ser71 de PIASy, no se observaría marca radiactiva en el mutante S71A y sí en la forma no mutada de PIASy.

Los controles positivos para estos ensayos fueron ACC para AMPK (Kudo et al., 1996) e YPI para PKA, dos sustratos conocidos para estas quinasas. La mezcla comercial de CDK1 contenía ciclina B que sirvió como control

positivo de la reacción. En todos los ensayos se utilizó GST purificada de bacteria como control negativo, ya que no se ha descrito que ninguna de estas tres quinasas la fosforile de manera eficiente.

Estos ensayos revelaron que AMPK y PKA no son capaces de fosforilar *in vitro* a PIASy, pero sí a los correspondientes controles (ACC e YPI respectivamente) (Figura 67 A y B). Sin embargo no se pudo concluir ningún resultado con CDK1 debido a que esta quinasa cataliza una reacción intramolecular fosforilandose a sí misma y el tamaño de esta proteína es el mismo que el de PIASy por lo que enmascara el resultado (Figura 67 C).

Resultados III

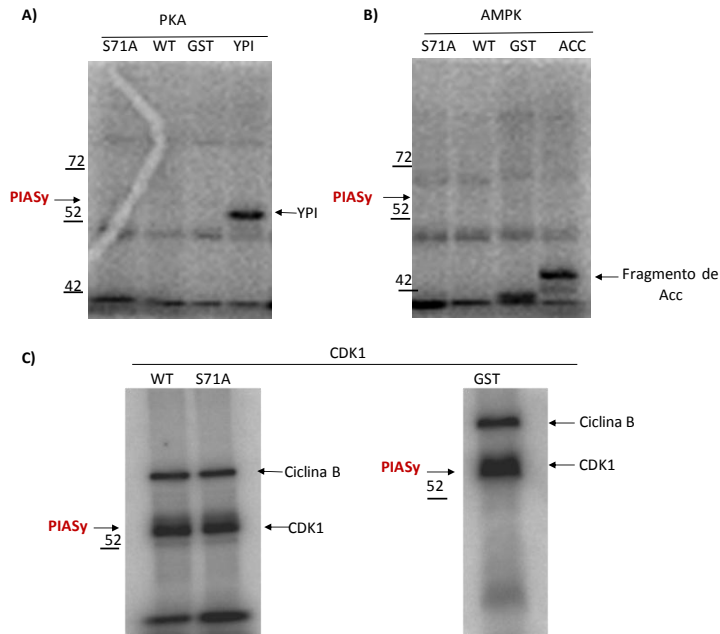


Figura 67. Ensayos de fosforilación *in vitro* por las quinasas AMPK, PKA y CDK1: Se utilizaron 6 μ L de las proteínas purificadas PIASy y PIASy S71A junto con 10 mU de AMPK, PKA y CDK1 y 2,5 μ ci/ μ L de γ ATP 32 P (apartado “Material y Métodos”). Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y autorradigrafía. **A)** PKA. **B)** AMPK. **C)** CDK1.

En resumen, AMPK no participa en la fosforilación *in vitro* de PIASy a pesar de existir una interacción física entre ambas proteínas. Sin embargo, estos ensayos han permitido identificar la fosforilación en el aminoácido Ser71 de PIASy.

Sorprendentemente la Ser71 está conservada en la secuencia de PIASy de diferentes especies, sugiriendo que puede tratarse de un aminoácido importante para la estructura o actividad de la proteína.

Por tanto quisimos investigar la importancia de la fosforilación en Ser71 para la actividad de PIASy.

5.3 Función de la fosforilación del residuo Ser71 en la actividad de PIASy.

5.3.1 Función de la fosforilación del residuo Ser71 en la actividad de PIASy como represor transcripcional.

En la presente tesis doctoral se ha observado que PIASy es un represor de las rutas de señalización NF- κ B y JAK2/STAT3.

Para estudiar la importancia de la fosforilación en el aminoácido Ser71 de PIASy se cuantificó la actividad de los mutantes fosfomiméticos sobre estas rutas comparada con la actividad de la proteína sin mutar (PIASy WT).

A) Actividad de PIASy sobre la ruta de NF- κ B.

En un ensayo inicial se transfectaron células Hek293 con la construcción pNF- κ B-lucifera y myc-PIASy o los mutantes myc-PIASy S71A/S71D.

En estos ensayos se observó que los mutantes ensayados presentaban la misma capacidad para inhibir la transcripción de NF- κ B sugiriendo que la fosforilación en Ser71 es prescindible para modular la actividad de PIASy sobre esta ruta (Figura 68).

Resultados III

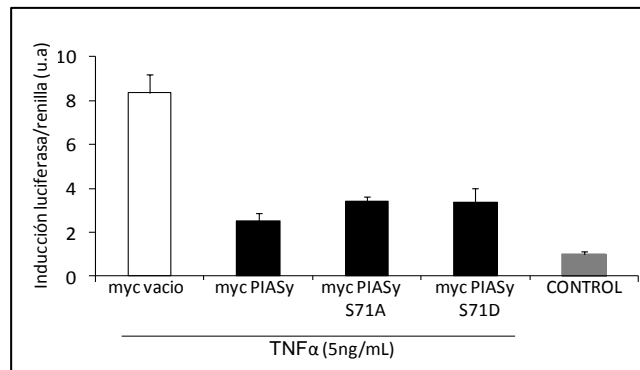


Figura 68. La fosforilación en Ser71 no es necesaria para la actividad represora de PIASy sobre la ruta NF- κ B. Ensayo luciferasa en células Hek293 transfectadas con la construcción pNF- κ B-luciferasa y 750 ng de pCMV myc-PIASy WT/ S71A /S71D o un vector vacío (pCMV myc). 24 h después de la transfección las células fueron tratadas con TNF α (5 ng/mL) durante 4 h observándose la inducción de la expresión de la luciferasa. La sobreexpresión de PIASy y de los mutantes fosfomiméticos resultó en una represión de la transcripción del gen de la luciferasa dependiente de NF- κ B. Los resultados se representan como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Posteriormente, se analizó la actividad de los mutantes en la ruta de señalización por leptina JAK2/STAT3.

B) Actividad de PIASy sobre la ruta de JAK2/STAT3.

Células Hek293 se sobreexpresaron con la construcción pSOCS3-luciferasa, y cantidades crecientes de myc PIASy o los mutantes S71A y S71D. Sorprendentemente la actividad represora de PIASy S71A (mutante no fosforilable) es menor respecto al mutante PIASy S71D y a la proteína sin mutar (PIASy wt), sugiriendo que la fosforilación en Ser71 de PIASy

promueve la actividad represora de PIASy sobre la ruta JAK2/STAT3 (Figura 69).

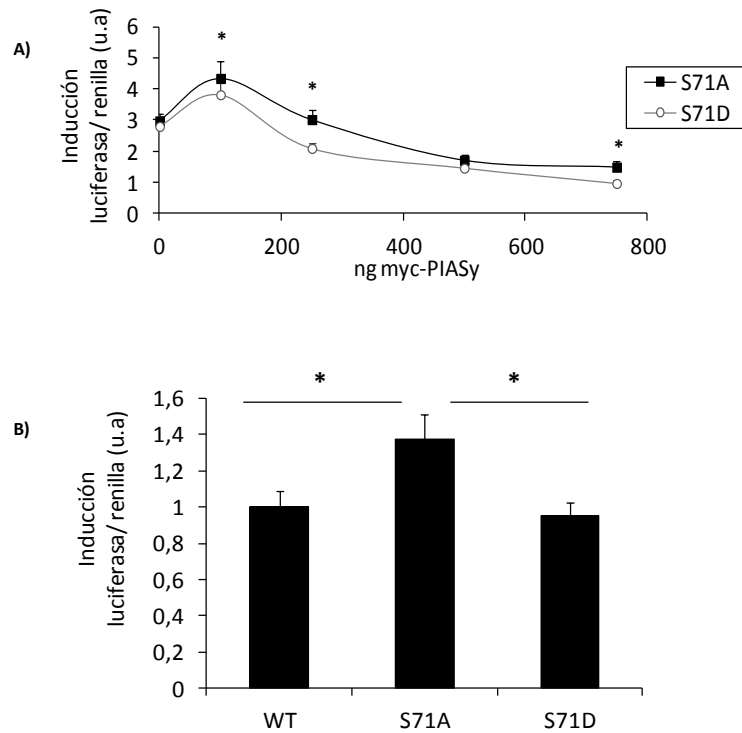


Figura 69. La fosforilación en el residuo Ser71 promueve la actividad represora de PIASy en la ruta de señalización inducida por leptina JAK2/STAT3. Células Hek293 se transfectaron con la construcción p-SOCS3-luciferasa, pObRb y las construcciones pCMV myc-PIASy S71A o myc-PIASy S71D en cantidades crecientes **A)** 24 h después de la transfección se trataron las células con 250 ng/mL de leptina, durante 16 h. En **B)** se resumen los resultados obtenidos con 250 ng de los correspondientes plásmidos. Los resultados de actividad luciferasa se han representado como media \pm SEM de seis experimentos independientes y la comparación estadística entre grupos se realizó utilizando el valor t de Student. * $p < 0,05$.

En resumen, la fosforilación de PIASy en el aminoácido Ser71 promueve su actividad como represor de la señalización dependiente de leptina JAK2/STAT3, aunque hasta la fecha desconocemos el mecanismo molecular de este proceso ni la quinasa implicada en esta fosforilación de PIASy.

En este contexto se ha descrito, que las proteínas PIAS son reguladores negativos de la actividad STAT, pero se desconoce el mecanismo exacto de esta actividad y se ha propuesto que pueden actuar impidiendo la unión a STAT al ADN o reclutando corepresores de la transcripción como HDAC (histonas deacetilasas) (Shuai and Liu et al., 2005). Por tanto la fosforilación de PIASy en Ser71 podría favorecer su interacción con STAT3 impidiendo que ejerza su función en el núcleo, o en otro sentido, podría mediar la interacción de PIASy con un correpresor de la transcripción.

5.3.2 Función de la fosforilación del residuo Ser71 en la actividad E3-SUMO ligasa de PIASy.

Para profundizar en la importancia de la fosforilación en el aminoácido Ser71 de PIASy, analizamos la capacidad del mutante PIASy S71A para sumoilar uno de los sustratos de PIASy, p53.

En estos ensayos se observó que la eficiencia de sumoilación de p53 es menor cuando sobreexpresamos el mutante PIASy S71A en lugar de PIASy silvestre, aunque mayor que en condiciones de sobreexpresión del mutante catalíticamente inactivo de PIASy (Figura 70). Por tanto la fosforilación de PIASy en el residuo Ser71, no es imprescindible para su actividad E3-SUMO ligasa sobre p53 pero favorece esta actividad.

En resumen, los ensayos de luciferasa con el mutante PIASy S71A junto con el ensayo de sumoilación de p53, sugieren que la fosforilación en este residuo de PIASy favorece su actividad. Por una parte, esta fosforilación promueve la capacidad de PIASy para inhibir la ruta de señalización JAK2/STAT3 y por otra parte promueve su actividad E3-SUMO ligasa.

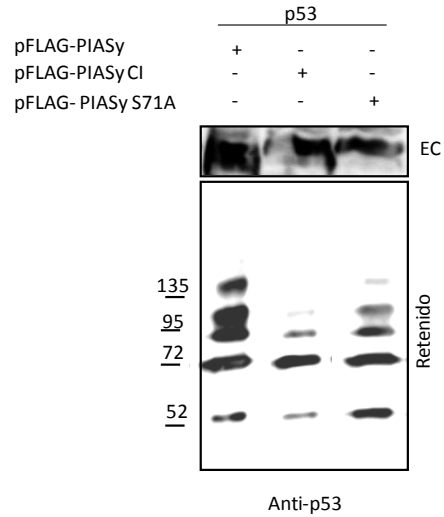


Figura 70. PIASy S71A sumoila con menor rendimiento a p53. En células Hek293 se sobreexpresaron 6xHis-SUMO2, p53 y pFLAG PIASy S71A o los controles pFLAG PIASy CI o pFLAG PIASy. Las células fueron lisadas en presencia de cloruro de guanidinio 6 M y las proteínas sumoiladas con la construcción 6xHis-SUMO2 se purificaron por cromatografía de afinidad en una resina de cobalto y se analizaron por *western blot* con el anticuerpo anti p53. RETENIDO: proteínas retenidas en la resina de cobalto. EC: 40 µg del extracto crudo.

DISCUSIÓN

1. Interacción entre PIASy y el complejo laforina-malina.

Laforina y malina forman un complejo funcional en el que laforina recluta sustratos para ser ubiquitinados por malina. Se ha observado que este complejo participa en la ubiquitinación y degradación de proteínas implicadas en el metabolismo del glucógeno como la proteína R5/PTG (Vernia et al., 2009b; Solaz-Fuster et al., 2008; Vilchez et al., 2007) o a la glucógeno sintasa (GS) (Liu et al., 2006).

En este contexto, se ha descrito que AMPK interacciona y fosforila también a laforina (Roma-Mateo et al. 2011) y a R5/PTG (Solaz-Fuster et al., 2008; Vernia et al., 2009b). Por tanto laforina, malina, R5/PTG y AMPK forman un macrocomplejo proteico que participa en la regulación de la síntesis de glucógeno. Independientemente, en un escrutinio genético realizado en nuestro laboratorio, se observó que laforina interacciona también con PIASy (proteína con actividad E3-SUMO ligasa) y además se observó la interacción de R5/PTG con PIASy, sugiriendo que PIASy podría estar implicada en la misma ruta que laforina.

En la presente tesis doctoral se ha confirmado la interacción entre el complejo laforina-malina y PIASy, una proteína que hasta el momento no se había relacionado con la enfermedad de Lafora. También se ha observado la interacción de ésta con otras proteínas implicadas en esta enfermedad como las subunidades AMPK α 2 y AMPK β 2, sugiriendo que PIASy podría formar parte de este macrocomplejo proteico (formado por laforina, malina, R5/PTG y AMPK), que además de regular el metabolismo del glucógeno, podría modular otros procesos celulares en los que participa PIASy, como apoptosis (Albor et al., 2006; Bischof et al., 2006), inflamación (Mabb et al., 2006) o regulación del ciclo celular entre otros (Zhang et al. 2010; Wu and Chiang, 2009; Azuma et al., 2005; Chiu et al., 2008).

Ya que el complejo laforina-malina participa en la ubiquitinación de otras proteínas, esta modificación ha sido profundamente estudiada en el contexto de la enfermedad de Lafora, pero también en otras enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, Alzheimer o Huntington. Una de las

Discusión

funciones de la ubiquitinación en estas enfermedades es la protección de las neuronas del efecto tóxico que supone la aparición de proteínas mal plegadas, de agregados de proteínas y otras estructuras anormales.

Existen evidencias de que la sumoilación también juega un papel importante en este tipo de enfermedades. Así, se ha observado que los agregados intracelulares de la proteína truncada Huntingtina colocalizan con SUMO y se ha descrito que existe una competencia entre ubiquitinación y sumoilación en los mismos residuos de lisina de esta proteína (Steffan et al., 2004). La ubiquitinación ejerce una función desestabilizante de la proteína mientras que la sumoilación resulta en su estabilización de ésta. En *Drosophila* se ha observado que las dos modificaciones (sumoilación y ubiquitinación) ejercen funciones contrarias en la patogeneidad de la enfermedad, mientras la ubiquitinación reduce el efecto tóxico de la Huntingtina, la sumoilación exagera la neurodegeneración. Una posible explicación de este efecto es que la modificación por SUMO podría estabilizar a la proteína cuando está soluble, antes de que se formen los agregados (Ulrich et al., 2005).

Por tanto la interacción de PIASy con el complejo laforina-malina, junto con las evidencias de una posible participación de la sumoilación de proteínas en la etiología de otras enfermedades neurodegenerativas, hacen interesante el estudio de la sumoilación de proteínas implicadas en la enfermedad de Lafora y su posible participación en el mecanismo molecular de esta enfermedad.

En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, PIASy interacciona con laforina y malina aunque no es capaz de sumoilarlas, por tanto desconocemos el significado biológico de estas interacciones y su posible implicación en la enfermedad de lafora.

2. Regulación de la señal de leptina por el complejo laforina-malina.

En la presente tesis doctoral se ha identificado un nuevo papel del complejo laforina-malina como regulador negativo de la ruta dependiente de leptina JAK2/STAT3, tanto en cultivos celulares sobreexpresando laforina y malina como en modelos animales que no expresan laforina (ratones *Epm2a*^{-/-}). Este resultado es interesante ya que explica el fenotipo de hiperfagia y aumento de peso corporal de los ratones *Epm2a*^{-/-}, observado en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio (Vernia et al.2011).

La resistencia a leptina en el hipotálamo es una de las causas que contribuyen al fenotipo de obesidad y puede ser causada por varios factores, por ejemplo la sobreexpresión de inhibidores de la ruta JAK2/STAT3, como la proteína SOCS3 (Myers et al., 2008). Recientemente se ha descrito que el estrés de RE, también contribuye a la resistencia a leptina (Ozcan et al., 2009; Zhang et al., 2008).

En este sentido hemos observado que los ratones *Epm2a*^{-/-} presentan elevados niveles de marcadores de estrés de RE en hipotálamo, así como un aumento en la expresión de SOCS3. Además nuestros resultados confirman que estos factores contribuyen a la resistencia a leptina, dado que estos animales presentaron hiperleptinemia en sangre, hiperfagia y mayor ganancia de peso corporal cuando fueron alimentados con dieta grasa.

En resumen, nuestros resultados sugieren una nueva función del complejo laforina-malina como regulador negativo de la señal de leptina, aunque por el momento desconocemos el mecanismo molecular de esta regulación. Por tanto, defectos en laforina y/o malina desencadenarían fenotipos de insensibilidad a leptina y en consecuencia mayor predisposición a fenotipos de obesidad inducida por dieta grasa.

Recientemente se ha descrito que la resistencia a leptina en el hipotálamo es un factor que agrava las consecuencias metabólicas de una dieta grasa (Scarpace and Zhang et al., 2009). En el laboratorio habíamos observado que los ratones *Epm2a*^{-/-} presentan estrés de RE en hígado, por lo que analizamos el estado funcional del hígado en estos animales,

Discusión

observándose que los ratones *Epm2a*^{-/-} alimentados con dieta grasa presentan hepatomegalia y aumento de los niveles de transaminasas hepáticas en plasma. Además se observó acumulación de gotas lipídicas en cortes histológicos hepáticos de estos animales. Estos resultados confirman que la dieta grasa agrava la disfunción hepática.

Esta conclusión es interesante en el contexto de la enfermedad de Lafora, dado que se ha observado que además de la neurodegeneración característica de la enfermedad, algunos pacientes presentan otros síntomas extra-neurológicos como disfunción hepática (Gomez-Garre et al., 2007). Nuestros resultados sugieren que el estilo de vida y la dieta, podría determinar la aparición de daño hepático en los pacientes de la enfermedad de Lafora.

Por último, en el presente trabajo hemos identificado la fosforilación del residuo Ser71 de PIASy, no descrita hasta el momento aunque todavía desconocemos la quinasa implicada en esta fosforilación.

La descripción de un residuo fosforilado en PIASy es interesante, ya que se ha publicado que otros miembros de la familia PIAS son regulados por fosforilación. Por ejemplo PIAS1 se fosforila en la Ser90, en un proceso mediado por IKK α . Esta fosforilación en PIAS1 es esencial para su capacidad para reprimir la actividad transcripcional de STAT1 y NF- κ B (Liu et al., 2005).

En este sentido hemos observado que la fosforilación de PIASy en el residuo Ser71 promueve su capacidad para reprimir la actividad transcripcional de STAT3, pero no es necesaria para la represión de la ruta NF- κ B.

Aunque, por el momento desconocemos el mecanismo molecular de la represión de la actividad transcripcional de STAT3 se ha propuesto que las proteínas PIAS podrían impedir la unión de STAT al ADN o reclutar corepresores de la transcripción como HDAC (histonas deacetilasas) (Shuai and Liu et al., 2005). Por tanto la fosforilación de PIASy en Ser71 podría favorecer su interacción con STAT3 impidiendo que ejerza su función en el núcleo, o por el contrario mediar la interacción de PIASy con un corepresor de la transcripción. Sin embargo, se necesitan más estudios para conocer el

mecanismo por el cual la fosforilación de PIASy en Ser71 promueve su actividad para reprimir la ruta JAK2/ STAT3. Además, recientemente se ha descrito que la actividad E3-SUMO ligasa de PIAS1 es necesaria para su fosforilación por lo que sería interesante estudiar si el mutante de PIASy catalíticamente inactivo se fosforila con la misma eficiencia en el residuo Ser71, que la proteína silvestre.

En resumen, en la presente tesis doctoral se ha identificado un sitio de fosforilación en Ser71 de PIASy, desconocido hasta el momento y que abre una nueva línea de trabajo en el contexto de la biología molecular de PIASy y su regulación por modificaciones post-traduccionales. La regulación de las proteínas PIAS es todavía desconocida y existen pocos estudios en el campo de las modificaciones post-traduccionales de estas proteínas. El estudio de la regulación de la actividad de PIASy por fosforilación así como, el conocimiento de la quinasa implicada y el estímulo que promueve esta modificación, podría relacionar a PIASy con nuevos procesos celulares.

3. Interacción entre PIASy y AMPK.

En la presente tesis doctoral se ha identificado la interacción entre PIASy y las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 1/2$ del complejo AMPK y hemos observado, por primera vez, que AMPK $\beta 2$ se modifica por sumoilación.

Ya que en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se observó que el complejo laforina-malina ubiquitina a la subunidad AMPK $\beta 2$ y en nuestro trabajo hemos observado que PIASy también sumoila a esta subunidad, pensamos que PIASy podría interactuar con el complejo laforina-malina para sumoilar a algunos de sus sustratos de ubiquitinación. Reforzando esta hipótesis recientemente se ha descrito que la sumoilación y ubiquitinación de proteínas son dos procesos íntimamente relacionados, de modo que ambos pueden competir por un mismo sustrato o en otros casos la sumoilación promueve la ubiquitinación de la proteína sustrato (Ulrich et al., 2005).

Discusión

Sorprendentemente, hemos observado que la sumoilación de AMPK β 2 es específica para esta isoforma ya que la isoforma AMPK β 1 no se sumoila. Además esta modificación es también específica de SUMO2 sugiriendo la formación de cadenas de polisumo, exclusivas de SUMO2/3 y no de SUMO1. (Tatham et al., 2001). Esta especificidad en la sumoilación de AMPK β 2 ha supuesto una dificultad para detectar la sumoilación de la proteína endógena. En primer lugar, la población de proteína modificada por SUMO generalmente es muy pequeña respecto a los niveles totales de proteína (Ulrich et al., 2005). Por otra parte, la expresión endógena de la isoforma AMPK β 2 es minoritaria respecto a la isoforma no sumoilable AMPK β 1 en las diferentes líneas celulares de las que disponíamos en el laboratorio, por lo que fue necesaria la sobreexpresión de AMPK β 2 para realizar los diferentes ensayos descritos en el apartado “Resultados III”.

Se ha descrito que la modificación por SUMO2/3 y no por SUMO1 se induce en respuesta a estrés celular (Vertegaal et al., 2006), dado que AMPK β 2 sólo se modifica por SUMO2, pensamos que los niveles de AMPK β 2 endógena sumoilada pueden inducirse en respuesta a algún estímulo por el momento desconocido, que facilitaría la detección de la sumoilación de AMPK β 2 endógena.

Por otra parte, tampoco hemos podido caracterizar el residuo o residuos sumoilados en la secuencia de AMPK β 2, a pesar de haber construido diferentes mutantes de lisina a arginina. Los diferentes mutantes se sumoilan con mayor eficiencia que la forma no mutada de la proteína. Una posible explicación a este fenómeno, es que la mutación de estos residuos puede producir un cambio conformacional en la proteína, dejando accesibles nuevas lisinas que en estas condiciones podrían ser mejores sustratos de sumoilación. En este sentido el cambio conformacional producido por las mutaciones K \rightarrow R de la proteína, podría llevar a un incorrecto plegamiento de la misma que podría ser el estímulo que desencadena la sumoilación de esta proteína con la finalidad de solubilizarla o agregarla para aminorar el efecto tóxico de la acumulación de

proteínas mal plegadas. Esta hipótesis explicaría porque, al introducir una mutación en la proteína, la sumoilación es más eficiente.

En este sentido una de las teorías que explican el mecanismo molecular de la enfermedad de Lafora sostiene que en ausencia de laforina o malina el sistema de degradación de proteínas erróneas se encuentra alterado, produciéndose una acumulación de material no degradable, que produce un efecto tóxico para la célula desencadenando estrés de retículo endoplásmico (ER) y eventualmente apoptosis celular. De acuerdo con esta hipótesis, recientemente se ha descrito que diferentes modelos celulares y animales carentes de laforina presentan estrés de retículo endoplásmico (ER) y disminución de la actividad proteasomal (Vernia et al., 2009a), sugiriendo que ambos fenómenos juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Lafora.

Aunque no hemos encontrado un mutante de AMPK β 2 defectivo para sumoilarse, el mutante AMPK β 2 K262R se sumoila con alto rendimiento y nos ha servido como herramienta para el estudio de la función biológica de esta modificación en la regulación del complejo AMPK.

Se ha descrito que la sumoilación puede modular la actividad y las interacciones proteína-proteína del sustrato (Rytinki et al., 2009). En este sentido, nuestros ensayos de activación de AMPK sobreexpresando el mutante AMPK β 2 K262R, PIASy y SUMO2 indican que la sumoilación de AMPK β 2, promueve la activación del trímero de AMPK. Este fenómeno puede deberse a que la sumoilación de AMPK β 2 impida la interacción del trímero con las fosfatasa que lo desforforilan e inactivan o por el contrario que favorezca la interacción con las quinasas que lo fosforilan y activan. Sin embargo por el momento desconocemos el mecanismo molecular por el cual la sumoilación de la subunidad AMPK β 2 promueve la activación del trímero de AMPK. No obstante este resultado sugiere un nuevo mecanismo de regulación de la actividad de AMPK.

Ya que la sumoilación por SUMO2 se activa en respuesta a estrés celular (Vertegaal et al., 2006)) pensamos que la sumoilación de AMPK β 2 puede iniciarse en respuesta a algún tipo de estrés que compromete la viabilidad

Discusión

celular. En estas condiciones se requiere la actividad de AMPK para revertir este estado de estrés y por ello podría inducirse la sumoilación de la isoforma AMPK β 2 con la finalidad de promover la activación de AMPK.

En este sentido el complejo AMPK se ha considerado “el sensor energético de la célula”, activándose en respuesta a una disminución de la energía celular o aumento de la relación AMP: ATP, para activar procesos catabólicos e inhibir los procesos anabólicos. Por tanto, la sumoilación podría inducirse en respuesta a un estado de deprivación energética para favorecer la actividad de AMPK y revertir esta situación. Interesantemente la activación de AMPK se ha implicado en la protección neuronal ante diferentes situaciones de estrés como isquemia regulando la función de receptores GABA (Kuramoto et al., 2007) o modulando el flujo glucolítico en astrocitos (Almeida et al., 2004)

Si esta hipótesis se confirma, la sumoilación de la subunidad AMPK β 2 podría considerarse un nuevo mecanismo de activación de AMPK ya que promueve la fosforilación del residuo Thr172 en la subunidad catalítica AMPK α 2. Sin embargo, por el momento desconocemos el estímulo que induce la sumoilación de la subunidad β 2 de AMPK.

Recientemente, se han atribuido otras funciones a la sumoilación de proteínas como modificar la estabilidad del sustrato (Schimmel et al., 2008) o su localización subcelular (Sachdev et al., 2001). Por ello también hemos estudiado la localización subcelular de AMPK β 2 en condiciones favorables para su sumoilación, observándose la agregación de AMPK β 2 en cuerpos de inclusión en el citoplasma que colocalizan con SUMO2.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se observó que la poliubiquitinación de AMPK β 2, por el complejo laforina-malina, promueve la acumulación de esta subunidad en agregados perinucleares. Nuestros resultados demuestran que la sumoilación secuestra a la subunidad AMPK β 2 en el citoplasma, y mayoritariamente en la cara externa del núcleo. Conjuntamente, estos resultados sugieren una posible competencia entre sumoilación y ubiquitinación de AMPK β 2. No obstante se requieren más experimentos para confirmar esta hipótesis.

Nuestros resultados de localización subcelular de AMPK β 2, concuerdan con un posible papel de laforina-malina-PIASy en la detoxificación de proteínas mal plegadas. En el caso de AMPK β 2, la sumoilación podría secuestrar a esta proteína en agregados citoplasmáticos con la finalidad de aliviar su efecto tóxico.

Por tanto, los resultados de actividad de AMPK y localización subcelular de AMPK β 2, en condiciones favorables para su sumoilación, sugieren dos posibles hipótesis, por una parte la sumoilación podría promover la activación de AMPK en respuesta a un estímulo o estrés celular, por el momento desconocido. Por otra parte, la sumoilación podría participar en la detoxificación de proteínas mal plegadas, de modo que en condiciones de estrés de RE se induciría la sumoilación de proteínas erróneas, secuestrándolas en cuerpos de inclusión citoplasmáticos con el fin de aminorar su toxicidad.

Estas hipótesis no son excluyentes, pero se requieren más experimentos para analizar la relevancia fisiológica de cada una de ellas. Podría existir una población de proteína sumoilada que forma los agregados citoplasmáticos y otra población en la que la sumoilación de AMPK β 2 promueve la activación del complejo AMPK, siendo dos procesos no relacionados entre sí. Esta posibilidad resulta especialmente interesante ya que se ha descrito una disminución en autofagia en distintos modelos celulares deficientes en laforina y malina (Aguado et al HMG 2010 y Criado et al In press 2011). AMPK es uno de los principales reguladores de la autofagia a través de la ruta mTOR (Kim et al., 2011; Meley et al., 2006) y más recientemente a través de la regulación directa de ULK1 (Hardie et al., 2011; Kim and Guan et al., 2011; Lee et al., 2010; Mao and Klionsky et al., 2011; Zhao and Klionsky et al., 2011) por lo que la participación de la sumoilación en la correcta activación de AMPK podría ser importante para la detoxificación de agregados intracelulares. El complejo multiproteico formado por AMPK, PIASy, laforina y malina podría participar en este mecanismo.

En resumen, en el presente trabajo hemos demostrado que PIASy, una proteína con actividad E3-SUMO ligasa interacciona con el complejo

Discusión

laforina-malina y con otras proteínas relacionadas con la enfermedad de Lafora como AMPK. Además hemos observado una nueva modificación postraduccional (sumoilación) en la subunidad AMPK β 2, no descrita hasta el momento.

Estos resultados en conjunto sugieren la participación del proceso de sumoilación en la regulación de proteínas implicadas en la enfermedad de Lafora, resultando interesante el estudio de esta modificación postraduccional en el contexto molecular de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. PIASy interacciona con laforina y malina. La interacción entre PIASy y malina se refuerza en presencia de laforina sugiriendo que estas proteínas pueden formar un complejo trimérico.
2. PIASy no promueve la sumoilación de laforina.
3. El complejo laforina-malina no ubiquitina ni modula la estabilidad, estado de fosforilación o actividad de PIASy (como regulador negativo de la ruta NF- κ B y JAK2/STAT3) en las condiciones analizadas en el presente trabajo.
4. El complejo laforina-malina es un inhibidor de la ruta de señalización, dependiente de leptina, JAK2/STAT3 independientemente de la sobreexpresión de PIASy
5. En hipotálamo de ratones *Epm2a*^{-/-} se observan elevados niveles de marcadores de estrés de RE y aumento de activación en la ruta proinflamatoria de NF- κ B y en consecuencia sobreexpresión de SOCS3, proteína inhibidora de la señal de leptina.
6. Los ratones *Epm2a*^{-/-} presentan hiperfagia, mayor aumento de peso corporal e hiperleptinemia cuando se alimentan con dieta grasa, respecto a animales control.
7. La dieta grasa empeora la disfunción hepática y el estado de esteatosis de los ratones *Epm2a*^{-/-}.
8. PIASy interacciona con las subunidades AMPK α 2 y AMPK β 1/2, pero no interacciona con la subunidad AMPK γ .
9. PIASy media la sumoilación específica por SUMO2 de la isoforma AMPK β 2 y no de AMPK β 1. PIASy tampoco sumoila a la subunidad catalítica AMPK α .
10. La sumoilación de AMPK β 2, promueve la activación del trímero de AMPK.
11. En condiciones favorables para la sumoilación de AMPK β 2, está se distribuye en gránulos citoplasmáticos que colocalizan con SUMO2.
12. La fosforilación del residuo Ser71 de PIASy favorece su actividad como inhibidor de la ruta JAK2/STAT3 y su capacidad para sumoilar a p53.

BIBLIOGRAFÍA

Aguado, C., Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Criado, O., Vernia, S., Boya, P., Sanz, P., de Cordoba, S. R., Knecht, E. and Rubinsztein, D. C. (2010). Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Hum Mol Genet* **19**, 2867-76.

Ahima, R. S. (2006). Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* **14 Suppl 5**, 242S-249S.

Albor, A., El-Hizawi, S., Horn, E. J., Laederich, M., Frosk, P., Wrogemann, K. and Kulesz-Martin, M. (2006). The interaction of Piasy with Trim32, an E3-ubiquitin ligase mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2H, promotes Piasy degradation and regulates UVB-induced keratinocyte apoptosis through NFkappaB. *J Biol Chem* **281**, 25850-66.

Almeida, A., Moncada, S. and Bolanos, J. P. (2004). Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 45-51.

Aravind, L. and Koonin, E. V. (2000). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci* **25**, 112-4.

Azuma, Y., Arnaoutov, A., Anan, T. and Dasso, M. (2005). PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *EMBO J* **24**, 2172-82.

Banks, W. A. (2001). Enhanced leptin transport across the blood-brain barrier by alpha 1-adrenergic agents. *Brain Res* **899**, 209-17.

Banks, W. A., Niehoff, M. L., Martin, D. and Farrell, C. L. (2002). Leptin transport across the blood-brain barrier of the Koletsky rat is not mediated by a product of the leptin receptor gene. *Brain Res* **950**, 130-6.

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

Bates, S. H., Stearns, W. H., Dundon, T. A., Schubert, M., Tso, A. W., Wang, Y., Banks, A. S., Lavery, H. J., Haq, A. K., Maratos-Flier, E. et al.

Bibliografia

(2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* **421**, 856-9.

Bernotiene, E., Palmer, G. and Gabay, C. (2006). The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthritis Res Ther* **8**, 217.

Bischof, O., Schwamborn, K., Martin, N., Werner, A., Sustmann, C., Grosschedl, R. and Dejean, A. (2006). The E3 SUMO ligase PIASy is a regulator of cellular senescence and apoptosis. *Mol Cell* **22**, 783-94.

Bluher, S. and Mantzoros, C. S. (2009). Leptin in humans: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr* **89**, 991S-997S.

Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M. and Ryan, I. (1996). Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 3419-23.

Boden, G., Duan, X., Homko, C., Molina, E. J., Song, W., Perez, O., Cheung, P. and Merali, S. (2008). Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* **57**, 2438-44.

Brennan, A. M. and Mantzoros, C. S. (2006). Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **2**, 318-27.

Brooks, C. L., Li, M. and Gu, W. (2004). Monoubiquitination: the signal for p53 nuclear export? *Cell Cycle* **3**, 436-8.

Burguera, B., Couce, M. E., Curran, G. L., Jensen, M. D., Lloyd, R. V., Cleary, M. P. and Poduslo, J. F. (2000). Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes* **49**, 1219-23.

Carlos Romá-Mateo, D. M., Santiago Vernia, Teresa Rubio, Travis M. Bridges, Matthew S. Gentry and Pascual Sanz. (2011). Lafora disease E3-ubiquitin ligase malin is related to TRIM32 at both the phylogenetic and functional level.

Clark, H., Carling, D. and Saggerson, D. (2004). Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids. *Eur J Biochem* **271**, 2215-24.

Cohen, P. T. (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* **115**, 241-56.

Coligan, J. E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. and Wingfield, P.T. (2003). Current protocols in Protein Science, (ed. J. W. a. sons). U.S.A.

Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L. et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* **334**, 292-5.

Crute, B. E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B. E. and Witters, L. A. (1998). Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**, 35347-54.

Chan, E. M., Omer, S., Ahmed, M., Bridges, L. R., Bennett, C., Scherer, S. W. and Minassian, B. A. (2004). Progressive myoclonus epilepsy with polyglucosans (Lafora disease): evidence for a third locus. *Neurology* **63**, 565-7.

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. (2003a). Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* **35**, 125-7.

Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D. and Mantzoros, C. S. (2003b). The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest* **111**, 1409-21.

Cheng, A., Zhang, M., Gentry, M. S., Worby, C. A., Dixon, J. E. and Saltiel, A. R. (2007). A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease. *Genes Dev* **21**, 2399-409.

Bibliografia

Chiu, S. Y., Asai, N., Costantini, F. and Hsu, W. (2008). SUMO-specific protease 2 is essential for modulating p53-Mdm2 in development of trophoblast stem cell niches and lineages. *PLoS Biol* **6**, e310.

Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* **278**, 1803-5.

Dardeno, T. A., Chou, S. H., Moon, H. S., Chamberland, J. P., Fiorenza, C. G. and Mantzoros, C. S. (2010). Leptin in human physiology and therapeutics. *Front Neuroendocrinol* **31**, 377-93.

Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T. and Hardie, D. G. (1995). 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett* **377**, 421-5.

Delgado-Escueta, A. V. (2007). Advances in lafora progressive myoclonus epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* **7**, 428-33.

Depaux, A., Regnier-Ricard, F., Germani, A. and Varin-Blank, N. (2007). A crosstalk between hSiah2 and Pias E3-ligases modulates Pias-dependent activation. *Oncogene* **26**, 6665-76.

Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. and Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell* **2**, 233-9.

Djouder, N., Tuerk, R. D., Suter, M., Salvioni, P., Thali, R. F., Scholz, R., Vaahtomeri, K., Auchli, Y., Rechsteiner, H., Brunisholz, R. A. et al. PKA phosphorylates and inactivates AMPK α to promote efficient lipolysis. *EMBO J* **29**, 469-81.

Duval, D., Duval, G., Kedinger, C., Poch, O. and Boeuf, H. (2003). The 'PINIT' motif, of a newly identified conserved domain of the PIAS protein family, is essential for nuclear retention of PIAS3L. *FEBS Lett* **554**, 111-8.

Ernst, M. B., Wunderlich, C. M., Hess, S., Paehler, M., Mesaros, A., Koralov, S. B., Kleinridders, A., Husch, A., Munzberg, H., Hampel, B. et al. (2009). Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J Neurosci* **29**, 11582-93.

Farooqi, I. S., Wangensteen, T., Collins, S., Kimber, W., Matarese, G., Keogh, J. M., Lank, E., Bottomley, B., Lopez-Fernandez, J., Ferraz-Amaro, I. et al. (2007). Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* **356**, 237-47.

Fei, H., Okano, H. J., Li, C., Lee, G. H., Zhao, C., Darnell, R. and Friedman, J. M. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7001-5.

Fernández-Sánchez, M. E. (2004). Biología Molecular de la enfermedad de Lafora. Análisis de la función biológica de los genes responsables mediante la caracterización de interacciones proteicas. In *Departamento de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

Fernandez-Sanchez, M. E., Criado-Garcia, O., Heath, K. E., Garcia-Fojeda, B., Medrano-Fernandez, I., Gomez-Garre, P., Sanz, P., Serratosa, 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.

Fogarty, S., Hawley, S. A., Green, K. A., Saner, N., Mustard, K. J. and Hardie, D. G. (2010). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca²⁺ and AMP. *Biochem J* **426**, 109-18.

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.

Ganesh, S., Agarwala, K. L., Ueda, K., Akagi, T., Shoda, K., Usui, T., Hashikawa, T., Osada, H., Delgado-Escueta, A. V. and Yamakawa, K.

Bibliografía

(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., Delgado-Escueta, A. V., Sakamoto, T., Avila, M. R., Machado-Salas, J., Hoshii, Y., Akagi, T., Gomi, H., Suzuki, T., Amano, K. et al. (2002). Targeted disruption of the Epm2a gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice. *Hum Mol Genet* **11**, 1251-62.

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-Haro, L. (2010). Regulación de la quinasa activada por AMP (AMPK) por glucosa. In *Consejos superior de investigaciones científicas (CSIC)*: Universidad de Valencia.

Garcia-Haro, L., Garcia-Gimeno, M. A., Neumann, D., Beullens, M., Bollen, M. and Sanz, P. The PP1-R6 protein phosphatase holoenzyme is involved in the glucose-induced dephosphorylation and inactivation of AMP-activated protein kinase, a key regulator of insulin secretion, in MIN6 beta cells. *FASEB J* **24**, 5080-91.

Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 947-56.

Gentry, M. S., Dixon, J. E. and Worby, C. A. (2009). Lafora disease: insights into neurodegeneration from plant metabolism. *Trends Biochem Sci* **34**, 628-39.

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.

Glickman, M. H. and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428.

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.

Gorina, R., Petegnief, V., Chamorro, A. and Planas, A. M. (2005). AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. *J Neurochem* **92**, 505-18.

Gottlin, E. B., Xu, X., Epstein, D. M., Burke, S. P., Eckstein, J. W., Ballou, D. P. and Dixon, J. E. (1996). Kinetic analysis of the catalytic domain of human cdc25B. *J Biol Chem* **271**, 27445-9.

Gross, M., Liu, B., Tan, J., French, F. S., Carey, M. and Shuai, K. (2001). Distinct effects of PIAS proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells. *Oncogene* **20**, 3880-7.

Gross, M., Yang, R., Top, I., Gasper, C. and Shuai, K. (2004). PIASy-mediated repression of the androgen receptor is independent of sumoylation. *Oncogene* **23**, 3059-66.

Bibliografia

Habinowski, S. A., Hirshman, M., Sakamoto, K., Kemp, B. E., Gould, S. J., Goodyear, L. J. and Witters, L. A. (2001). Malonyl-CoA decarboxylase is not a substrate of AMP-activated protein kinase in rat fast-twitch skeletal muscle or an islet cell line. *Arch Biochem Biophys* **396**, 71-9.

Hamrick, M. W., Della-Fera, M. A., Choi, Y. H., Pennington, C., Hartzell, D. and Baile, C. A. (2005). Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res* **20**, 994-1001.

Hannich, J. T., Lewis, A., Kroetz, M. B., Li, S. J., Heide, H., Emili, A. and Hochstrasser, M. (2005). Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 4102-10.

Hardie, D. G. (2004). AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 28-34.

Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 774-85.

Hardie, D. G. (2011). AMPK and autophagy get connected. *EMBO J* **30**, 634-5.

Hardie, D. G. and Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* **246**, 259-73.

Hardie, D. G. and Sakamoto, K. (2006). AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)* **21**, 48-60.

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.

Harriman, D. G., Millar, J. H. and Stevenson, A. C. (1955). Progressive familial myoclonic epilepsy in three families: its clinical features and pathological basis. *Brain* **78**, 325-49.

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.

Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G. and Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* **2**, 9-19.

Hawley, S. A., Selbert, M. A., Goldstein, E. G., Edelman, A. M., Carling, D. and Hardie, D. G. (1995). 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J Biol Chem* **270**, 27186-91.

Hay, R. T. (2007). SUMO-specific proteases: a twist in the tail. *Trends Cell Biol* **17**, 370-6.

Hecker, C. M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P. and Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* **281**, 16117-27.

Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* **107**, 5-8.

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.

Huang, T. T., Wuerzberger-Davis, S. M., Wu, Z. H. and Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* **115**, 565-76.

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.

Bibliografia

Hunter, T. (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* **28**, 730-8.

Hurley, R. L., Barre, L. K., Wood, S. D., Anderson, K. A., Kemp, B. E., Means, A. R. and Witters, L. A. (2006). Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J Biol Chem* **281**, 36662-72.

Ianzano, L., Young, E. J., Zhao, X. C., Chan, E. M., Rodriguez, M. T., Torrado, M. V., Scherer, S. W. and Minassian, B. A. (2004). Loss of function of the cytoplasmic isoform of the protein laforin (EPM2A) causes Lafora progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mutat* **23**, 170-6.

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.

Ihara, M., Yamamoto, H. and Kikuchi, A. (2005). SUMO-1 modification of PIASy, an E3 ligase, is necessary for PIASy-dependent activation of Tcf-4. *Mol Cell Biol* **25**, 3506-18.

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

Jaleel, M., Villa, F., Deak, M., Toth, R., Prescott, A. R., Van Aalten, D. M. and Alessi, D. R. (2006). The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochem J* **394**, 545-55.

Jang, H. D., Yoon, K., Shin, Y. J., Kim, J. and Lee, S. Y. (2004). PIAS3 suppresses NF-kappaB-mediated transcription by interacting with the p65/RelA subunit. *J Biol Chem* **279**, 24873-80.

Jenne, D. E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Muller, O., Back, W. and Zimmer, M. (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* **18**, 38-43.

Kagey, M. H., Melhuish, T. A. and Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* **113**, 127-37.

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.

Kaiser, P. and Tagwerker, C. (2005). Is this protein ubiquitinated? *Methods Enzymol* **399**, 243-8.

Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-63.

Karin, M., Yamamoto, Y. and Wang, Q. M. (2004). The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 17-26.

Kerscher, O., Felberbaum, R. and Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 159-80.

Kiess, W., Petzold, S., Topfer, M., Garten, A., Bluher, S., Kapellen, T., Korner, A. and Kratzsch, J. (2008). Adipocytes and adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **22**, 135-53.

Kim, J. and Guan, K. L. (2011). Regulation of the autophagy initiating kinase ULK1 by nutrients: Roles of mTORC1 and AMPK. *Cell Cycle* **10**.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. and Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132-41.

Kim, J. H. and Baek, S. H. (2009). Emerging roles of desumoylating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 155-62.

Kim, Y. B., Uotani, S., Pierroz, D. D., Flier, J. S. and Kahn, B. B. (2000). In vivo administration of leptin activates signal transduction directly

Bibliografia

in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology* **141**, 2328-39.

Knecht, E., Aguado, C., Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Criado-Garcia, O., Vernia, S., Boya, P., Sanz, P., Rodriguez de Cordoba, S. and Rubinsztein, D. C. (2010). Impaired autophagy in Lafora disease. *Autophagy* **6**, 991-3.

Kobe, B. and Kemp, B. E. (1999). Active site-directed protein regulation. *Nature* **402**, 373-6.

Kudo, N., Gillespie, J. G., Kung, L., Witters, L. A., Schulz, R., Clanachan, A. S. and Lopaschuk, G. D. (1996). Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia. *Biochim Biophys Acta* **1301**, 67-75.

Kuramoto, N., Wilkins, M. E., Fairfax, B. P., Revilla-Sanchez, R., Terunuma, M., Tamaki, K., Iemata, M., Warren, N., Couve, A., Calver, A. et al. (2007). Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron* **53**, 233-47.

Lafora, G. R. (1911a). über das Vorkommen amyloider Körperchen im Inner 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.

Leclerc, I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaulont, S., Kahn, A. and Violette, 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, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I. and Friedman, J. M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**, 632-5.

Lee, J. W., Park, S., Takahashi, Y. and Wang, H. G. (2010). The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One* **5**, e15394.

Li, C. and Friedman, J. M. (1999). Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9677-82.

Licinio, J., Mantzoros, C., Negrao, A. B., Cizza, G., Wong, M. L., Bongiorno, P. B., Chrousos, G. P., Karp, B., Allen, C., Flier, J. S. et al. (1997). Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med* **3**, 575-9.

Lim, C. T., Kola, B. and Korbonits, M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol* **44**, 87-97.

Liu, B., Gross, M., ten Hoeve, J. and Shuai, K. (2001). A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3203-7.

Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D. and Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10626-31.

Liu, B., Mink, S., Wong, K. A., Stein, N., Getman, C., Dempsey, P. W., Wu, H. and Shuai, K. (2004). PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat Immunol* **5**, 891-8.

Liu, B., Yang, R., Wong, K. A., Getman, C., Stein, N., Teitell, M. A., Cheng, G., Wu, H. and Shuai, K. (2005). Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1. *Mol Cell Biol* **25**, 1113-23.

Liu, B., Yang, Y., Chernishof, V., Loo, R. R., Jang, H., Tahk, S., Yang, R., Mink, S., Shultz, D., Bellone, C. J. et al. (2007). Proinflammatory stimuli induce IKKalpha-mediated phosphorylation of PIAS1 to restrict inflammation and immunity. *Cell* **129**, 903-14.

Liu, Y., Wang, Y., Wu, C. and Zheng, P. (2006). Dimerization of Laforin is required for its optimal phosphatase activity, regulation of GSK3beta phosphorylation, and Wnt signaling. *J Biol Chem* **281**, 34768-74.

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

Bibliografia

kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Genet* **14**, 2727-36.

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.

Mabb, A. M., Wuerzberger-Davis, S. M. and Miyamoto, S. (2006). PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* **8**, 986-93.

Mao, K. and Klionsky, D. J. (2011). AMPK activates autophagy by phosphorylating ULK1. *Circ Res* **108**, 787-8.

Marchetti, P., Bugliani, M., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Boggi, U., Filipponi, F., Weir, G. C., Eizirik, D. L. and Cnop, M. (2007). The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* **50**, 2486-94.

Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G. and Hill, R. A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**, 1407-33.

Matarese, G., Moschos, S. and Mantzoros, C. S. (2005). Leptin in immunology. *J Immunol* **174**, 3137-42.

Matsuura, T., Shimono, Y., Kawai, K., Murakami, H., Urano, T., Niwa, Y., Goto, H. and Takahashi, M. (2005). PIAS proteins are involved in the SUMO-1 modification, intracellular translocation and transcriptional repressive activity of RET finger protein. *Exp Cell Res* **308**, 65-77.

McBride, A. and Hardie, D. G. (2009). AMP-activated protein kinase--a sensor of glycogen as well as AMP and ATP? *Acta Physiol (Oxf)* **196**, 99-113.

McCool, K. and Miyamoto, S. (2009). A PAR-SUMOnious mechanism of NEMO activation. *Mol Cell* **36**, 349-50.

Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J. H., Dubbelhuis, P. F., Helmond, M. T., Codogno, P. and Meijer, A. J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J Biol Chem* **281**, 34870-9.

Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y. B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M. J. et al. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428**, 569-74.

Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., Carling, D. and Kahn, B. B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415**, 339-43.

Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M. and Caput, D. (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* **275**, 36316-23.

Mittal, S., Dubey, D., Yamakawa, K. and Ganesh, S. (2007). Lafora disease proteins malin and laforin are recruited to aggresomes in response to proteasomal impairment. *Hum Mol Genet* **16**, 753-62.

Momcilovic, M., Hong, S. P. and Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* **281**, 25336-43.

Moran, S. A., Patten, N., Young, J. R., Cochran, E., Sebring, N., Reynolds, J., Premkumar, A., Depaoli, A. M., Skarulis, M. C., Oral, E. A. et al. (2004). Changes in body composition in patients with severe lipodystrophy after leptin replacement therapy. *Metabolism* **53**, 513-9.

Moreno, D., Towler, M. C., Hardie, D. G., Knecht, E. and Sanz, P. The laforin-malin complex, involved in Lafora disease, promotes the incorporation of K63-linked ubiquitin chains into AMP-activated protein kinase beta subunits. *Mol Biol Cell* **21**, 2578-88.

Bibliografia

Morris, D. L. and Rui, L. (2009). Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E1247-59.

Myers, M. G., Cowley, M. A. and Munzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* **70**, 537-56.

Nelson, T. J. and Alkon, D. L. (2005). Insulin and cholesterol pathways in neuronal function, memory and neurodegeneration. *Biochem Soc Trans* **33**, 1033-6.

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

Nishida, T. and Yasuda, H. (2002). PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* **277**, 41311-7.

Nisole, S., Stoye, J. P. and Saib, A. (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* **3**, 799-808.

Oswal, A. and Yeo, G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity (Silver Spring)* **18**, 221-9.

Ozcan, L., Ergin, A. S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Myers, M. G., Jr. and Ozcan, U. (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* **9**, 35-51.

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L. H. and Hotamisligil, G. S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-61.

Pang, T., Xiong, B., Li, J. Y., Qiu, B. Y., Jin, G. Z., Shen, J. K. and Li, J. (2007). Conserved alpha-helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase alpha subunits. *J Biol Chem* **282**, 495-506.

Pauli, E. K., Schmolke, M., Wolff, T., Viemann, D., Roth, J., Bode, J. G. and Ludwig, S. (2008). Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS-3 expression. *PLoS Pathog* **4**, e1000196.

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

Pickart, C. M. and Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 610-6.

Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T. K. and Melchior, F. (2004). The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 984-91.

Planas, A. M., Gorina, R. and Chamorro, A. (2006). Signalling pathways mediating inflammatory responses in brain ischaemia. *Biochem Soc Trans* **34**, 1267-70.

Polekhina, G., Gupta, A., van Denderen, B. J., Feil, S. C., Kemp, B. E., Stapleton, D. and Parker, M. W. (2005). Structural basis for glycogen recognition by AMP-activated protein kinase. *Structure* **13**, 1453-62.

Puri, R., Suzuki, T., Yamakawa, K. and Ganesh, S. (2009). Hyperphosphorylation and aggregation of Tau in laforin-deficient mice, an animal model for Lafora disease. *J Biol Chem* **284**, 22657-63.

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

Roma-Mateo, C., Solaz-Fuster, M. C., Gimeno-Alcaniz, J. V., Dukhande, V., Donderis, J., Marina, A., Criado, O., Koller, A., Rodriguez de Cordoba, S., Gentry, M. S. et al. (2011). Laforin, a dual specificity protein phosphatase involved in Lafora disease, is phosphorylated at Ser25 by AMP-activated protein kinase. *Biochem J*.

Rytinki, M. M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jaaskelainen, T. and Palvimo, J. J. (2009). PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell Mol Life Sci* **66**, 3029-41.

Bibliografia

Saad, M. F., Damani, S., Gingerich, R. L., Riad-Gabriel, M. G., Khan, A., Boyadjian, R., Jinagouda, S. D., el-Tawil, K., Rude, R. K. and Kamdar, V. (1997). Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 579-84.

Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* **15**, 3088-103.

Sakai, M., Austin, J. and Witmer, F. (1968). Polyglucosans in the systemic deposits of myoclonic epilepsy and in corpora amylacea. *Neurology* **18**, 298.

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

Samari, H. R., Moller, M. T., Holden, L., Asmyhr, T. and Seglen, P. O. (2005). Stimulation of hepatocytic AMP-activated protein kinase by okadaic acid and other autophagy-suppressive toxins. *Biochem J* **386**, 237-44.

Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A. and Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* **403**, 139-48.

Sanz, P. (2008). AMP-activated protein kinase: structure and regulation. *Curr Protein Pept Sci* **9**, 478-92.

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.

Scarpace, P. J. and Zhang, Y. (2009). Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**, R493-500.

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.

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.

Schimmel, J., Larsen, K. M., Matic, I., van Hagen, M., Cox, J., Mann, M., Andersen, J. S. and Vertegaal, A. C. (2008). The ubiquitin-proteasome system is a key component of the SUMO-2/3 cycle. *Mol Cell Proteomics* **7**, 2107-22.

Sharma, N. K., Das, S. K., Mondal, A. K., Hackney, O. G., Chu, W. S., Kern, P. A., Rasouli, N., Spencer, H. J., Yao-Borengasser, A. and Elbein, S. C. (2008). Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 4532-41.

Shuai, K. (2006). Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res* **16**, 196-202.

Shuai, K. and Liu, B. (2005). Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **5**, 593-605.

Sinha, M. K., Ohannesian, J. P., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Magosin, S., Marco, C. and Caro, J. F. (1996). Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* **97**, 1344-7.

Slack, F. J. and Ruvkun, G. (1998). A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs. *Trends Biochem Sci* **23**, 474-5.

Solaz-Fuster, M. C., Gimeno-Alcaniz, J. V., Ros, S., Fernandez-Sanchez, M. E., Garcia-Fojeda, B., Criado Garcia, O., Vilchez, D., Dominguez, J., Garcia-Rocha, M., Sanchez-Piris, M. et al. (2008). Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum Mol Genet* **17**, 667-78.

Bibliografia

Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G. and Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14373-8.

Song, J., Zhang, Z., Hu, W. and Chen, Y. (2005). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J Biol Chem* **280**, 40122-9.

Steffan, J. S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L. C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y. Z., Cattaneo, E. et al. (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* **304**, 100-4.

Steinberg, G. R., McAinch, A. J., Chen, M. B., O'Brien, P. E., Dixon, J. B., Cameron-Smith, D. and Kemp, B. E. (2006). The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 3592-7.

Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T. and Neumann, D. (2006). Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **281**, 32207-16.

Tagliabracci, V. S., Girard, J. M., Segvich, D., Meyer, C., Turnbull, J., Zhao, X., Minassian, B. A., Depaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. (2008). Abnormal metabolism of glycogen phosphate as a cause for Lafora disease. *J Biol Chem* **283**, 33816-25.

Tagliabracci, V. S., Heiss, C., Karthik, C., Contreras, C. J., Glushka, J., Ishihara, M., Azadi, P., Hurley, T. D., DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. (2011). Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease. *Cell Metab* **13**, 274-82.

Tagliabracci, V. S., Turnbull, J., Wang, W., Girard, J. M., Zhao, X., Skurat, A. V., Delgado-Escueta, A. V., Minassian, B. A., Depaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. (2007). Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19262-6.

Tahk, S., Liu, B., Chernishof, V., Wong, K. A., Wu, H. and Shuai, K. (2007). Control of specificity and magnitude of NF-kappa B and STAT1-mediated gene activation through PIASy and PIAS1 cooperation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11643-8.

Tartaglia, L. A. (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem* **272**, 6093-6.

Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H. and Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* **276**, 35368-74.

Tu, H., Kastin, A. J., Hsueh, H. and Pan, W. (2008). Soluble receptor inhibits leptin transport. *J Cell Physiol* **214**, 301-5.

Ulrich, H. D. (2005). Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol* **15**, 525-32.

Van heycop Ten ham, M. W. (1974). Lafora disease, a form of progressive myoclonus epilepsy. in the epilepsies. In *Handbook of clinical neurology*, vol. 15 (ed. B. PJ Vinken, G.W), pp. 382-422. North Holland, Amsterdam.

Vernia, S., Heredia, M., Criado, O., Rodriguez de Cordoba, S., Garcia-Roves, P. M., Cansell, C., Denis, R., Luquet, S., Foufelle, F., Ferre, P. et al. (2011). Laforin, a dual specificity phosphatase involved in Lafora disease, regulates insulin response and whole-body energy balance in mice. *Hum Mol Genet* **20**, 2571-84.

Vernia, S., Rubio, T., Heredia, M., Rodriguez de Cordoba, S. and Sanz, P. (2009a). Increased endoplasmic reticulum stress and decreased proteasomal function in lafora disease models lacking the phosphatase laforin. *PLoS One* **4**, e5907.

Vernia, S., Solaz-Fuster, M. C., Gimeno-Alcaniz, J. V., Rubio, T., Garcia-Haro, L., Foretz, M., de Cordoba, S. R. and Sanz, P. (2009b). AMP-activated protein kinase phosphorylates R5/PTG, the glycogen targeting subunit of the R5/PTG-protein phosphatase 1 holoenzyme, and accelerates its down-regulation by the laforin-malin complex. *J Biol Chem* **284**, 8247-55.

Bibliografia

Vertegaal, A. C., Andersen, J. S., Ogg, S. C., Hay, R. T., Mann, M. and Lamond, A. I. (2006). Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* **5**, 2298-310.

Viana, R., Towler, M. C., Pan, D. A., Carling, D., Viollet, B., Hardie, D. G. and Sanz, P. (2007). A conserved sequence immediately N-terminal to the Bateman domains in AMP-activated protein kinase gamma subunits is required for the interaction with the beta subunits. *J Biol Chem* **282**, 16117-25.

Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V. and Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and I kappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* **30**, 43-52.

Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Valles, J., Garcia-Fojeda, B., Criado-Garcia, O., Fernandez-Sanchez, E., Medrano-Fernandez, I., Dominguez, J. et al. (2007). Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci* **10**, 1407-13.

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

Weger, S., Hammer, E. and Heilbronn, R. (2005). Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett* **579**, 5007-12.

Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 169-78.

Witczak, C. A., Sharoff, C. G. and Goodyear, L. J. (2008). AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3737-55.

Won, J. C., Jang, P. G., Namkoong, C., Koh, E. H., Kim, S. K., Park, J. Y., Lee, K. U. and Kim, M. S. (2009). Central administration of an

endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity (Silver Spring)* **17**, 1861-5.

Wong, K. A., Kim, R., Christofk, H., Gao, J., Lawson, G. and Wu, H. (2004). Protein inhibitor of activated STAT Y (PIASy) and a splice variant lacking exon 6 enhance sumoylation but are not essential for embryogenesis and adult life. *Mol Cell Biol* **24**, 5577-86.

Woods, A., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Stein, S. C., Lemarchand, P., Ferre, P., Foufelle, 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.

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M. and Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* **2**, 21-33.

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. (2003a). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* **13**, 2004-8.

Woods, A., Vertommen, D., Neumann, D., Turk, R., Bayliss, J., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D. and Rider, M. H. (2003b). Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **278**, 28434-42.

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.

Worby, C. A., Gentry, M. S. and Dixon, J. E. (2008). Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG). *J Biol Chem* **283**, 4069-76.

Bibliografia

Wu, S. Y. and Chiang, C. M. (2009). p53 sumoylation: mechanistic insights from reconstitution studies. *Epigenetics* **4**, 445-51.

Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M. and Zou, M. H. (2007). Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **282**, 9777-88.

Xie, M., Zhang, D., Dyck, J. R., Li, Y., Zhang, H., Morishima, M., Mann, D. L., Taffet, G. E., Baldini, A., Khoury, D. S. et al. (2006). A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17378-83.

Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y. and Kikuchi, A. (2003). Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J* **22**, 2047-59.

Yang, S. H. and Sharrocks, A. D. (2006). PIASxalpha differentially regulates the amplitudes of transcriptional responses following activation of the ERK and p38 MAPK pathways. *Mol Cell* **22**, 477-87.

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

Yokoi, S., Nakayama, H. and Negishi, T. (1975). Biochemical studies on tissues from a patient with Lafora disease. *Clin Chim Acta* **62**, 415-23.

Zhang, C., Yuan, X., Yue, L., Fu, J., Luo, L. and Yin, Z. (2010). PIASy interacts with p73alpha and regulates cell cycle in HEK293 cells. *Cell Immunol* **263**, 235-40.

Zhang, F., Basinski, M. B., Beals, J. M., Briggs, S. L., Churgay, L. M., Clawson, D. K., DiMarchi, R. D., Furman, T. C., Hale, J. E., Hsiung, H. M. et al. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* **387**, 206-9.

Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H. and Cai, D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* **135**, 61-73.

Zhao, M. and Klionsky, D. J. (2011). AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 induces autophagy. *Cell Metab* **13**, 119-20.

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.

Zlatanou, A. and Stewart, G. S. A PIAS-ed view of DNA double strand break repair focuses on SUMO. *DNA Repair (Amst)* **9**, 588-92.

Zlatanou, A. and Stewart, G. S. (2010). A PIAS-ed view of DNA double strand break repair focuses on SUMO. *DNA Repair (Amst)* **9**, 588-92.

ANEXOS

Anexo I. Reactivos

Reactivos	Casa comercial
Medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM)	Lonza
Tampón fosfato salino (PBS)	Lonza
Tripsina	Lonza
Glutamina	Lonza
Penicilina-Estreptomicina	Lonza
Suero Bovino Fetal (FBS)	Lonza
LIPOFECTAMINA 2000TM	Invitrogen
OPTIMEM	Invitrogen
β -Mercaptoetanol (2-ME)	SIGMA
Albúmino de suero bovino (BSA)	SIGMA
Glucosa	J.T Baker
Sacarosa	SIGMA
Galactosa	SIGMA
Leptina	SIGMA
TNF- α	SIGMA
Ampicilina	Roche
Cloramfenicol	SIGMA
Isopropyl-b-D-thiogalactopiranosido (IPTG)	Roche
Dithiothreitol (DTT)	SIGMA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	SIGMA
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	SIGMA
Tritón X-100	SIGMA
Glicerol	J.T Baker
Azul bromofenol	J.T Baker
Coctel de inhibidores de proteasas sin EDTA	Roche
Fluoruro de sodio (NaF)	SIGMA
Peptona	Pronadisa

