



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

**Mecanismos de regulación de
transportadores de membrana.
Interacción entre AMPK y Nedd4.2**

Presentada por:

Guillem Hueso Lorente

Dirigida por:

Lynne Yenush

Pascual Sanz Bigorra

Agradecimientos

Estos últimos días sueño mucho con mis yayos. Lo primero que hice cuando leí el TFC de Agrónomos fue correr a casa de mi yaya Matilde a decírselo, para mí era muy importante, ella decía que cuando lo entregase me nombrarían por lo menos capitán. Fue la última vez que la vi y estaba contenta. Estos sueños de ahora me llevan con los cuatro, estamos contentos en la huerta o en el pueblo. A vosotros va dedicado este trabajo, os quiero mucho, os echo de menos. Y a los que seguís aquí conmigo y habéis seguido este proceso comida a comida, noche a noche gracias familia. Pare, Mare, Mireieta, Ana...gracias por vuestro ánimo y comprensión, sois fun-da-men-ta-les en mi vida.

Esta tesis, como la mayoría, ha supuesto un esfuerzo no sólo mío sino de toda la gente que ha querido estar a mi alrededor. Vosotros me habéis animado y me habéis hecho creer en mi trabajo.

Después de tanto tiempo viniendo a trabajar cada día y sin que los domingos fuesen un bajón por ello, tengo muchas cosas que agradecer. Gracias por confiar en mí cuando aún no había terminado la carrera, por explicarme todo como si fuese la primera vez que lo hicieses. Gracias también por cederme tu sitio, tus pipetas, el pelador de semillas de arroz... gracias por animarme con cada paso que daba y preocuparte por mí con cariño. Gracias por tanta generosidad y confianza, apoyo y comprensión, alegrías y festejos en vuestra casa.

Gracias por ser la primera persona que me habló en la bancada por aquellas primeras risas que nos pegábamos a escondidas cuando la liábamos. Gracias por confiar en mí en la cabina, "lo que se dice en la cabina se queda en la cabina" decíamos...hasta que llegué al IBV y me di cuenta que lo que se dice en la cabina se escucha en todo el laboratorio! :S (por suerte hay cámara de cultivos celulares XD), gracias por confiar en mí, por escucharme y por seguir haciéndolo. Gracias por tus explicaciones tan escuetas como exactas, tan químicas...Recuerdo cuando nos fuimos juntos a la nieve y no paramos de reír desde que quedamos para coger el autobús... en la Huella. Gracias por tu disposición a resolver los problemas, por guardarme el medio a 65°C, por cerrarme las placas, por sacarlas de la estufa de 37°C los sábados, por hacer medio de más, por hacer "lechita" para todos, por subirme los tubos, por ayudarme en cada técnica nueva para mí, por las maxis, en definitiva por toda esa colaboración que no debería perderse cuando seáis "jefes".

Gracias por aceptar ayudarme cuando estabas con tanto lío, intentando avanzar, me motivaste mucho. Gracias por hacerme caso en todo lo que tuvimos que hacer juntos y por animarme a enseñar, mi vocación. Discutimos sí, como el perro y el gato, pero lo disfruté mucho y te quiero!. Me has enseñado paciencia y eficiencia, me tuve que ir muy lejos contigo para empezar a descubrir la mina que eres. Me acuerdo cuando estabas mal y yo me moría por dentro de verte así, gracias por contar conmigo como apoyo. Saber que me podría apuntar a cualquier cosa que me propusieses y saber que me sentiría arropado, y al revés! Si ahora mismo mi sustento viene de la música con la bebida energética es por tu apoyo aquellos jueves de invierno, cuando me tiraba una semana sin poder comer de los nervios.

Gracias por contar conmigo para este proyecto, me dijiste que querías que fuésemos un equipo y vaya si lo fuimos! Hasta de fútbol...El camino no has sido fácil y con lo parecidos que somos en nuestros estados anímicos me has sabido motivar y animar. Desde que por primera vez hace muchos años te acercaste a mí después de un yeast club y me dijiste, "tío tú vales para esto", qué más da si verdad o no?, me lo creí y seguí adelante en momentos de mucha duda que es lo que importa. Lo tienes claro, sabes que lo importante es que nos sintamos capaces y lo consigues.

Gracias por invitarme durante medio año a trabajar con tu grupo, por entender mis dudas iniciales y por tu paciencia con mi inexperiencia. Gracias por acompañarme en cada experimento con una sonrisa, más bien una carcajada! "nianoniaaaaa" por hacerme ver de lo malo lo bueno, y por ayudarme en mis momentos de dudas tan complicados. Me has mostrado la naturalidad y el entusiasmo que se puede tener en un laboratorio a pesar de ser casi dios! nunca olvidaré toda la música que hemos compartido ni el día que fuimos "competentes". Eres la generosidad hecha jamón. Me da mucha vida saber que te acuerdas de mí en los malos momentos, era lo que quería y me lo sigues dando, a veces echo de menos pasar células contigo, como me la jugaste en la cámara de flujo que se oye todo eh?... gracias por tus palabras de apoyo cuando no me salía nada como a ti al principio! Tus consejos claros, concisos y alternativos me han servido mucho, llegarás muy lejos seguro!. Gracias por toda tu ayuda y tu buen rollo, ah! y tus presentaciones, las mejores sin duda. Me sentí muy arropado con vosotros, que grupo más bueno!

Me va a dar mucha pena despedirme de ti pero que mucha mucha, sigue usando esa sonrisa japo, no te puedes ni imaginar lo que ayuda a consolidar cualquier afirmación! Me voy del labo pero seguimos yendo a

conciertos eh? Que me reservo el derecho a los desagradecimientos! Gracias por interesarte tantas veces por cómo iba todo, y por contagiarme ese espíritu de determinación a hacer cualquier cosa. Gracias por tu naturalidad y por demostrarme que todo puede estar donde quiera que vayamos, que fácil lo haces! Gracias por tus carcajadas y tu disposición a ayudar, a compartir las medicinas “lo tengo to barato”

Esta Tesis, como no puede ser de otra manera tiene banda sonora, yo hubiese querido ponerla en materiales y métodos...fundamentales en mi proceso de escritura han sido Kings of Convenience, José González, Yeasayer, Archive, Camille, The Wave Pictures, Antònia Font, Loon Choir, Lali Puna, Arcade Fire... Las hojas que hay de aquí en adelante te están muy agradecidas por tu profesionalidad y calidad “habrá un antes y un después en las Tesis!”. Gracias por estar ahí siempre que necesito tu buen gusto, todo lo que te quiero y lo capaz que eres de todo che...gracias a ti también por dedicarme tres días a ponerle el optimismo a lo escrito, ha sido la guinda definitiva.

A todos:

“Oh, benvinguts, passeu passeu, ara ja no hi falta ningú,
o potser sí, ja me n'adono que tan sols hi faltes tu.

També pots venir si vols, t'esperem, hi ha lloc per tots.
El temps no compta, ni l'espai, qualsevol nit pot sortir el sol.

Oh, benvinguts, passeu passeu, de les tristors en farem fum.
A casa meva és casa vostra si que hi ha cases d'algú.”

Resumen

La regulación del transporte iónico es importante en mamíferos ya que disfunciones en él producen enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, etc. En este contexto, se ha descrito que mutaciones en el gen que codifica para la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) están asociadas con enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas; como el síndrome de *Wolf Parkinson White* que provoca arritmias y la epilepsia mioclónica progresiva de tipo Lafora. La disfunción de transportadores de iones esta implicada en la fisiopatología de estas enfermedades. La regulación post-traducciona l ejerce el control rápido y estricto de proteínas de membrana en respuesta a estímulos concretos. Tanto la fosforilación como la ubiquitinación se estudian en la presente tesis como ejemplos de regulación post-traducciona l. Mediante la fosforilación de proteínas de membrana se puede regular su actividad positiva o negativamente, mientras que con la ubiquitinación se controla la degradación y el reciclaje que se puede producir después de la endocitosis, determinando así la cantidad de cada transportador que se encuentra en la membrana.

En la presente Tesis se profundiza en el modelo constituido por AMPK que regula un canal de sodio (ENaC) a través de la fosforilación de la E3 ubiquitina ligasa Nedd4-2, un regulador directo del canal. Para ello, se ha caracterizado la interacción entre AMPK y Nedd4-2 y se ha estudiado como ésta puede afectar a la interacción entre Nedd4-2 y ENaC. El modelo conocido indica que AMPK activada fosforila a Nedd4-2, lo que favorece su interacción con ENaC y por tanto su ubiquitinación, lo cual dirige el canal a degradarse en el lisosoma, disminuyendo así su presencia en la membrana. Durante este trabajo, se ha podido comprobar que la interacción física entre AMPK y Nedd4-2 es transitoria o indirecta. Sin embargo, se ha descrito que ambas se regulan de manera recíproca, ya que Nedd4-2 ubiquitina a AMPK y AMPK fosforila a Nedd4-2 en al menos tres aminoácidos. Se ha comprobado que uno de estos sitios de fosforilación tiene un papel relevante en la interacción *in vitro* de Nedd4-2 con ENaC cuando AMPK está presente y activa. Aunque serán necesarios más abordajes experimentales para definir la relevancia fisiológica de estas modificaciones post-traduccionales, este estudio añade un componente novedoso y profundiza a nivel molecular en la regulación de la E3 ubiquitina ligasa Nedd4-2 por la proteína quinasa AMPK.

Abstract

Ion transport regulation in mammals is important because dysfunctions in this process may produce cardiovascular and neurodegenerative diseases. Mutations in the gene encoding the AMP-activated protein kinase (AMPK) have been associated with cardiovascular and neurodegenerative diseases, such as Wolf Parkinson White syndrome, which causes arrhythmias, and a type of progressive myoclonic epilepsy called Lafora Disease. The dysfunction of ion transporters is involved in the pathophysiology of these diseases. Post-translational regulation controls membrane proteins strictly and dynamically in response to specific stimuli. Both ubiquitylation and phosphorylation are studied in this Thesis as examples of post-translational regulation. The phosphorylation of membrane proteins may regulate their activity either positively or negatively, while the ubiquitylation controls degradation and recycling that may occur after endocytosis, thereby determining the amount of each membrane transporter present at the plasma membrane.

The starting point of this Thesis is the model which consists of AMPK as a sodium channel (ENaC) regulator via the phosphorylation of the E3 ubiquitin ligase Nedd4-2, a direct regulator of the channel. The interaction between AMPK and Nedd4-2 is characterized and its role in the interaction between Nedd4-2 and ENaC is studied. The model indicates that activated AMPK phosphorylates Nedd4-2, which favors its interaction with ENaC and therefore its ubiquitylation, reducing its presence in the membrane. During this work, we determined that the physical interaction between AMPK and Nedd4-2 is likely to be transient or indirect. However, we find that both are regulated in a reciprocal manner: Nedd4-2 ubiquitinates AMPK and AMPK phosphorylates Nedd4-2 on at least three serine residues. We show that one of these phosphorylation sites has a role in the *in vitro* interaction between Nedd4-2 and ENaC when AMPK is present and active. Although more experimental approaches are needed to define the physiological relevance of these post-translational modifications, this study adds a novel component and contributes to the molecular characterization of the regulation of the E3 ubiquitin ligase Nedd4-2 by the protein kinase AMPK.

Resum

La regulació del transport iònic és important en mamífers ja que disfuncions en aquest procés produeixen malalties cardiovasculars, neurodegeneratives, etc. En aquest context, s'ha descrit que mutacions en el gen que codifica per a la proteïna quinasa activada per AMP (AMPK) estan associades amb infermetats cardiovasculars i neurodegeneratives com la síndrome de *Wolf Parkinson White* que provoca arítmies, i l'epilèpsia mioclònica progressiva de tipus Lafora. La disfunció de transportadors d'ions està implicada amb la fisiopatologia d'aquestes infermetats. La regulació post-traducciona exerceix el control ràpid i estricte de proteïnes de membrana en resposta a estímuls concrets. Tant la fosforilació com la ubicuitinació s'estudien en la present tesi com exemples de regulació post-traducciona. Mitjançant la fosforilació de proteïnes de membrana es pot regular la seva activitat positivament o negativament, mentre que amb la ubicuitinació es controla la degradació i el reciclatge que es pot produir després de l'endocitosis, determinant així la quantitat de cada transportador que es troba en la membrana.

En la present Tesi s'aprofondeix en el model constituït per AMPK que regula un canal de sodi (ENaC) a través de la fosforilació de la E3 ubicuitina ligasa Nedd4.2, un regulador directe del canal. Per a això s'ha caracteritzat la interacció entre AMPK i Nedd4.2, i s'ha estudiat com aquesta pot afectar a la interacció entre Nedd4.2 i ENaC. El model conegut indica que AMPK activada fosforila a Nedd4.2, el que afavoreix la seua interacció amb ENaC i per tant la seua ubicuitinació, disminuint la seua presència a la membrana. Al llarg d'aquest treball s'ha pogut comprovar que la interacció física entre AMPK i Nedd4.2 es transitòria o indirecta. S'ha descrit, però, que ambdós es regulen de manera recíproca, degut a que Nedd4.2 ubicuitina a AMPK i AMPK fosforila a Nedd4.2 en al menys tres aminoàcids. S'ha comprovat que un d'aquests llocs de fosforilació tenen un paper rellevant en la interacció *in vitro* de Nedd4.2 amb ENaC quan AMPK està present i activa. Encara que seran necessaris més abordatges experimentals per definir la rellevància fisiològica d'aquestes modificacions post-traduccionals, el present estudi afegeix un component nou i profunditza a nivell molecular en la regulació de la E3 ubicuitina ligasa Nedd4.2 per la proteïna quinasa AMPK.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1 Proteína quinasas: AMPK y sus ortólogos.....	3
1.1 AMPK.....	3
1.1.1 Estructura cuaternaria y localización de AMPK.....	5
1.1.2 Regulación de AMPK.....	9
1.1.3 Secuencia de reconocimiento de las dianas de AMPK.....	13
1.1.4 Efectos fisiológicos de la activación de AMPK.....	14
1.2 Snf1	18
1.2.1 Estructura cuaternaria	18
1.2.2 Regulación.....	19
1.2.3 Efectos metabólicos.....	19
1.3 Trastornos derivados de defectos en la actividad AMPK.....	20
2 Ubicuitinación	22
2.1 La ubiquitina y la maquinaria de ubiquitinaación	22
2.2 Funciones de la ubiquitinaación	24
2.3 Familia Nedd4.....	27
2.3.1 Nedd4.1/Nedd4.2.....	28
2.3.2 Dianas de Nedd4.2: Transportadores de membrana.....	31
2.3.3 Regulación de Nedd4.2	33
2.4 Rsp5	35
2.4.1 Estructura.....	35
2.4.2 Función y dianas de Rsp5	36
2.5 Adaptadores en levadura y en mamíferos	38
2.6 Trastornos derivados de problemas en la actividad de Nedd4.2.....	42
MATERIAL Y MÉTODOS	51
1 Material biológico y condiciones de crecimiento.....	53

1.1	Bacterias	53
1.2	Levaduras	54
1.3	Cultivos celulares.....	56
2	Plásmidos.....	57
2.1	Vectores de expresión en levadura.....	57
2.2	Vectores de expresión en bacteria.....	58
2.3	Vectores de expresión en mamíferos.....	58
2.4	Vectores intermedios.....	58
3	Obtención de construcciones génicas.....	58
4	Obtención y análisis de proteínas	59
4.1	Obtención de extractos proteicos crudos	59
	a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
	b) Células <i>HEK293T</i>	60
4.2	Electroforesis de proteínas.....	60
4.3	Transferencia a membrana.....	60
4.4	Tinción de membranas con Ponceau S.....	61
4.5	Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.....	61
5	Doble híbrido	62
5.1	Ensayo β -galactosidasa	63
	5.1.1 Ensayo cualitativo en filtro	63
	5.1.2 Ensayo cuantitativo en líquido	64
6	Mutagénesis dirigida.....	64
7	Determinación de la ubiquitinación <i>in vivo</i>	66
8	Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	67
9	Purificación por afinidad de GST.....	67
10	Co-inmunoprecipitación.....	68
	RESULTADOS	71
1	Obtención de hNedd4.2	73

2	Caracterización de la interacción física entre Nedd4.2 y AMPK.....	74
2.1	Ensayos de Doble híbrido	74
2.2	Ensayos de purificación por afinidad GST y co-inmunoprecipitación	77
2.3	Búsqueda de dianas de Nedd4.2: adaptadores entre AMPK y Nedd4.2.....	79
3	Caracterización de la modificación post-traducciona por Nedd4.2 y AMPK.....	81
3.1	Fosforilación de Nedd4.2 por AMPK.....	81
3.2	Determinación del sitio de fosforilación de Nedd4.2 por AMPK.....	83
3.3	Modulación de la interacción entre Nedd4.2 y ENaC por AMPK.	87
3.4	Efecto de la activación de Snf1 en la interacción por doble híbrido entre Nedd4.2 y ENaC.....	91
3.5	Papel de las serinas de Nedd4.2 fosforiladas por AMPK en la interacción por doble híbrido entre Nedd4.2 y ENaC.	95
3.6	Ubiquitinación de AMPK por Nedd4.2.....	98
	DISCUSIÓN	109
1	Caracterización de la interacción entre AMPK y Nedd4.2	112
1.1	Fosforilación de Nedd4.2 por AMPK.	114
1.2	Ubiquitinación de AMPK por Nedd4.2.....	118
	CONCLUSIONES	125
	ANEXO I	167

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y dominios de las subunidades α , β y γ de AMPK, Snf1, Gal83 y Snf4	7
Figura 2. Reguladores de AMPK	11
Figura 3. Alineamiento de la secuencia consenso de reconocimiento por AMPK.	14
Figura 4. Molécula de Ubicuitina.....	23
Figura 5. Esquema de la ubiquitinación. Ubicuitinación tipo HECT. Ubicuitinación tipo RING....	24
Figura 6. Tipos de ubiquitinación.	27
Figura 7. Esquema de la estructura de los dominios de las proteínas de la familia Nedd4.....	27
Figura 8. Relación filogenética entre los Nedd4 de distintas especies.....	28
Figura 9. Esquema de la estructura de los dominios de las proteínas Nedd4.1 y Nedd4.2	29
Figura 10. SGK y PKA regulan la actividad de Nedd4.2.....	34
Figura 11. Esquema de la estructura de los dominios de la proteína Rsp5.....	36
Figura 12. Internalización y distribución endocítica	37
Figura 13. Adaptadores de Rsp5. Miembros de la familia ART en levadura	40
Figura 14. Esquema de la estructura de los dominios de las isoformas 2 y 6 de la proteína Nedd4.2.	74
Figura 15. Doble híbrido. Análisis de crecimiento en medio sólido.....	75
Figura 16. Medida de la interacción entre Nedd4.2 y las subunidades de AMPK mediante la actividad β -galactosidasa.....	76
Figura 17. Análisis Western blot de los transformantes LexA (AMPK α 2, β 2 ó γ 1) con GAD-Nedd4.2.	77
Figura 18. Ensayo de purificación por afinidad de GST-Nedd4.2.....	78

Figura 19. Secuencias consenso de fosforilación de la isoforma 2 de Nedd4.2.	82
Figura 20. Fosforilación in vitro de Nedd4.1 y Nedd4.2.	83
Figura 21. Fosforilación in vitro de Nedd4.2 y ACC1.	84
Figura 22. Alineamiento de secuencias parciales de Nedd4.2.....	86
Figura 23. Fosforilación in vitro de mutantes de Nedd4.2.	87
Figura 24. Esquema del fragmento de la isoforma 2 de Nedd4.2 clonado que contiene los dominios WW.	88
Figura 25. Esquema de los dominios de las tres subunidades de ENaC.....	88
Figura 26. Los dominios WW de Nedd4.2 interactúan con el dominio PY de las tres subunidades de ENaC (α , β , y γ)..	90
Figura 27. La sobre-expresión de AMPK T172D favorece la interacción entre WW-Nedd4.2 y ENaC.....	91
Figura 28. La activación de Snf1 favorece la interacción entre WW-Nedd4.2 y en α/β ENaC.....	93
Figura 29. La interacción entre WW-Nedd4.2 y α ENaC depende de Snf1.	94
Figura 30. Ensayo de doble híbrido en levadura de la interacción entre los mutantes de WW-Nedd4.2 y las subunidades α , β ó γ de ENaC.	97
Figura 31. Ensayo de doble híbrido en levadura de la interacción entre los mutantes de WW-Nedd4.2 y α ENaC.	98
Figura 32. AMPK se ubiquitina por Nedd4.2.	100
Figura 33. Las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ AMPK se ubiquitina por Nedd4.2.	101
Figura 34. Ubiquitinación de las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ AMPK por Nedd4.1 y Nedd4.2 cuando se sobre-expresan los tres componentes del heterotrímero de AMPK.....	103
Figura 35. La ubiquitinación de AMPK $\alpha 2$ por Nedd4.2 se produce en su dominio regulador.	104

Figura 36. Nedd4.2 ubiquitina las subunidades α 2 y β 2 de AMPK formando cadenas en K63.....	106
Figura anexa I. Ensayo de doble híbrido en levadura de la interacción entre Snf1 en combinación con ART1, 2, 3 y 4.	169

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos de activación de AMPK.....	12
Tabla 2. Procesos metabólicos regulados por AMPK.....	15
Tabla 3. Características de las 8 variantes de Nedd4.2 descritas en la base de datos UniProt bajo la referencia Q96PU5.....	30
Tabla 4. Transportadores regulados por Nedd4.2.....	32
Tabla 5. Adaptadores de la familia ART (Adaptada de (Conibear, 2010)).	41
Tabla 6. Oligonucleótidos usados en las construcciones.	59
Tabla 7. Anticuerpos usados para inmunodetección de proteínas.....	62
Tabla 8. Oligonucleótidos usados para realizar la mutagénesis dirigida.....	65

ABREVIATURAS

ACC1/ACC2:	Isoformas 1 (α) y 2 (β) de la acetil-CoA carboxilasa
AICAR:	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribofuranósido
AID:	<i>Autoinhibitory Domain</i>
Akt1:	<i>Protein kinase B (PKB)</i>
AMPK:	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ASC:	<i>Association with Snf1 Complex</i>
APG1:	<i>AutoPhaGy related 1</i>
ART:	<i>Arrestin-Related Trafficking adaptors</i>
CaMKK:	<i>Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase</i>
CKII:	<i>Casein Kinase II</i>
CBS:	<i>Cistationina-β-Sintasa</i>
CFTR:	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CID:	<i>Collission Induced Dissociation</i>
CMV:	Citomegalovirus
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO:	Dimetilsulfóxido
CNB:	Centro Nacional de Biotecnología
DTE:	Ditioeritritol
DTT:	Ditiotreitól
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EF-2:	<i>Elongation Factor-2</i>
Ena1:	<i>Exitus Natrus</i>
ENaC:	<i>Epitelial Sodium Channel</i>
EPM2A/ EPM2B:	<i>Epilepsy of Progressive Myoclonus type 2 gene A/B</i>
ETD:	<i>Electron Transfer Dissociation</i>
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GAD:	<i>Gal4 Activating Domain</i>
GAL83:	<i>GALactose metabolism 83</i>
GBD:	<i>Glycogen Binding Domain</i>

GST:	<i>Glutathión S Transferasa</i>
HA:	<i>Human influenza virus hemagglutinin epitope</i>
HECT:	<i>Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus</i>
HEK:	<i>Human Embryonic Kidney cells</i>
HeLa:	<i>Henrietta Lacks</i>
HMG-CoA:	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HNF4:	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4</i>
HPLC-MS:	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)</i>
HRP:	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSL:	<i>Hormone Sensitive Lipase</i>
IKK β :	I κ β quinasa- β
IP:	Inmunoprecipitación
IPTG:	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
GAP1:	<i>General Amino acid Permease</i>
GLUT1/2/4:	<i>Glucose transporter 1/2/4</i>
KCNM:	<i>Potassium large Conductance calcium-activated channel, subfamily M</i>
KD:	<i>Kinase Domain</i>
KCNQ:	<i>Potassium voltage-gated Channel, KQT-like family</i>
LB:	<i>Lysogenic-Broth</i>
LKB1:	<i>Liver kinase B1</i>
MALDI TOF:	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight.</i>
MARK4:	<i>Microtubule-Affinity-Regulating Kinase 4</i>
MVB:	<i>Multi vesicular body</i>
myc:	<i>Avian myelocytomatosis virus epitope</i>
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NBD:	<i>Nucleotide binding domain</i>
Nedd4:	<i>Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4</i>
ONPG:	o-nitrofenil β -D-galactopiranosido
ORF:	<i>Open Reading Frame</i>
PBS:	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PKA :	Protein Kinase A

PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PP1/2A/2C:	<i>Protein phosphatase 1/2A/2C</i> (proteína fosfatasa de tipo 1/2A/2C)
PPAR γ :	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PRKAA1/2:	<i>Protein kinase, AMP-activated, alpha 1/2 catalytic subunit</i>
PRKAB1/2:	<i>Protein kinase, AMP-activated, beta 1/2 regulatory subunit</i>
PRKAG1/2/3:	<i>Protein kinase, AMP-activated, gamma 1/2/3 regulatory subunit</i>
RD:	<i>Regulatory Domain</i> (dominio regulador)
RING:	<i>Really Interesting New Gene</i>
Rsp5:	<i>Reverses Spt- Phenotype 5</i>
SGK:	<i>Serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase</i>
SIP1:	<i>SNF1-Interacting Protein 1</i>
Snf1:	<i>Sucrose, Non-Fermenting 1</i>
SnRK1:	<i>Snf1 related kinase 1</i>
SREBP:	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Proteins</i>
TORC2:	<i>Transducer of regulated CREB-2</i>
TAK1:	<i>Transforming growth factor β-activated kinase 1</i>
TASK3:	<i>TWIK-related Acid-sensitive K Channel 3</i>
TSC2:	<i>Tuberous sclerosis 2</i>
Tween-20:	<i>Polyoxyethylene sorbitan monolaurate</i>
WPWS:	<i>Wolff-Parkinson-White Syndrome</i>
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YNB:	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD:	<i>Yeast peptone dextrose</i>



INTRODUCCIÓN

Las células de cualquier organismo están constantemente expuestas a cambios y estímulos tanto externos como internos. Los mecanismos de señalización celular consiguen combinar y adaptar las distintas rutas para controlar una gran variedad de procesos celulares que se reparten tanto espacial como temporalmente. El proceso celular en el que una señal es transmitida para producir un cambio en la actividad o el estado de la célula es la transducción de señales. Ésta comienza con la recepción de una señal, por ejemplo la unión de un ligando a un receptor o la activación de un receptor por un estímulo como la luz, y termina con la regulación de un proceso celular, como por ejemplo la transcripción o un ruta metabólico.

La regulación post-traducciona l de proteínas es una herramienta específica y eficiente que permite regular muchos procesos celulares. La fosforilación/desfosforilación controla la mayor parte de la transducción de señales en células eucariotas. A través de la fosforilación las quinasas pueden ejercer la regulación post-traducciona l de muchas proteínas, influyendo en su actividad, localización y función general. En el caso de transportadores de membrana, las quinasas participan regulando directa o indirectamente ciertos transportadores, regulándolos positiva o negativamente mediante fosforilación.

En la presente Tesis se profundiza en un modelo constituido por una quinasa (AMPK) que regula indirectamente la actividad de un canal iónico (ENaC) a través de la fosforilación de una ubiquitina ligasa (Nedd4.2), un regulador directo del canal.

1 Proteína quinasas: AMPK y sus ortólogos

1.1 AMPK

En 1973 se describió en mamíferos una proteína quinasa que se activaba en presencia de AMP y que era capaz de fosforilar e inactivar reversiblemente tanto a la 3-hidroxi-3-metilglutaril Co-enzima A [(HMG)-CoA]



reductasa, como a la acetil Co-enzima A carboxilasa 1 (ACC1), enzimas reguladoras de la síntesis del colesterol y de los ácidos grasos respectivamente (Beg et al., 1973; Carlson and Kim, 1973). Posteriormente se caracterizó (Yeh et al., 1980) y se clonó el gen que codifica la quinasa activada por AMP (AMPK) de mamíferos (Berl et al., 1994), permitiendo la identificación de ortólogos en levaduras como Snf1 (*sucrose non fermenting*) (Carlson, 1999) o en plantas como la familia SnRK (*SNF1 Related Kinase*) (Halford and Hardie, 1998).

La caracterización de ratones mutantes en AMPK desveló el papel fisiológico que tiene esta proteína quinasa. Se ha descrito que ratones que carecen del gen que codifica para AMPK α 2 desarrollan hiperglucemia en ayuno, intolerancia a la glucosa y un aumento en la producción de glucosa hepática, lo que indica que esta isoforma puede tener un papel en la regulación de la producción de glucosa (Andreelli et al., 2006; Viollet et al., 2003). Ratones que carecen del gen que codifica para la subunidad α 1 de AMPK presentan una entrada reducida de glucosa en músculo, anemia, reticulocitosis y un mayor peso del bazo (Turnley et al., 1999; Um et al., 2011). También se ha propuesto que AMPK puede tener además un papel neuroprotector ya que los ratones que carecen del gen que codifica para la subunidad β 1 de AMPK presentan daños en el cerebro, convulsiones, pérdida de peso corporal, esteatosis hepática, hiperinsulinemia y muerte anterior al destete (Dzamko et al., 2010; Turnley et al., 1999). Siguiendo esta línea, se han descrito también daños cerebrales en ratones con una disrupción en la subunidad β 1 de AMPK (Dasgupta and Milbrandt, 2009).

Está descrito que la activación de AMPK puede regular tanto positiva como negativamente la actividad o la presencia de ciertos transportadores de iones en la membrana. En este sentido AMPK puede tener un papel importante en la homeostasis iónica y constituye una parte importante en la presente tesis.

1.1.1 Estructura cuaternaria y localización de AMPK

AMPK es un heterotrímero formado por tres subunidades distintas: α , β y γ . Las subunidades reguladoras β y γ se asocian a la subunidad catalítica α . Para estas subunidades se han descrito distintas isoformas. La subunidad α tiene dos isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Stapleton et al., 1996), la subunidad β tiene dos isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ (Thornton et al., 1998), y la subunidad γ tiene tres isoformas $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$ (Cheung et al., 2000). La existencia de dichas isoformas provoca que se formen múltiples combinaciones heterotriméricas. La composición del heterotrímero depende fundamentalmente del tipo celular aunque la predominante en la mayoría de tejidos es la combinación formada por $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (Hardie and Sakamoto, 2006).

1.1.1.1 AMPK α

Como se ha definido con anterioridad, la subunidad α de AMPK es la subunidad catalítica. Se han descrito dos isoformas: la codificada por el gen PRKAA1, AMPK $\alpha 1$, de 548 aminoácidos (63k Da) y la codificada por PRKAA2, AMPK $\alpha 2$, de 552 aminoácidos (63 kDa). Ambas isoformas tienen un dominio quinasa (KD) en su parte amino-terminal y un dominio regulador (RD) en su parte carboxi-terminal (revisado en Sanz, 2008) (Sanz, 2008).

El KD está conservado a lo largo de la evolución y tiene un 61% de homología con sus ortólogos en levaduras y plantas, Snf1 y SnRK1, respectivamente. El RD presenta menor homología y es el responsable de la interacción con las subunidades AMPK β y AMPK γ . En el KD se encuentra el aminoácido Thr172 cuya fosforilación es fundamental para la actividad de AMPK (Hawley et al., 1996). En su estado inactivo (ausencia de actividad quinasa), el KD interacciona con una región inhibidora (AID; *autoinhibitory domain*), que se encuentra dentro de su propio RD entre los aminoácidos 313 y 392. En su estado activado, el KD se libera de su unión al AID, favoreciendo la fosforilación del aminoácido Thr172 en el lazo catalítico (Hardie et al., 1998) (Figura 1).

En cuanto a su localización, las dos variantes de AMPK α muestran diferentes patrones en células de mamífero: AMPK α 1 es mayoritariamente citoplasmática mientras que AMPK α 2 se puede localizar tanto en núcleo como en citoplasma en proporciones similares (Salt et al., 1998). Adicionalmente, se ha observado que la localización intracelular puede variar. Por ejemplo, se ha visto que después del ejercicio físico la subunidad α 2 de AMPK se acumula en el núcleo de células de músculo esquelético (McGee et al., 2003). De manera similar, se ha observado que, en células HeLa, las subunidades α 1 y α 2 se translocan al núcleo después de un estrés por tratamiento con deoxiglucosa (Witczak et al., 2008).

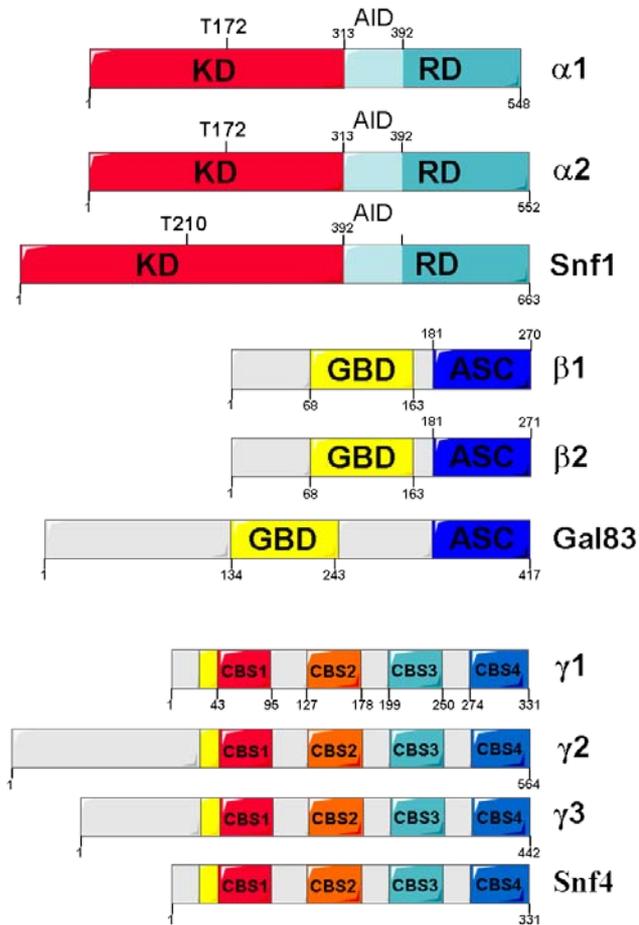


Figura 1. Estructura y dominios de las subunidades α , β y γ de AMPK, Snf1, Gal83 y Snf4

1.1.1.2 AMPK β

La subunidad β , es una subunidad reguladora dentro del heterotrímero AMPK. Se han descrito dos isoformas, la codificada por el gen PRKAB1, denominada β 1, que es una proteína de 270 aminoácidos (38 kDa) y la codificada por PRKAB2, denominada β 2, que es una proteína de 271 aminoácidos (34 kDa) (revisado en (Sanz, 2008)). Sus ortólogos en levadura

son Sip1/Sip2/Gal83 (Jiang and Carlson, 1997). La subunidad β actúa como elemento de unión entre la subunidad α y la subunidad γ mediante un dominio localizado en su parte carboxi-terminal denominado ASC (Association with Snf1 Complex), que es esencial para esta unión (Hudson et al., 2003; Iseli et al., 2005; Woods et al., 1996). En la parte amino-terminal se encuentra el dominio GBD (Glycogen Binding Domain) (Hudson et al., 2003; Polekhina et al., 2003), cuyo papel, al menos en parte, es localizar AMPK cerca de una de sus dianas, la glucógeno sintasa, mediante su unión a glucógeno (Hardie, 2011; McBride and Hardie, 2009) (Figura 1).

La subunidad $\beta 1$ parece estar expresada de manera ubicua y homogénea (Salt et al., 1998) mientras que los niveles de $\beta 2$ son más elevados en músculo esquelético (Thornton et al., 1998). La localización subcelular de la subunidad β puede variar en función de distintas modificaciones post-traduccionales como la miristoilación, que favorece su asociación a membrana (Mitchelhill et al., 1997; Warden et al., 2001), o la fosforilación de las serinas S24 y S25 que favorece su localización nuclear (Mitchelhill et al., 1997). Por otra parte, la estimulación con agentes inductores de estrés celular como la deoxiglucosa y el dietil maleato (Kodiha et al., 2007) provoca la acumulación de la subunidad β en el núcleo.

1.1.1.3 AMPK γ

En el caso de la subunidad γ de AMPK, se han descrito tres isoformas. AMPK $\gamma 1$ es una proteína de 331 aminoácidos (37k Da), AMPK $\gamma 2$ contiene 564 aminoácidos (63 kDa) y AMPK $\gamma 3$ es un compuesto por 492 aminoácidos (55 kDa) (Figura 1). El ortólogo de esta subunidad en levadura es Snf4. La parte carboxi-terminal está conservada mientras que la amino-terminal es la que presenta las mayores diferencias (revisado en (Sanz, 2008)).

En la parte conservada de la subunidad γ , se encuentra un tándem de cuatro dominios CBS, acrónimo de la cistationina- β -sintasa (Bateman,

1997). Estos dominios forman pares, siendo entonces conocidos como dominios de Bateman. Estos dominios son capaces de unir ATP y AMP (Kemp, 2004; Scott et al., 2004). La unión de AMP o ATP a los dominios de Bateman es altamente cooperativa (Hardie and Sakamoto, 2006; Hardie et al., 2006). La afinidad de la unión de AMP es mucho mayor que la de ATP, y su unión es mutuamente excluyente (Hardie and Sakamoto, 2006; Hardie et al., 2006; Scott et al., 2004). La región amino-terminal previa al primer dominio CBS (Pre-CBS) es fundamental para la formación funcional y activa del complejo con las subunidades α y β (Viana et al., 2007) (Figura 1).

Las tres isoformas de la subunidad γ de AMPK se expresan en todos los tejidos. Sin embargo, la isoforma 3 se expresa más en músculo esquelético (Mahlapuu et al., 2004), mientras la isoforma 2 se expresa mayoritariamente en corazón, cerebro, placenta y músculo esquelético (Cheung et al., 2000). La localización subcelular de la subunidad γ es tanto citosólica como nuclear, siendo principalmente nuclear para la isoforma 1 en neuronas (Turnley et al., 1999).

1.1.2 Regulación de AMPK

AMPK es un sensor energético celular sumamente sensible a cambios en el ratio AMP/ATP, de manera que el aumento en la concentración de AMP provoca que su actividad se incremente hasta 5 veces. AMP activa AMPK mediante dos vías. Por un lado es un activador alostérico que induce un cambio conformacional en el heterotrímero de AMPK. Por otro lado, la unión de AMP, hace que sea peor sustrato para sus fosfatasas específicas. Ambos procesos son reversibles por ATP, que a elevadas concentraciones, compite con AMP por los dominios de Bateman en la subunidad γ de AMPK (Hardie et al., 1998; Sanders et al., 2007; Suter et al., 2006).

La activación de AMPK se correlaciona con la fosforilación de la treonina 172 (Thr172) de la subunidad catalítica AMPK (Hardie and Hawley,

2001; Sugden et al., 1999). Se han identificado varias AMPK quinasas (AMPKKs) encargadas de realizar esta fosforilación *in vivo*, como LKB1, CaMKK α , CaMKK β y TAK1 (Hawley et al., 2003; Hurley et al., 2005; Momcilovic et al., 2006; Woods et al., 2003a; Woods et al., 2005). LKB1 es una quinasa supresora tumoral relacionada con el síndrome de Peutz-Jeghers (Alessi et al., 2006) y es la responsable de la mayor parte de la actividad AMPKK en extractos celulares (Carling, 2004a). Al contrario que LKB1, CaMKK fosforila AMPK, independientemente del ratio AMP/ATP, en respuesta al tratamiento de células mediante ionóforos de Ca²⁺ (Hawley et al., 2005). TAK1 (transforming growth factor- β -activated kinase) se identificó como quinasa de AMPK en un estudio de activadores de su ortólogo en levadura Snf1 (Momcilovic et al., 2006).

Como se representa en la figura 2, la activación de AMPK se correlaciona con la fosforilación en Thr172, además esto es condición necesaria y suficiente, ya que el mutante T172A carece de actividad mientras que el mutante T172D es constitutivamente activo y no está afectado por tratamiento con fosfatasas (Stein et al., 2000).

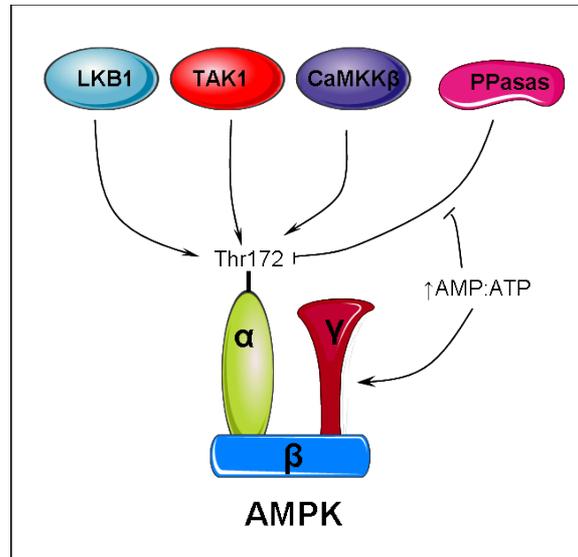


Figura 2. Reguladores de AMPK

La activación de AMPK en células de mamífero se puede producir en respuesta a estrés o al tratamiento con compuestos activadores de la quinasa (Tabla 1). Las condiciones de activación se clasifican en dos grupos; aquellas en las que se produce un aumento en el ratio AMP/ATP, y aquellas en las que la activación de AMPK es independiente del ratio AMP/ATP (Sanders et al., 2007).

Tabla 1. Mecanismos de activación de AMPK. (Sanz, 2008)

Activadores de AMPK que afectan al ratio AMP/ATP	Referencia	Activadores de AMPK que no afectan al ratio AMP/ATP	Referencia
AICAR	(Corton et al., 1995)	Peroxinitrito	(Zou et al., 2002)
Dinitrofenol	(Fryer et al., 2002)	Metformina	(Zou et al., 2004)
H ₂ O ₂	(Choi et al., 2001)	Estrés osmótico	(Daniel and Carling, 2002)
Inhibidores de la cascada de MAP quinasas	(Dokladda et al., 2005)	Estradiol	(Schulz et al., 2005)
Tiazolidinedionas	(Fryer et al., 2002)	Baja glucosa	(Itani et al., 2003b)
Leptina (en músculo)	(Minokoshi et al., 2002)	Ácidos grasos saturados de cadena larga y monosaturados	(Fediuc et al., 2006)
Adiponectina	(Yamauchi et al., 2002)	Agonista de receptores de nucleótidos	(da Silva et al., 2006)
Ácido α -lipóico (en músculo)	(Lee et al., 2005)	Agonistas de α 1-adrenoreceptores	(Hutchinson and Bengtsson, 2006)
		A769662 (6,7-Dihidro-4-hidroxi-3-(2'-hidroxi[1,1'-bifenil]-4-il)-6-oxotieno[2,3-b]piridin-5-carbonitrilo)	(Cool et al., 2006)

Por otro lado, en cuanto a la inactivación de AMPK, se sabe que las fosfatasa PP1, PP2A y PP2C son capaces de desfosforilar el aminoácido Thr172 de AMPK α *in vitro* (Davies et al., 1995; Woods et al., 2003b). Recientemente se ha demostrado que PP1-R6 está implicada en la desfosforilación inducida por glucosa de AMPK en células β pancreáticas

(Garcia-Haro et al., 2010). Además se sabe que la activación de PP2A mediante tratamientos con glucosa, palmitato y etanol (Liangpunsakul et al., 2010; Ravnskjaer et al., 2006; Wu et al., 2007) y por choque térmico (Wang et al., 2010) inhibe AMPK.

1.1.3 Secuencia de reconocimiento de las dianas de AMPK

Desde la identificación de las primeras proteínas diana de AMPK, las enzimas biosintéticas de lípidos 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (Davies et al., 1992) y la isoforma ACC1 (α) de la acetil-CoA carboxilasa (Clarke and Hardie, 1990), se ha intentado determinar una secuencia consenso de fosforilación por AMPK mediante la comparación de los sitios fosforilados de éstas y otras dianas conocidas. En la figura 3 (adaptada de (Towler and Hardie, 2007)), se representa el alineamiento del sitio de fosforilación de 14 dianas de AMPK. El sitio consenso obtenido es Φ -[β ,X]-X-X-S/T-X-X-X- Φ donde Φ es un aminoácido hidrofóbico (M, I, L, F, V), β es un aminoácido básico (R, K, H) y X puede ser cualquier aminoácido.

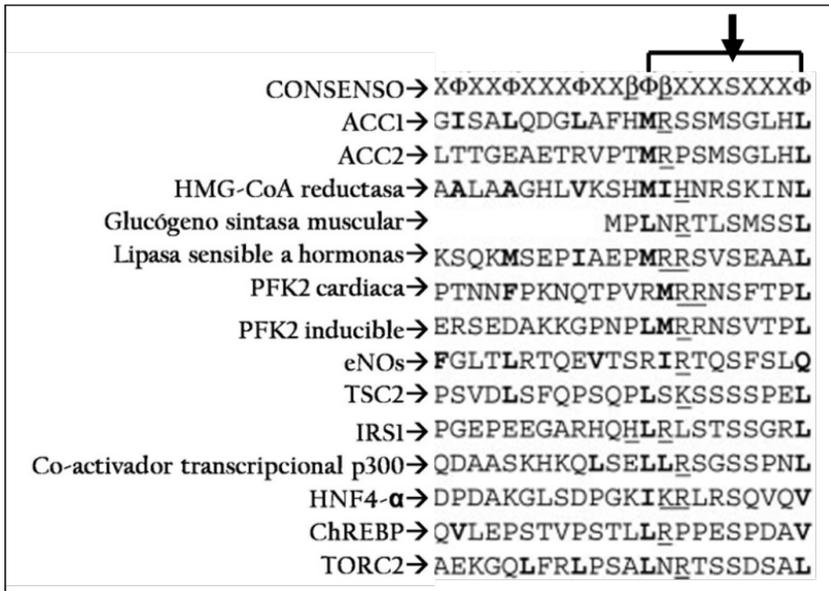


Figura 3. Alineamiento de la secuencia consenso de reconocimiento por AMPK de varias proteínas humanas, a las cuales fosforila de manera fisiológica. El aminoácido de serina fosforilado está indicado por una flecha, Φ es un residuo hidrofóbico, β es un residuo básico y X puede ser cualquier residuo. PFK2, 6-fosfofructoquinasa 2. eNOS, *endothelial nitric-oxide synthase*. HNF4-α, hepatocyte nuclear factor 4. TORC2, transducer of regulated CREB-2. TSC2, tuberous sclerosis complex 2. Modificado de (Towler and Hardie, 2007).

1.1.4 Efectos fisiológicos de la activación de AMPK

1.1.4.1 Efectos sobre el metabolismo energético

Como ya se ha mencionado, AMPK actúa como sensor energético ya que su actividad cambia en función del ratio de AMP/ATP. La activación de AMPK provoca generalmente el estímulo de respuestas metabólicas encaminadas a prevenir crisis energéticas y metabólicas en situaciones donde la síntesis de ATP se reduce (hipoxia, isquemia, baja disponibilidad de nutrientes) o el consumo de ATP se acelera. De este modo, la activación de AMPK estimula la toma de glucosa y/o procesos catabólicos que generan ATP como la oxidación de ácidos grasos, la glucólisis, la degradación proteica

(Towler and Hardie, 2007; Witczak et al., 2008) e inhibe procesos anabólicos como las rutas de síntesis de ácidos grasos, colesterol, glucógeno y proteínas (Towler and Hardie, 2007) que consumen ATP y que no son necesarios para la inmediata supervivencia de la célula (Canto and Auwerx, 2010) (Tabla 2).

Tabla 2. Procesos metabólicos regulados por AMPK. El color verde indica regulación positiva y el rojo negativa. AS160, Akt substrate 160. CPT1, carnitine palmitoyl-CoA transferase 1. PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase. P70S6K, proteína ribosomal S6Kinasa 1. HSL, hormone-sensitive lipase. mTOR, mammalian target of rapamicin. TSC2, tuberous sclerosis complex 2. FOXO, family of forkhead transcription factors. MuRF1, E3 ubiquitina ligasa. PPAR y peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Sirtuin1, silent mating type information regulation 2 homolog, deacetilasa NAD dependiente. Tabla adaptada de (Canto et al., 2009; Jager et al., 2007; Towler and Hardie, 2007; Witczak et al., 2008).

Ruta metabólica	Tejido	Diana inmediata	Efecto inmediato
Entrada glucosa	Músculo	AS160	Aumenta translocación GLUT4
Entrada glucosa	Músculo		Aumenta expresión GLUT4
Entrada glucosa	Distintos tejidos		Aumenta expresión GLUT1
Entrada glucosa	Adipocitos	GLUT4	Baja estimulación por insulina
Glucólisis	Músculo cardiaco	PFK2 cardiaca	Aumenta actividad de PFK2 cardiaca y fructosa-2,6-bisfosfatasa
Glucólisis	Monocitos, Macrófagos	PFK2 inducible	Aumenta actividad de PFK 2 inducible y fructosa-2,6-bisfosfatasa
Oxidación ácidos grasos	Músculo, Hígado, Otros tejidos	ACC-2	Baja actividad de ACC-2 y malonil-CoA. Aumenta actividad de CPT1
Síntesis ácidos grasos	Todos los tejidos	ACC-1	Baja actividad de ACC1
Síntesis ácidos grasos	Hígado	SREBP-1c, HNF4.1α	Baja expresión de ACC1 y ácido graso sintasa
Síntesis colesterol	Hígado	HMG-CoA reductasa	Baja actividad de HMG-CoA reductasa
Síntesis glucógeno	Músculo	Glucógeno sintasa muscular	Baja actividad de glucógeno sintasa muscular

Ruta metabólica	Tejido	Diana inmediata	Efecto inmediato
Síntesis glucosa	Hígado	TORC2	Baja expresión de PEPCK y glucosa-6-fosfatasa
Síntesis proteínas	Todos los tejidos	EF2K	Baja elongación traducción proteica
Síntesis proteínas	Todos los tejidos	TSC2	Baja actividad mTOR y P70S6K1
Degradación proteínas	Músculo		Aumenta expresión de FOXO1, FOXO3, MuRF1
Autofagia	Todos los tejidos	TSC2	Baja actividad mTOR
Lipólisis	Adipocitos	HSL	Baja estimulación adrenérgica de Lipólisis
Lipólisis	Músculo	HSL	Aumenta degradación de triglicéridos
Biogénesis mitocondrias	Músculo	PPAR γ co-activador-1 α , Sirtuin-1	Aumenta expresión de genes de mitocondria

1.1.4.2 Efectos de la actividad de AMPK sobre la homeostasis iónica

La mayoría de las dianas conocidas de AMPK están implicadas en el metabolismo energético, sin embargo, se ha visto que AMPK también puede contribuir en otros aspectos de la función celular fosforilando otras proteínas, como es el caso de algunos canales iónicos. Se ha visto que la activación de AMPK regula ciertas proteínas de membrana como el canal epitelial de sodio (ENaC) (Almacá et al., 2009; Bhalla et al., 2006; Carattino et al., 2005), algunos canales de potasio sensibles a oxígeno (TASK-3, KCNMA1, KCNMB1) (Dallas et al., 2009), y el canal de cloro regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) (Hallows et al., 2000; Kongsuphol et al., 2009b).

El canal epitelial de sodio (ENaC) controla la reabsorción de sodio en riñón, colon, pulmón y glándulas sudoríparas. ENaC se encuentra en la

membrana y es permeable principalmente a iones sodio (Na^+), pero también a litio (Li^+) y protones (H^+) (Palmer, 1987). Se ha demostrado que la estimulación de AMPK mediante compuestos como la fenformina, metformina, y el AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-beta-4-ribofuranosido), en oocitos de *Xenopus*, células HEK293 y células epiteliales polarizadas de riñón, reduce el transporte de sodio (Bhalla et al., 2006; Carattino et al., 2005; Woollhead et al., 2005). Se han realizado estudios con ratones $\text{AMPK}\alpha 1^{-/-}$ que muestran mediante medidas electrofisiológicas que la ausencia del gen $\text{AMPK}\alpha 1$ causa mayor presencia de ENaC en células epiteliales (Almacá et al., 2009). Se propone que AMPK controla ENaC facilitando su ubiquitinación por la E3 ubiquitina ligasa Nedd4.2 y su posterior endocitosis (Bhalla et al., 2006; Carattino et al., 2005). Dicho modelo de regulación es uno de los contenidos principales de esta tesis y será tratado con mayor profundidad en el apartado 2.3.2.

Existen varios canales de potasio regulados por AMPK, como Kv7.1 (KCNQ1), que sigue un modelo de regulación similar a ENaC. Kv7.1 es un canal de potasio de baja conductancia y dependiente de voltaje (Jespersen et al., 2005). Su expresión en diferentes tejidos permite que regule distintas funciones, como en el caso de cardiomiocitos donde es responsable de cesar el potencial de acción cardíaco (Jespersen et al., 2005; Nerbonne and Kass, 2005; Peroz et al., 2008). La ubiquitinación de Kv7.1 por Nedd4.2 provoca la internalización del canal de potasio desde la membrana plasmática (Jespersen et al., 2007). Se ha observado que AMPK inhibe la actividad de Kv7.1 indirectamente a través de Nedd4.2 (Alzamora et al., 2010; Andersen et al., 2011), de forma similar a como lo hace con ENaC, aunque, como en el caso de ENaC, el mecanismo molecular involucrado todavía no está definido.

CFTR es un canal de Cl^- dependiente de ATP cuya función es deficiente en pacientes que padecen de fibrosis quística, una enfermedad genética letal (Welsh and Smith, 1993). Se ha visto que AMPK se une a CFTR

en su dominio NBD (nucleotide binding domain) (Carling, 2004b; Hallows et al., 2000; Hallows et al., 2003) inhibiendo su actividad al fosforilar dos serinas (S737 y S768) que se encuentran en el dominio regulador (Kongsuphol et al., 2009a).

Todos estos datos indican un papel fundamental de AMPK en la regulación de canales iónicos, ejerciendo su influencia bien de forma directa, como con el canal de cloro CFTR, o bien y mayoritariamente de forma indirecta, a través de la regulación de un regulador intermedio, como en el caso de los canales ENaC o Kv7.1.

1.2 Snf1

Snf1 (sucrose non-fermenting) es una serina/treonina proteína quinasa de levadura ortóloga de AMPK en mamíferos (Hardie et al., 1998) que actúa como sensor del estatus energético de la célula. En la presente tesis, se emplea el sistema modelo de la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, y en concreto la función del ortólogo de AMPK, Snf1, para abordar algunos aspectos de la regulación de Nedd4.2 por AMPK. Por tanto, a continuación se describe en más detalle su estructura y función.

1.2.1 Estructura cuaternaria

Al igual que en mamíferos, el complejo AMPK de levaduras consta de tres subunidades. La proteína quinasa Snf1 (ortólogo de la subunidad α de AMPK) forma parte de un complejo junto con la subunidad activadora Snf4 (ortólogo de la subunidad γ de AMPK) y con miembros de la familia Sip1/Sip2/Gal83 (ortólogos de la subunidad β de AMPK) (Jiang and Carlson, 1997). Snf1 tiene un dominio catalítico amino-terminal (KD) y otro regulador carboxi-terminal (RD) (Jiang and Carlson, 1996), que interacciona tanto con la subunidad activadora Snf4 como con los miembros de la familia Sip1/Sip2/Gal83 (Jiang and Carlson, 1997). De igual manera que AMPK β , las

proteínas Sip1, Sip2, y Gal83 tienen dos dominios definidos: el dominio ASC (Association with Snf1 Complex) y el GBD (Glycogen Binding Domain) (Wiatrowski et al., 2004; Yang et al., 1994). Asimismo, Snf4 también presenta 4 dominios CBS (cistationina- β -sintasa como AMPK γ) (Rudolph et al., 2007) (Figura1).

1.2.2 Regulación

Snf1 se activa como respuesta a la disminución de los niveles intracelulares de glucosa (Jiang and Carlson, 1996; McCartney and Schmidt, 2001; Wilson et al., 1996; Woods et al., 1994), en concordancia con su papel principal en la adaptación a la ausencia de glucosa mediante la utilización de fuentes alternativas de carbono. Al contrario que AMPK, el complejo Snf1 no se activa alostéricamente por AMP, aunque su activación se correlaciona con un aumento del ratio AMP/ATP (Adams et al., 2004; Wilson et al., 1996). Adicionalmente, el complejo Snf1 se activa por otros estreses como el pH alcalino, el estrés salino, y el estrés oxidativo (Hong and Carlson, 2007).

La regulación de la actividad del complejo Snf1 requiere la fosforilación de la subunidad catalítica Snf1 en el aminoácido treonina 210 (Thr210), equivalente a Thr172 en AMPK α , por una quinasa específica y la interacción con Snf4, lo que neutraliza la función del dominio auto-inhibitorio de Snf1 (Jiang and Carlson, 1996; Leech et al., 2003).

1.2.3 Efectos metabólicos

Snf1 regula la transcripción de un gran número de genes, entre ellos, los relacionados con el metabolismo de fuentes de carbono alternativas a la glucosa, gluconeogénesis, respiración, transporte y meiosis. Estudios genómicos han demostrado que la expresión de más de 400 genes depende de Snf1 en condiciones de baja concentración de glucosa (Young et al., 2003).

Como parte de su función controlando el uso de la energía celular, Snf1 regula la actividad de enzimas metabólicos relacionados con la

acumulación de ácidos grasos y carbohidratos. También regula genes relacionados con autofagia *ATG1* y *ATG13* (Hardy et al., 1994; Mitchelhill et al., 1994; Wang et al., 2001b).

Snf1 es importante en la respuesta a otros tipos de estrés. Así, el mutante *snf1* tiene un defecto de crecimiento en ayuno de otros nutrientes diferentes a la glucosa como el fosfato, el sulfato y el nitrógeno (Thompson-Jaeger et al., 1991). También es sensible a los iones sodio y litio (Alepuz et al., 1997; Portillo et al., 2005; Ye et al., 2006), a otros cationes tóxicos como la higromicina B (Portillo et al., 2005), así como al pH alcalino y al choque térmico (Platara et al., 2006). La mayoría de respuestas a estrés mediadas por *Snf1* conllevan control transcripcional, como en el caso de la inducción de la expresión Na^+ -ATPasa *ENA1* por estrés alcalino o salino (Portillo et al., 2005; Ye et al., 2006).

1.3 Trastornos derivados de defectos en la actividad AMPK

Debido al papel fundamental que tiene AMPK y sus ortólogos en levaduras y plantas en el mantenimiento del balance energético, cualquier disfunción de la ruta de señalización en la que participe provocará perturbaciones sistémicas que contribuirán al desarrollo de desórdenes metabólicos.

La implicación de AMPK en la tolerancia al estrés metabólico provocado por envejecimiento se ha estudiado en eucariotas inferiores como *Saccharomyces cerevisiae* (Ashrafi et al., 2000; Lin et al., 2001) o *Caenorhabditis elegans* (Curtis et al., 2006; Lin et al., 2001) y se ha observado que la vida media del organismo aumenta con la activación de AMPK. En eucariotas superiores, el papel de AMPK no está tan claro. En algunos estudios se relaciona una baja actividad de AMPK con la reducción de la resistencia a la insulina durante el envejecimiento (Qiang et al., 2007; Reznick et al., 2007), mientras que en otros casos el envejecimiento se correlaciona con un aumento

de la actividad de AMPK como consecuencia de la fosforilación de la misma (Thomson and Gordon, 2005; Thomson and Gordon, 2006).

En relación con la obesidad, en la mayoría de modelos genéticos de esta enfermedad en roedores se sabe que la actividad de AMPK está reducida en tejidos periféricos como corazón, músculo esquelético e hígado (Barnes et al., 2002; Liu et al., 2006; Wang and Unger, 2005).

La subunidad α de AMPK presenta alta actividad durante la isquemia, aunque existen diferentes modelos genéticos donde los resultados sugieren que, en la recuperación del corazón durante la reperfusión, esta actividad puede resultar tanto positiva (Scott et al., 2008; Shibata et al., 2005) como negativa (Xing et al., 2003).

Como se ha explicado en el apartado 1.1.2, LBK1 es una quinasa activadora de AMPK, y tiene propiedades como supresor tumoral. Esta quinasa esta mutada en el síndrome Peutz-Jegher, una enfermedad genética que predispone a varios tipos de cáncer (Ji et al., 2007), lo que podría mediar que una disminución de la actividad de AMPK estuviese relacionada con un aumento de la proliferación celular.

AMPK también está implicada en enfermedades tanto cardiovasculares como neurodegenerativas. Mutaciones en la subunidad γ de AMPK de *Drosophila* produce un fenotipo de neurodegeneración (Scott et al., 2008). El síndrome de *Wolf Parkinson White* afecta prácticamente al 0,1% de la población y consiste en una anomalía de la conducción eléctrica del corazón que puede producir arritmias, taquicardias y muerte súbita (Fitzsimmons et al., 2001). Se descubrió que dicho síndrome estaba asociado a una mutación en la subunidad $\gamma 2$ de AMPK en pacientes con la enfermedad (Gollob et al., 2001). Por otro lado, la epilepsia mioclónica progresiva de tipo Lafora (LD, OMIM 254780), es una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva que se caracteriza por la presencia de inclusiones intracelulares de glucógeno

llamadas cuerpos de Lafora (HARRIMAN et al., 1955; Lafora, 1911; Sakai et al., 1970). Esta enfermedad se puede producir por mutaciones en los genes EPM2A (epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene A) (Minassian et al., 1998; Serratosa et al., 1999) y EPM2B (Chan et al., 2004) que codifican para laforina y malina respectivamente. Ambos genes forman un complejo que es importante para la regulación negativa del metabolismo del glucógeno y dicha formación está modulada positivamente por la fosforilación de laforina por AMPK (Solaz-Fuster et al., 2008)

2 Ubicuitinación

2.1 La ubiquitina y la maquinaria de ubiquitinación

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos muy conservada y presente en todos los organismos eucariotas (Figura 4). Puede formar enlaces covalentes estables con otras proteínas lo cual condiciona su estabilidad, actividad o localización (Ciechanover et al., 1978; Hershko and Ciechanover, 1998; Hershko et al., 2000). La ubiquitinación de proteínas está vinculada con la degradación por el proteasoma, el control de localización subcelular, la expresión génica, la reparación del DNA, las cascadas de señalización, la endocitosis y el tráfico intracelular (Glickman and Ciechanover, 2002; Haglund and Dikic, 2005; Pickart and Fushman, 2004).

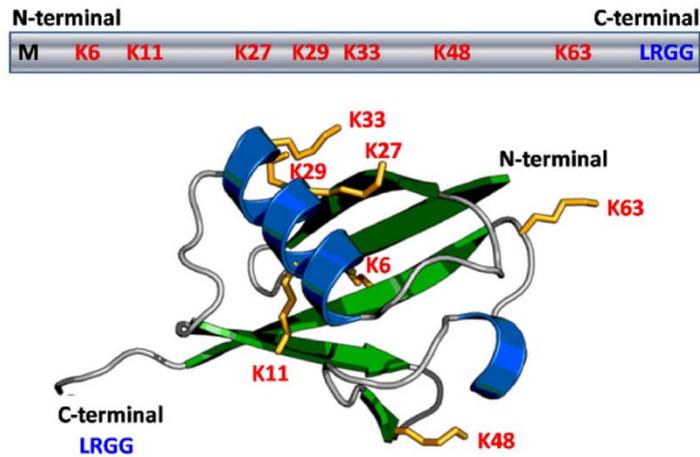


Figura 4. Molécula de Ubiquitina. Esquema lineal y estructura terciaria de la ubiquitina. Las lisinas se indican en rojo y el tetrapéptido C-terminal que contiene la G 76 en azul.

La ubiquitinación ocurre por la acción de tres enzimas que actúan de forma secuencial: la E1, que es la enzima activadora de la ubiquitina, la E2, una enzima que conjuga la ubiquitina y la E3, una ubiquitina ligasa. Las E3 ubiquitina ligasas son las encargadas de determinar la especificidad de la ubiquitinación y por ello, su número es mucho mayor en comparación con el de las E1 o E2. En el genoma humano se estima que existen dos E1, aproximadamente treinta E2 y más de seiscientos E3 (Li et al., 2008). Dependiendo de su mecanismo de acción las E3 se clasifican en dos tipos: RING (*Really Interesting New Gene*) y las tipo HECT (*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*).

Las E3 ubiquitina ligasas tipo HECT poseen una cisteína conservado que sirve de intermediario entre la ubiquitina y la proteína diana. El proceso comienza con la formación de un enlace de alta energía tioéster entre la glicina (G76) del extremo carboxi-terminal de la ubiquitina y la enzima E1,

con gasto de una molécula de ATP. Posteriormente la ubiquitina se transfiere por transtiolación al enzima E2. Por último, la E3 transfiere la ubiquitina activada mediante un enlace amida a un grupo ϵ -amino de una lisina de la proteína diana (Hershko and Ciechanover, 1998) (Figura 5).

Las E3 ubiquitina ligasa tipo RING no tienen función catalítica y únicamente actúan como puente que acerca a la E2 a la proteína diana y posibilita la reacción de conjugación entre la ubiquitina-E2 y dicho sustrato (Figura 5).

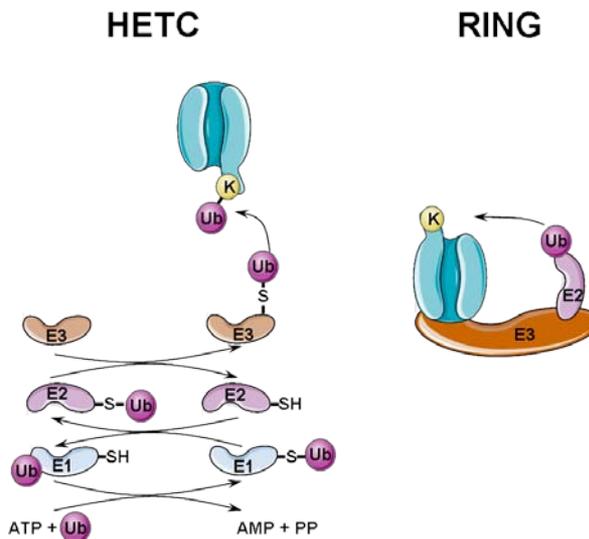


Figura 5. Esquema de la ubiquitinación. Ubiquitinación tipo HECT. Ubiquitinación tipo RING.

2.2 Funciones de la ubiquitinación

La unión covalente de la ubiquitina a una proteína es una modificación postraduccional. Originalmente se había descrito esta modificación como un etiquetado de proteínas para su rápida degradación por el proteasoma, aunque posteriormente se ha visto que la ubiquitinación puede

estar relacionada con algunas funciones no proteolíticas, como la regulación de la actividad y la localización del sustrato ubiquitinado (Bhoj and Chen, 2009; Chen and Sun, 2009; Giasson and Lee, 2003; Hoeller and Dikic, 2009; Raiborg and Stenmark, 2009).

La unión de una molécula de ubiquitina a un único aminoácido Lys de la proteína sustrato se denomina monoubiquitinación, mientras que si se unen a varios aminoácidos Lys se denomina muti-ubiquitinación. Además, la ubiquitina también puede ser ubiquitinada y formar cadenas de ubiquitinas sobre uno o varios aminoácidos Lys, lo que se denomina poliubiquitinación (Figura 6).

La molécula de ubiquitina contiene siete aminoácidos Lys (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) (Figura 4) a los que se puede unir otra ubiquitina, siendo las cadenas más comunes las formadas sobre los aminoácidos Lys48 y Lys63 (K48 y K63). Adicionalmente también se pueden formar cadenas sobre la metionina amino-terminal de la ubiquitina (Komander et al., 2009). Generalmente, el tipo de ubiquitinación y el tipo de cadena que se forma determinará el destino de la proteína ubiquitinada.

Las cadenas de ubiquitina con uniones en **K48** son las más comunes y suponen una etiqueta para la degradación proteasomal de la proteína poliubiquitinada (Baboshina and Haas, 1996; Thrower et al., 2000).

La poliubiquitinación en **K63** está implicada en la reparación de DNA, tráfico y localización intracelular, respuesta inflamatoria, función ribosomal, y regulación de cascadas de señalización, y no implica necesariamente etiquetado para degradación proteasomal *in vivo* (Chen and Sun, 2009; Glickman and Ciechanover, 2002; Pickart and Fushman, 2004; Wang et al., 2001a).

Las cadenas formadas en las lisinas **K29**, **K33** son menos frecuentes. Este tipo de uniones fueron descubiertas en levadura mediante

espectrometría de masas (Peng et al., 2003). Las uniones K29 están vinculadas al direccionamiento del sustrato al proteasoma, aunque no está claro si implica proteólisis, mientras que se desconoce la función de la poliubiquitinación en cadenas con uniones K33. Se ha observado que las quinasas relacionadas con AMPK, NUA1 (*AMPK-related kinase 5*) y MARK4 (*microtubule-affinity-regulating kinase 4*) son ubiquitinadas mediante la formación de cadenas con uniones en K29 y/o K33 (Al-Hakim et al., 2008).

La poliubiquitinación en **K27** también fue descrita gracias a la espectrometría de masas (Peng et al., 2003). Se ha visto que Jun, una proteína reguladora de la transcripción, está regulada por poliubiquitinación en K27 y degradación en el lisosoma (Ikeda and Kerppola, 2008).

Estudios iniciales indican que las cadenas tipo **K11** pueden servir como señal para la degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD) (Xu et al., 2009). Las uniones K11 también se han observado en cadenas combinadas con K63 donde son efectivas para internalización y degradación del complejo MHC (*major histocompatibility complex*) clase 1 (Boname et al., 2010; Goto et al., 2010).

Las cadenas de tipo **K6** son poco frecuentes y se han observado en combinación con K27, K48 y K63 con función no proteolítica (Ben-Saadon et al., 2006; Pickart and Fushman, 2004).

Recientemente se han identificado unas cadenas denominadas **lineales** en las que las moléculas de ubiquitina no se unen sobre ninguna de sus lisinas, sino que el enlace consiste en la unión de la glicina carboxi-terminal de un monómero de ubiquitina con la metionina amino-terminal del siguiente monómero (Kirisako et al., 2006). Se ha descrito que una de sus funciones es activar NFκB (clave en procesos inflamatorios, anti-apoptóticos e inmunológicos) mediante la poliubiquitinación lineal de NEMO (*NFκB essential modulator*) (Tokunaga et al., 2009)

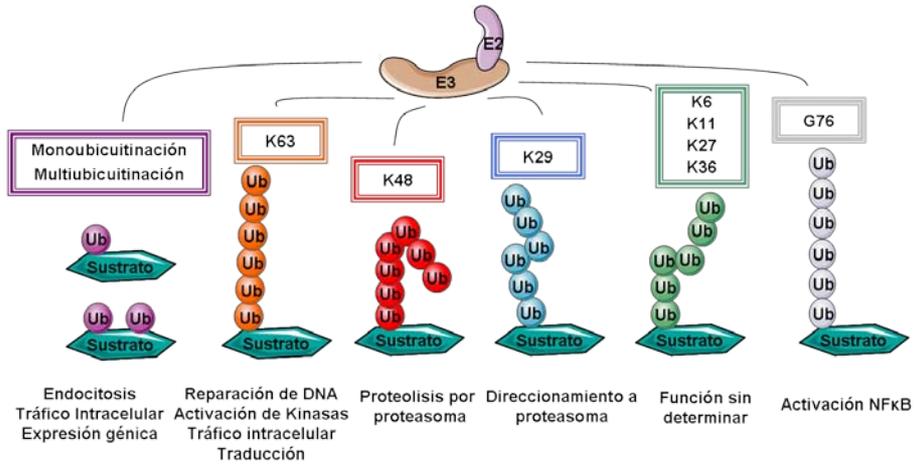


Figura 6. Tipos de ubiquitinación. Esquema de los diferentes tipos de cadenas mono y poliubiquitinadas y eventos celulares en los que intervienen.

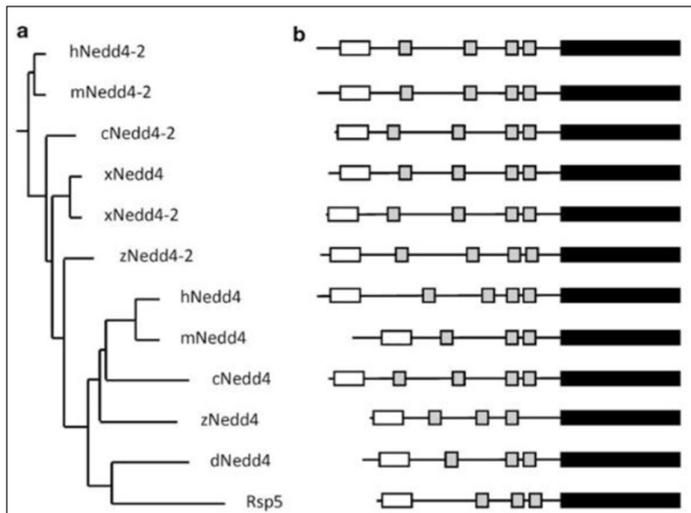
2.3 Familia Nedd4

La familia Nedd4 se encuentra dentro de la familia de E3 ubiquitina ligasas tipo HECT que, en humanos, está formada por nueve miembros: Nedd4.1, Nedd4.2 (Nedd4L), ITCH, SMURF1, SMURF2, WWP1, WWP2, NEDL1, y NEDL2.11-13 (Harvey and Kumar, 1999; Ingham et al., 2004; Shearwin-Whyatt et al., 2006). Nedd4.1 y Nedd4.2 son los más relacionados entre sí. Las proteínas de la familia Nedd4 se caracterizan por tener en la parte amino-terminal un dominio C2 de unión a lípidos y/o calcio, varios dominios WW (de 2 a 4) de interacción proteína-proteína y un dominio catalítico HECT en la parte carboxilo-terminal (Harvey et al., 1999; Ingham et al., 2004; Shearwin-Whyatt et al., 2006) (Figura 7).



Figura 7. Esquema de la estructura de los dominios de las proteínas de la familia Nedd4

El análisis filogenético a partir de varias especies indica que Nedd4.1 sería el miembro ancestral de la familia, mientras que Nedd4.2 se originó más tarde, probablemente por duplicación génica (Yang and Kumar, 2010) (Figura 8). Todos los vertebrados presentarían Nedd4.1 y Nedd4.2. En levadura únicamente existe un gen de la familia Nedd4, denominado RSP5.



2.3.1 Nedd4.1/Nedd4.2

2.3.1.1 Estructura

Nedd4.1 se identificó originalmente como Nedd4 en 1992 en un rastreo de genes de ratón reprimidos en el sistema nervioso central durante la

fase embrionaria temprana (Kumar et al., 1992). Tanto Nedd4.1 como Nedd4.2 tienen en la parte amino-terminal un dominio C2 de unión a lípidos y/o calcio, cuatro dominios WW de interacción proteína-proteína y en la parte carboxilo-terminal el dominio catalítico HECT (Harvey et al., 1999; Ingham et al., 2004; Shearwin-Whyatt et al., 2006). Existe un 65% de similitud con la secuencia peptídica de Nedd4.2, siendo la parte menos conservada la localizada entre los dominios WW1 y WW3 (Figura 9).

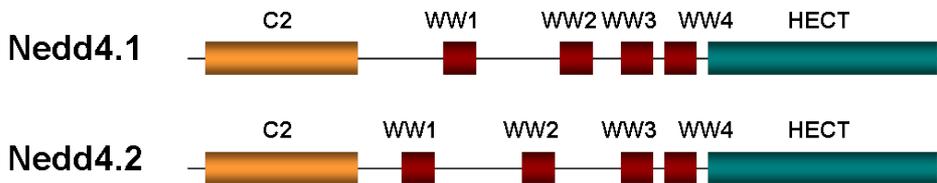


Figura 9. Esquema de la estructura de los dominios de las proteínas Nedd4.1 y Nedd4.2

En humanos, el gen Nedd4.1 (NCBI Gene ID: 4734) se localiza en el cromosoma 15 (Chen et al., 2001) y el gen Nedd4.2 (NCBI Gene ID: 23327) se localiza en el cromosoma 18 (Chen et al., 2001) y tiene una estructura genómica compleja. Presenta múltiples exones proximales en los que el sitio de inicio de la transcripción es variable, además la secuencia/señal de poliadenilación varía, formándose regiones 3' no traducidas de diferentes tamaños, y exones internos, produciéndose lo que se conoce como eventos de *splicing* (empalme) alternativo. Como consecuencia, se produce un conjunto de transcritos distintos cuya expresión puede estar asociada a un tejido concreto. Esta variedad de transcritos codifica proteínas Nedd4.2 que pueden variar tanto en la cantidad de dominios WW como en la presencia o no del dominio C2 (Itani et al., 2003b). En la tabla 3 se resume las características de las variantes de Nedd4.2.

Tabla 3. Características de las 8 variantes de Nedd4.2 descritas en la base de datos UniProt bajo la referencia Q96PU5.

Isoforma	Nº aa	C2	WW1	WW2	WW3	WW4	HECT	Tejido
1	975	SI	SI	SI	SI	SI	SI	Riñón
2	911	SI	SI	NO	SI	SI	SI	Piel, Útero
3	871	SI	SI	NO	SI	SI	SI	Testículo
4	854	NO	SI	SI	SI	SI	SI	Próstata
5	955	SI	SI	SI	SI	SI	SI	Piel, Útero
6	947	SI	SI	SI	SI	SI	SI	Próstata
7	967	SI	SI	SI	SI	SI	SI	Próstata
8	995	SI	SI	SI	SI	SI	SI	Cerebro

2.3.1.2 Función

A pesar de presentar cierta redundancia funcional (Henry et al., 2003), Nedd4.1 y Nedd4.2 presentan distinta preferencia por ciertos sustratos. De manera general, Nedd4.1 tiene implicaciones en la regulación del crecimiento celular y el desarrollo del sistema nervioso (Cao et al., 2008; Liu et al., 2009; Shi et al., 2008). Muchas funciones que realiza Nedd4.2 son comunes a las de Nedd4.1, pero existen funciones específicas y hay diversos estudios que tratan de elucidar qué sustratos son ubicuitinados por cada una de dichas proteínas específicamente. Así, Nedd4.2 se identificó como regulador específico del canal epitelial de Na⁺, ENaC (Abriel et al., 1999; Harvey et al., 2001; Kamynina et al., 2001).

Para conocer el papel de Nedd4.2 *in vivo* se han generado ratones Nedd4.2 *knockout* o *KO* (carentes de función Nedd4.2). En un primer estudio se vio que los ratones *KO* presentaban alta presión sanguínea por la desregulación del canal epitelial de Na⁺ ENaC acrecentada por dieta alta en sales (Shi et al., 2008). En otro estudio más reciente se observa que los

ratones Nedd4.2 KO tienen síntomas más severos con muerte perinatal y elevada actividad de ENaC en los pulmones, lo que provoca que las crías no sean capaces de inflar los pulmones y, por tanto, de respirar (Boase et al., 2011).

2.3.2 Dianas de Nedd4.2: Transportadores de membrana.

Las proteínas de la familia Nedd4 interactúan físicamente con sus sustratos mediante los dominios de unión WW que reconocen motivos denominados PY en las proteínas diana, que son secuencias PPxY o, en algunos casos LPxY (Kanelis et al., 2001; Kasanov et al., 2001; Staub et al., 1996).

Entre los sustratos ubiquitinados por Nedd4.2 hasta la fecha, la mayoría son proteínas de membrana. El dominio amino terminal de Nedd4.2 (C2) se une a fosfolípidos de manera dependiente de Ca^{2+} , y parece ser el responsable de la localización de la proteína Nedd4.2 en la cara interior de la membrana plasmática (Ingham et al., 2004; Suzuki et al., 2002).

Un ejemplo de la regulación de una proteína de membrana por Nedd4.2 es el ya mencionado canal epitelial de Na^+ , ENaC. Esta proteína se encuentra en pulmón, riñón, colon, conductos de sudor y glándulas salivares. Consta de tres subunidades α , β , y γ en una estequiometría trimérica (Canessa et al., 1994). Su función es crítica ya que el transporte de sodio en el riñón es el último responsable de mantener el balance corporal de dicho ión así como de mantener la presión sanguínea en niveles normales (Garty and Benos, 1988). Además, la retirada normal de fluido del espacio alveolar para el intercambio adecuado de aire en los pulmones depende también del transporte de sodio mediado por ENaC (Matalon and O'Brodoovich, 1999).

La ubiquitinación de ENaC es un requisito para su internalización y posterior degradación. La E3 ubiquitina ligasa Nedd4.2 tiene el mismo patrón de localización subcelular que ENaC (Staub et al., 1997b). La descripción inicial

de la interacción entre ambas proteínas se realizó en el sistema de doble híbrido en levadura. Dicha interacción se realiza entre los dominios WW de Nedd4.2 y los dominios PY (PPxY) que se encuentran en las tres subunidades de ENaC (Staub et al., 1996). Diversos estudios sobre la interacción Nedd4.2/ENaC en células renales demuestran que Nedd4.2 se une a las moléculas de ENaC que están asociadas a la membrana para ubiquitinarlas (Malik et al., 2005; Snyder, 2005; Zhou et al., 2007).

Tabla 4. Transportadores regulados por Nedd4.2

Ión transportado	Transportador	Referencia
Sodio	ENaC	(Staub et al., 1997a)
	Nav1.2	(Fotia et al., 2004; Rougier et al., 2005)
	Nav1.3	(Fotia et al., 2004; Rougier et al., 2005)
	Nav1.5	(van Bemmelen et al., 2004)
	Nav1.7	(Fotia et al., 2004; Rougier et al., 2005)
	Nav1.8	(Fotia et al., 2004; Rougier et al., 2005)
Potasio	KCNQ1/KCNE1/ Kv7.1	(Jespersen et al., 2007; Andersen et al., 2011)
	KCNQ2/3, KCNQ3/5	(Ekberg et al., 2007; Schuetz et al., 2008)
	KCNJ2	(Alesutan et al., 2011)
	KCNA3/KCNA5	(Boehmer et al., 2008; Henke et al., 2004)
Calcio	CACNB1	(Persaud et al., 2009)
	TRPV6	(Zhang et al., 2010)
Cloro	CIC5	(Hryciw et al., 2004)
	CIC2	(Palmada et al., 2004)
	CIC-Ka/Barttin	(Embark et al., 2004)
	TTHY2	(He et al., 2008)
	EAAT2	(Boehmer et al., 2008)
	DMT1	(Howitt et al., 2009)

Desde la identificación de ENaC como un canal de iones regulado por ubiquitinación (Staub et al., 1997a), se han ido sumando estudios sobre otros canales que se regulan por Nedd4.2. Por ejemplo, dos canales de sodio y potasio cardiacos, Nav1.5 y Kv7.1, están regulados por ubiquitinación a través de Nedd4.2 (Jespersen et al., 2007; Staub and Rotin, 2006; van Bemmelen et al., 2004), mediante un mecanismo similar al descrito para la regulación de ENaC (Abriel et al., 1999). En la tabla 4 se resumen los diferentes transportadores regulados mediante ubiquitinación por Nedd4.2 agrupados según el ión que transportan.

2.3.3 Regulación de Nedd4.2

Existen estudios sobre la regulación de Nedd4.2 mediante fosforilación por proteínas quinasa y el efecto que dicha regulación produce sobre la ubiquitinación de proteínas de membrana. El transporte de sodio engloba algunos de estos estudios, y en concreto los dirigidos al canal epitelial de sodio ENaC (Almacá et al., 2009). Existen dos rutas hormonales que asocian los cambios de $[Na^+]$ y volumen celular con la fosforilación de Nedd4.2. La ruta de la renina-angiotensina-aldosterona se activa por un flujo sanguíneo renal escaso. En el epitelio, la aldosterona se une al receptor mineralcorticoide, lo que induce la transcripción de la quinasa inducida por glucocorticoide del suero (SGK) (Chen et al., 1999; Naray-Fejes-Toth et al., 1999). SGK fosforila a Nedd4.2 en tres sitios consenso RXRXX(S/T), lo que disminuye la afinidad por el sitio de unión PPxY de ENaC (Debonneville et al., 2001; Snyder et al., 2002). Este efecto está causado aparentemente por la interacción de Nedd4.2 fosforilada con proteínas del tipo 14-3-3 que impiden que la E3 ubiquitina ligasa se una a su diana ENaC (Liang et al., 2008) (Figura 10). Las proteínas 14-3-3 se unen a aminoácidos serina o treonina fosforilados que se encuentran en la secuencia consenso (RSX(S/T)XP). El mecanismo por el que la unión de estas proteínas impide la interacción entre Nedd4.2 y ENaC se podría explicar como una interferencia directa en la unión, bien dejando a Nedd4.2 en una

conformación desfavorable para la unión, o bien produciendo impedimento estérico. Dicha unión podría estar interfiriendo en la desfosforilación de Nedd4.2 (Ichimura et al., 2005) o en su localización celular (Lopez-Girona et al., 1999).

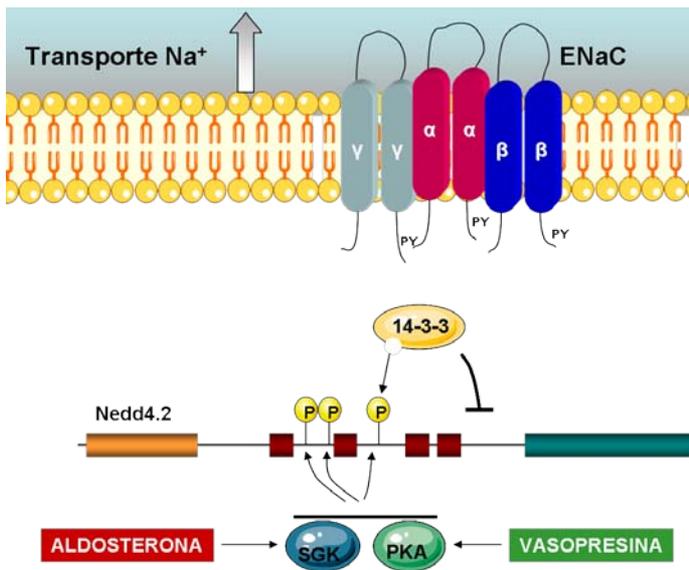


Figura 10. SGK y PKA regulan la actividad de Nedd4.2. Para aumentar el transporte de Na⁺, SGK fosforila Nedd4.2. La fosforilación induce la unión de dimeros de 14-3-3, lo que impide la unión de Nedd4.2 con ENaC. PKA fosforila los mismos tres sitios que SGK.

La segunda ruta hormonal implicada se inicia con la liberación de vasopresina desde la pituitaria posterior en respuesta a la reducción del volumen intravascular (Garty and Palmer, 1997). La vasopresina se une a los receptores V2 de la membrana basolateral en las células epiteliales, lo que induce la acumulación de cAMP, a través de la actividad de la adenilato ciclasa, y activa la proteína quinasa A (PKA). PKA fosforila los mismos tres aminoácidos que fosforila SGK, lo que representa un punto de convergencia entre las dos rutas hormonales (Snyder et al., 2002) (Snyder et al., 2004).

De manera similar a SGK y PKA, también $\text{I}\kappa\text{B}$ quinasa $-\beta$ (IKK β), que responde principalmente a la inflamación, fosforila Nedd4.2 evitando la ubiquitinación de ENaC y por tanto, aumentando la reabsorción de Na^+ y disminuyendo la vasodilatación y la hipotensión derivadas de la inflamación (Edinger et al., 2009).

Otras quinasas que se ha demostrado que fosforilan Nedd4.2 son Akt1 (Lee et al., 2007) y AMPK, con la particularidad de que esta última provoca el efecto contrario a todas las anteriores sobre ENaC. La activación de AMPK reduce la presencia de ENaC en la membrana, supuestamente por favorecer la ubiquitinación de ENaC por Nedd4.2, aunque el mecanismo involucrado no está definido (Bhalla et al., 2006). A diferencia de las quinasas anteriores, se desconocen los aminoácidos de Nedd4.2 fosforilados por AMPK y es objeto de la presente tesis profundizar en este aspecto.

2.4 Rsp5

En *Saccharomyces cerevisiae* existe una única E3 ubiquitina ligasa ortóloga a la familia Nedd4 denominada Rsp5 (Huibregtse et al., 1995). El gen que codifica Rsp5 es esencial para la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* y dicha proteína es clave para el tráfico intracelular de proteínas, la respuesta a choque térmico, la transcripción, la endocitosis y la estabilidad ribosomal.

2.4.1 Estructura

De la misma forma que las proteínas de la familia Nedd4, Rsp5 posee un dominio C2 en la parte amino-terminal, tres dominios WW y un dominio HECT en la parte carboxilo-terminal (Harvey and Kumar, 1999) (Figura 11). El dominio C2 contiene aproximadamente 130 aminoácidos y como se ha comentado para Nedd4 está regulado por calcio. En levadura, se ha visto que mutaciones en este dominio C2 impiden que Rsp5 se una a la membrana (Dunn et al., 2004; Harvey and Kumar, 1999). Rsp5 contiene tres dominios WW

compuestos de unos 40 aminoácidos que reconocen los denominados dominios PY presentes en las proteínas sustrato. El dominio catalítico HECT está compuesto por aproximadamente 350 aminoácidos y es esencial para la actividad ubiquitina ligasa. La mutación de una cisteína conservada en dicho centro activo supone la pérdida de dicha actividad y produce un efecto dominante negativo en el crecimiento celular (Huibregtse et al., 1995).

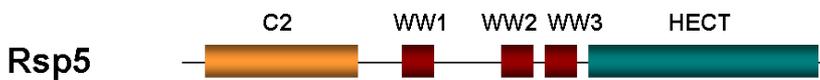


Figura 11. Esquema de la estructura de los dominios de la proteína Rsp5.

2.4.2 Función y dianas de Rsp5

Uno de los papeles más estudiados de Rsp5 es el que juega en el tráfico intracelular de proteínas, en concreto en la endocitosis y distribución de cuerpos multi-vesiculares (MVB: *multi vesicular body*). De manera general, la endocitosis supone la invaginación de parte de la membrana plasmática en la que se encuentran proteínas de membrana y/o nutrientes extracelulares formando vesículas cuyo destino puede ser el aparato del Golgi, donde son generalmente recicladas y devueltas a la membrana o siguen el proceso de maduración de las vesículas hasta llegar a fusionarse con el orgánulo de degradación proteico, que en levaduras es la vacuola y en células de mamíferos es el lisosoma (Figura 12). Rsp5 participa en dicho proceso ya que se ha demostrado que el destino de las proteínas endocitadas (reciclaje o degradación) depende de su estadio de ubiquitinación. Las dianas de Rsp5 son proteínas como la permeasa general de aminoácidos Gap1 (Springael et al., 1999), las permeasas de uracilo Fur4 (Galan et al., 1996; Hein and Andre, 1997), de triptófano Tat2 (Beck et al., 1999), de maltosa Mal61 (Medintz et al.,

1998), los transportadores de hexosa Hxt6/7 (Beck et al., 1999), de zinc Zrt1 (Gitan and Eide, 2000) y el receptor de feromonas Ste2 (Dunn and Hicke, 2001).

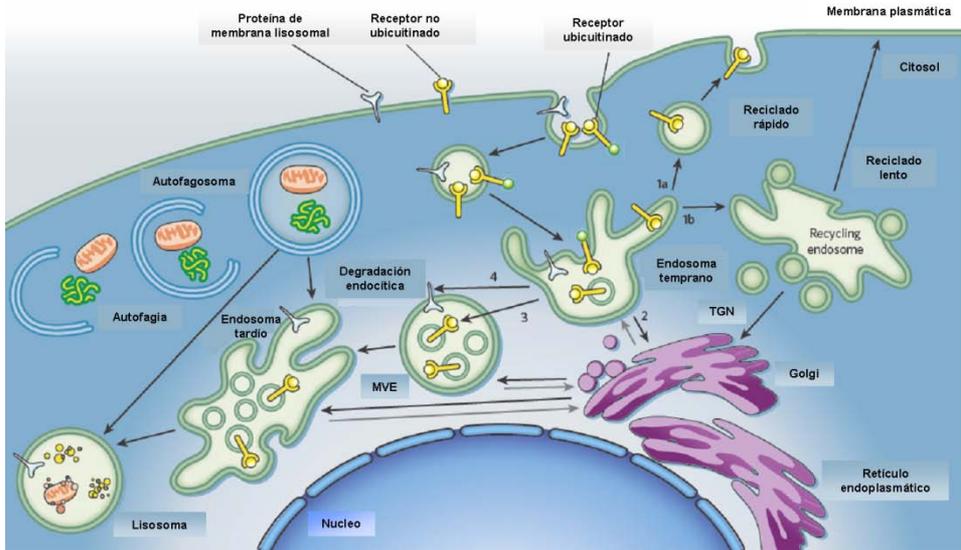


Figura 12. Internalización y distribución endocítica (Raiborg and Stenmark, 2009). Los diferentes tipos de proteínas de membrana son internalizadas por endocitosis y trasladadas al endosoma temprano, que también recibe cargas de la red trans-Golgi (TGN). Dependiendo de las diversas proteínas que entran en la membrana del endosoma, y de las modificaciones post-traduccionales que llevan, se envían a diferentes destinos. Algunas cargas, como los receptores de nutrientes, son reciclados de vuelta a la membrana plasmática, bien directamente (paso 1a), bien indirectamente a través del endosoma de reciclaje (paso 1b). Otros, como los receptores de enzimas lisosomales y algunas proteínas tóxicas, se mandan al TGN (paso 2). Las proteínas de membrana ubiquitinadas, son enviadas en vesículas intra-luminales y algunas acaban en el lumen del lisosoma (o vacuola en levadura) via los endosomas multivesiculares MVE (paso 3). En contraste, las proteínas de membrana lisosomales alcanzan su destino siendo principalmente enviadas al perímetro de la membrana de los MVE (paso 4). El contenido de los autofagosomas también se degrada en los lisosomas.

Existen diversos estudios que localizan a Rsp5 en el núcleo, donde se ha descrito que afecta a la transcripción regulando la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (Rpb1 de RNAII), que es ubiquitinada y dirigida para

degradación por el proteasoma 26S en condiciones de estrés (Beaudenon et al., 1999; Wang et al., 1999). Rsp5 también está implicada en la exportación de mRNA (Rodríguez et al., 2003), en la localización del tRNA (Neumann et al., 2003) y en la condensación de la cromatina (Altheim and Schultz, 1999; Harkness et al., 2002).

Otra de las funciones esenciales de Rsp5 es la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos insaturados y el mantenimiento de la homeostasis de lípidos y esteroides (Hoppe et al., 2000; Kaliszewski et al., 2008; Neumann et al., 2003). Rsp5 controla la activación de dos activadores transcripcionales homólogos (Spt23 y Mga2) (Hoppe et al., 2000; Shcherbik et al., 2003; Shcherbik et al., 2004) que, a su vez, regulan la expresión del gen *OLE1* (Zhang et al., 1999), necesario para síntesis de ácidos grasos monosaturados (Stukey et al., 1990).

2.5 Adaptadores en levadura y en mamíferos

La ubiquitinación es una modificación fundamental en la regulación de proteínas de membrana a través de endocitosis y Rsp5 está implicada en la ubiquitinación de un gran número de estas proteínas. Como ejemplos de proteínas reguladas por la maquinaria endocítica a través de Rsp5 se encuentran el transportador de uracilo Fur4 (Blondel et al., 2004), el transportador general de aminoácidos Gap1 (Soetens et al., 2001), Pma1 (Pizzirusso and Chang, 2004) y Smf1 (Hetteema et al., 2004). Dichos transportadores tienen una característica común: no interactúan directamente con Rsp5 ya que carecen del motivo de reconocimiento (PY) por Rsp5. Debido a esto, se planteó la posibilidad que proteínas adaptadoras mediasen en la interacción entre Rsp5 y los sustratos que no presentan el dominio de reconocimiento PY en su secuencia.

En 2008, Lin y colaboradores identificaron dos miembros de la familia (*ART1* y *ART2*) mediante dos rastreos de una colección de mutantes *knockout* de genes de levadura no esenciales que fuesen sensibles a canavanina y a thialisina (análogos tóxicos a arginina y lisina respectivamente). Al realizar un análisis de la secuencia de Art1 encontraron, mediante abordajes de predicción de estructura, un motivo muy similar al de las arrestinas de mamíferos (Figura 13). Usando la secuencia de dicho motivo arrestina como punto de partida, se encontró este elemento de plegamiento en nueve proteínas (Art1-Art9) de *Saccharomyces cerevisiae*. Además cada una de estas nueve proteínas presentaba el motivo PY. Por tanto, el modelo que se plantea es que los ARTs estarían mediando la interacción entre Rsp5 y las distintas proteínas de membrana, contribuyendo a la especificidad para su reconocimiento y su ubiquitinación (Lin et al., 2008). Posteriormente se identificó Art10, que a pesar de ser muy distinto a los otros 9, presenta las características para ser un adaptador de Rsp5, por tener motivos PY y un dominio similar a la arrestina (Nikko and Pelham, 2009).

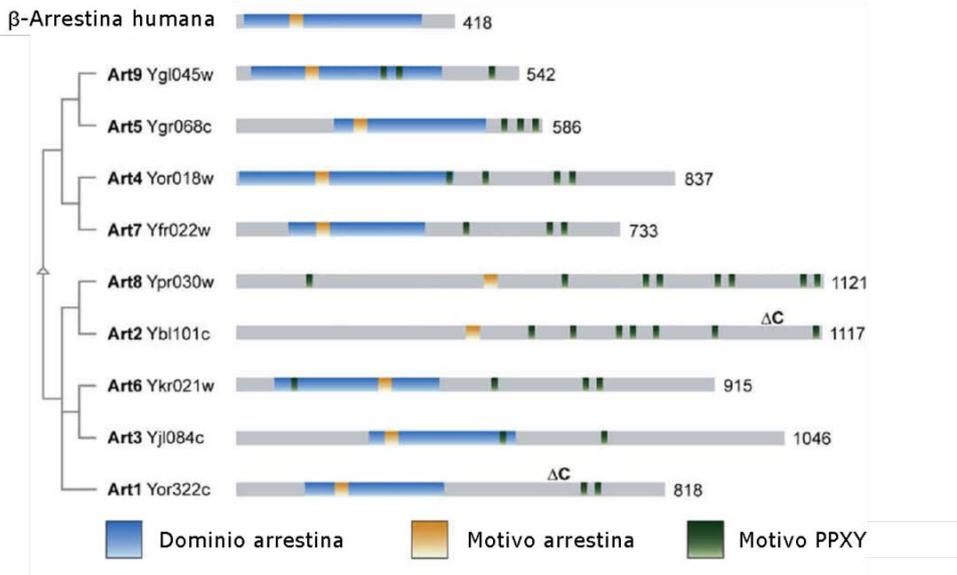


Figura 13. Adaptadores de Rsp5. Miembros de la familia ART en levadura (Lin et al., 2008). El árbol indica la relación entre los miembros de la familia ART basada en similitud de secuencia. Cada proteína ART contiene el motivo arrestina (amarillo), y en siete de los nueve miembros existe predicción de la existencia de dominio arrestina (azul). Los bloques verdes indican motivos PY.

Cada miembro de la familia de los ARTs es capaz de interactuar con diversas proteínas de membrana, que en algunos casos son compartidos y en otros son específicos (Tabla 5). El estudio sobre los miembros de la familia ARTs es reciente, por lo que queda mucho por determinar en cuanto a la especificidad como adaptadores de Rsp5. Sin embargo, la mayoría de sus miembros son conocidos por otras funciones, dado que han sido estudiados y anotados anteriormente (Tabla 5). Además, los eventos de señalización podrían estar determinando que miembro de la familia ART entra en escena, ya que se ha descrito que la internalización del transportador de glucosa Hxt6 está mediada por Art8 bajo condiciones de estrés (ciclohexamida) y por Art4 en condiciones de cambio de fuente de carbono.

Tabla 5. Adaptadores de la familia ART (Adaptada de (Conibear, 2010)).

Nombre	Nombre sistemático	Transportador regulado	Referencia
ART1	YOR322C	Can1, Lyp1, Mup1, Tat2, Fur4	(Lin et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009)
ART2	YBL101C	Lyp1, Smf1, Tat2, Fur4	(Lin et al., 2008; Nikko et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009)
ART3	YJL084C	Dip5, Gap1	(Hatakeyama et al., 2010; O'Donnell et al., 2010)
ART4	YOR018W	Hxt6	(Nikko and Pelham, 2009)
ART5	YGR068C	Itr1	(Nikko and Pelham, 2009)
ART6	YKR021W	Gap1	(O'Donnell et al., 2010)
ART7	YFR022W		(yeastgenome.org)
ART8	YPR030W	Smf1, Hxt6	(Nikko et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009)
ART9	YGL045W	Rim21	(Herrador et al., 2010)
ART10	YLR392C		(yeastgenome.org)

Para hablar de posibles ortólogos de la familia ART en mamíferos es necesario comenzar por la familia de las arrestinas, ya que como se ha indicado anteriormente la familia ART presenta un dominio conservado de arrestinas de mamíferos. La familia de arrestinas se divide en alfa-arrestinas y beta-arrestinas. Las alfa-arrestinas surgieron antes que las beta-arrestinas a lo largo de la evolución y se diferencian de éstas en que poseen en su parte carboxilo-terminal el dominio PY reconocido por las E3 ubiquitina ligasas (Alvarez, 2008). Las alfa-arrestinas serían las posibles ortólogas en mamíferos de la familia ART de levadura y son 6: Arrdc1-5 y Txnip. Una de estas Arrdc (*arrestin domain containing*), en concreto la 3, se ha descrito que media la ubiquitinación de receptor adrenérgico β 2 por Nedd4.2, jugando un papel muy

similar al de los ARTs en levadura (Nabhan et al., 2010), que se describe con detalle en el apartado anterior.

2.6 Trastornos derivados de problemas en la actividad de Nedd4.2

La mayoría de enfermedades asociadas alteraciones en la función normal de Nedd4.2 están relacionadas con fallos en la homeostasis de iones. Los problemas en el transporte de iones mayoritariamente convergen en enfermedades neurológicas o cardíacas (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999). Una de las enfermedades más estudiadas en este contexto es el síndrome de Liddle (Shimkets et al., 1994), que se produce como consecuencia de una desregulación de canal epitelial de sodio ENaC por problemas en la interacción con Nedd4.2. El estudio de ratones Nedd4.2 *knockout* reveló que éstos presentaban problemas de hipertensión (Shi et al., 2008) y/o muerte con síntomas similares a la fibrosis quística en los pulmones (Boase et al., 2011).

En cuanto a la hipertensión también existen estudios en humanos que relacionan esta enfermedad con mutaciones en el gen Nedd4.2 (Li et al., 2010) o que relacionan Nedd4.2 con la regulación del co-transporte bidireccional de litio y sodio (Zheng et al., 2011). En relación con estos fenotipos, donde el transporte de iones se ve alterado, se describió que ratones mutantes AMPK α 1^{-/-} tenían mayores niveles de ENaC en riñón, hígado, colon y vías respiratorias (Almacá et al., 2009). Esto se correlaciona con la regulación que ejerce AMPK sobre ENaC a través de Nedd4.2 (Bhalla et al., 2006). Precisamente este punto constituye uno de los antecedentes fundamentales para iniciar los estudios desarrollados en la presente tesis. Como antecedente adicional, se había descrito en el laboratorio del Dr. Sanz la interacción entre AMPK y otra E3 ubiquitina ligasa, la malina (Solaz-Fuster et al., 2008; Moreno et al., 2010).



El objetivo principal de esta tesis es estudiar cómo influye la proteína quinasa AMPK en la actividad de la E3 ubiquitina ligasa Nedd4.2 en la regulación de proteínas transportadoras de membrana. En éste contexto se definen dos objetivos concretos:

1. Caracterizar la interacción recíproca entre AMPK y Nedd4.2 profundizando en la regulación post-traducciona por fosforilación y ubiquitinación, incluyendo la identificación de los posibles sitios de fosforilación en Nedd4.2 por AMPK y la clase de ubiquitinación de AMPK por Nedd4.2.
2. Estudiar la influencia AMPK en la interacción física entre Nedd4.2 y el transportador epitelial de sodio ENaC.



MATERIAL Y MÉTODOS

1 Material biológico y condiciones de crecimiento.

1.1 Bacterias

La cepa **DH5 α** de *Escherichia coli* se utilizó como vehículo para la propagación y el aislamiento de plásmidos. Las células bacterianas se crecieron a 37°C en el medio de *Lysogenic-Broth* (LB), conocido como Luria-Bertani, que contiene 0,5% de extracto de levadura, 1% de triptona y 1% de NaCl, y que está ajustado a pH 7. Para la preparación de medios sólidos se añadió un 2% de agar. Cuando fue necesario para la selección de plásmidos se añadió ampicilina al medio (50 mg/L).

La cepa **BL21-RIL** (Stratagene) de *Escherichia coli* se utilizó como huésped para la producción de proteínas. Se creció en medio LB y para la selección de plásmidos fue suplementado con 50 mg/L de ampicilina y 33 mg/L de cloramfenicol. La temperatura de crecimiento fue de 37° C.

Para las transformaciones de bacterias por choque térmico utilizamos un protocolo estándar de transformación (Hanahan, 1983). Se mezcló entre 0,1 y 1 ng de plásmido con 100 μ l de bacterias competentes. Después de incubar la mezcla durante 30 minutos en hielo, se calentó a 42 °C durante 1 minuto, y seguidamente se volvió a poner en hielo. A continuación se añadió 600 de medio LB e se incubó a 37 °C en agitación durante 45 minutos. Por último se extendieron las células en placas de LB con antibiótico para la selección de las células transformadas.

Para las transformaciones por electroporación las bacterias competentes se transformaron con un pulso de 1700 V. Tras recuperarse durante 1 hora en LB a 37 °C, fueron sembradas en placas de LB con los antibióticos necesarios para la selección de los plásmidos.

1.2 Levaduras

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en éste trabajo fueron:

- **THY.AP4:** [*MATa ura3 leu2 lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*] (Obrdlik et al., 2004)
- **FY250:** [*MATa his3 leu2 trp1 ura3 SUC2*], cedida por F. Winston (Harvard Medical School, Boston, USA).
- **FY250 *snf1Δ10*:** derivado de FY250 con la mutación *snf1Δ10* (Sanz et al., 2000).

Las células de levadura se crecieron a 28°C en medio *yeast peptone dextrose* YPD (2% glucosa, 2% peptona bacteriológica, 1% extracto de levadura) o en medio mínimo sintético SD (2% glucosa, 0,7% *yeast nitrogen base* YNB, 50 mM ácido succínico ajustado a pH 5.5 con Tris) o medio mínimo sintético completo SCD al que se añade 20 mg/L arginina, 20 mg/L lisina, 20 mg/L metionina, 30 mg/L isoleucina, 30 mg/L serina, 30 mg/L treonina, 30 mg/L tirosina, 30 mg/L valina, 50 mg/L fenilalanina 85 mg/L inositol y 90 mg/L ácido p-aminobenzóico. En el caso del medio SD y SCD se añadieron aminoácidos y bases púricas y pirimidínicas de acuerdo con las necesidades de cada cepa (30 µg/ml adenina, 100 µg/ml triptófano, 30 µg/ml histidina, 100 µg/ml leucina, 30 µg/ml metionina, 30 µg/ml uracilo). También se ha utilizado 2% rafinosa como fuente de carbono en lugar de 2% glucosa. Para la preparación de medios sólidos se añadió un 2% de agar.

Activación de Snf1

En los ensayos de activación de Snf1 se crecieron las células en medio mínimo completo SCD (glucosa al 2%) hasta fase exponencial (DO_{600} 0,4) momento en el que se recogieron muestras de 1 ml para su posterior análisis. El cultivo restante se lavó dos veces con un volumen igual al del cultivo inicial de agua estéril. Posteriormente se continuó su crecimiento en medio SCD con 2% de rafinosa en lugar de glucosa durante 3 horas, se midió la DO_{600} del cultivo y se recogió como muestra el volumen equivalente a 1 ml de células en cultivo a una DO_{600} de 0,4.

Transformación de levaduras

La transformación de levadura se llevó a cabo usando el protocolo del acetato de litio (Ito et al., 1983). La cepa de levadura correspondiente se creció en YPD o en SCD con los requerimientos adecuados hasta alcanzar una DO_{600} entre 0,3 y 0,6 correspondiente a la fase de crecimiento exponencial. Tras centrifugar a 2000 g, las células se resuspendieron en 1/10 del volumen inicial del cultivo con tampón TE-LiAc (acetato de litio 0,1 M pH 7,5, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Tras centrifugar a 2000 g, las células se resuspendieron en 1/100 del volumen inicial del cultivo con tampón TE-LiAc. A 50 μ L de las células en tampón TE-LiAc, se le adicionó 2 μ L de 1% DNA de esperma de salmón (Sigma) como DNA vehículo, 3 μ L de cada plásmido y 300 μ L de PEG - TE-LiAc [tampón TE-LiAc al que se le añade PEG al 40% (p/v)]. Tras una incubación a 30° C durante 30 min, se efectuó un choque térmico a 42° C durante 15 min en presencia de DMSO al 10% (v/v). Después, se lavaron las células con agua estéril y se sembraron en las placas de SCD correspondientes al requerimiento de aminoácidos para la selección de los plásmidos. Las células se dejaron crecer a 30° C durante tres días.

1.3 Cultivos celulares

El material plástico de cultivos en el que se han sembrado las células ha sido proporcionado por Sarstedt. El trabajo que ha implicado manipulación de los cultivos celulares ha sido realizado en una campana de bioseguridad de nivel II-A. El crecimiento de los cultivos celulares se ha llevado a cabo en condiciones constantes de temperatura (37° C) y concentración de CO₂ (5%) y en atmósfera húmeda. Los pases necesarios para el mantenimiento de los cultivos celulares se han realizado mediante tripsinización [Tripsina-EDTA, 200 mg/L EDTA, 500 mg/L Tripsina 1:250, (BioWhittaker)]. Para conservar durante largo tiempo las células, éstas se resuspendieron en el correspondiente medio de cultivo al que se le adicionó un 10% (v/v) de DMSO y se pasaron a un criotubo donde se congelaron lentamente a -80° C. Posteriormente se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido. La descongelación se llevó a cabo sometiendo los criotubos a un baño de 37° C, y después se diluyeron las células en el correspondiente medio y fueron centrifugadas y sembradas con su medio de cultivo.

Las células de mamífero utilizadas fueron las denominadas **HEK293T** que son células embrionarias de riñón humano. Fueron cedidas por la Dra. Marta Casado (Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC).

Las células se crecieron en placas de 60 o 100 mm en medio DMEM completo (Lonza bioscience, Barcelona) con 10% (v/v) de *Fetal Bovine Serum* (FBS, GIBCO/Invitrogen) inactivado y suplementado con glutamina 2 mM, 100 mg/L penicilina y 100 mg/L estreptomycin (Lonza). El método de transfección usado fue el del fosfato cálcico (Graham and Van der Eb, 1973). Entre 3 y 5 horas antes de la transfección se reemplazó la mitad del medio de cada placa por medio fresco. Para placas de 100 mm de diámetro, se mezcló 600 μ L de HBS 2 x [NaCl 280 mM, Hepes (*N*-[2-Hydroxyethyl] piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]) 50 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, pH 7,05], 1 a 5 μ g de cada plásmido y 60 μ L de CaCl₂ 2 M. Tras esperar 20 min para que se formaran los

precipitados de fosfato cálcico, se añadió lentamente a las placas donde se habían sembrado las células el día anterior. Para placas de 60 mm la mezcla se efectuó con un tercio de la cantidad de cada componente. En los casos en los que el ensayo necesitaba más de 24 horas post-transfección, el medio que contenía la mezcla de transfección era retirado a las 20 horas y renovado por DMEM completo fresco.

2 Plásmidos.

2.1 Vectores de expresión en levadura.

Las proteínas de fusión con LexA se generaron usando el vector **pEG202** (Golemis et al., 1997), que contiene el gen *HIS3* como gen de selección en levadura o el vector **pBTM116** (Vojtek, 1997) que contiene el gen *TRP1* como gen de selección.

Las fusiones con GAD (Gal4 Activation Domain) se obtuvieron a partir del vector **pACT2** (Legrain et al., 1994) que, además, lleva una etiqueta HA (Hemaglutinina) y contiene el gen *LEU2* como gen de selección.

El fragmento de la subunidad $\alpha 2$ de AMPK con la mutación T172D se subclonó en el vector pWS93 (Song and Carlson, 1998) que contiene el gen *URA3* para su selección.

Para las fusiones con GST (Glutathión S Transferasa) se utilizó un derivado del vector pWS93 (Song and Carlson, 1998) donde el epítipo HA se sustituyó por GST. El plásmido fue cedido por Heather Wiatrowski de la Universidad de Columbia en Nueva York.

El plásmido pSH18-18 contiene el gen marcador *lexAop-lacZ*, derivado del vector pLR1 Δ 1 (West, Jr. et al., 1984).

2.2 Vectores de expresión en bacteria.

Para las fusiones con GST se utilizó el vector pGEX-6P-1 de GE Healthcare.

2.3 Vectores de expresión en mamíferos.

Para expresar proteínas con la incorporación de epitopos *myc* o HA en células de mamífero, utilizamos el vector **pCMV-myc** o **pCMV-HA** (BD-Biosciences), el pFLAG-CMV (Sigma) y el pcDNA3 (Invitrogen) que presenta el promotor viral de citomegalovirus (CMV) para alta expresión.

Para el ensayo de co-inmunoprecipitación en células de mamífero se expresaron las proteínas en el vector ya mencionado anteriormente pCMV-myc y pFLAG-CMV (Sigma).

2.4 Vectores intermedios.

Para clonar productos de PCR directamente desde la reacción se empleó el vector pCR[®]2.1 de Invitrogen.

3 Obtención de construcciones génicas.

La obtención de insertos de DNA se llevo a cabo por la amplificación mediante PCR usando un termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf), *Pfu DNA polimerasa* (Stratagene), y un programa de temperatura adecuado a la extensión del fragmento y a los requerimientos de secuencia de los oligonucleótidos (Tabla 6). Para la preparación del vector y del inserto, los fragmentos de DNA digeridos con el correspondiente enzima de restricción o amplificados por PCR, fueron purificados utilizando el sistema *GENECLEAN TURBO* (MP Biomedicals). Tras las digestiones con enzimas de restricción, todos los vectores fueron tratados con fosfatasa alcalina (Roche) para desfosforilar los extremos 5' y aumentar la eficiencia de clonación evitando la

religación de extremos cohesivos. Para la construcción de los plásmidos se utilizó T4 DNA ligasa (Roche) y/o DNA Quick ligasa (New England Biolabs).

Tabla 6. Oligonucleótidos usados en las construcciones.

Oligonucleótido	Gen diana	Sitio de restricción incorporado
ATAATTC GTCGAC ACATGGCGACCGGGCTCGG	hNedd4.2	Sall
ATAATT GTCGAC TAAATCCACCCCTTCAAATCC	hNedd4.2	Sall
ATAATTC GGATCC ACATGGCAACTTGC GCGGTG	hNedd4.1	BamHI
ATAAATT GTCGAC CTAATCAACTCCATCAAAGCC	hNedd4.1	Sall
ATAATTC GTCGAC CTCAGCACCAAGAGGAA	WWNedd4.2	Sall
ATAATT GTCGAC TAAATAGCGGGTTCTGCAG	WWNedd4.2	Sall
ATTATA GGATCC CCTCCTTCCCACTTCTGC	α ENaC	EcoRI
ATTATA GTCGAC TCAGGGCCCCCCCAGA	α ENaC	Sall
ATTATA GGATCC ACACCAACTTTGGCTTC	β ENaC	EcoRI
ATTATA GTCGAC TTAGATGGCATCACCCCTC	β ENaC	Sall
ATTATA GGATCC CAGCC CTGGATATAGAC	γ ENaC	EcoRI
ATTATA GTCGAC TCAGAGCTCATCCAGCATC	γ ENaC	Sall

4 Obtención y análisis de proteínas

4.1 Obtención de extractos proteicos crudos

a) *Saccharomyces cerevisiae*

Para la obtención de extractos proteicos, las células se crecieron hasta fase logarítmica y se recogieron 20 ml de cultivo por centrifugación (2000 g durante 5 minutos). A continuación se desechó el sobrenadante y se lavaron las células con agua estéril. Después se resuspendieron las células en 30 μ l de

tampón de carga Laemmli 2,5X (3,8% SDS, 0,05 M DTE, EDTA 5mM, 15% sacarosa, 0,125 mg/ml azul de bromofenol, 0,15 M Tris-HCl ajustado a pH 6.8) y se incubaron a 95°C durante 5 minutos.

b) Células HEK293T

Las células, crecidas en monocapa, se lavaron una vez con PBS 1X y las placas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Para la obtención del extracto protéico las placas fueron procesadas añadiendo sobre cada una de ellas tampón de lisis frío. Este tampón contiene Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 15 mM pH 8, NaF 50 mM, Na₂P₂O₇ 5mM, NaVO₄ 1mM, 2-mercaptoetanol 15 mM, 20% sacarosa, una mezcla de inhibidores de proteasas sin EDTA. Las células se recogieron en tampón de lisis con la ayuda de un rascador y fueron lisadas pasándolas por jeringas de 24Gx5/8" 5 veces cada muestra.

4.2 Electroforesis de proteínas

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Estos geles constan de una zona superior de empaquetamiento (acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 al 6%, Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0,1%) y una zona inferior de separación (acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 al 8%, Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS 0,1%). La primera parte de la electroforesis (empaquetamiento) se realizó a 50 V, mientras que para la segunda parte (resolución) se llevó a cabo a 100 V. El tampón de electroforesis utilizado fue SDS-PAGE 1X (0,19 M glicina, 0,1% SDS, pH 8.3 ajustado con Tris).

4.3 Transferencia a membrana.

Una vez separadas por electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore). Para la transferencia se utilizó el set

Mini-Trans blot (BioRad) y el tampón de transferencia TOWBIN (0,19 M glicina, 0,01% SDS, 20% metanol, pH 8.3 ajustado con Tris). La transferencia se realizó a 100 V durante 1,5 horas a 4°C.

4.4 Tinción de membranas con Ponceau S.

Esta técnica se utilizó para comprobar la eficiencia de la transferencia a la membrana y en algunos casos como control interno de carga (Korotzer et al., 1961). Se sumergieron las membranas en la solución colorante (0,1% Ponceau S (Sigma), 1% ácido acético) durante 2 minutos en agitación. A continuación se retiró el exceso de colorante lavando con agua destilada.

4.5 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.

En primer lugar, se bloquearon todos los sitios de unión no específicos utilizando una solución de bloqueo (0,1 % Tween 20, 150 mM NaCl, Tris-HCl 20 mM pH 7.6, 2% leche desnatada) durante 30 minutos en agitación. Seguidamente se retiró la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario a una dilución específica para cada caso (Tabla 7), y se dejó incubando durante 16 horas a 4°C en agitación. Luego se realizaron 4 lavados de 10 minutos en TBS-Tween 20 (0,1 % Tween 20, NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.6). Después de los lavados se añadió el anticuerpo secundario a una dilución adecuada (Tabla 7) en TBS-Tween 20 y se dejó incubando durante 1 hora en agitación. Después se realizaron otros 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween 20 para retirar el exceso de anticuerpo secundario.

Tabla 7. Anticuerpos usados para inmunodetección de proteínas

Anticuerpo primario	Procedencia	Dilución	Anticuerpo secundario
Anti-myc	Cell Signaling	1:10000	Anti-ratón
Anti-HA	Cell Signaling	1:10000	Anti-ratón
Anti-GST (Z-5)	Santa Cruz	1:10000	Anti-conejo
Anti-LexA	Abcam	1:20000	Anti-conejo
Anti-AMPKα	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo
Anti-AMPKβ1/2	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo
Anti-AMKγ1	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo

La detección se realizó utilizando un sistema de quimioluminiscencia (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La señal se analizó bien utilizando películas de rayos X (Biomax Light-1, Kodak) o bien mediante un lector electrónico LAS-3000 (FUJIFILM) y fue analizada con el programa *Image Gauge V4.0* (FUJIFILM).

En los casos en los que fue necesaria la reutilización de las membranas, éstas se incubaron durante 30 minutos a 50°C en un tampón que contenía 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS y 62,5 mM Tris-HCl pH 6.7, y después de una serie de lavados, se re-incubaron con un anticuerpo alternativo como se ha descrito anteriormente.

5 Doble híbrido

La técnica de doble híbrido fue diseñada por Stanley Fields (Fields and Song, 1989) para identificar proteínas que interaccionan en un sistema *in vivo*.

Esta técnica se basa en el carácter modular de factores de transcripción que presentan dos dominios funcionales independientes: un dominio de unión a secuencias específicas de DNA y un dominio activador de la transcripción. El dominio de unión a DNA dirige al factor de transcripción a unas secuencias específicas de un promotor, y el dominio de activación facilita el ensamblaje del complejo de iniciación, permitiendo la transcripción del gen reportero. De este modo, en el doble híbrido se usan dos proteínas híbridas recombinantes. La proteína de interés (proteína cebo) se fusiona a un dominio de unión al DNA, y la segunda proteína híbrida (proteína presa) se fusiona a un dominio de activación de la transcripción. La asociación física entre las proteínas cebo y presa permite la formación de un heterodímero con capacidad de unir DNA específicamente y de activar la transcripción génica. La reconstitución del factor de transcripción se produce por una unión física no covalente entre la proteína cebo y la proteína presa. Esta unión se ensaya en una levadura con un fondo genético particular, que contiene genes reporteros bajo el control de la UAS (*Upstream Activation Sequence*) correspondiente al dominio de unión al DNA (LexA o Gal4) del vector en el que se construye la proteína cebo. La mayoría de cepas existentes tienen dos genes reporteros independientes: un gen que permite una selección nutricional (biosíntesis de histidina, *HIS3*) y otro que codifica para una enzima cuya actividad es cuantificable (*lacZ*). Este gen codifica para la enzima β -galactosidasa que degrada la lactosa y otros β -galactósidos como el 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-galactósido (X-gal) o el orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG). El X-gal y el ONPG, cuando son degradados por la β -galactosidasa generan un compuesto coloreado (azul y amarillo respectivamente) cuantificable por colorimetría.

5.1 Ensayo β -galactosidasa

5.1.1 Ensayo cualitativo en filtro

Para los ensayos en filtro (Yang et al., 1992), se crecieron clones individuales en medio SC sólido con los requerimientos necesarios para

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

5.1.2 Ensayo cuantitativo en líquido

Para los ensayos cuantitativos de la actividad β -galactosidasa se crecieron células hasta fase logarítmica (D.O. 0,5) y se recogió 1 ml de cultivo por centrifugación. Las células se resuspendieron en 100 μl de GTED (20% glicerol, Tris 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM pH 8, DTE 1 mM) y se trató con $100\mu\text{l}$ de TET (1 volumen de tolueno, 1 volumen de Triton X-100 10%, 4 volúmenes de etanol) para permeabilizar las membranas celulares y permitir la entrada del sustrato. 10 μl de células permeabilizadas se mezclaron con 190 μl de tampón Z (0,1 M fosfato sódico pH 7, KCl 10 mM, Mg_2SO_4 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM), se añadió 40 μl de ONPG (4 mg/ml onitrofenil- β -galactosidasa en fosfato sódico 0,1 M pH 7) y se dejó la reacción a 28°C hasta que las muestras adoptaron una coloración amarillenta. Para parar la reacción se añadieron 100 μl de Na_2CO_3 . Finalmente se midió la absorbancia a 415 nm de las muestras y se calculó la actividad β -galactosidasa en función de la absorbancia a 415 nm, el tiempo de reacción determinada midiendo la cantidad de células midiendo la absorbancia a 660 nm (Serrano et al., 1973; miller, 1972).

6 Mutagénesis dirigida.

Para crear mutantes de Nedd4.2 en los sitios de fosforilación se usó la amplificación tipo círculo rodante por PCR. En esta reacción se usa como molde un plásmido que contenga el DNA que se quiera mutar y se diseñan dos

cebadores de 45 pares de bases que contengan la mutación deseada (Tabla 8). Dichos cebadores deben ser reversos y complementarios y si es posible, se debe añadir un sitio de restricción, que no provoque cambios en la traducción, para poder seguir la mutación mediante patrón de restricción como paso previo a la secuenciación. La reacción de PCR se lleva a cabo usando la polimerasa de Stratagene *PfuTurbo* y con las condiciones especificadas en el manual del producto (<http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/600250.pdf>). Para eliminar el molde se incubaba la muestra durante 1 hora con 10 unidades del enzima de restricción Dpn1, que corta en sitios GATC metilados.

Tabla 8. Oligonucleótidos usados para realizar la mutagénesis dirigida. En amarillo subrayadas aparecen la secuencias de reconocimiento por los enzimas de restricción que se indican, y en negrita amarilla los tripletes mutados.

Secuencia	Mutación	Sitios de restricción
GAGAACCTCC <u>TCTAGA</u> TTGAGG BAT TGCAGTGCACCGACGCAG CTGCGTCGGTGACACTGCAATCCCTCAATCTAGAGGAGGGTTCTC	Ser340Asp	XbaI
CCCTCCTCAAGGTTGAGG BCATGC AGTGCACCGACGCAGTTG CAACTGCGTCGGTGACACTGCATGCCCTCAACCTTGAGGAGGG	Ser340Ala	SphI
GAACCTCCTCAAGGTTG <u>GGATCG</u> TGC BAT GTCACCGACGCAG CTGCGTCGGTGACATCGCACGATCGCAACCTTGAGGAGGGTTC	Ser342Asp	PvuI
CCCTCCTCAAGGTTGAGGTCAT <u>TGCACA</u> GTCACCGACGCAGTTG CAACTGCGTCGGTGACTGCGCATGACCTCAACCTTGAGGAGGG	Ser342Ala	AviII
TCCGCCGGCCTCGTAGC <u>CTCGAG</u> TCGCCAACAGTAACTTTATC GATAAAGTTACTGTTGGCGACTCGAGGCTACGACCGCGCGGGA	Ser384Glu	XhoI
CAGATCCGCCGCCT <u>GGATCG</u> CTC GC TCGCCAACAGTAAC GTTACTGTTGGCGAGGCGAGCGATCGAGGCCGGCGGATCTG	Ser384Ala	PvuI

7 Determinación de la ubiquitinación *in vivo*.

Para estudiar la ubiquitinación de las subunidades de AMPK se usó un ensayo basado en la expresión de una versión de ubiquitina marcada con 6 aminoácidos histidina (6xHis-UB) en células de mamífero HEK293T (Kaiser et al., 2005). Para las diferentes condiciones de ensayo se sembraron 2.500.000 células HEK293T en placas de 100 mm de diámetro en medio DMEM. A las 24 horas, las células se transfectaron con las combinaciones de plásmidos correspondientes para cada ensayo mediante el protocolo del fosfato de calcio. Estas combinaciones se componen de los plásmidos que expresan las proteínas necesarias para el ensayo y una molécula de ubiquitina fusionada a colas de histidina (pCMV-6xHis-UB, pCMV-6xHis-UBK48R o pCMV-6xHis-UBK63R). A las 36 horas post-transfección se retiró el medio y se efectuó el lisado de las células a temperatura ambiente con tampón A (HCl-guanidinio 6 M, tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 8, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 e imidazol 10 mM). El lisado fue retirado de las placas mediante rascador y homogeneizado mediante jeringuilla con aguja de 25G. Los lisados se clarificaron por centrifugación a 15000 g durante 15 min, la fracción soluble se recogió y la concentración de proteína se cuantificó utilizando el sistema *Dc Protein Assay* (Bio-Rad).

4 mg de proteína total se incubaron con 100 μ L de matriz de cobalto TALON (Clontech) durante 3 horas a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. Cada muestra presentaba un volumen final de 1 mL y una concentración final de 10 mM de imidazol. Tras la incubación se efectuaron varios lavados de 15 minutos. El primer lavado se realizó con 2 ml de tampón C (HCl-guanidinio 6 M, tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 8, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 e imidazol 10 mM), y cuatro lavados finales con 2 ml de tampón D (Urea 8 M, tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 8, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 e imidazol 10 mM). La elución se realizó mediante la adición de 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, DTT 31 mg/mL] e incubación de la muestra a 95°C durante 5 min. El análisis se realizó por *Western blot* usando los anticuerpos adecuados a cada condición experimental.

8 Ensayos de fosforilación *in vitro*.

Para los ensayos de fosforilación se utilizó tampón compuesto por Hepes-NaOH 20 mM pH 7,0, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM. La reacción se llevó a cabo con 100 mU de AMPK (Upstate), AMP 200 μM y 100 μM de una mezcla 1:4 de γ-³²P-ATP (3000 Ci/mmol, proporcionado por Amersham Biosciences) y ATP. Tras 1 hora a 30° C, la reacción se paró calentando las muestras en tampón de carga a 95° C durante tres minutos. Las muestras se analizaron mediante electroforesis de proteínas, transferencia a filtro de nylon, exposición y revelado de autoradiografía.

9 Purificación por afinidad de GST.

La cepa **BL21-RIL** de *Escherichia coli* se utilizó como huésped para la producción de proteínas fusionadas a GST. Las células de *Escherichia coli* se crecieron hasta fase exponencial, y se indujo la producción de proteína mediante la adición de IPTG 0.1 mM y se incubó en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lisaron las células correspondientes a 25 ml de cultivo, en 500 μl de Tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,1% de Triton x100, 10% Glicerol, DTE 1 mM, PMSF 1 mM, 1 pastilla de inhibidor de proteasas (Roche) / 10 ml tampón)) mediante sonicación (3 ciclos de 10 pulsos a 80% de amplitud). A continuación se realizó una centrifugación en frío durante 10 minutos (15000 g) y se recogió el sobrenadante. La cantidad de proteína total de dicho sobrenadante se valoró mediante el método Bradford [Bio-Rad *Protein Assay* (Bradford, 1976)]. A 250 μg de proteína se añadió 50 μl *Glutathione Sepharose*[™] 4B (GE Healthcare) previamente lavada tres veces

con Tampón B. La mezcla se incubó durante 3 horas a 4°C en agitación. Cuando se terminó la incubación, se lavó tres veces con 300 µl Tampón B para eliminar todo aquello que no se había unido a la resina y por último se eluyó la proteína mediante la adición de 50 µl 10mM de L-Glutation en Tampón B. Los eluidos fueron analizados por *Western blot*.

10 Co-inmunoprecipitación

48h después de la transfección con los plásmidos pFLAG-Nedd4.2 en combinación con pCMV-myc-AMPK α 2, AMPK β 2 o AMPK γ 1, las células HEK293 se lavaron con PBS 1X frío y fueron inmediatamente congeladas en N₂ líquido. Las células fueron recogidas en tampón de lisis frío (Tris HCl 25 mM pH 8, NaF 5 mM, glicerol 10%, Na₂P₂O₇ 5 mM, KCl 100 mM, Triton-X-100 0.5%, PMSF 1 mM, NaVO₄ 2 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas). Los lisados celulares fueron obtenidos pasando las células a través de jeringas de 25G/5-8'' e incubadas en hielo durante 20 minutos. Los lisados fueron clarificados por centrifugación a 2000 g durante 5 min a 4 °C. Se utilizaron 0,4 mg de proteína total de la fracción soluble para la inmunoprecipitación, incubando con anti-FLAG (Sigma) en un volumen final de 500 µl (completado con tampón de lisis) durante toda la noche a 4° C. Tras esto, los 50µl fueron incubados durante 4 horas a 4° C en presencia de 5µl de proteína A/G plus agarosa (Santa Cruz Biotech). Tras varios lavados de 10 min a 4° C con PBS y con PBS + NP-40 0,05% (v/v), tanto los extractos crudos como la fracción inmunoprecipitada fueron analizados por *Western blot*.



Varios estudios realizados previamente sugieren que existe una relación funcional entre la E3 ubiquitina ligasa Nedd4.2 y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en humanos. Se ha demostrado que el canal epitelial de sodio (ENaC) está regulado negativamente por AMPK a través de Nedd4.2 (Bhalla et al., 2006). A su vez también se ha visto que AMPK fosforila a Nedd4.2 y que tanto la presencia de AMPK como de Nedd4.2 son necesarias para la regulación de ENaC (Carattino et al., 2005). Sin embargo, la interacción física entre AMPK y Nedd4.2 no está caracterizada a nivel molecular.

1 Obtención de hNedd4.2

En humanos existen distintas isoformas de la proteína Nedd4.2 dependiendo del tejido en el que se exprese (Chen et al., 2001). Para la obtención del ORF (Open Reading Frame) de Nedd4.2 mediante PCR se diseñaron diferentes cebadores. Se utilizó como molde: i) genotecas de distintos tejidos humanos como hígado fetal, páncreas, cerebro y músculo esquelético; ii) el clon de Nedd4.2 disponible en la colección del instituto Kazusa (KIAA0439); iii) el clon adquirido del consorcio IMAGE (5528964) (UniProtKB: Q96PU5-2). Las dos primeras aproximaciones no permitieron obtener el producto de PCR adecuado. En el segundo caso, debido a que el clon KIAA0439 contenía la isoforma 8 (UniProtKB: Q96PU5-8), que presenta divergencias en la parte amino-terminal y carece del dominio C2 del amino terminal, que se ha descrito que es necesario para su asociación con la membrana plasmática.

El cDNA obtenido contiene la isoforma 2 del transcrito y codifica para una proteína que carece de los exones 12 y 13, en los que se encuentra la región correspondiente al segundo dominio WW de los cuatro que posee la proteína correspondiente a la isoforma más larga (isoforma 6) (Figura 14). Basándonos en diversos estudios sobre los dominios WW que determinan que,

por orden de afinidad con ENaC, el primero en importancia sería el WW3, seguido de WW4, WW1 y WW2 (Asher et al., 2003; Fotia et al., 2003; Henry et al., 2003; Itani et al., 2003a), y dada la dificultad en la obtención de la isoforma completa de Nedd4.2, se consideró que la isoforma 2 cumplía los requisitos necesarios para la realización del trabajo presentado en esta Tesis.

El cDNA de la isoforma 2 de Nedd4.2 se clonó en un vector para su expresión en bacterias y en otro para su expresión en levadura. Ambos vectores generaban una proteína de fusión con GST en su extremo amino-terminal (GST-Nedd4.2) para facilitar su posterior purificación.

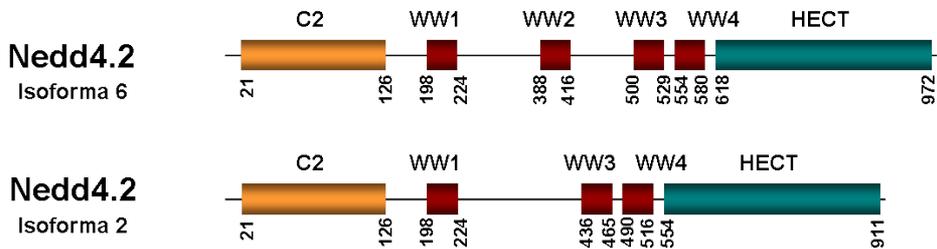


Figura 14. Esquema de la estructura de los dominios de las isoformas 2 y 6 de la proteína Nedd4.2.

2 Caracterización de la interacción física entre Nedd4.2 y AMPK

2.1 Ensayos de Doble híbrido

El primer paso en la caracterización de la interacción entre AMPK y Nedd4.2 fue la realización de un ensayo de interacción proteína-proteína de doble híbrido. Para ello se clonó el cDNA de Nedd4.2 en el vector pGADT7 (Activation Domain) para su co-expresión en la cepa de levadura THY.AP-4 [MATa *ura3 leu2 lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*] (Obrdlik et al., 2004) junto al cDNA de cada una de las subunidades $\alpha 2$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ de AMPK clonadas en el vector pBTM116 (DNA Binding Domain).

La interacción física entre proteínas se estudió mediante la comparación del crecimiento en medio mínimo (SCD) selectivo de distintos transformantes de THY.AP-4 y el registro de la actividad β -galactosidasa de los mismos. Además, se tomaron muestras de estos transformantes para comprobar que los niveles de expresión de las proteínas de fusión eran correctos.

En la figura 15 se observa que la co-expresión de las subunidades γ 1 y β 2 de AMPK con Nedd4.2 no confiere más crecimiento en medio sin histidina que la cepa control que co-expresa el vector vacío junto con Nedd4.2. Sin embargo, se observó un ligero crecimiento cuando se co-expresa la E3 ubiquitina ligasa Nedd4.2 y la subunidad catalítica α 2 de AMPK. Como control positivo del ensayo, se incluyó la cepa que co-expresa las subunidades α 2 y β 2 de AMPK en los vectores adecuados (pBTM116- AMPK α 2 y pACT2-AMPK β 2).

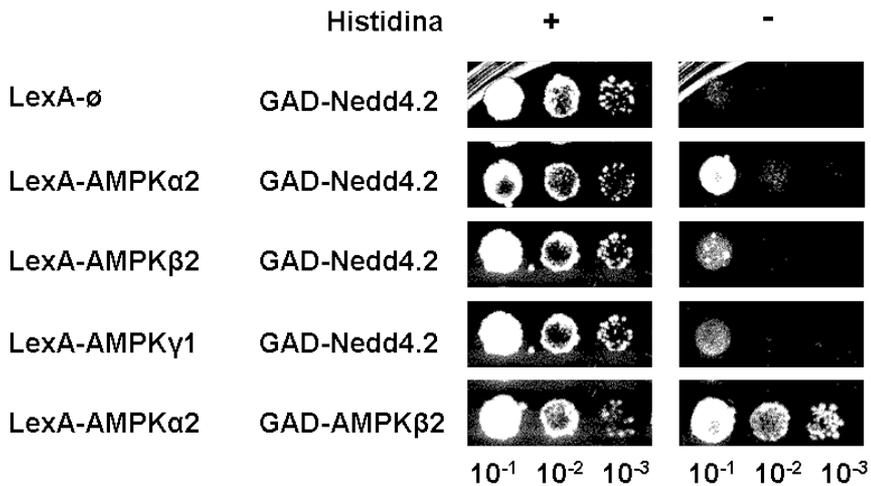


Figura 15. Doble híbrido. Análisis de crecimiento en medio sólido. La cepa THY.AP-4 transformada con los plásmidos pBTM116 (LexA) y pGADT7 con los genes indicados se creció hasta saturación en medio mínimo completo (SCD), se hicieron diluciones seriadas y se depositó una alícuota de estas diluciones en placas con y sin histidina.

Se cuantificó la interacción entre la subunidad $\alpha 2$ de AMPK y Nedd4.2 por ensayos de β -galactosidasa (Figura 16). El aumento de actividad β -galactosidasa obtenido al co-expresar Nedd4.2 y la subunidad $\alpha 2$ de AMPK, aunque fue significativo, fue bajo en relación al control. Lo que sugiere que la interacción entre estas dos proteínas no es muy fuerte y/o estable. En la figura 17 se muestra el análisis Western de extractos proteicos obtenidos a partir de las cepas indicadas, donde se puede observar que los transformantes analizados mostraban una expresión similar de las proteínas de fusión sobre-expresadas (Nedd4.2, AMPK $\alpha 2$, AMPK $\beta 2$ y AMPK $\gamma 1$).

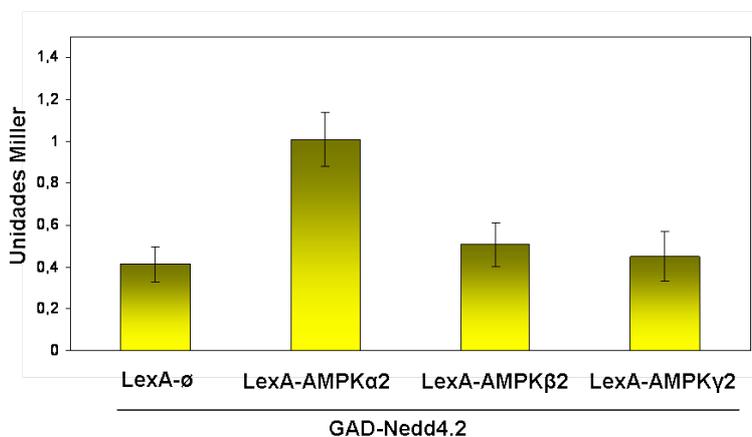


Figura 16. Medida de la interacción entre Nedd4.2 y las subunidades de AMPK mediante la actividad β -galactosidasa (Unidades Miller). La cepa THY.AP-4 transformada con los plásmidos pBTM116 (LexA) y pGADT7 con los genes indicados se creció hasta fase logarítmica en medio mínimo completo (SCD). Se midió la actividad β -galactosidasa de las muestras recogidas como se describe en Materiales y Métodos.

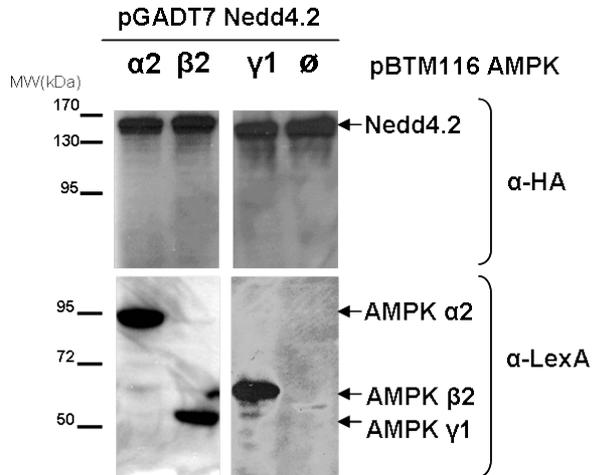


Figura 17. Análisis Western blot de los transformantes LexA (AMPK $\alpha 2$, $\beta 2$ ó $\gamma 1$) con GAD-Nedd4.2. La cepa THY.AP-4, transformada con los plásmidos indicados, se creció hasta fase logarítmica en medio mínimo completo (SCD). Los extractos crudos fueron obtenidos como esta descrito en Materiales y Métodos y se resolvieron en geles SDS-PAGE y se realizó una inmunodetección con los anticuerpos contra HA y LexA respectivamente.

2.2 Ensayos de purificación por afinidad GST y co-inmunoprecipitación

Dado que el aumento de la actividad β -galactosidasa no era muy elevado, se estudió por abordajes alternativos la interacción entre Nedd4.2 y la subunidad $\alpha 2$ de AMPK mediante la realización de ensayos de purificación por afinidad con GST en levadura, y ensayos de co-inmunoprecipitación en cultivos celulares.

Para el ensayo en levadura se expresó en la cepa BY4741 la proteína Nedd4.2 fusionada a GST (pWS-GST-Nedd4.2) o la proteína GST (pWS-GST) en combinación con las tres subunidades de AMPK ($\alpha 2$, $\beta 2$ y $\gamma 1$) fusionadas a LexA (pBTM116-AMPK $\alpha 2$, pBTM116-AMPK $\beta 2$ y pEG202-AMPK $\gamma 1$). Las muestras resultantes de la purificación por afinidad con GST fueron analizadas por Western blot con los anticuerpos correspondientes (α -GST y α -LexA), y pese a que la cantidad de GST-Nedd4.2 fue considerable, no se pudo detectar

la presencia de ninguna de las subunidades de AMPK en el material purificado con GST-Nedd4.2 (Figura 18). En este experimento se usó un gel SDS-PAGE del 8% de acrilamida para resolver la proteína Nedd4.2 que tiene un tamaño aproximado de 120 kDa, con este porcentaje de acrilamida la detección de GST (26 kDa) no se muestra. La expresión de las tres subunidades de AMPK en los extractos crudos de los transformantes analizados fue comprobada por *Western blot* de los extractos crudos y su expresión presentó unos niveles normales.

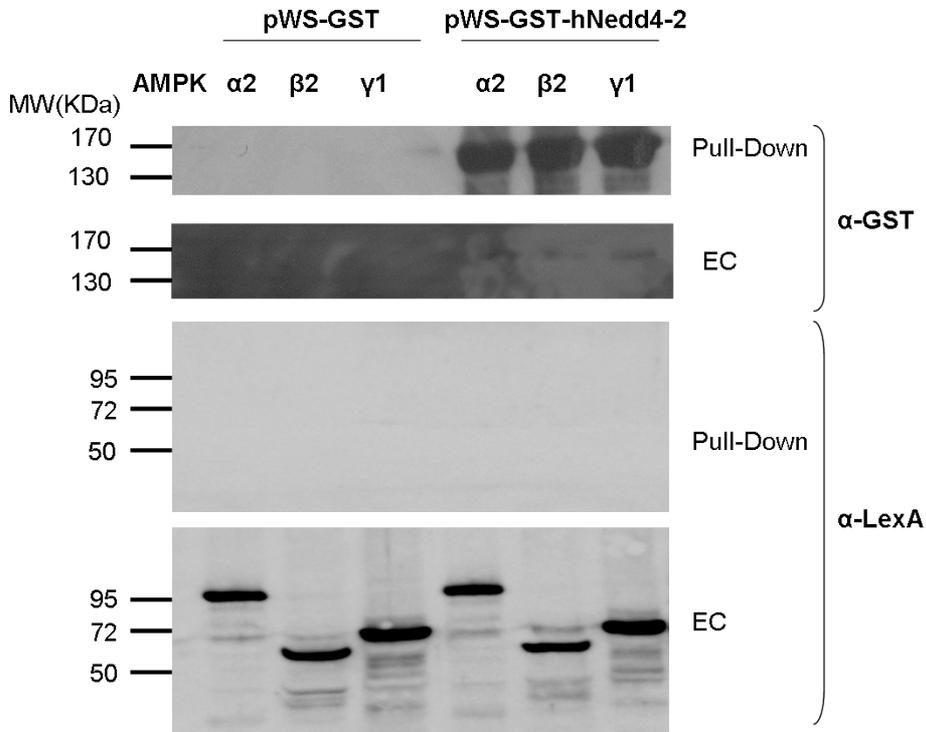


Figura 18. Ensayo de purificación por afinidad de GST-Nedd4.2. La cepa de levadura BY4741 se transformó con los plásmidos que expresaban las proteínas de fusión GST, GST-Nedd4.2, LexA-AMPK α 2, LexA-AMPK β 2 y LexA-AMPK γ 2. Los extractos crudos (EC) se obtuvieron a partir de cultivos crecidos en 2% (p/v) de glucosa y la purificación por afinidad se realizó tal y como está descrito en Materiales y Métodos. Las muestras se resolvieron en geles SDS-PAGE y se realizó una inmunodetección con los anticuerpos contra GST y LexA respectivamente.

Para la co-inmunoprecipitación en cultivos celulares se co-expresó Nedd4.2 con las tres subunidades de AMPK ($\alpha 2$, $\beta 2$ ó $\gamma 1$). Se clonó Nedd4.2 en el plásmido pFLAG-CMVTM y las subunidades de AMPK en el plásmido pCMV-Myc y se transfectaron células embrionarias humanas de riñón de la línea celular no tumoral HEK293. Con los extractos celulares se inmunoprecipitó Nedd4.2 utilizando el anticuerpo α -FLAG y se comprobó la presencia de AMPK $\alpha 2$, $\beta 2$, y $\gamma 1$ mediante Western blot usando el anticuerpo α -myc. Del mismo modo que en el caso de la purificación por afinidad con GST en levadura, la co-inmunoprecipitación en células HEK293 no permitió detectar la interacción física entre Nedd4.2 con ninguna de las subunidades de AMPK expresadas (datos no mostrados)

Los resultados obtenidos no son concluyentes a la hora de demostrar la interacción física entre AMPK y Nedd4.2. La interacción entre AMPK y Nedd4.2 podría ser transitoria o indirecta y por tanto, difícilmente detectable. El dominio C2 de Nedd4.2 podría estar anclando a la proteína a la membrana impidiendo revelar un resultado positivo en doble híbrido si lo hubiese.

2.3 Búsqueda de dianas de Nedd4.2: adaptadores entre AMPK y Nedd4.2.

En la introducción se ha descrito como los dominios WW de Nedd4.2 reconocen motivos PY en las proteínas diana (Staub et al., 1996). Dado que ninguna de las tres subunidades de AMPK posee un dominio PY de reconocimiento por Nedd4.2, cabe la posibilidad de que la interacción física entre ambas proteínas dependa de un intermediario. Siguiendo esta línea, se ha descrito que en *Saccharomyces cerevisiae* existe un conjunto de proteínas que contienen el motivo PY de reconocimiento por los dominios WW denominadas ARTs (Arrestin-Related trafficking adaptors). Los ARTs sirven de intermediarios entre Rsp5, ortólogo en levadura de Nedd4.2, y proteínas que no

tienen el motivo PY (Lin et al., 2008). Paralelamente, en mamíferos se ha identificado una familia de α -arrestinas (ARRDC en humanos) mediante estudios *in silico*, diferenciando este grupo de arrestinas del resto como las únicas que presentan el dominio PY de reconocimiento por dominios WW de las E3 ubiquitina ligasas (Alvarez, 2008).

Con el objetivo de encontrar proteínas que interactuasen con Nedd4.2 se diseñó en el laboratorio el rastreo de una genoteca de páncreas de Clontech (Human Páncreas Matchmaker™ cDNA library) mediante el sistema de doble híbrido en el que se utilizó como cebo Nedd4.2 unida a LexA (pBTM116-Nedd4.2). Adicionalmente, se sobre-expresó una versión catalíticamente activa de AMPK α 2 (pWS93-AMPK α 2T172D). Realizando el rastreo en este contexto se pretendía encontrar tanto dianas, como intermediarios cuya interacción con Nedd4.2 estuviese condicionada por la sobre-expresión de AMPK α 2 T172D.

Se rastrearon 310.000 colonias de la cepa THY.AP-4, transformada con los plásmidos indicados anteriormente, en placas con medio de cultivo sintético completo (SCD) con los requerimientos necesarios para mantener los plásmidos pero sin histidina, de manera que únicamente las colonias en las que se producía la activación de la transcripción del gen *HIS3*, cuyo promotor contiene operadores LexA, eran capaces de crecer. De estas colonias se realizó un ensayo de β -galactosidasa en filtro, proteína codificada por el gen *lacZ* que también contiene un su promotor operadores LexA. De los candidatos positivos, que mostraron actividad por coloración azul, se rescató el plásmido de la genoteca y se amplificó mediante transformación y crecimiento de bacteria. Se obtuvieron 21 plásmidos diferentes que presentaban distinto patrón de restricción. La cepa THYAP-4 se transformó con los plásmidos, junto con pBTM116-Nedd4.2, pWS93-AMPK α 2T172D y cada uno de los 21 plásmidos anteriores. Se ensayó la actividad β -galactosidasa en filtro de estos transformantes frente a la cepa transformada con cada uno de los 21 candidatos y el plásmido pBTM116 vacío. De los 21 plásmidos

preseleccionados, 3 mostraban un efecto de autoactivación ya que su co-expresión frente al plásmido pBTM116 mostraba actividad β -galactosidasa. Por otro lado, al co-expresar el resto de plásmidos (18) tanto con pBTM116-Nedd4.2 como con pBTM116 vacío no se observó actividad β -galactosidasa. Estos resultados no nos permitieron la identificación de ninguna proteína capaz de interactuar con Nedd4.2 en estas condiciones.

3 Caracterización de la modificación post-traducciona por Nedd4.2 y AMPK

3.1 Fosforilación de Nedd4.2 por AMPK

Aunque no se ha podido demostrar de manera robusta la interacción física entre AMPK y Nedd4.2, está descrito que AMPK fosforila a Nedd4.2 (Bhalla et al., 2006) sin embargo, se desconoce cuál o cuáles son los sitios de fosforilación.

Con el objetivo de conocer la especificidad de la fosforilación de Nedd4.2 por AMPK se diseñó un ensayo *in vitro* donde se comparó la fosforilación por AMPK con la fosforilación por otra proteína quinasa (caseína quinasa 2; CKII). CKII al igual que las quinasas SGK y PKA comparte, como posible diana de fosforilación, al menos una serina situada en un sitio consenso de Nedd4.2 (Figura 19) (Debonneville et al., 2001; Kuenzel et al., 1987). Existen estudios que indican que uno de los papeles de CKII es fosforilar ENaC lo que impide que Nedd4.2 lo ubiquitine (Bachhuber et al., 2008). Además, se incluyó en el ensayo otra ubiquitina ligasa de la misma familia que Nedd4.2 (Nedd4.1).

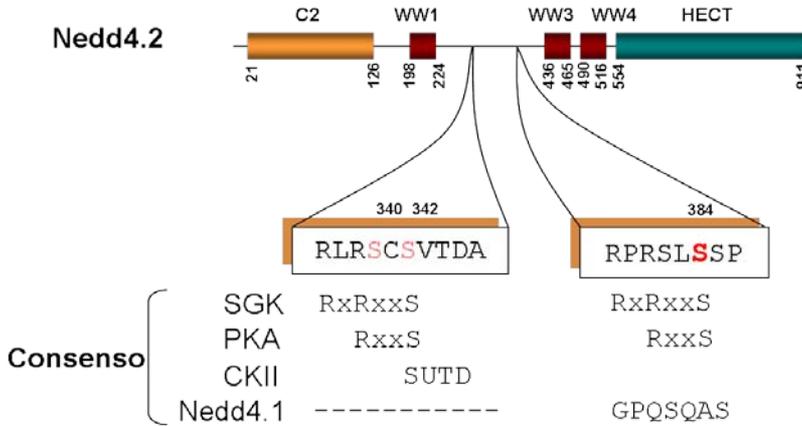


Figura 19. Secuencias consenso de fosforilación de la isoforma 2 de Nedd4.2. En rojo aparecen las serinas candidatas a estar fosforiladas por AMPK. Alineados aparecen los consensos de las quinasas SGK, PKA y CKII, además de la secuencia correspondiente al alineamiento de Nedd4.2 con Nedd4.1.

Tanto Nedd4.1 como Nedd4.2, expresadas en levadura con el plásmido pWS-GST, se purificaron fusionadas a GST como sustratos en el ensayo de fosforilación *in vitro*. Como control positivo de fosforilación por CKII se utilizó la proteína de fusión GST-Ypi1. En la figura 20, se observa una mayor incorporación de fosfato marcado radiactivamente en Nedd4.2 por AMPK en presencia de AMP, lo que confirma la fosforilación *in vitro* de Nedd4.2 por AMPK. Cuando se ensaya la fosforilación *in vitro* de Nedd4.1 por AMPK, se observa que la incorporación de ^{32}P es mucho menor en comparación con Nedd4.2. Además cuando se realiza en ensayo de fosforilación *in vitro* con CKII, no se observa incorporación de ^{32}P ni en Nedd4.1 ni en Nedd4.2, pero sí en el caso del sustrato control Ypi1. En ningún caso se observa la fosforilación de la proteína GST. Se realizó la tinción *Coomassie Blue* del gel donde se comprobó la cantidad de proteína ensayada era similar en cada caso (datos no mostrados). Este ensayo demuestra que Nedd4.2 es un mejor sustrato de

fosforilación *in vitro* que Nedd4.1, y que dicha fosforilación es dependiente de AMP.

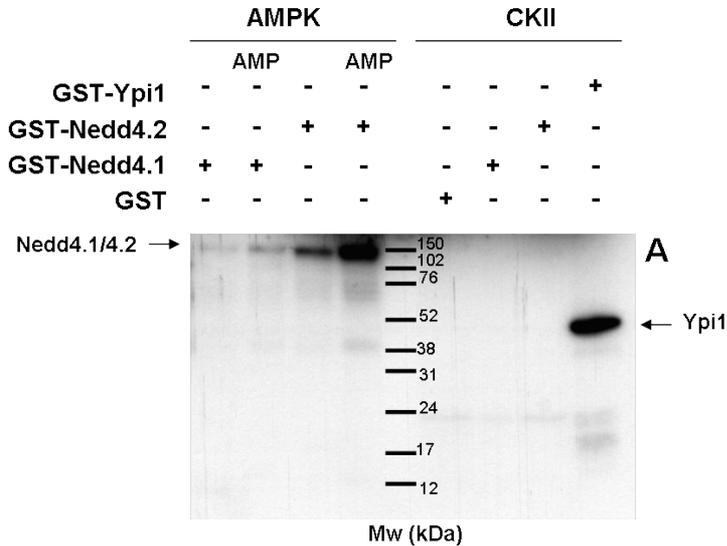


Figura 20. Fosforilación *in vitro* de Nedd4.1 y Nedd4.2. Las proteínas fusionadas a GST y purificadas a partir de levadura se emplearon en una reacción de fosforilación *in vitro*. Las muestras fueron resueltas en un gel SDS-PAGE y se reveló la autorradiografía del gel.

3.2 Determinación del sitio de fosforilación de Nedd4.2 por AMPK

Una vez confirmada la fosforilación de Nedd4.2 por AMPK, se prosiguió con la determinación del sitio de fosforilación mediante análisis de secuencia de péptidos fosforilados. Para ello, se purificó GST-Nedd4.2 producido en *Escherichia coli* y se volvió a realizar la fosforilación *in vitro* de la proteína. En este ensayo de fosforilación se añadió como control positivo ACC1 (acetil-CoA carboxilasa 1), que es una diana de AMPK y se usa como indicador de la actividad de ésta (Carlson and Kim, 1973). En la figura 21 se presenta la autorradiografía y la tinción Ponceau de las muestras de la fosforilación *in vitro*. La muestra de GST no presenta la incorporación de fosfato marcado

radiactivamente lo que indica que la fosforilación por AMPK es específica. En el control positivo GST-ACC1, se observa que no hay marca radiactiva en la muestras sin AMPK, mientras que cuando AMPK está presente se observa que la fosforilación depende de la presencia de AMP, siendo mayor cuando éste está presente en la reacción. Las muestras correspondientes a Nedd4.2 muestran que no hay incorporación de fosfato radiactivo cuando no está AMPK en la reacción, mientras que con la quinasa se observa marca de fosforilación tanto en presencia como en ausencia de AMP.

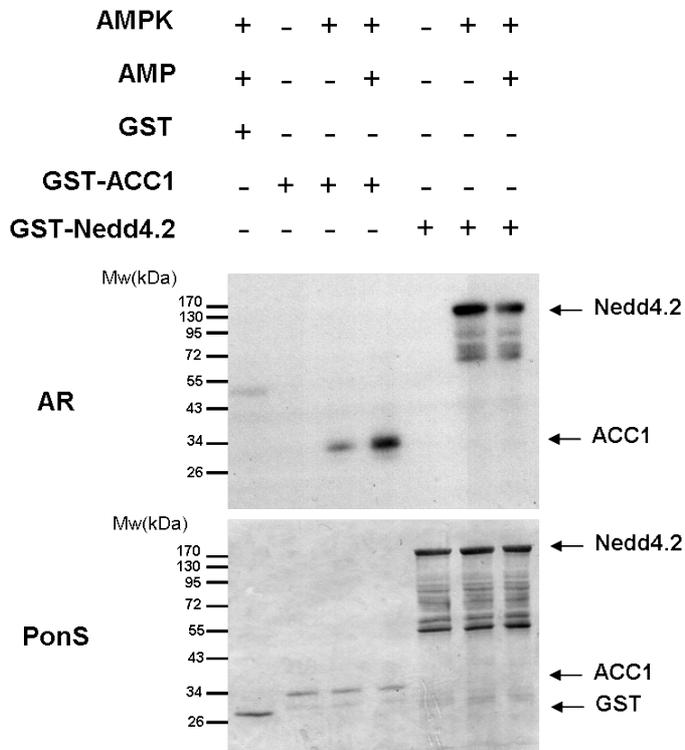


Figura 21. Fosforilación in vitro de Nedd4.2 y ACC1. Las proteínas fusionadas a GST y purificadas a partir de bacteria se emplearon en una reacción de fosforilación in vitro. Las muestras fueron resueltas en un gel SDS-PAGE y transferidas a membrana de nitrocelulosa. (AR) Autorradiografía de la membrana. (PonS) Tinción con Ponceau S de la membrana.

Tras la reacción de fosforilación *in vitro* de Nedd4.2 por AMPK y la separación de las proteínas en un gel de SDS-PAGE, la banda correspondiente a Nedd4.2 fue purificada y analizada por el servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de Madrid. Se analizó mediante MALDI TOF/TOF aplicando un procedimiento de purificación de fosfopéptidos, optimizado por el laboratorio del servicio de proteómica del CNB, denominado IMAC-fase inversa. Después de dicha purificación, el análisis de la muestra consistió en caracterizar los péptidos mediante nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica, de manera que se alternan como técnicas de fragmentación CID (Collision Induced Dissociation) y ETD (Electron Transfer Dissociation).

Mediante MALDI-TOF/TOF se identificaron dos fosfopéptidos que presentaban las siguientes secuencias:

* SCSVTDAVAEQGHLPPPSAPAGRAR (posición 340-364)

* LRSCSVTDAVAEQGHLPPPSAPAGR (posición 338-362)

Estos péptidos, candidatos a contener el sitio de fosforilación, solapan en 23 de sus 25 aminoácidos por lo que se decidió tener en cuenta para posteriores ensayos las serinas que se encontraban en un posible sitio consenso de fosforilación por AMPK S340 y S342 (Figura 22). Para ello se tuvo en cuenta el sitio consenso de fosforilación por AMPK establecido por diversos estudios (RXXSXXXL), donde R es una arginina, X es cualquier aminoácido, S es la serina fosforilada y L es un aminoácido hidrofóbico (Hardie and Carling, 1997; Hardie et al., 2003; Towler and Hardie, 2007).

El análisis por nano HPLC-MS/MS identificó la serina 384 como fosforilada en la secuencia del fosfopéptido SLSSPTVTLSPLEGAK (382-398). Esta serina se encuentra en un sitio consenso para AMPK (Figura 22).

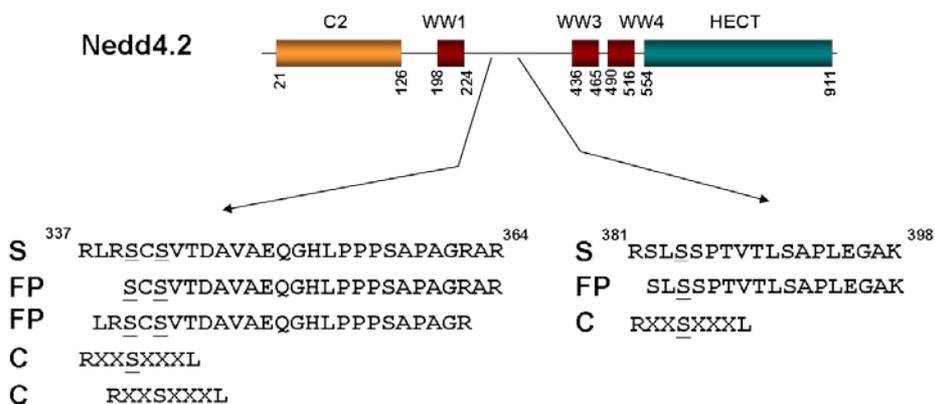


Figura 22. Alineamiento de secuencias parciales de Nedd4.2. S: secuencia de Nedd4.2, FP: fosfopéptido obtenido en el análisis mediante MALDI-TOF/TOF y por nano HPLC-MS/MS, C: sitio consenso de fosforilación por AMPK.

A partir de los resultados de identificación de sitios fosforilados se construyeron mutantes de las tres serinas candidatas S340, S342 y S384 a alanina en el vector de expresión de bacterias pWS-GST. Tras la purificación de cada una de las proteínas, se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* con AMPK. Como se puede observar en la figura 23, la fosforilación por AMPK de cada una de las versiones de Nedd4.2 con mutaciones en las tres serinas de Nedd4.2 disminuye con respecto a la proteína no mutada. Se observa que la fosforilación es menor en los mutantes S340A y S384A. Aunque sería necesario la construcción y análisis del triple mutante para determinar si estas tres serinas son los únicos sitios de fosforilación, estos datos sugieren que contribuyen a los niveles de fosforilación de Nedd4.2 por AMPK observado *in vitro*.

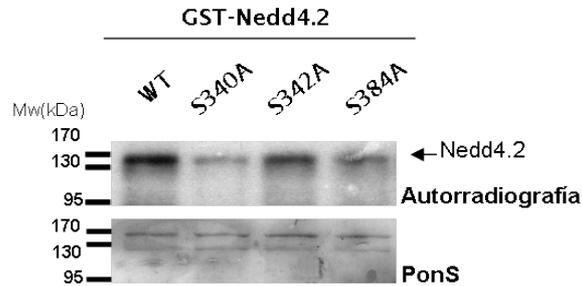


Figura 23. Fosforilación in vitro de mutantes de Nedd4.2. Las proteínas fusionadas a GST y purificadas se fosforilaron in vitro. Las muestras fueron resueltas en un gel SDS-PAGE y transferidas a membrana de nitrocelulosa. La membrana se sometió a una autorradiografía y a una tinción con Ponceau S.

3.3 Modulación de la interacción entre Nedd4.2 y ENaC por AMPK.

Bhalla y colaboradores demostraron como el canal epitelial de sodio ,ENaC, está regulado por AMPK a través de Nedd4.2 (Bhalla et al., 2006). En nuestro laboratorio se estableció un modelo de estudio de la influencia de AMPK sobre Nedd4.2 basado en el modelo de interacción que existe entre ENaC y Nedd4.2 (Staub et al., 1996), utilizando el doble híbrido en levadura como técnica de comprobación.

Inicialmente se estudió la influencia que podía tener la sobre-expresión de una versión catalíticamente activa de AMPK (AMPK α 2 T172D) en la interacción entre Nedd4.2 y las distintas subunidades de ENaC. Para ello se clonaron los dominios WW de Nedd4.2 y los dominios PY de ENaC (α , β y γ) implicados en la interacción. Por un lado se clonó la región que contiene los dominios WW de Nedd4.2 encargados de la identificación del sustrato (Figura 24), ya que la expresión de la proteína entera no presentaba interacción con las subunidades de ENaC por doble híbrido, debido posiblemente a que su

dominio C2 podría estar uniendo la proteína a la membrana, y por tanto, interfiriendo en el sistema de doble híbrido excluyéndola del núcleo.

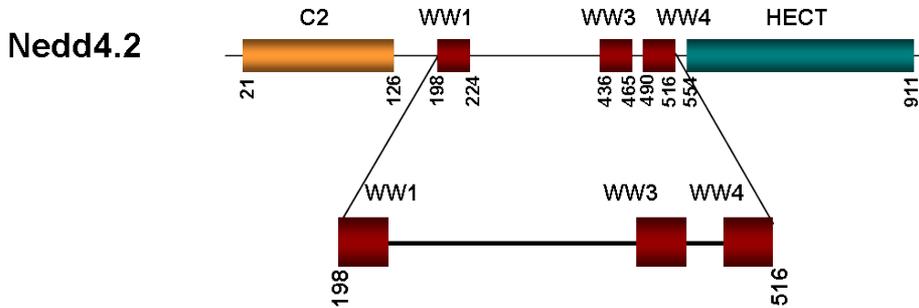


Figura 24. Esquema del fragmento de la isoforma 2 de Nedd4.2 clonado que contiene los dominios WW.

Por otro lado, se clonó la parte citosólica de las 3 subunidades del transportador ENaC (α , β , γ), que contiene los dominios PY reconocidos por Nedd4.2 (Figura 25), ya que la proteína entera estaría en la membrana lo que impediría ver cualquier resultado en el ensayo de doble híbrido.

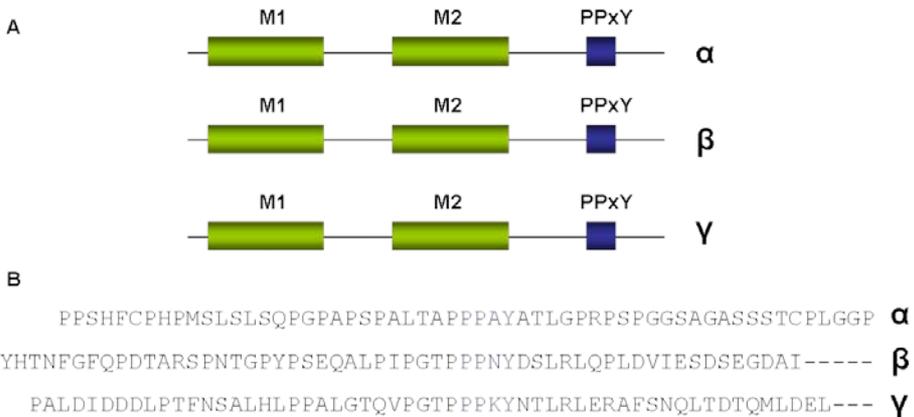


Figura 25. Esquema de los dominios de las tres subunidades de ENaC. (A) M1 y M2 en verde representan los fragmentos transmembrana y PPxY, en azul, representa el motivo de reconocimiento por Nedd4.2. (B) Secuencia clonada que contiene el motivo PY de cada una de las subunidades.

Se transformó la cepa THY.AP4 [MATa *ura3 leu2 lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*] (Obrdlik et al., 2004) de levadura con WW-Nedd4.2 fusionada a LexA (BD) (pBTM116-WW-Nedd4.2) (Figura 24) con el dominio carboxilo-terminal de cada una de las tres subunidades α , β o γ de ENaC fusionado a GAL4 (AD) (pACTII- $\alpha/\beta/\gamma$ ENaC) en presencia o ausencia de AMPK α 2 T172D (pWS93-AMPK α 2 T172D). A partir de dos diluciones (1/10 y 1/100) de cultivos saturados de levadura se realizaron goteos sobre medio SCD, SCD-His y SCD-Ade. En la figura 26, se observa como existe crecimiento en medio selectivo sin Histidina y sin Adenina de las células transformadas con WW-Nedd4.2 y con cada una de las tres subunidades de ENaC. Adicionalmente, se observa que la prueba de β -galactosidasa realizada a las células transferidas a membrana de nylon presenta coloración azul en aquellos transformantes que co-expresan WW-Nedd4.2 y ENaC (α , β , γ), lo que confirma la expresión de la proteína β -galactosidasa, que se utiliza como indicador de una interacción entre las proteínas co-expresadas. Tanto el crecimiento en medio selectivo como el ensayo β -galactosidasa en filtro indican la interacción entre Nedd4.2 y cada una de las tres subunidades de ENaC (α , β , γ). Como control negativo se sobre-expresó WW-Nedd4.2 frente al plásmido vacío de GAL4-AD y no se observó ni crecimiento ni color azul.

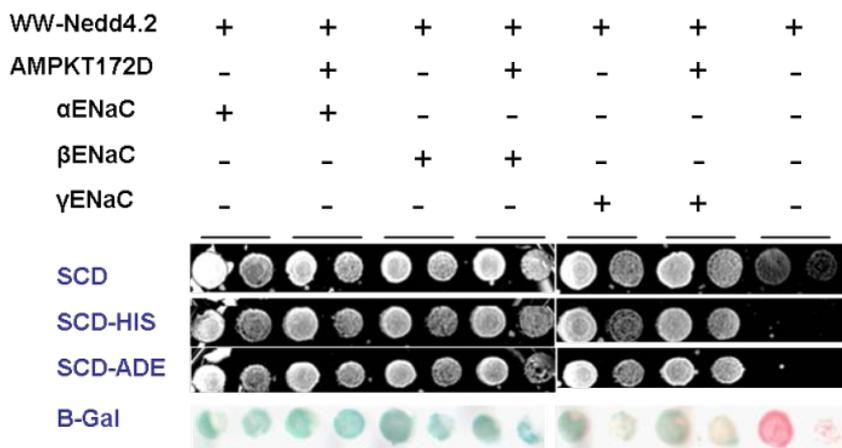


Figura 26. Los dominios WW de Nedd4.2 interactúan con el dominio PY de las tres subunidades de ENaC (α , β , y γ). La cepa THY.AP-4 transformada con los plásmidos pBTM116 (LexA BD), pACT2 (GAL4 AD) y pWS-93-AMPK α 2-T172D, con los genes indicados se creció hasta saturación en medio mínimo completo (SCD), se diluyó en serie y se depositó en placas con y sin histidina o adenina. Las células transferidas a filtro de nylon se incubaron a -80°C y se les realizó el ensayo β -galactosidasa en filtro como se describe en Materiales y Métodos.

Mediante estos ensayos no fue posible determinar si la sobre-expresión de AMPK α 2 T172D influye en la interacción entre Nedd4.2 y ENaC. Con el objetivo de determinar si la sobre-expresión de AMPK α 2 T172D supone diferencias en la interacción se realizó una cuantificación de la actividad β -galactosidasa de los mismos transformantes estudiados en los ensayos de crecimiento en placa. Mediante esta medida se puede cuantificar de manera indirecta la interacción entre dos proteínas y expresarla en unidades arbitrarias de actividad β -galactosidasa denominadas Unidades Miller. En la gráfica de la figura 27A se observa que la actividad β -galactosidasa derivada de la interacción de WW-Nedd4.2 con α ENaC es mayor que con β ENaC y γ ENaC, y por tanto la sobre-expresión de AMPK α 2 T172D favorece la interacción de WW-Nedd4.2 con α ENaC y con β ENaC, pero no con γ ENaC. Estas diferencias no obedecen a diferencias en los niveles de sobre-expresión de las proteínas

ya que, como se puede observar en el Western blot de la figura 27B los niveles de WW-Nedd4.2, de $\alpha/\beta/\gamma$ ENaC y de AMPK α 2 T172D son similares.

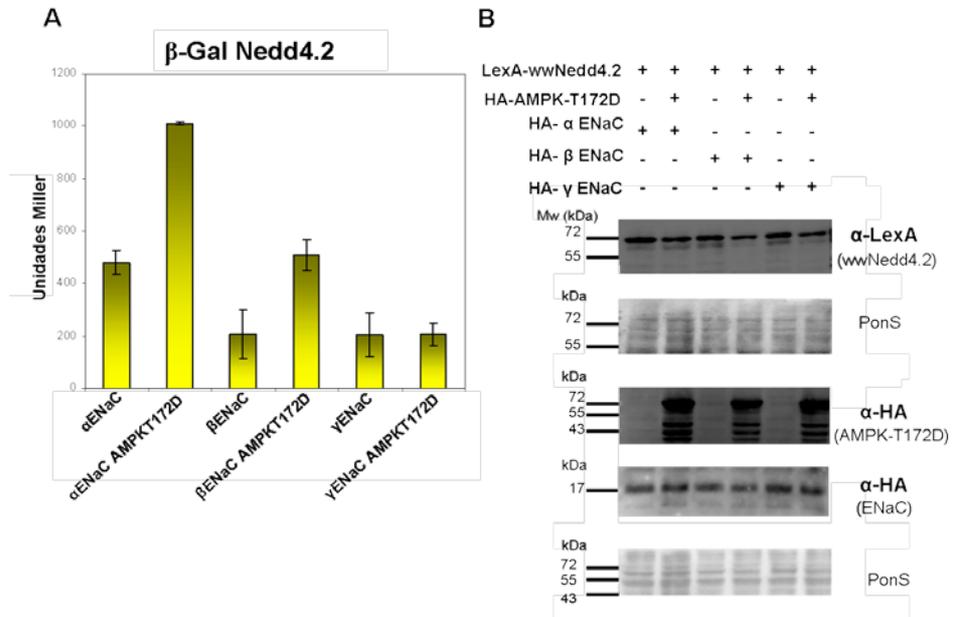


Figura 27. La sobre-expresión de AMPK T172D favorece la interacción entre WW-Nedd4.2 y ENaC. La cepa THY.AP-4 se transformó con los plásmidos pBTM116-WW-Nedd4.2 (LexA) en combinación con pACT2 (GAL4-AD) con las tres subunidades de ENaC (pACT2- α ENaC, pACT2- β ENaC y pACT2- γ ENaC) y con o sin pWS93- α AMPKT172D . (A) Los transformantes se crecieron hasta fase logarítmica en medio mínimo completo (SCD). Se tomaron muestras y se realizó la medida de la actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) como se describe en Materiales y Métodos. (B) Los extractos crudos fueron analizados mediante Western blot usando los anticuerpos anti-LexA y anti-HA.

3.4 Efecto de la activación de Snf1 en la interacción por doble híbrido entre Nedd4.2 y ENaC

La sobre-expresión de AMPK α 2 T172D implicaba trabajar con la expresión heteróloga de proteínas en levaduras derivadas de tres plásmidos diferentes, lo que puede conllevar diferencias de expresión de los genes de interés en los distintos transformantes, con el consiguiente error en la

valoración de la interacción. Para solucionar éste problema se decidió comprobar si la activación del ortólogo de AMPK α 2 en levadura, Snf1 (Carling et al., 1994), era capaz de producir un efecto parecido en la interacción entre Nedd4.2 y las subunidades de ENaC.

Está descrito que la quinasa Snf1 se activa en ausencia de glucosa (Woods et al., 1994). En el laboratorio provocamos esta activación cambiando las células que se encuentran creciendo en fase logarítmica (OD_{660} 0,3-0,4), de un medio de cultivo con 2% de glucosa a otro con 2% de rafinosa. Las muestras analizadas fueron tomadas antes del cambio de medio y tres horas después de crecimiento en rafinosa. En la figura 28 se observa que la interacción medida en términos de unidades Miller es mayor en las células que sobre-expresan WW-Nedd4.2 en combinación con las subunidades α y β de ENaC cuando estas crecen en rafinosa (activación de Snf1) que cuando crecen en glucosa. Además, se observa que este aumento de la interacción es similar al que se produce cuando se sobre-expresa AMPK α 2 T172D. Por otro lado la interacción entre WW-Nedd4.2 y γ ENaC se mantiene en los mismos niveles tanto cuando las células crecen en rafinosa como cuando crecen en glucosa, de igual manera que cuando se sobre-expresa AMPK α 2 T172D.

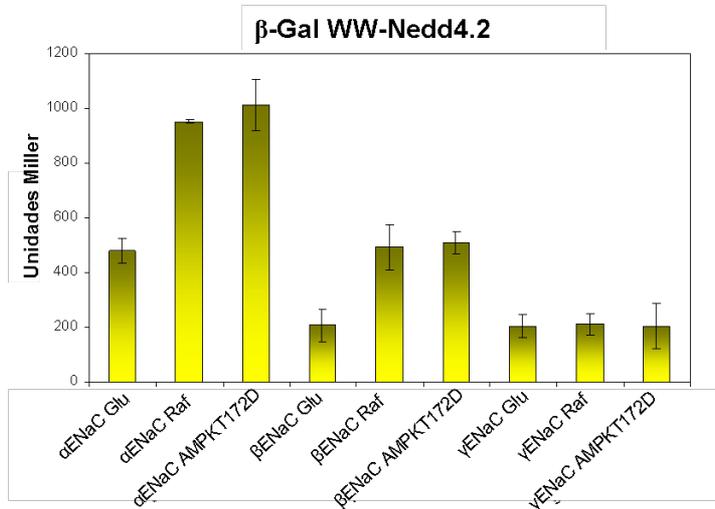


Figura 28. La activación de *Snf1* favorece la interacción entre *WW-Nedd4.2* y en α/β ENaC. La cepa THY.AP-4 se transformó con los plásmidos pBTM116-*WW-Nedd4.2* (LexA) en combinación con pACT2 (GAL4-AD) con las tres subunidades de ENaC (pACT2- α ENaC, pACT2- β ENaC y pACT2- γ ENaC). Los transformantes se crecieron hasta fase logarítmica en medio mínimo completo (SCD) y se tomó la muestra correspondiente a glucosa. El medio SCD con 2% de glucosa se lavó para eliminar la glucosa, las células se cambiaron a SCD con 2% rafinosa se crecieron durante 3 horas, y se tomaron muestras correspondientes a rafinosa. Se realizó el análisis de la actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) de las muestras como se describe en Materiales y Métodos.

A la vista de los resultados anteriores, se decidió comprobar que los efectos causados por el cambio de medio de cultivo de glucosa a rafinosa eran debidos a la activación de *Snf1*. Para ello se diseñó un experimento en el que se compararon los niveles de interacción entre *WW-Nedd4.2* y α ENaC en un mutante $\Delta snf1$, cuando se produce el cambio de medio de glucosa a rafinosa. La cepa que se utilizó para este experimento fue FY250 *MAT α his3- Δ 200 leu2- Δ 1 trp1 Δ 63 ura3-52* (Winston et al., 1995) y el mutante que no expresa *SNF1* fue FY250 *snf1 Δ 10* (Sanz et al., 2000).

Para poder valorar la interacción de proteínas mediante doble híbrido, la cepa FY250 se transformó con el plásmido pSH18-18, con un reportero

lexAop-lacZ, derivado del plásmido pLR1Δ1 (West, Jr. et al., 1984). Para este ensayo se decidió estudiar la interacción entre WW-Nedd4.2 y αENaC dado que era la que presentaba mayor diferencia de interacción con el cambio de medio de glucosa a rafinosa. En la figura 29 se representa, en unidades Miller relativas a la muestra en glucosa, como aumenta la interacción entre WW-Nedd4.2 y αENaC, tal y como ocurría en el experimento hecho con el fondo genético THY-AP4, cuando el cultivo FY250 (silvestre) pasa de glucosa a rafinosa. Cuando se sobre-expresa WW-Nedd4.2 y αENaC en el mutante FY250 *snf1Δ10* no se aprecia la diferencia entre las muestras recogidas en glucosa y las recogidas en rafinosa 3 horas después. Estos resultados indican que el aumento de interacción observado entre WW-Nedd4.2 y el dominio citosólico de αENaC al realizar el cambio de medio se deben a la activación de Snf1.

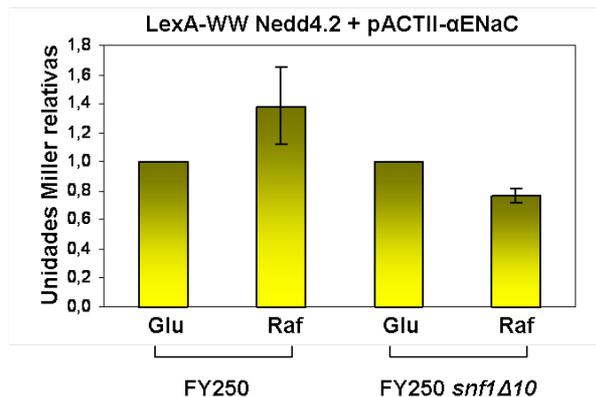


Figura 29. La interacción entre WW-Nedd4.2 y αENaC depende de Snf1. Las cepas FY250 y FY250 *snf1Δ10* se transformaron con los plásmidos pBTM116-WW-Nedd4.2 (LexA), pACT2 (GAL4-AD) con la subunidad α de ENaC (pACT2-αENaC) y pSH18-18 con el reportero *lexAop-LacZ*. Los transformantes se crecieron hasta fase logarítmica en medio mínimo completo (SCD) y se tomó la muestra correspondiente a glucosa. El medio SCD con 2% de glucosa se lavó para eliminar la glucosa, las células se cambiaron a SCD con 2% rafinosa se crecieron durante 3 horas, y se tomaron muestras correspondientes a rafinosa. Se realizó el análisis de la actividad β-galactosidasa (Unidades Miller) como se describe en Materiales y Métodos.

3.5 Papel de las serinas de Nedd4.2 fosforiladas por AMPK en la interacción por doble híbrido entre Nedd4.2 y ENaC.

Para estudiar la importancia de las serinas de Nedd4.2 candidatas a ser fosforiladas por AMPK, se realizaron mutaciones sustituyendo la serina candidata por un aspartato o glutamato (S340D, S342D y S384E). Estos dos aminoácidos se eligieron respectivamente en función de la posibilidad de añadir un sitio de corte por enzimas de restricción que permitiese identificar los mutantes. Dichos mutantes aportan una carga negativa, pudiendo mimetizar en parte la fosforilación del aminoácido mutado (Hoeffler et al., 1994; Huang and Erikson, 1994). Por otro lado, usaron los mutantes a alanina de las mismas tres serinas (S340A, S342A y S384A), que evitan la fosforilación de los aminoácidos mutados.

Se realizó un ensayo de doble híbrido para estudiar la interacción entre los distintos mutantes de WW-Nedd4.2 y las tres subunidades de ENaC. Debido a la influencia que tiene AMPK en la regulación de ENaC por Nedd4.2 presentada en el apartado anterior, se planteó la hipótesis de que los mutantes en las serinas fosforiladas podrían tener niveles de interacción con ENaC distintos a la versión no mutada. En base a este sistema, la hipótesis formulada fue que los mutantes a aspartato/glutamato favorecerían la interacción con ENaC, por mimetizar la fosforilación producida por AMPK, mientras que los mutantes a alanina deberían de tener una interacción menor por no poder fosforilarse por AMPK/Snf1.

En la figura 30 se representan los valores en unidades Miller de las interacciones entre las subunidades α (Figura 30A), β (Figura 30B) o γ (Figura 30C) de ENaC y los distintos mutantes de WW-Nedd4.2 crecidos en glucosa. En la figura 30A se observa que los mutantes en la serina 340 (S340D y S340A) presentan menores niveles interacción con α ENaC que el silvestre. En el caso de los mutantes en la serina 342 (S342D y S342A) se observan mayores niveles de interacción con α ENaC en el mutante WW-Nedd4.2 S342D

que en el silvestre, mientras que cuando se sobre-expresa el mutante WW-Nedd4.2 S342A la interacción es menor que en el silvestre. En el caso de los mutantes de la serina 384, contrariamente a lo esperado, se observa como el mutante WW-Nedd4.2 S384E presenta menores niveles de interacción que el silvestre mientras que el mutante WW-Nedd4.2 S384A presenta niveles similares. Estos resultados indican que la fosforilación de la serina 342 de Nedd4.2 podría estar jugando un papel importante en la regulación de la interacción entre Nedd4.2 α ENaC. En la figura 30B se observan que diferencias entre los mutantes y el silvestre no son suficientes para permitir seleccionar alguna de las tres serinas como candidatas a ser una diana de fosforilación por AMPK que influya en la interacción entre Nedd4.2 y β ENaC. En la figura 30C se observa como en las mutaciones a aspartato/glutamato (S340D, S342D y S384E) los niveles de interacción con β ENaC son mayores que con las mutaciones a alanina (S340A, S342D y S384A). Únicamente en el caso de las mutaciones en la serina 340 las diferencias son significativas, aunque la mutación a alanina no conlleva niveles de interacción inferiores a los que se dan con el silvestre de Nedd4.2 (WW-Nedd4.2).

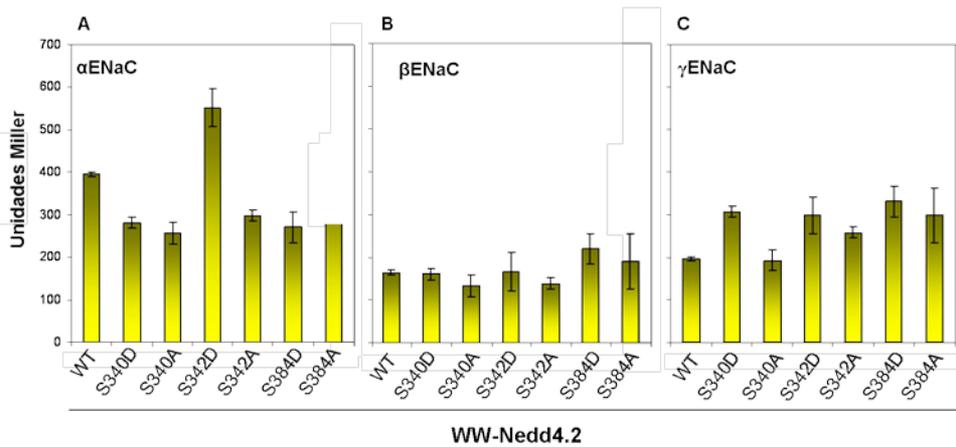


Figura 30. Ensayo de doble híbrido en levadura de la interacción entre los mutantes de WW-Nedd4.2 y las subunidades α , β ó γ de ENaC. La cepa THY.AP-4 se transformó con los plásmidos pACT2 (GAL4-AD) con la subunidades de α ENaC (A), β ENaC (B) ó γ ENaC (C) con el plásmido pBTM116 (LexA) con los mutantes de WW-Nedd4.2. Los transformantes se crecieron hasta fase logarítmica en medio mínimo completo (SCD). Se tomaron muestras y se realizó la medida de la actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) como se describe en Materiales y Métodos.

En el apartado anterior se ha reflejado que la activación de Snf1 por el cambio de medio de glucosa a rafinosa favorece la interacción de WW-Nedd4.2 con ENaC. Nos planteamos si las serinas de Nedd4.2 identificadas como importantes para su fosforilación por AMPK podían influir en la interacción de Nedd4.2 con ENaC cuando se activa Snf1 mediante el cambio de medio de crecimiento con glucosa a rafinosa. Para ello se decidió estudiar los tres mutantes de serina a alanina (S340A, S342A y S384A) de Nedd4.2 y su interacción con α ENaC cuando se realiza el cambio de medio con glucosa a rafinosa. En la figura 31 se compara la interacción en términos relativos al cambio de glucosa a rafinosa. Se puede observar que el mutante en la serina 340 (S340A) experimenta un aumento en la interacción con α ENaC similar al silvestre (*SNF1*). En el caso del mutante en la serina 342 (S342A) no se observa un aumento en la interacción con α ENaC cuando se pasa de glucosa a

rafinosa de forma similar a cuando Snf1 no está en la célula ($\Delta snf1$). Este resultado podría significar que la serina 342 tiene un papel importante en la regulación de la interacción entre Nedd4.2 y α ENaC.

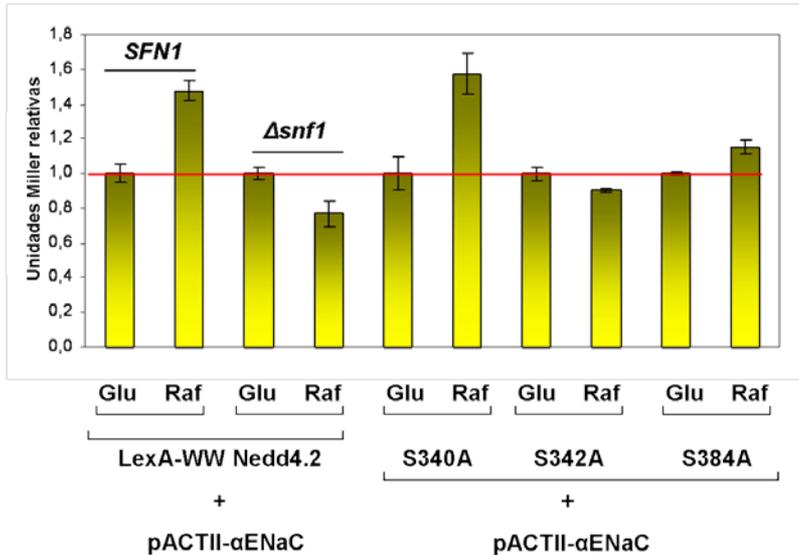


Figura 31. Ensayo de doble híbrido en levadura de la interacción entre los mutantes de WW-Nedd4.2 y α ENaC. Las cepas FY250 (SNF1) y FY250 $snf1\Delta10$ se transformaron con los plásmidos pBTM116-WW-Nedd4.2 (LexA), pACT2 (GAL4-AD) con la subunidad α de ENaC (pACT2- α ENaC) y pSH18-18 con el reportero *lexAop-LacZ*. La cepa THY.AP-4 se transformó con los plásmidos pACT2 (GAL4-AD) con la subunidad α de ENaC (pACT2- α ENaC) en combinación con el plásmido pBTM116 (LexA) con los mutantes de WW-Nedd4.2. Los transformantes se crecieron hasta fase logarítmica en medio mínimo completo (SCD) y se tomó la muestra correspondiente a glucosa. El medio SCD con 2% de glucosa se lavó para eliminar la glucosa, cambiar a SCD con 2% rafinosa, crecer durante 3 horas, y tomar muestra correspondiente a rafinosa. Se realizó el análisis de la actividad β -galactosidasa (Unidades Miller). Los resultados son relativos a cada transformante crecido en medio SCD con 2% de glucosa.

3.6 Ubicuitinación de AMPK por Nedd4.2

Una vez realizado el estudio de los sitios de fosforilación de Nedd4.2 por AMPK, se quiso investigar la posibilidad de que AMPK fuese un sustrato para la actividad E3 ubiquitina ligasa de Nedd4.2. Ya se había observado en

estudios anteriores que la subunidad $\alpha 1$ de AMPK se encontraba ubiquitinada en fibroblastos (Al-Hakim et al., 2008). Adicionalmente en trabajos recientes de nuestro laboratorio se describió la ubiquitinación de la subunidad $\beta 2$ de AMPK por el complejo formado por laforina (una fosfatasa de tipo dual) y malina (una E3 ubiquitina ligasa) (Moreno et al., 2010). Sin embargo, el papel de Nedd4.2 en la ubiquitinación de AMPK estaba aún por elucidar.

Para el estudio de la ubiquitinación de AMPK por Nedd4.2, se estableció un análisis basado en la expresión, en células embrionarias humanas de riñón HEK293, de la ubiquitina etiquetada con 6 histidinas en tándem (6xHis-UB) (Kaiser and Tagwerker, 2005). Los extractos celulares se obtuvieron en presencia de un agente caotrópico, como es el cloruro de guanidinio, para evitar la acción de las deubiquitinasas. Las proteínas ubiquitinadas, conteniendo la fusión 6xHis-UB, se purificaron por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (TALON® His-Tag Purification Resin). La fracción purificada (retenido) y los extractos crudos se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot usando anticuerpos contra la proteína de interés.

El ensayo de ubiquitinación consistió en transfectar las células HEK293 con los plásmidos 6xHis-UB y pCMV-myc-AMPK $\beta 2$ en combinación con distintas E3 ubiquitina ligasas (pCMV-HA-Nedd4.2, pCMV-HA-laforina + pCMV-HA-malina, pCDNA-Mdm2). El análisis de los sustratos muestra el típico patrón de ubiquitinación, de escalera de mayor peso molecular, de la subunidad $\beta 2$ de AMPK dependiente de la presencia de Nedd4.2 (Figura 32). Como control positivo de ubiquitinación de la subunidad $\beta 2$ de AMPK se utilizó el complejo , ya nombrado anteriormente, formado por laforina y malina (Moreno et al., 2010). Como control negativo se utilizó Mdm2, que es una E3 ubiquitina ligasa de tipo RING que es responsable de ubiquitinar a p53 para su degradación proteasomal.

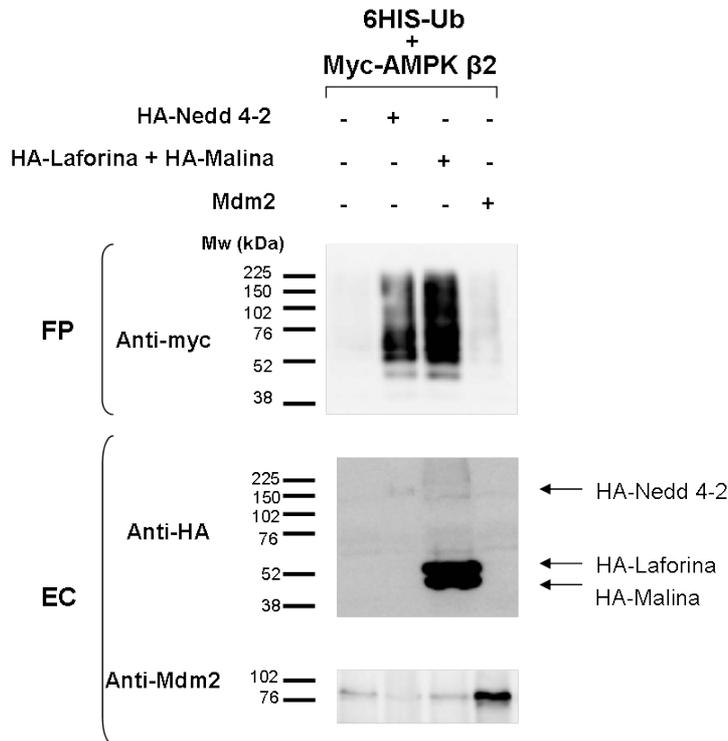


Figura 32. AMPK se ubiquitina por Nedd4.2. En HEK293 se sobre-expresaron 6xHis-UB y pCMV-myc-AMPKβ) en combinación con o sin Nedd4.2 (pCMV-HA-Nedd4.2), y con el complejo laforina/malina (pCMV-HA-laforina, pCDNA-HA-malina), y Mdm2 (pCDNA-Mdm2). A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech). Tanto la fracción purificada (FP), como 40 µg del extracto crudo (EC) fueron analizados mediante SDS-PAGE y se realizó una inmunodetección con anticuerpos específicos.

Una vez probada la ubiquitinación de la subunidad β2 de AMPK se amplió el estudio a las subunidades de AMPK α2 y γ1. Para ello se utilizó la misma técnica de purificación de proteínas ubiquitinadas. En este caso, se transfectaron las células HEK293 con los plásmidos 6xHis-UB y pCMV-HA-Nedd4.2 combinándolos con las subunidades de AMPK (pCMV-myc-AMPK α2, AMPK β2 o AMPK γ1). En la figura 33 se observa como la ubiquitinación de las subunidades α2 y β2 de AMPK es dependiente de la presencia de Nedd4.2, mientras que la ubiquitinación de la subunidad γ1 es independiente de Nedd4.2.

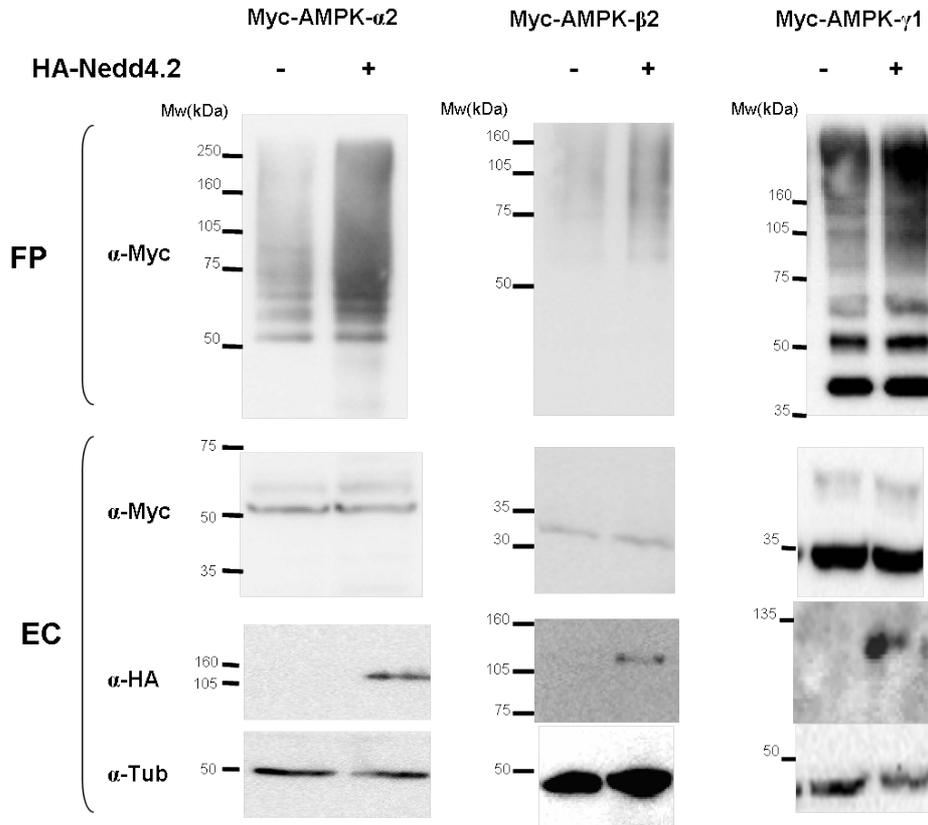


Figura 33. Las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ AMPK se ubiquitina por Nedd4.2. En HEK293 se sobre-expresaron 6xHis-UB y las subunidades de AMPK (pCMV-myc-AMPK $\alpha 2$, pCMV-myc-AMPK $\beta 2$ o pCMV-myc-AMPK $\gamma 1$) con o sin Nedd4.2 (pCMV-HA-Nedd4.2). A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech). Tanto la fracción purificada (FP), como 40 μ g de cada extracto crudo (EC) fueron analizados mediante SDS-PAGE y se realizó un inmunodetección con anticuerpos específicos.

La proteína quinasa AMPK funciona como un heterotrímero formado por las subunidades α , β y γ (Hardie and Sakamoto, 2006). En estudios anteriores se observó que la degradación por proteasoma de las subunidades de AMPK era mayor si éstas se encontraban de forma libre que formando parte

del heterotrímero (Crute et al., 1998). Para descartar que la ubiquitinación de las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ de AMPK se estuviese produciendo por la sobre-expresión de una sola subunidad, se realizó un ensayo sobre-expresando las tres subunidades simultáneamente (pCMV-myc-AMPK $\alpha 2$, pCMV-myc-AMPK $\beta 2$ y pCMV-myc-AMPK $\gamma 1$) y se estudió su ubiquitinación por Nedd4.2. Este ensayo se centró en analizar que pasaba con las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$, dejando aparte la subunidad $\gamma 1$, dado que, como se observa en los experimentos anteriores, sólo las dos primeras son ubiquitinadas por Nedd4.2. Adicionalmente se incluyó Nedd4.1, que como se ha descrito anteriormente, es una E3 ubiquitina ligasa de la misma familia que Nedd4.2 que no está descrita su regulación por AMPK. Para el análisis de este ensayo, se utilizaron anticuerpos específicos contra cada una de las subunidades de AMPK. En la figura 34 se aprecia que la ubiquitinación de las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ se produce tanto si se co-expresan junto con la subunidad $\gamma 1$ como si se sobre-expresan de manera individual. También se aprecia una mayor cantidad de proteína de las tres subunidades de AMPK cuando estas se co-expresan, probablemente debido a que aumenta la estabilidad de la proteína al formarse mayor número de trímeros. En cuanto a la capacidad de ubiquitinación de Nedd4.1 no parece que ubiquitine la subunidad $\alpha 2$ de AMPK cuando la co-expresamos junto a las subunidades $\beta 2$ y $\gamma 1$, mientras que ísse observa una ligera marca de ubiquitinación cuando únicamente se sobre-expresa AMPK $\alpha 2$. La subunidad $\beta 2$ parece que se ubiquitina por Nedd4.1 tanto al co-expresarse junto a las otras dos subunidades de AMPK $\alpha 2$ y $\gamma 1$ como al sobre-expresarla en ausencia de las mismas.

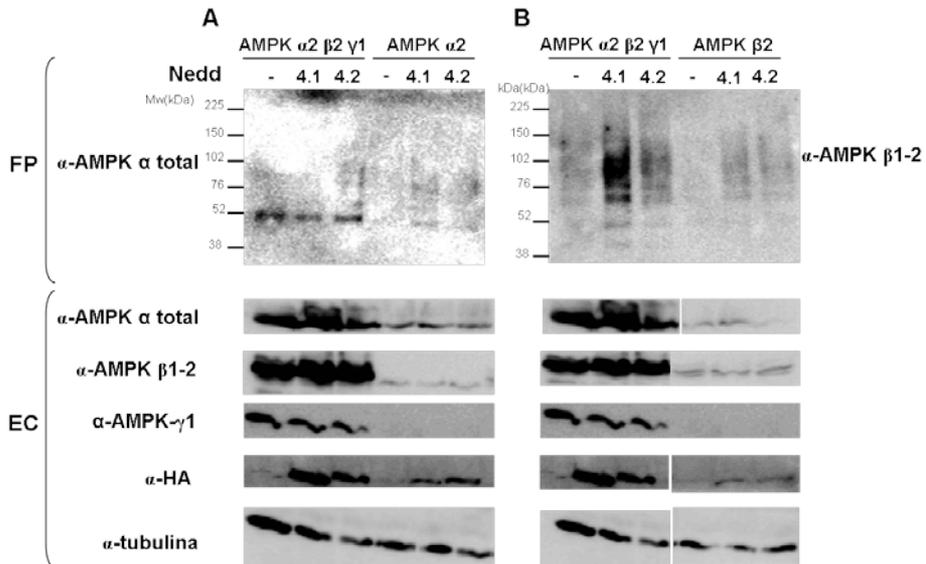


Figura 34. Ubicuitinación de las subunidades α 2 y β 2 AMPK por Nedd4.1 y Nedd4.2 cuando se sobre-expresan los tres componentes del heterotrímero de AMPK. (A) En HEK293 se sobre-expresaron 6xHis-UB y la subunidad α 2 de AMPK (pCMV-myc-AMPK α 2) individualmente o formando parte del heterotrímero β 2 y γ 1 (pCMV-myc-AMPK β 2 y pCMV-myc-AMPK γ 1) con o sin Nedd4.1 y Nedd4.2 (pCMV-HA-Nedd4.2 y pCMV-HA-Nedd4.2). A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada (FP), como 40 μ g de cada extracto crudo (EC). Fueron analizados mediante SDS-PAGE y se realizó una inmunodetección con anticuerpos específicos.

Para caracterizar con más detalle la ubiquitinación de la subunidad α 2 de AMPK se estudió que región de dicha subunidad es más importante en dicho proceso de ubiquitinación. Para ello, se sobre-expresaron en células HEK293 los plásmidos que contenían el dominio regulador (RD), el dominio catalítico (KD) de la subunidad α 2 (pCMV-myc-AMPK α 2 RD y KD) o la subunidad α 2 entera (pCMV-myc-AMPK α 2). En la figura 35 se observa que el dominio catalítico de AMPK α 2 (KD) no presenta diferencias de ubiquitinación dependientes de la sobre-expresión de Nedd4.2. En cambio, se observa que el dominio regulador de AMPK α 2 (RD) posiblemente presenta mayor

ubiquitinación dependiente de Nedd4.2, del mismo modo que ocurre con la subunidad $\alpha 2$ completa.

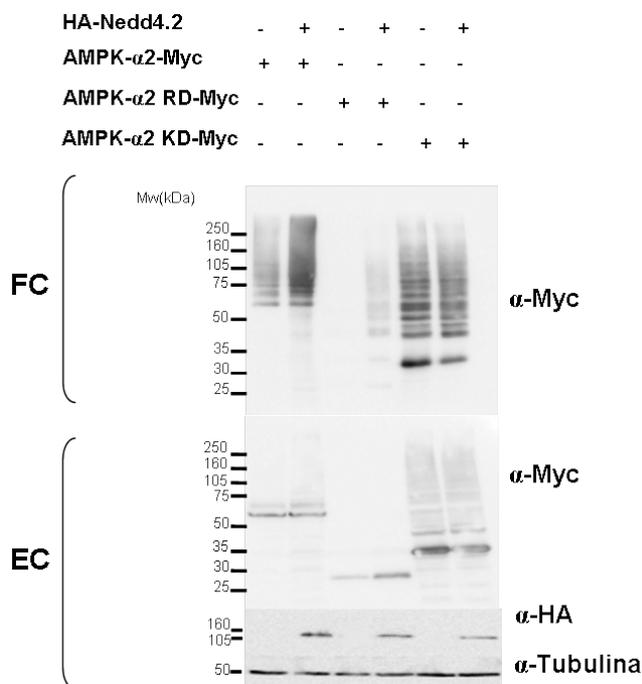


Figura 35. La ubiquitinación de AMPK $\alpha 2$ por Nedd4.2 se produce en su dominio regulador. En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB y pCMV-myc-AMPK $\alpha 2$, su dominio catalítico N-terminal (residuos 1-312) (pCMV-myc-kDa) o su dominio regulador C-terminal (residuos 313-552) (pCMV-myc-RD) con o sin Nedd4.2 (pCMV-HA-Nedd4.2). A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas con la construcción 6xHis-UB fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada (FP), como 40 μ g de cada extracto crudo (EC) fueron analizados mediante SDS-PAGE y se realizó una inmunodetección con anticuerpos específicos.

La ubiquitinación de proteínas puede implicar la adición de una molécula de ubiquitina (monoubiquitinación) o varias (multiubiquitinación) o bien mediante la adición de cadenas de poliubiquitina. Cuando se forman cadenas de ubiquitina se ensamblan sobre aminoácidos lisina (K) en la molécula nueva de ubiquitina. En la ubiquitina hay siete aminoácidos lisina (K6, K11, K27, K29,

K33, K48 y K63). Lo más común es que las cadenas de poliubiquitina se formen sobre los aminoácidos K48 o K63. Las cadenas de ubiquitina que polimerizan sobre K48 marcan los sustratos ubiquitinados para su degradación por el proteasoma 26S (Chau et al., 1989; Thrower et al., 2000), mientras que las cadenas formadas sobre K63 pueden modificar el tráfico de proteínas, endocitosis de proteínas de membrana, activación de la señalización por quinasas y reparación de daños del DNA (Fisk and Yaffe, 1999; Galan and Haguenauer-Tsapis, 1997; Hoege et al., 2002).

Utilizando nuevamente la columna de cobalto TALON®, se realizó un ensayo en el que se quería comprobar que tipo de cadena de ubiquitinación producía Nedd4.2 sobre las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ de AMPK. Para ello se utilizaron mutantes de ubiquitina tanto en K48 (Ub-K48R) como en K63 (Ub-K63R) (Dupre et al., 2004). En la figura 36, se observa que la subunidad $\alpha 2$ de AMPK no se ubiquitina cuando se sobreexpresa el mutante Ub-K63R, en cambio, se ubiquitina correctamente en presencia de la forma mutante Ub-K48R. Lo mismo sucede cuando se realiza el mismo ensayo con la subunidad $\beta 2$ de AMPK. Estos resultados indican que las cadenas de poliubiquitina precisan de la K63 para formarse. Además, se observa una mayor ubiquitinación de la subunidad $\beta 2$ de AMPK cuando se sobre-expresa el mutante Ub-K48R. Esto podría ser debido a una mayor afinidad de Nedd4.2 por ubiquitinar a esta subunidad formando cadenas excluyendo las formadas sobre el aminoácido K48 de ubiquitina.

En conclusión, Nedd4.2 ubiquitina las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ de AMPK. Dicha ubiquitinación tiene lugar mayoritariamente formando cadenas de poliubiquitina del tipo K63.

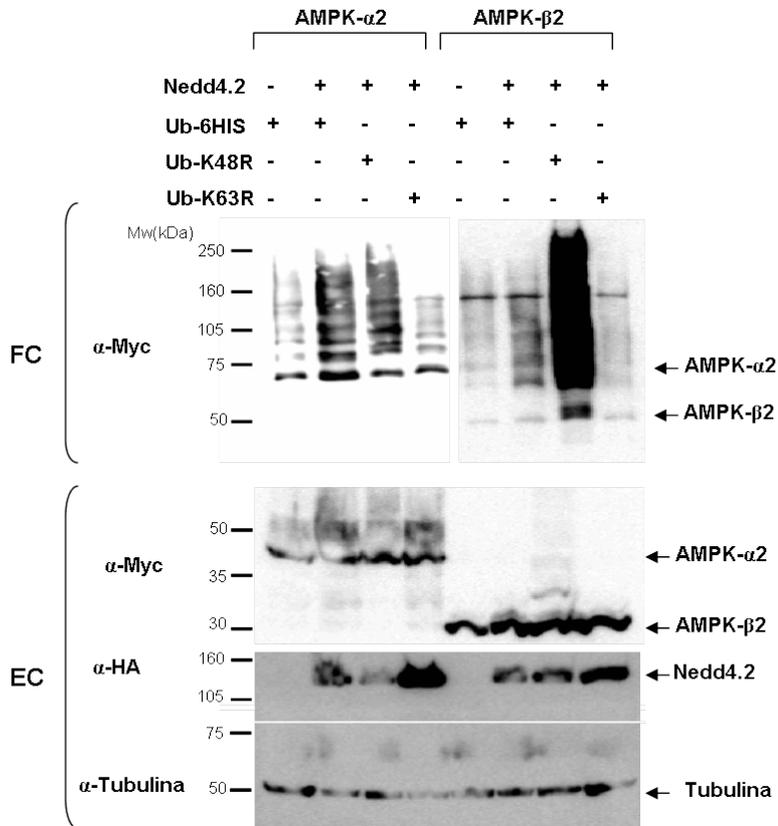


Figura 36. Nedd4.2 ubiquitina las subunidades α 2 y β 2 de AMPK formando cadenas en K63. En HEK293 se sobreexpresaron 6xHis-UB, 6xHis-UB-K48R o 6xHis-UB-K63R y pCMVmyc-AMPK (AMPK α 2 o AMPK β 2) con o sin Nedd4.2. A las 36 horas se efectuó la lisis del cultivo en cloruro de guanidinio 6M. Las proteínas ubiquitinadas fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de cobalto (Clontech) y tanto la fracción purificada (FP), como 40 μ g de cada extracto crudo (EC) fueron analizadas mediante SDS-PAGE y se realizó una inmunodetección con anticuerpos específicos.



Tanto la recopilación de datos que anteceden al inicio de este trabajo como otros que han ido apareciendo y que han sido obtenidos durante la presente Tesis llevan a una discusión en torno al papel que juega la regulación post-traducciona en la homeostasis de iones. En concreto, se profundiza en la modificación por ubiquitinación y por fosforilación, caracterizando la interacción de dos proteínas capaces de realizar estas modificaciones como son Nedd4.2 y AMPK.

La mayor parte de las células de mamíferos se encuentran inmersas en un fluido extracelular cuyas condiciones de presión osmótica, pH y concentración de iones se mantiene, gracias a la acción de los riñones, dentro de unos rangos compatibles con las funciones que desempeñan. La membrana y las proteínas que se encuentran en ella llevan a cabo el control de entrada y de salida de moléculas según las necesidades de la célula. Muchas proteínas de membrana como las permeasas, se encargan del transporte pasivo de moléculas a favor de su gradiente. Entre las proteínas encargadas del transporte activo en contra de gradiente están las bombas dependientes de ATP, los antiportadores y simportadores. En este contexto la regulación de bombas como la ATPasa de sodio y potasio, de los canales de sodio y potasio, de los antiportadores Na^+/H^+ y de los simportadores (Na^+ , K^+ , 2Cl^-) determinará el volumen celular y las concentraciones intracelulares de iones.

La regulación post-traducciona de proteínas de membrana añade un nivel más en la capacidad de respuesta de la célula ante un estímulo o un cambio en su entorno. Mediante la fosforilación de proteínas de membrana se puede regular su actividad positiva o negativamente, mientras que con la ubiquitinación se controla la degradación y el reciclaje que se pueden producir después de la endocitosis, determinando así la cantidad de cada transportador que se encuentra en la membrana.

Como ejemplo del papel de la modificación post-traducciona en el mantenimiento de la homeostasis de iones, en la presente tesis se propone

caracterizar la interacción entre la quinasa AMPK y la E3 ubiquitina ligasa Nedd4.2 así como el papel que puede tener en la regulación del canal epitelial de sodio ENaC. Con anterioridad a este trabajo, en 2005 Carratino y colaboradores observaron mediante mediciones electrofisiológicas que la activación de AMPK inhibía ENaC y ya apuntaban a la posibilidad de que dicha regulación se produjese a través de Nedd4.2. En 2006 Bhalla y sus colaboradores demostraron que la regulación de ENaC por AMPK tenía lugar a través de la fosforilación de Nedd4.2. Ya en 2009, Almaça y colaboradores publicaron un trabajo en el que se correlacionaba el transporte de sodio con AMPK. En dicho estudio caracterizaron el ratón AMPK α 1 KO demostrando que AMPK modula Nedd4.2 para inhibir ENaC, incrementando la ubiquitinación y la consiguiente endocitosis de ENaC.

Con estos precedentes se inició el estudio de la interacción entre AMPK y Nedd4.2 mediante ensayos de doble híbrido, la identificación de dianas de fosforilación en Nedd4.2 y los ensayos de ubiquitinación de AMPK. Posteriormente se estudió el papel que tiene la fosforilación de Nedd4.2 por AMPK en la interacción con la parte citosólica de las tres subunidades de ENaC.

1 Caracterización de la interacción entre AMPK y Nedd4.2

A lo largo de la presente Tesis Doctoral, se ha resaltado que el punto de partida o antecedente sobre el que se apoya el trabajo realizado es la relación que existe entre AMPK y Nedd4.2. Una de las técnicas más utilizadas para estudiar interacciones entre proteínas es el doble híbrido en levadura, por lo que se usó para comprobar si esta relación significaba una interacción entre Nedd4.2 y las subunidades α 2, β 2 y γ 1 de AMPK. En dicha aproximación se consiguieron resultados que apoyaban la existencia de una interacción aparentemente débil entre la subunidad catalítica α 2 de AMPK y Nedd4.2

(Figura 15). Posteriormente se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación y de purificación por afinidad con GST, sin embargo, los resultados obtenidos no confirmaron la existencia de interacción entre Nedd4.2 y las subunidades $\alpha 2$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ de AMPK.

Consistentemente con estas observaciones, y a pesar de que existen publicaciones que demuestran que tanto AMPK como Nedd4.2 son necesarias para la regulación de diversas proteínas de membrana, ninguna demuestra la existencia de una interacción directa entre Nedd4.2 y las subunidades $\alpha 2$, $\beta 2$ y $\gamma 1$ de AMPK. Así, desde que en 2006 Bhalla y colaboradores demostraron que AMPK regulaba a ENaC a través de Nedd4.2, se han publicado mecanismos de regulación similares de canales de potasio como Kir2.1 (Alesutan et al., 2011) o Kv7.1 (Andersen et al., 2011) pero en ningún caso se demuestra la interacción directa entre Nedd4.2 y las subunidades $\alpha 2$, $\beta 2$ ó $\gamma 1$ de AMPK.

Con los datos obtenidos mediante los tres abordajes empleados aquí no se pudo demostrar una interacción directa entre AMPK y Nedd4.2. Estos resultados no excluían no obstante la posibilidad de que la interacción entre AMPK $\alpha 2$ y Nedd4.2 fuese del tipo de la descrita en la bibliografía como *hit and run*. Dicha interacción sería muy rápida en el tiempo y débil, por lo que difícilmente sería detectable. Otra posibilidad sería que la interacción estuviese mediada por un adaptador, ya que las subunidades de AMPK no presentan los dominios PY reconocidos por Nedd4.2. Tomando como base esta última posibilidad y apoyados en las publicaciones surgidas a partir de Lin *et al.*, 2008, donde se describe una familia de proteínas adaptadoras (ART) de la ortóloga a Nedd4.2 en levadura Rsp5, se propuso un nuevo enfoque usando levadura como modelo tanto conceptual como experimental.

En el abordaje en *Saccharomyces cerevisiae* se estudió la posible interacción entre los ortólogos a la subunidad catalítica $\alpha 2$ de AMPK y Nedd4.2 en levadura (Snf1 y Rsp5, respectivamente) mediante ensayos de doble híbrido. Mediante esta técnica tampoco se observó ninguna interacción. Debido

a la mencionada aparición de publicaciones que describían la familia ART como adaptadores de la E3 ubiquitina ligasa Rsp5 se planteó estudiar si algún miembro de dicha familia podía estar interactuando con Snf1 y, por tanto, ser un intermediario entre ésta y Rsp5. Se clonó *ART1*, *ART2*, *ART3* y *ART4* para comprobar mediante doble híbrido la interacción con Snf1. El resultado fue positivo para la interacción entre Art4 y Snf1, y puesto que la interacción entre Art4 y Rsp5 está descrita, este adaptador podría servir como intermediario en la interacción entre Snf1 y Rsp5 (Figura anexa I A). Sin embargo, los ensayos dirigidos al estudio de proteínas de levadura, han sido y están siendo llevados a cabo como líneas de investigación independientes en el laboratorio.

En cuanto a humanos, en 2008 Álvarez C. publicó una aproximación *in silico* donde destacó que las α -arrestinas de humanos podrían ser los ortólogos a los ARTs de levadura ya que algunas poseen dominios PY, por lo que podrían interaccionar con Nedd4.2. En el laboratorio se realizó un ensayo que nos permitía buscar dichos adaptadores en humanos ya que, como se muestra en la figura anexa I B, WW-Nedd4.2 interacciona en doble híbrido con Art2 y Art4. Las conclusiones que se obtengan del trabajo realizado en levaduras podrían aplicarse en futuras investigaciones destinadas a la búsqueda y elucidación del papel de las α -arrestinas en humanos.

1.1 Fosforilación de Nedd4.2 por AMPK.

En 2006 Bhalla y colaboradores demostraron la fosforilación de Nedd4.2 por AMPK. En la presente tesis, se propuso confirmar la fosforilación de Nedd4.2. Se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* para comprobar que, en las condiciones *in vitro*, se podía reproducir la fosforilación de Nedd4.2 descrita en la bibliografía. La fosforilación de Nedd4.2 se comparó con la de Nedd4.1, una ubiquitina ligasa de la misma familia. Además se sabe que Nedd4.2 es diana de otras quinasas como SGK y PKA (Snyder et al., 2002),

Sin embargo, la quinasa CKII aunque tiene un sitio consenso de fosforilación compartido con estas quinastas, no está descrito que fosforile a Nedd4-2. Por tanto, CKII se usó como posible quinasa alternativa a AMPK como control negativo de la especificidad. En el ensayo de fosforilación *in vitro* se pudo observar que CKII no era capaz de fosforilar Nedd4.2, y se pudo no sólo confirmar que AMPK fosforila a Nedd4.2, sino demostrar que lo hace de manera más eficiente a Nedd4.2 que a Nedd4.1.

Para el análisis de los sitios de fosforilación se realizó la fosforilación *in vitro* de Nedd4.2 y se recurrió al servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de Madrid donde se realizó una purificación de fosfopéptidos por MALDI-TOF/TOF. Posteriormente los fosfopéptidos purificados se analizaron mediante HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica. Se decidió usar la información obtenida de ambos procesos para decidir los aminoácidos candidatos a estudiar como diana de fosforilación por AMPK. A partir de los fosfopéptidos identificados mediante MALDI-TOF/TOF se eligieron dos aminoácidos (serinas 340 y 342) que se ajustaban al sitio consenso de fosforilación por AMPK (Figura 22) y que estaban presentes en ambos. Del posterior análisis por nano HPLC-MS/MS se identificó la serina 384 inequívocamente como un aminoácido fosforilado.

Una vez identificados los sitios de fosforilación de Nedd4.2 se realizaron mutaciones puntuales en las serinas candidatas a estar fosforiladas por AMPK, con el objetivo de identificar su papel en ésta regulación. Para ello se obtuvieron mutantes singulares de cada una de ellas sustituyéndolas por alanina con la hipótesis que dichas mutaciones impedirían la fosforilación por AMPK del aminoácido mutado. Se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* para comparar los niveles entre los distintos mutantes y la proteína no mutada. El resultado mostró que las tres mutaciones singulares resultaban en una disminución de los niveles de fosforilación de Nedd4.2 (Figura 23). Según lo observado en este ensayo se podría afirmar que individualmente las serinas

340 y 384 juegan un papel más importante en la fosforilación de Nedd4.2 ya que su nivel de fosforilación es el más afectado en este ensayo *in vitro*. Los resultados indican además que la fosforilación de uno de estos sitios pueda estar favoreciendo la de otro. En cualquier caso, sería necesario comprobar si AMPK es incapaz de fosforilar a un mutante de Nedd4.2 en las tres serinas candidatas.

Para estudiar desde otro enfoque la importancia que pueden tener los aminoácidos de Nedd4.2 candidatos a ser fosforilados por AMPK en la interacción con otras proteínas, se planteó un ensayo de doble híbrido. Para ello se clonó el fragmento que contiene los dominios WW de Nedd4.2 y los dominios citosólicos de las tres subunidades de ENaC (α , β y γ). Se realizaron dos ensayos previos con el objetivo de establecer un sistema simple en el que poder medir cuantitativamente los distintos niveles de interacción. Partíamos de la hipótesis que la fosforilación de Nedd4.2 por AMPK favorece su interacción con ENaC. Diseñamos un primer ensayo y comprobamos que la influencia que tiene AMPK en la interacción entre Nedd4.2 y ENaC se puede cuantificar en un ensayo de doble híbrido. Para ello se sobre-expresó, comparando con la cepa salvaje, un mutante catalíticamente activo de AMPK (AMPK-T172D) y se midió la actividad β -galactosidasa de la interacción entre Nedd4.2 y las tres subunidades de ENaC (Figura 27). Mediante este ensayo pudimos determinar que AMPK favorece la interacción entre Nedd4.2 y las subunidades α y β de ENaC. Para apoyar estos resultados se comprobó si el ortólogo de AMPK en levadura Snf1 era capaz de modular la interacción entre Nedd4.2 y ENaC. El ayuno de glucosa por crecimiento en rafinosa activa Snf1, por lo que la hipótesis sería que dicho tratamiento favorecería la interacción entre Nedd4.2 y ENaC de forma similar a como lo realiza AMPK. El resultado fue que el aumento en la interacción entre Nedd4.2 y ENaC era similar al que se produce con la sobre-expresión del mutante catalíticamente activo de AMPK (Figura

28). Previsiblemente el tratamiento de rafinosa en un fondo mutante no tendría efecto, tal y como se observa en la figura 29.

Haciendo uso del sistema expuesto anteriormente medimos la interacción entre los distintos mutantes en los aminoácidos candidatos de Nedd4.2 y ENaC. Para ello usamos los mutantes con una alanina en lugar de serina (descritos anteriormente) evitando la fosforilación en el aminoácido mutado y diseñamos los mutantes correspondientes sustituyendo la serina por un aminoácido con carga negativa para mimetizar la fosforilación. La hipótesis era que, si los sitios mutados eran importantes en la interacción entre Nedd4.2 y ENaC, impedir su fosforilación disminuiría los niveles de interacción mientras que mimetizarla los aumentaría. Sin embargo, este patrón no se reprodujo en todos los casos, lo que por otro lado, podía otorgar importancia a cada uno de los sitios mutados en el sistema AMPK/Nedd4.2/ENaC. En particular, observamos que la serina 342 es importante en la interacción entre Nedd4.2 y ENaC en este sistema ya que los mutantes cumplen la hipótesis propuesta (Figura 30). Además la activación de Snf1 no influye en la interacción del mutante Nedd4.2-S342A con ENaC en nuestro sistema de doble híbrido (Figura 31). Estos datos permiten correlacionar los resultados de fosforilación *in vitro* de Nedd4.2 por AMPK con el papel que tiene la fosforilación de estos sitios en su interacción con ENaC.

Con el estudio de los sitios de fosforilación se comprobó que dos de ellos, S342 y S384, coinciden con los sitios identificados para dos quinasas como PKA y SGK (Figura 19) (Snyder et al., 2002; Snyder et al., 2004) . La fosforilación de Nedd4.2 tanto por PKA como por SGK desfavorece la interacción de la E3 ubiquitina ligasa con ENaC, que al no ser ubiquitinada mantiene sus niveles en la membrana. Dicho efecto, es contrario al que produce la fosforilación de Nedd4.2 por AMPK, y plantea el interrogante de cómo la fosforilación de un mismo sitio por quinasas distintas favorece de manera desigual la interacción con ENaC. El efecto que produce la fosforilación

está descrito que puede ser aparentemente debido a la interacción de Nedd4.2 fosforilada con proteínas del tipo 14-3-3 que impiden que la E3 ubiquitina ligasa se una a su diana ENaC (Liang et al., 2008). Un estudio de las condiciones en que las proteínas de tipo 14-3-3 interaccionan con Nedd4.2 podría aclarar este punto.

1.2 Ubicuitinación de AMPK por Nedd4.2

En el marco de la descripción de la interacción entre AMPK y Nedd4.2 se decidió estudiar si Nedd4.2 podría ubiquitinar AMPK. Muchas proteínas celulares son moduladas y degradadas en el proteasoma. La regulación de la estabilidad de las subunidades de AMPK podría suponer una forma adicional de regular su actividad. Al-Hakim y colaboradores observaron en 2008 la ubiquitinación de la subunidad $\alpha 1$ de AMPK. En el laboratorio del Dr. Pascual Sanz se definió una relación funcional y el tipo de ubiquitinación de AMPK por el complejo formado por laforina (una fosfatasa de tipo dual) y malina (una E3 ubiquitina ligasa) (Moreno et al., 2010; Solaz-Fuster et al., 2008; Vernia et al., 2009).

Los primeros ensayos realizados en células HEK293 mostraron la ubiquitinación de la subunidad $\beta 2$ de AMPK dependiente de Nedd4.2 (Figura 32). Para comprobar la especificidad de la ubiquitinación se comparó Nedd4.2 con otra E3 ubiquitina ligasa de tipo RING como Mdm2, relacionada con la poli-ubiquitinación de p53 (Brooks and Gu, 2004) y con el complejo laforina/malina descrito anteriormente como regulador de la ubiquitinación de AMPK. Se comprobó que la ubiquitinación de la subunidad $\beta 2$ de AMPK por Nedd4.2 era similar a la que produce el complejo laforina/malina y que Mdm2 no ubiquitinaba a dicha subunidad.

Está descrito que la vida media de las tres subunidades de AMPK sobre-expresadas por separado es de 6 horas, mientras que si forman parte del

complejo trimérico es de unas 13 horas (Crute et al., 1998). Se diseñaron los ensayos de ubiquitinación destinados a comparar la ubiquitinación de las subunidades de AMPK cuando estas se sobre-expresan solas o formando parte del complejo trimérico. Mediante estos ensayos comprobamos que la ubiquitinación se produce tanto cuando las tres subunidades que forman el heterotrímero de AMPK se sobre-expresan individualmente como cuando se sobre-expresan conjuntamente (Figura 34).

En los experimentos de fosforilación in vitro se había observado que Nedd4.1 era un sustrato de fosforilación peor que Nedd4.2 para AMPK. Cuando comparamos la ubiquitinación que produce Nedd4.2 frente a Nedd4.1 de las distintas subunidades de AMPK se observa que, cuando AMPK está formando trímeros, Nedd4.1 ubiquitina menos a la subunidad $\alpha 2$ y más a la subunidad $\beta 2$ que Nedd4.2. Cuando se sobre-expresan por separado, los niveles de ubiquitinación cuando se sobre-expresa Nedd4.1 son similares a cuando se sobre-expresa Nedd4.2.

Dado que una de las funciones principales de la poliubiquitinación es el etiquetado de sustratos para destrucción por el proteasoma, se pensó que la poliubiquitinación de las subunidades libres de AMPK podría indicar una señal degradativa. Está descrito que el tipo de cadena de poliubiquitina determina el destino de la proteína sustrato. En general, las cadenas tipo K48 dirigen al sustrato a degradación proteasomal y las cadenas K63 están implicadas en señalización, activación de quinasas, y en tráfico y localización subcelular del sustrato (Baboshina and Haas, 1996; Wang et al., 2001a). Para definir qué tipo de cadena es la que predomina en la ubiquitinación de las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ de AMPK se emplearon moléculas de ubiquitina mutadas en estas dos lisinas a arginina. Los resultados demuestran que las cadenas de ubiquitina se forman sobre K63 (Figura 36). Este resultado descarta que la sobre-expresión de Nedd4.2 esté formando cadenas de poliubiquitina del tipo K48, por tanto, es probable que Nedd4.2 afecte la localización y/o actividad de AMPK y no a su

estabilidad, aunque harán falta más experimentos para comprobar esta hipótesis. Otra observación que apoya la afirmación que la poliubiquitinación que se está registrando no resulta en una degradación, es que los niveles de proteína no disminuyen a pesar de que se esté ubiquitinando el sustrato sobre-expresado en cuestión.

Se intentó identificar las regiones de AMPK $\alpha 2$ relacionadas con la ubiquitinación dependiente de Nedd4.2. Para ello, se emplearon plásmidos que expresan por un lado el dominio quinasa (KD), como el dominio regulador (RD) de la subunidad $\alpha 2$ de AMPK. El dominio regulador presentaba una mayor ubiquitinación que el dominio catalítico (Figura 35).

A lo largo del trabajo han surgido algunas preguntas y alternativas que serán abordadas en ambos laboratorios. Con perspectiva creemos que sería conveniente complementar ciertos apartados. La interacción post-traducciona l entre Nedd4.2 y AMPK ha sido demostrada en este y otros trabajos, sin embargo, no se ha podido demostrar la interacción física mediante doble híbrido o co-inmunoprecipitación/purificación por afinidad con GST. Cuando se intentó abordar el estudio de interacción física con los ortólogos en levadura (*RSP5* y *SNF1*) tampoco se obtuvieron resultados, consecuentemente se abrió la posibilidad de buscar un intermediario que sustentase la interacción basada en los estudios publicados en torno a la familia ART. Para ello se planteó la conveniencia de poner a punto el rastreo de genotecas humanas así como comprobar la importancia que pueden tener los ortólogos a la familia ART en humanos en la interacción entre Nedd4.2 y AMPK u otros transportadores de membrana. Aunque este abordaje de rastreo no dio resultados, sería interesante comprobar de manera directa la interacción entre los miembros de la familia de α -arrestinas de mamíferos y Nedd4.2 ó AMPK. De hecho, existen estudios recientes que abordan como la interacción entre una proteína con dominio arrestina (ARRDC3) media en la ubiquitinación del receptor adrenérgico beta-2 (beta2AR) por Nedd4.2 (Nabhan et al., 2010).

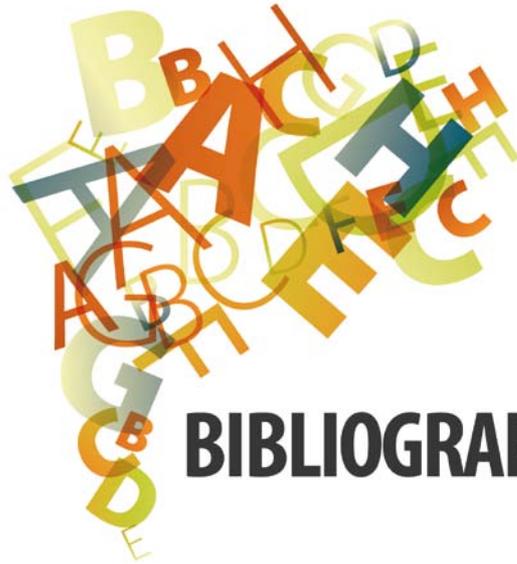
En el estudio de los aminoácidos de Nedd4.2 fosforilados por AMPK se evaluaron los mutantes simples en dichos aminoácidos. Sería conveniente un análisis de mutantes que combinasen dos y tres mutaciones de los aminoácidos candidatos. Uno de los sistemas elegidos para el estudio de la influencia que puede tener la interacción entre Nedd4.2 y AMPK en la regulación de proteínas de membrana fue el doble híbrido en levadura. Sería conveniente establecer un sistema de estudio en células de mamíferos donde se pueda evaluar el efecto que tiene la activación endógena de AMPK en la regulación de proteínas de membrana a través de Nedd4.2 en comparación con los mutantes diseñados. Esto permitiría avanzar en la determinación del mecanismo molecular por el cual Nedd4.2 es regulada por AMPK.



CONCLUSIONES

1. AMPK fosforila la isoforma 2 de Nedd4.2 en los aminoácidos de serina 340, 342 y 384 *in vitro*.
2. La mutación en Nedd4.2 de los aminoácidos de serina 340, 342 y 384 reduce los niveles de fosforilación *in vitro* por AMPK con respecto al silvestre.
3. El fragmento que contiene los dominios WW de Nedd4.2 interacciona mediante doble híbrido con los dominios carboxi-terminales de las subunidades α , β y γ de ENaC. La sobre-expresión del mutante catalíticamente activo AMPK α 2 T172D mejora la interacción entre WW-Nedd4.2 y los dominios carboxi-terminales de las subunidades α y β de ENaC.
4. La activación de Snf1 mediante ayuno de glucosa mejora la interacción entre WW-Nedd4.2 y el dominio carboxi-terminal de la subunidad α ENaC de forma similar a AMPK α 2 T172D.
5. El mutante de WW-Nedd4.2 en la serina 342 a aspartato presenta mayores niveles de interacción con el dominio carboxi-terminal de la subunidad de α ENaC que el silvestre. Por el contrario, el mutante de WW-Nedd4.2 en la serina 342 a alanina presenta menores niveles de interacción con el dominio carboxi-terminal de la subunidad de α ENaC que el silvestre. Dicha interacción no aumenta cuando se activa Snf1 mediante ayuno de glucosa, sugiriendo que la fosforilación de WW-Nedd4.2 en la serina 342 por AMPK favorece la interacción de Nedd4-2 con α ENaC.
6. Nedd4.2 poliubiquitina a las subunidades α 2 y β 2 de AMPK tanto cuando están libres en la célula, como cuando forman parte de un complejo trimérico estable. Dicha poliubiquitinación se produce formando cadenas de ubiquitina en el aminoácido lisina 63.

7. Nedd4.1 poliubiquitina a las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ de AMPK tanto cuando están libres en la célula, como cuando forman parte de un complejo trimérico estable.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abriel,H., Loffing,J., Rebhun,J.F., Pratt,J.H., Schild,L., Horisberger,J.D., Rotin,D., and Staub,O. (1999). Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J. Clin. Invest* 103, 667-673.

Adams,J., Chen,Z.P., van Denderen,B.J., Morton,C.J., Parker,M.W., Witters,L.A., Stapleton,D., and Kemp,B.E. (2004). Intracellular control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein Sci.* 13, 155-165.

Al-Hakim,A.K., Zagorska,A., Chapman,L., Deak,M., Peggie,M., and Alessi,D.R. (2008). Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem. J.* 411, 249-260.

Alepuz,P.M., Cunningham,K.W., and Estruch,F. (1997). Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Mol. Microbiol.* 26, 91-98.

Alessi,D.R., Sakamoto,K., and Bayascas,J.R. (2006). LKB1-dependent signaling pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 137-163.

Alesutan,I., Munoz,C., Sopjani,M., Dermaku-Sopjani,M., Michael,D., Fraser,S., Kemp,B.E., Seeböhm,G., Foller,M., and Lang,F. (2011). Inhibition of Kir2.1 (KCNJ2) by the AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Almacá,J., Kongsuphol,P., Hieke,B., Ousingsawat,J., Viollet,B., Schreiber,R., Amaral,M.D., and Kunzelmann,K. (2009). AMPK controls epithelial Na⁽⁺⁾ channels through Nedd4-2 and causes an epithelial phenotype when mutated. *Pflugers Arch.* 458, 713-721.

Altheim,B.A. and Schultz,M.C. (1999). Histone modification governs the cell cycle regulation of a replication-independent chromatin assembly pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 1345-1350.

Alvarez,C.E. (2008). On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC. Evol. Biol.* 8, 222.

Alzamora,R., Gong,F., Rondanino,C., Lee,J.K., Smolak,C., Pastor-Soler,N.M., and Hallows,K.R. (2010). AMP-activated protein kinase inhibits KCNQ1

channels through regulation of the ubiquitin ligase Nedd4-2 in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 299, F1308-F1319.

Andersen, M.N., Krzystanek, K., Jespersen, T., Olesen, S.P., and Rasmussen, H.B. (2011). AMP-activated protein kinase down-regulates Kv7.1 cell surface expression. *Traffic*.

Andreelli, F., Foretz, M., Knauf, C., Cani, P.D., Perrin, C., Iglesias, M.A., Pillot, B., Bado, A., Tronche, F., Mithieux, G., Vaulont, S., Burcelin, R., and Viollet, B. (2006). Liver adenosine monophosphate-activated kinase- α 2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. *Endocrinology* 147, 2432-2441.

Asher, C., Sinha, I., and Garty, H. (2003). Characterization of the interactions between Nedd4-2, ENaC, and sgk-1 using surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta* 1612, 59-64.

Ashrafi, K., Lin, S.S., Manchester, J.K., and Gordon, J.I. (2000). Sip2p and its partner snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 14, 1872-1885.

Baboshina, O.V. and Haas, A.L. (1996). Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J. Biol. Chem.* 271, 2823-2831.

Bachhuber, T., Almaca, J., Aldehni, F., Mehta, A., Amaral, M.D., Schreiber, R., and Kunzelmann, K. (2008). Regulation of the epithelial Na⁺ channel by the protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* 283, 13225-13232.

Barnes, B.R., Ryder, J.W., Steiler, T.L., Fryer, L.G., Carling, D., and Zierath, J.R. (2002). Isoform-specific regulation of 5' AMP-activated protein kinase in skeletal muscle from obese Zucker (*fa/fa*) rats in response to contraction. *Diabetes* 51, 2703-2708.

Bateman, A. (1997). The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem. Sci.* 22, 12-13.

Beaudenon, S.L., Huacani, M.R., Wang, G., McDonnell, D.P., and Huijbrechtse, J.M. (1999). Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19, 6972-6979.

Beck,T., Schmidt,A., and Hall,M.N. (1999). Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell Biol.* **146**, 1227-1238.

Beg,Z.H., Allmann,D.W., and Gibson,D.M. (1973). Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 1362-1369.

Ben-Saadon,R., Zaaroor,D., Ziv,T., and Ciechanover,A. (2006). The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. *Mol. Cell* **24**, 701-711.

Beri,R.K., Marley,A.E., See,C.G., Sopwith,W.F., Aguan,K., Carling,D., Scott,J., and Carey,F. (1994). Molecular cloning, expression and chromosomal localisation of human AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett.* **356**, 117-121.

Bhalla,V., Oyster,N.M., Fitch,A.C., Wijngaarden,M.A., Neumann,D., Schlattner,U., Pearce,D., and Hallows,K.R. (2006). AMP-activated kinase inhibits the epithelial Na⁺ channel through functional regulation of the ubiquitin ligase Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* **281**, 26159-26169.

Bhoj,V.G. and Chen,Z.J. (2009). Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* **458**, 430-437.

Blondel,M.O., Morvan,J., Dupre,S., Urban-Grimal,D., Haguenaer-Tsapis,R., and Volland,C. (2004). Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. *Mol. Biol. Cell* **15**, 883-895.

Boase,N.A., Rychkov,G.Y., Townley,S.L., Dinudom,A., Candi,E., Voss,A.K., Tsoutsman,T., Semsarian,C., Melino,G., Koentgen,F., Cook,D.I., and Kumar,S. (2011). Respiratory distress and perinatal lethality in Nedd4-2-deficient mice. *Nat. Commun.* **2**, 287.

Boehmer,C., Laufer,J., Jeyaraj,S., Klaus,F., Lindner,R., Lang,F., and Palmada,M. (2008). Modulation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5 by the SGK1 protein kinase involves inhibition of channel ubiquitination. *Cell Physiol Biochem.* **22**, 591-600.

Boname,J.M., Thomas,M., Stagg,H.R., Xu,P., Peng,J., and Lehner,P.J. (2010). Efficient internalization of MHC I requires lysine-11 and lysine-63 mixed linkage polyubiquitin chains. *Traffic.* **11**, 210-220.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brooks, C.L. and Gu, W. (2004). Dynamics in the p53-Mdm2 ubiquitination pathway. *Cell Cycle* 3, 895-899.

Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D., and Rossier, B.C. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367, 463-467.

Canto, C. and Auwerx, J. (2010). AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol. Life Sci.* 67, 3407-3423.

Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056-1060.

Cao, X.R., Lill, N.L., Boase, N., Shi, P.P., Croucher, D.R., Shan, H., Qu, J., Sweezer, E.M., Place, T., Kirby, P.A., Daly, R.J., Kumar, S., and Yang, B. (2008). Nedd4 controls animal growth by regulating IGF-1 signaling. *Sci. Signal.* 1, ra5.

Carattino, M.D., Edinger, R.S., Grieser, H.J., Wise, R., Neumann, D., Schlattner, U., Johnson, J.P., Kleyman, T.R., and Hallows, K.R. (2005). Epithelial sodium channel inhibition by AMP-activated protein kinase in oocytes and polarized renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 17608-17616.

Carling, D. (2004a). AMPK. *Curr. Biol.* 14, R220.

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

Carling, D., Aguan, K., Woods, A., Verhoeven, A.J., Beri, R.K., Brennan, C.H., Sidebottom, C., Davison, M.D., and Scott, J. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J. Biol. Chem.* 269, 11442-11448.

Carlson, C.A. and Kim, K.H. (1973). Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 248, 378-380.

Carlson,M. (1999). Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 202-207.

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, 565-567.

Chau,V., Tobias,J.W., Bachmair,A., Marriott,D., Ecker,D.J., Gonda,D.K., and Varshavsky,A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583.

Chen,H., Ross,C.A., Wang,N., Huo,Y., MacKinnon,D.F., Potash,J.B., Simpson,S.G., McMahon,F.J., DePaulo Jr,J.R., and McInnis,M.G. (2001). NEDD4L on human chromosome 18q21 has multiple forms of transcripts and is a homologue of the mouse Nedd4-2 gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 922-930.

Chen,S.Y., Bhargava,A., Mastroberardino,L., Meijer,O.C., Wang,J., Buse,P., Firestone,G.L., Verrey,F., and Pearce,D. (1999). Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 2514-2519.

Chen,Z.J. and Sun,L.J. (2009). Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol. Cell* 33, 275-286.

Cheung,P.C., Salt,I.P., Davies,S.P., Hardie,D.G., and Carling,D. (2000). Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem. J.* 346 Pt 3, 659-669.

Choi,S.L., Kim,S.J., Lee,K.T., Kim,J., Mu,J., Birnbaum,M.J., Soo,K.S., and Ha,J. (2001). The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 92-97.

Ciehanover,A., Hod,Y., and Hershko,A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 1100-1105.

Clarke,P.R. and Hardie,D.G. (1990). Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J.* 9, 2439-2446.

Conibear,E. (2010). Converging views of endocytosis in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 513-518.

Cool,B., Zinker,B., Chiou,W., Kifle,L., Cao,N., Perham,M., Dickinson,R., Adler,A., Gagne,G., Iyengar,R., Zhao,G., Marsh,K., Kym,P., Jung,P., Camp,H.S., and Frevert,E. (2006). Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 3, 403-416.

Corton,J.M., Gillespie,J.G., Hawley,S.A., and Hardie,D.G. (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* 229, 558-565.

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, 35347-35354.

Curtis,R., O'Connor,G., and DiStefano,P.S. (2006). Aging networks in *Caenorhabditis elegans*: AMP-activated protein kinase (aak-2) links multiple aging and metabolism pathways. *Aging Cell* 5, 119-126.

da Silva,C.G., Jarzyna,R., Specht,A., and Kaczmarek,E. (2006). Extracellular nucleotides and adenosine independently activate AMP-activated protein kinase in endothelial cells: involvement of P2 receptors and adenosine transporters. *Circ. Res.* 98, e39-e47.

Dallas,M.L., Scragg,J.L., Wyatt,C.N., Ross,F., Hardie,D.G., Evans,A.M., and Peers,C. (2009). Modulation of O(2) sensitive K (+) channels by AMP-activated protein kinase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 648, 57-63.

Daniel,T. and Carling,D. (2002). Expression and regulation of the AMP-activated protein kinase-SNF1 (sucrose non-fermenting 1) kinase complexes in yeast and mammalian cells: studies using chimaeric catalytic subunits. *Biochem. J.* 365, 629-638.

Dasgupta,B. and Milbrandt,J. (2009). AMP-activated protein kinase phosphorylates retinoblastoma protein to control mammalian brain development. *Dev. Cell* 16, 256-270.

Davies,S.P., Carling,D., Munday,M.R., and Hardie,D.G. (1992). Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *Eur. J. Biochem.* 203, 615-623.

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, 421-425.

Debonneville,C., Flores,S.Y., Kamynina,E., Plant,P.J., Tauxe,C., Thomas,M.A., Munster,C., Chraïbi,A., Pratt,J.H., Horisberger,J.D., Pearce,D., Loffing,J., and Staub,O. (2001). Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J.* 20, 7052-7059.

Dokladda,K., Green,K.A., Pan,D.A., and Hardie,D.G. (2005). PD98059 and U0126 activate AMP-activated protein kinase by increasing the cellular AMP:ATP ratio and not via inhibition of the MAP kinase pathway. *FEBS Lett.* 579, 236-240.

Dunn,R. and Hicke,L. (2001). Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *J. Biol. Chem.* 276, 25974-25981.

Dunn,R., Klos,D.A., Adler,A.S., and Hicke,L. (2004). The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *J. Cell Biol.* 165, 135-144.

Dupre,S., Urban-Grimal,D., and Haguenaer-Tsapis,R. (2004). Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 89-111.

Dzamko,N., van Denderen,B.J., Hevener,A.L., Jorgensen,S.B., Honeyman,J., Galic,S., Chen,Z.P., Watt,M.J., Campbell,D.J., Steinberg,G.R., and Kemp,B.E. (2010). AMPK beta1 deletion reduces appetite, preventing obesity and hepatic insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 285, 115-122.

Edinger,R.S., Lebowitz,J., Li,H., Alzamora,R., Wang,H., Johnson,J.P., and Hallows,K.R. (2009). Functional regulation of the epithelial Na⁺ channel by IkappaB kinase-beta occurs via phosphorylation of the ubiquitin ligase Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 284, 150-157.

Ekberg,J., Schuetz,F., Boase,N.A., Conroy,S.J., Manning,J., Kumar,S., Poronnik,P., and Adams,D.J. (2007). Regulation of the voltage-gated K(+) channels KCNQ2/3 and KCNQ3/5 by ubiquitination. Novel role for Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 282, 12135-12142.

Embark,H.M., Bohmer,C., Palmada,M., Rajamanickam,J., Wyatt,A.W., Wallisch,S., Capasso,G., Waldegger,P., Seyberth,H.W., Waldegger,S., and Lang,F. (2004). Regulation of CLC-Ka/barttin by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum- and glucocorticoid-dependent kinases. *Kidney Int.* 66, 1918-1925.

Fediuc,S., Gaidhu,M.P., and Ceddia,R.B. (2006). Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells. *J. Lipid Res.* 47, 412-420.

Fields,S. and Song,O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

Fisk,H.A. and Yaffe,M.P. (1999). A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 145, 1199-1208.

Fitzsimmons,P.J., McWhirter,P.D., Peterson,D.W., and Kruyer,W.B. (2001). The natural history of Wolff-Parkinson-White syndrome in 228 military aviators: a long-term follow-up of 22 years. *Am. Heart J.* 142, 530-536.

Fotia,A.B., Dinudom,A., Shearwin,K.E., Koch,J.P., Korbmacher,C., Cook,D.I., and Kumar,S. (2003). The role of individual Nedd4-2 (KIAA0439) WW domains in binding and regulating epithelial sodium channels. *FASEB J.* 17, 70-72.

Fotia,A.B., Ekberg,J., Adams,D.J., Cook,D.I., Poronnik,P., and Kumar,S. (2004). Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 279, 28930-28935.

Fryer,L.G., Parbu-Patel,A., and Carling,D. (2002). The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 25226-25232.

Galan,J.M. and Haguenaer-Tsapis,R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.* 16, 5847-5854.

Galan,J.M., Moreau,V., Andre,B., Volland,C., and Haguenaer-Tsapis,R. (1996). Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* 271, 10946-10952.

Garcia-Haro,L., Garcia-Gimeno,M.A., Neumann,D., Beullens,M., Bollen,M., and Sanz,P. (2010). 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, 5080-5091.

Garty,H. and Benos,D.J. (1988). Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel. *Physiol Rev.* 68, 309-373.

Garty,H. and Palmer,L.G. (1997). Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev.* 77, 359-396.

Giasson,B.I. and Lee,V.M. (2003). Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 114, 1-8.

Gitan,R.S. and Eide,D.J. (2000). Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. *Biochem. J.* 346 Pt 2, 329-336.

Glickman,M.H. and Ciechanover,A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82, 373-428.

Gollob,M.H., Green,M.S., Tang,A.S., Gollob,T., Karibe,A., Ali Hassan,A.S., Ahmad,F., Lozado,R., Shah,G., Fananapazir,L., Bachinski,L.L., and Roberts,R. (2001). Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome. *N. Engl. J. Med.* 344, 1823-1831.

Goto,E., Yamanaka,Y., Ishikawa,A., Aoki-Kawasumi,M., Mito-Yoshida,M., Ohmura-Hoshino,M., Matsuki,Y., Kajikawa,M., Hirano,H., and Ishido,S. (2010). Contribution of lysine 11-linked ubiquitination to MIR2-mediated major histocompatibility complex class I internalization. *J. Biol. Chem.* 285, 35311-35319.

Haglund,K. and Dikic,I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.* 24, 3353-3359.

Halford,N.G. and Hardie,D.G. (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol. Biol.* 37, 735-748.

Hallows,K.R., McCane,J.E., Kemp,B.E., Witters,L.A., and Foskett,J.K. (2003). Regulation of channel gating by AMP-activated protein kinase modulates cystic

fibrosis transmembrane conductance regulator activity in lung submucosal cells. *J. Biol. Chem.* 278, 998-1004.

Hallows, K.R., Raghuram, V., Kemp, B.E., Witters, L.A., and Foskett, J.K. (2000). Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J. Clin. Invest* 105, 1711-1721.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

Hardie, D.G. (2011). Energy sensing by the AMP-activated protein kinase and its effects on muscle metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 70, 92-99.

Hardie, D.G. and Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* 246, 259-273.

Hardie, D.G., Carling, D., and Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67, 821-855.

Hardie, D.G. and Hawley, S.A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23, 1112-1119.

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

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, 113-120.

Hardy, T.A., Huang, D., and Roach, P.J. (1994). Interactions between cAMP-dependent and SNF1 protein kinases in the control of glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 27907-27913.

Harkness, T.A., Davies, G.F., Ramaswamy, V., and Arnason, T.G. (2002). The ubiquitin-dependent targeting pathway in *Saccharomyces cerevisiae* plays a critical role in multiple chromatin assembly regulatory steps. *Genetics* 162, 615-632.

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, 325-349.

Harvey,K.F., Dinudom,A., Cook,D.I., and Kumar,S. (2001). The Nedd4-like protein KIAA0439 is a potential regulator of the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 276, 8597-8601.

Harvey,K.F., Dinudom,A., Komwatana,P., Jolliffe,C.N., Day,M.L., Parasivam,G., Cook,D.I., and Kumar,S. (1999). All three WW domains of murine Nedd4 are involved in the regulation of epithelial sodium channels by intracellular Na⁺. *J. Biol. Chem.* 274, 12525-12530.

Harvey,K.F. and Kumar,S. (1999). Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends Cell Biol.* 9, 166-169.

Hatakeyama,R., Kamiya,M., Takahara,T., and Maeda,T. (2010). Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2. *Mol. Cell Biol.* 30, 5598-5607.

Hawley,S.A., Boudeau,J., Reid,J.L., Mustard,K.J., Udd,L., Makela,T.P., Alessi,D.R., and Hardie,D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* 2, 28.

Hawley,S.A., Davison,M., Woods,A., Davies,S.P., Beri,R.K., Carling,D., and Hardie,D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 27879-27887.

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.

He,Y., Hryciw,D.H., Carroll,M.L., Myers,S.A., Whitbread,A.K., Kumar,S., Poronnik,P., and Hooper,J.D. (2008). The ubiquitin-protein ligase Nedd4-2 differentially interacts with and regulates members of the Tweety family of chloride ion channels. *J. Biol. Chem.* 283, 24000-24010.

Hein,C. and Andre,B. (1997). A C-terminal di-leucine motif and nearby sequences are required for NH₄(+)-induced inactivation and degradation of the general amino acid permease, Gap1p, of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **24**, 607-616.

Henke,G., Maier,G., Wallisch,S., Boehmer,C., and Lang,F. (2004). Regulation of the voltage gated K⁺ channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *J. Cell Physiol* **199**, 194-199.

Henry,P.C., Kanelis,V., O'Brien,M.C., Kim,B., Gautschi,I., Forman-Kay,J., Schild,L., and Rotin,D. (2003). Affinity and specificity of interactions between Nedd4 isoforms and the epithelial Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **278**, 20019-20028.

Herrador,A., Herranz,S., Lara,D., and Vincent,O. (2010). Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol. Cell Biol.* **30**, 897-907.

Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479.

Hershko,A., Ciechanover,A., and Varshavsky,A. (2000). Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat. Med.* **6**, 1073-1081.

Hettema,E.H., Valdez-Taubas,J., and Pelham,H.R. (2004). Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J.* **23**, 1279-1288.

Hoeffler,W.K., Levinson,A.D., and Bauer,E.A. (1994). Activation of c-Jun transcription factor by substitution of a charged residue in its N-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1305-1312.

Hoegel,C., Pfander,B., Moldovan,G.L., Pyrowolakis,G., and Jentsch,S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141.

Hoeller,D. and Dikic,I. (2009). Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* **458**, 438-444.

Hong,S.P. and Carlson,M. (2007). Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.* **282**, 16838-16845.

Hoppe,T., Matuschewski,K., Rape,M., Schlenker,S., Ulrich,H.D., and Jentsch,S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102, 577-586.

Howitt,J., Putz,U., Lackovic,J., Doan,A., Dorstyn,L., Cheng,H., Yang,B., Chan-Ling,T., Silke,J., Kumar,S., and Tan,S.S. (2009). Divalent metal transporter 1 (DMT1) regulation by Ndfip1 prevents metal toxicity in human neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 15489-15494.

Hryciw,D.H., Ekberg,J., Lee,A., Lensink,I.L., Kumar,S., Guggino,W.B., Cook,D.I., Pollock,C.A., and Poronnik,P. (2004). Nedd4-2 functionally interacts with CIC-5: involvement in constitutive albumin endocytosis in proximal tubule cells. *J. Biol. Chem.* 279, 54996-55007.

Huang,W. and Erikson,R.L. (1994). Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 8960-8963.

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, 861-866.

Huibregtse,J.M., Scheffner,M., Beaudenon,S., and Howley,P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5249.

Hurley,R.L., Anderson,K.A., Franzone,J.M., Kemp,B.E., Means,A.R., and Witters,L.A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 29060-29066.

Hutchinson,D.S. and Bengtsson,T. (2006). AMP-activated protein kinase activation by adrenoceptors in L6 skeletal muscle cells: mediation by alpha1-adrenoceptors causing glucose uptake. *Diabetes* 55, 682-690.

Ichimura,T., Yamamura,H., Sasamoto,K., Tominaga,Y., Taoka,M., Kakiuchi,K., Shinkawa,T., Takahashi,N., Shimada,S., and Isobe,T. (2005). 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na⁺ channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 280, 13187-13194.

Ikeda,H. and Kerppola,T.K. (2008). Lysosomal localization of ubiquitinated Jun requires multiple determinants in a lysine-27-linked polyubiquitin conjugate. *Mol. Biol. Cell* 19, 4588-4601.

Ingham,R.J., Gish,G., and Pawson,T. (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23, 1972-1984.

Iseli,T.J., Walter,M., van Denderen,B.J., Katsis,F., Witters,L.A., Kemp,B.E., Michell,B.J., and Stapleton,D. (2005). AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *J. Biol. Chem.* 280, 13395-13400.

Itani,O.A., Campbell,J.R., Herrero,J., Snyder,P.M., and Thomas,C.P. (2003a). Alternate promoters and variable splicing lead to hNedd4-2 isoforms with a C2 domain and varying number of WW domains. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 285, F916-F929.

Itani,S.I., Saha,A.K., Kurowski,T.G., Coffin,H.R., Tornheim,K., and Ruderman,N.B. (2003b). Glucose autoregulates its uptake in skeletal muscle: involvement of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 52, 1635-1640.

Ito,H., Fukuda,Y., Murata,K., and Kimura,A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.

Jager,S., Handschin,C., St-Pierre,J., and Spiegelman,B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 12017-12022.

Jespersen,T., Grunnet,M., and Olesen,S.P. (2005). The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology. (Bethesda.)* 20, 408-416.

Jespersen,T., Membrez,M., Nicolas,C.S., Pitard,B., Staub,O., Olesen,S.P., Baro,I., and Abriel,H. (2007). The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family. *Cardiovasc. Res.* 74, 64-74.

Ji,H., Ramsey,M.R., Hayes,D.N., Fan,C., McNamara,K., Kozlowski,P., Torrice,C., Wu,M.C., Shimamura,T., Perera,S.A., Liang,M.C., Cai,D., Naumov,G.N., Bao,L., Contreras,C.M., Li,D., Chen,L., Krishnamurthy,J., Koivunen,J., Chirieac,L.R., Padera,R.F., Bronson,R.T., Lindeman,N.I., Christiani,D.C., Lin,X., Shapiro,G.I., Janne,P.A., Johnson,B.E., Meyerson,M., Kwiatkowski,D.J., Castrillon,D.H., Bardeesy,N., Sharpless,N.E., and Wong,K.K. (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* **448**, 807-810.

Jiang,R. and Carlson,M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* **10**, 3105-3115.

Jiang,R. and Carlson,M. (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2099-2106.

Kaiser,P. and Tagwerker,C. (2005). Is this protein ubiquitinated? *Methods Enzymol.* **399**, 243-248.

Kaliszewski,P., Szkopinska,A., Ferreira,T., Swiezewska,E., Berges,T., and Zoladek,T. (2008). Rsp5p ubiquitin ligase and the transcriptional activators Spt23p and Mga2p are involved in co-regulation of biosynthesis of end products of the mevalonate pathway and triacylglycerol in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 627-634.

Kamynina,E., Debonneville,C., Bens,M., Vandewalle,A., and Staub,O. (2001). A novel mouse Nedd4 protein suppresses the activity of the epithelial Na⁺ channel. *FASEB J.* **15**, 204-214.

Kanelis,V., Rotin,D., and Forman-Kay,J.D. (2001). Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 407-412.

Kasanov,J., Pirozzi,G., Uveges,A.J., and Kay,B.K. (2001). Characterizing Class I WW domains defines key specificity determinants and generates mutant domains with novel specificities. *Chem. Biol.* **8**, 231-241.

Kemp,B.E. (2004). Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *J. Clin. Invest* **113**, 182-184.

Kirisako,T., Kamei,K., Murata,S., Kato,M., Fukumoto,H., Kanie,M., Sano,S., Tokunaga,F., Tanaka,K., and Iwai,K. (2006). A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J.* 25, 4877-4887.

Kodiha,M., Rassi,J.G., Brown,C.M., and Stochaj,U. (2007). Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK-->ERK1/2 pathway. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 293, C1427-C1436.

Komander,D., Reyes-Turcu,F., Licchesi,J.D., Odenwaelder,P., Wilkinson,K.D., and Barford,D. (2009). Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep.* 10, 466-473.

Kongsuphol,P., Cassidy,D., Hieke,B., Treharne,K.J., Schreiber,R., Mehta,A., and Kunzelmann,K. (2009a). Mechanistic insight into control of CFTR by AMPK. *J. Biol. Chem.* 284, 5645-5653.

Kongsuphol,P., Hieke,B., Ousingsawat,J., Almaca,J., Viollet,B., Schreiber,R., and Kunzelmann,K. (2009b). Regulation of Cl(-) secretion by AMPK in vivo. *Pflugers Arch.* 457, 1071-1078.

Kuenzel,E.A., Mulligan,J.A., Sommercorn,J., and Krebs,E.G. (1987). Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 262, 9136-9140.

Kumar,S., Tomooka,Y., and Noda,M. (1992). Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 1155-1161.

Lafora,G.R. (1911). Über das Vorkommen amyloider Körperchen im Innern der Ganglienzellen. *Virchows Archiv* 205, 295-303.

Lee,I.H., Dinudom,A., Sanchez-Perez,A., Kumar,S., and Cook,D.I. (2007). Akt mediates the effect of insulin on epithelial sodium channels by inhibiting Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 282, 29866-29873.

Lee,W.J., Song,K.H., Koh,E.H., Won,J.C., Kim,H.S., Park,H.S., Kim,M.S., Kim,S.W., Lee,K.U., and Park,J.Y. (2005). Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 885-891.

Leech,A., Nath,N., McCartney,R.R., and Schmidt,M.C. (2003). Isolation of mutations in the catalytic domain of the snf1 kinase that render its activity independent of the snf4 subunit. *Eukaryot. Cell* 2, 265-273.

Lehmann-Horn,F. and Jurkat-Rott,K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev.* 79, 1317-1372.

Li,N., Guo,Y., Zhou,L., Wang,H., Yao,X., Luo,W., and Chang,J. (2010). Genetic variation and association analyses of NEDD4 gene in Kazak Chinese patients with hypertension. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 1, 226-235.

Li,W., Bengtson,M.H., Ulbrich,A., Matsuda,A., Reddy,V.A., Orth,A., Chanda,S.K., Batalov,S., and Joazeiro,C.A. (2008). Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS. One.* 3, e1487.

Liang,X., Butterworth,M.B., Peters,K.W., Walker,W.H., and Frizzell,R.A. (2008). An obligatory heterodimer of 14-3-3beta and 14-3-3epsilon is required for aldosterone regulation of the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 283, 27418-27425.

Liangpunsakul,S., Sozio,M.S., Shin,E., Zhao,Z., Xu,Y., Ross,R.A., Zeng,Y., and Crabb,D.W. (2010). Inhibitory effect of ethanol on AMPK phosphorylation is mediated in part through elevated ceramide levels. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 298, G1004-G1012.

Lin,C.H., MacGurn,J.A., Chu,T., Stefan,C.J., and Emr,S.D. (2008). Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135, 714-725.

Lin,S.S., Manchester,J.K., and Gordon,J.I. (2001). Enhanced gluconeogenesis and increased energy storage as hallmarks of aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 36000-36007.

Liu,Y., Oppenheim,R.W., Sugiura,Y., and Lin,W. (2009). Abnormal development of the neuromuscular junction in Nedd4-deficient mice. *Dev. Biol.* 330, 153-166.

Liu,Y., Wan,Q., Guan,Q., Gao,L., and Zhao,J. (2006). High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKa in rats' skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 701-707.

Lopez-Girona,A., Furnari,B., Mondesert,O., and Russell,P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 397, 172-175.

Mahlapuu,M., Johansson,C., Lindgren,K., Hjalml,G., Barnes,B.R., Krook,A., Zierath,J.R., Andersson,L., and Marklund,S. (2004). Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 286, E194-E200.

Malik,B., Yue,Q., Yue,G., Chen,X.J., Price,S.R., Mitch,W.E., and Eaton,D.C. (2005). Role of Nedd4-2 and polyubiquitination in epithelial sodium channel degradation in untransfected renal A6 cells expressing endogenous ENaC subunits. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 289, F107-F116.

Matalon,S. and O'Brodivich,H. (1999). Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. *Annu. Rev. Physiol* 61, 627-661.

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.

McCartney,R.R. and Schmidt,M.C. (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 36460-36466.

McGee,S.L., Howlett,K.F., Starkie,R.L., Cameron-Smith,D., Kemp,B.E., and Hargreaves,M. (2003). Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle. *Diabetes* 52, 926-928.

Medintz,I., Jiang,H., and Michels,C.A. (1998). The role of ubiquitin conjugation in glucose-induced proteolysis of *Saccharomyces* maltose permease. *J. Biol. Chem.* 273, 34454-34462.

Miller,J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY).

Minassian,B.A., Lee,J.R., Herbrick,J.A., Huizenga,J., Soder,S., Mungall,A.J., Dunham,I., Gardner,R., Fong,C.Y., Carpenter,S., Jardim,L., Satishchandra,P., Andermann,E., Snead,O.C., III, Lopes-Cendes,I., Tsui,L.C., Delgado-Escueta,A.V., Rouleau,G.A., and Scherer,S.W. (1998). Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.* 20, 171-174.

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, 339-343.

Mitchelhill,K.I., Michell,B.J., House,C.M., Stapleton,D., Dyck,J., Gamble,J., Ullrich,C., Witters,L.A., and Kemp,B.E. (1997). Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase beta1 subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 24475-24479.

Mitchelhill,K.I., Stapleton,D., Gao,G., House,C., Michell,B., Katsis,F., Witters,L.A., and Kemp,B.E. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 2361-2364.

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, 25336-25343.

Moreno,D., Towler,M.C., Hardie,D.G., Knecht,E., and Sanz,P. (2010). 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, 2578-2588.

Nabhan,J.F., Pan,H., and Lu,Q. (2010). Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor. *EMBO Rep.* 11, 605-611.

Naray-Fejes-Toth,A., Canessa,C., Cleaveland,E.S., Aldrich,G., and Fejes-Toth,G. (1999). *sgk* is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na^+ channels. *J. Biol. Chem.* 274, 16973-16978.

Nerbonne,J.M. and Kass,R.S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev.* 85, 1205-1253.

Neumann,S., Petfalski,E., Brugger,B., Grosshans,H., Wieland,F., Tollervey,D., and Hurt,E. (2003). Formation and nuclear export of tRNA, rRNA and mRNA is regulated by the ubiquitin ligase Rsp5p. *EMBO Rep.* 4, 1156-1162.

Nikko,E. and Pelham,H.R. (2009). Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic.* 10, 1856-1867.

Nikko,E., Sullivan,J.A., and Pelham,H.R. (2008). Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* 9, 1216-1221.

O'Donnell,A.F., Apffel,A., Gardner,R.G., and Cyert,M.S. (2010). Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol. Biol. Cell* 21, 3552-3566.

Obrdlik,P., El-Bakkoury,M., Hamacher,T., Cappellaro,C., Vilarino,C., Fleischer,C., Ellerbrok,H., Kamuzinzi,R., Ledent,V., Blaudez,D., Sanders,D., Revuelta,J.L., Boles,E., Andre,B., and Frommer,W.B. (2004). K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 12242-12247.

Palmada,M., Dieter,M., Boehmer,C., Waldegger,S., and Lang,F. (2004). Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate ClC-2 channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 1001-1006.

Palmer,L.G. (1987). Ion selectivity of epithelial Na channels. *J. Membr. Biol.* 96, 97-106.

Peng,J., Schwartz,D., Elias,J.E., Thoreen,C.C., Cheng,D., Marsischky,G., Roelofs,J., Finley,D., and Gygi,S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* 21, 921-926.

Peroz,D., Rodriguez,N., Choveau,F., Baro,I., Merot,J., and Loussouarn,G. (2008). Kv7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies. *J. Physiol* 586, 1785-1789.

Persaud,A., Alberts,P., Amsen,E.M., Xiong,X., Wasmuth,J., Saadon,Z., Fladd,C., Parkinson,J., and Rotin,D. (2009). Comparison of substrate specificity of the ubiquitin ligases Nedd4 and Nedd4-2 using proteome arrays. *Mol. Syst. Biol.* 5, 333.

Pickart,C.M. and Fushman,D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 610-616.

Pizzirusso,M. and Chang,A. (2004). Ubiquitin-mediated targeting of a mutant plasma membrane ATPase, Pma1-7, to the endosomal/vacuolar system in yeast. *Mol. Biol. Cell* 15, 2401-2409.

Platara,M., Ruiz,A., Serrano,R., Palomino,A., Moreno,F., and Arino,J. (2006). The transcriptional response of the yeast Na(+)-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 36632-36642.

Polekhina,G., Gupta,A., Michell,B.J., van,D.B., Murthy,S., Feil,S.C., Jennings,I.G., Campbell,D.J., Witters,L.A., Parker,M.W., Kemp,B.E., and Stapleton,D. (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr. Biol.* 13, 867-871.

Portillo,F., Mulet,J.M., and Serrano,R. (2005). A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. *FEBS Lett.* 579, 512-516.

Qiang,W., Weiqiang,K., Qing,Z., Pengju,Z., and Yi,L. (2007). Aging impairs insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle via suppressing AMPKalpha. *Exp. Mol. Med.* 39, 535-543.

Raiborg,C. and Stenmark,H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445-452.

Ravnskjaer,K., Boergesen,M., Dalgaard,L.T., and Mandrup,S. (2006). Glucose-induced repression of PPARalpha gene expression in pancreatic beta-cells involves PP2A activation and AMPK inactivation. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 289-299.

Reznick,R.M., Zong,H., Li,J., Morino,K., Moore,I.K., Yu,H.J., Liu,Z.X., Dong,J., Mustard,K.J., Hawley,S.A., Befroy,D., Pypaert,M., Hardie,D.G., Young,L.H., and Shulman,G.I. (2007). Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab* 5, 151-156.

Rodriguez,M.S., Gwizdek,C., Haguenaer-Tsapis,R., and Dargemont,C. (2003). The HECT ubiquitin ligase Rsp5p is required for proper nuclear export of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic.* 4, 566-575.

Rougier,J.S., van Bemmelen,M.X., Bruce,M.C., Jespersen,T., Gavillet,B., Apotheloz,F., Cordonier,S., Staub,O., Rotin,D., and Abriel,H. (2005). Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 288, C692-C701.

Rudolph,M.J., Amodeo,G.A., Iram,S.H., Hong,S.P., Pirino,G., Carlson,M., and Tong,L. (2007). Structure of the Bateman2 domain of yeast Snf4: dimeric association and relevance for AMP binding. *Structure*. 15, 65-74.

Sakai,M., Austin,J., Witmer,F., and Trueb,L. (1970). Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). II. Polyglucosans in the systemic deposits of myoclonus epilepsy and in corpora amylacea. *Neurology* 20, 160-176.

Salt,I., Celler,J.W., Hawley,S.A., Prescott,A., Woods,A., Carling,D., and Hardie,D.G. (1998). AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem. J.* 334 (Pt 1), 177-187.

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, 139-148.

Sanz,P. (2008). AMP-activated protein kinase: structure and regulation. *Curr. Protein Pept. Sci.* 9, 478-492.

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, 1321-1328.

Schuetz,F., Kumar,S., Poronnik,P., and Adams,D.J. (2008). Regulation of the voltage-gated K(+) channels KCNQ2/3 and KCNQ3/5 by serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 295, C73-C80.

Schulz,E., Anter,E., Zou,M.H., and Keaney,J.F., Jr. (2005). Estradiol-mediated endothelial nitric oxide synthase association with heat shock protein 90 requires adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation* 111, 3473-3480.

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, 274-284.

Scott, J.W., van Denderen, B.J., Jorgensen, S.B., Honeyman, J.E., Steinberg, G.R., Oakhill, J.S., Iseli, T.J., Koay, A., Gooley, P.R., Stapleton, D., and Kemp, B.E. (2008). Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes. *Chem. Biol.* 15, 1220-1230.

Serrano, R., Gancedo, J.M., and Gancedo, C. (1973). Assay of yeast enzymes in situ. A potential tool in regulation studies. *Eur. J. Biochem.* 34, 479-482.

Serratos, J.M., Gomez-Garre, P., Gallardo, M.E., Anta, B., de Bernabe, D.B., Lindhout, D., Augustijn, P.B., Tassinari, C.A., Malafosse, R.M., Topcu, M., Grid, D., Dravet, C., Berkovic, S.F., and de Cordoba, S.R. (1999). A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum. Mol. Genet.* 8, 345-352.

Shcherbik, N., Kee, Y., Lyon, N., Huibregtse, J.M., and Haines, D.S. (2004). A single PXY motif located within the carboxyl terminus of Spt23p and Mga2p mediates a physical and functional interaction with ubiquitin ligase Rsp5p. *J. Biol. Chem.* 279, 53892-53898.

Shcherbik, N., Zoladek, T., Nickels, J.T., and Haines, D.S. (2003). Rsp5p is required for ER bound Mga2p120 polyubiquitination and release of the processed/tethered transactivator Mga2p90. *Curr. Biol.* 13, 1227-1233.

Shearwin-Whyatt, L., Dalton, H.E., Foot, N., and Kumar, S. (2006). Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins. *Bioessays* 28, 617-628.

Shi, P.P., Cao, X.R., Sweezer, E.M., Kinney, T.S., Williams, N.R., Husted, R.F., Nair, R., Weiss, R.M., Williamson, R.A., Sigmund, C.D., Snyder, P.M., Staub, O., Stokes, J.B., and Yang, B. (2008). Salt-sensitive hypertension and cardiac hypertrophy in mice deficient in the ubiquitin ligase Nedd4-2. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 295, F462-F470.

Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D.R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N., and Walsh, K. (2005). Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through. *Nat. Med.* 11, 1096-1103.

Shimkets, R.A., Warnock, D.G., Bositis, C.M., Nelson-Williams, C., Hansson, J.H., Schambelan, M., Gill, J.R., Jr., Ulick, S., Milora, R.V., Findling, J.W., and . (1994). Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79, 407-414.

Snyder,P.M. (2005). Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endocrinology* 146, 5079-5085.

Snyder,P.M., Olson,D.R., Kabra,R., Zhou,R., and Steines,J.C. (2004). cAMP and serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulate the epithelial Na⁺ channel through convergent phosphorylation of Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 279, 45753-45758.

Snyder,P.M., Olson,D.R., and Thomas,B.C. (2002). Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 277, 5-8.

Soetens,O., De Craene,J.O., and Andre,B. (2001). Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J. Biol. Chem.* 276, 43949-43957.

Solaz-Fuster,M.C., Gimeno-Alcaniz,J.V., Ros,S., Fernandez-Sanchez,M.E., Garcia-Fojeda,B., Criado,G.O., Vilchez,D., Dominguez,J., Garcia-Rocha,M., Sanchez-Piris,M., Aguado,C., Knecht,E., Serratosa,J., Guinovart,J.J., Sanz,P., and Rodriguez de,C.S. (2008). Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum. Mol. Genet.* 17, 667-678.

Song,W. and Carlson,M. (1998). Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. *EMBO J.* 17, 5757-5765.

Springael,J.Y., Galan,J.M., Haguenaer-Tsapis,R., and Andre,B. (1999). NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 9), 1375-1383.

Stapleton,D., Mitchelhill,K.I., Gao,G., Widmer,J., Michell,B.J., Teh,T., House,C.M., Fernandez,C.S., Cox,T., Witters,L.A., and Kemp,B.E. (1996). Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J. Biol. Chem.* 271, 611-614.

Staub,O., Dho,S., Henry,P., Correa,J., Ishikawa,T., McGlade,J., and Rotin,D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.* 15, 2371-2380.

Staub,O., Gautschi,I., Ishikawa,T., Breitschopf,K., Ciechanover,A., Schild,L., and Rotin,D. (1997a). Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J.* 16, 6325-6336.

Staub,O. and Rotin,D. (2006). Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev.* 86, 669-707.

Staub,O., Yeger,H., Plant,P.J., Kim,H., Ernst,S.A., and Rotin,D. (1997b). Immunolocalization of the ubiquitin-protein ligase Nedd4 in tissues expressing the epithelial Na⁺ channel (ENaC). *Am. J. Physiol* 272, C1871-C1880.

Stein,S.C., Woods,A., Jones,N.A., Davison,M.D., and Carling,D. (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.* 345 Pt 3, 437-443.

Stukey,J.E., McDonough,V.M., and Martin,C.E. (1990). The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.* 265, 20144-20149.

Sugden,C., Crawford,R.M., Halford,N.G., and Hardie,D.G. (1999). Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J.* 19, 433-439.

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, 32207-32216.

Suzuki,C., Murakami,G., Fukuchi,M., Shimanuki,T., Shikauchi,Y., Imamura,T., and Miyazono,K. (2002). Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 277, 39919-39925.

Thompson-Jaeger,S., Francois,J., Gaughran,J.P., and Tatchell,K. (1991). Deletion of SNF1 affects the nutrient response of yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. *Genetics* 129, 697-706.

Thomson,D.M. and Gordon,S.E. (2005). Diminished overload-induced hypertrophy in aged fast-twitch skeletal muscle is associated with AMPK hyperphosphorylation. *J. Appl. Physiol* 98, 557-564.

Thomson,D.M. and Gordon,S.E. (2006). Impaired overload-induced muscle growth is associated with diminished translational signalling in aged rat fast-twitch skeletal muscle. *J. Physiol* 574, 291-305.

Thornton,C., Snowden,M.A., and Carling,D. (1998). Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 273, 12443-12450.

Thrower,J.S., Hoffman,L., Rechsteiner,M., and Pickart,C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19, 94-102.

Tokunaga,F., Sakata,S., Saeki,Y., Satomi,Y., Kirisako,T., Kamei,K., Nakagawa,T., Kato,M., Murata,S., Yamaoka,S., Yamamoto,M., Akira,S., Takao,T., Tanaka,K., and Iwai,K. (2009). Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat. Cell Biol.* 11, 123-132.

Towler,M.C. and Hardie,D.G. (2007). AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* 100, 328-341.

Turnley,A.M., Stapleton,D., Mann,R.J., Witters,L.A., Kemp,B.E., and Bartlett,P.F. (1999). Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J. Neurochem.* 72, 1707-1716.

Um,J.H., Pendergast,J.S., Springer,D.A., Foretz,M., Viollet,B., Brown,A., Kim,M.K., Yamazaki,S., and Chung,J.H. (2011). AMPK regulates circadian rhythms in a tissue- and isoform-specific manner. *PLoS. One.* 6, e18450.

van Bemmelen,M.X., Rougier,J.S., Gavillet,B., Apotheloz,F., Daidie,D., Tateyama,M., Rivolta,I., Thomas,M.A., Kass,R.S., Staub,O., and Abriel,H. (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ. Res.* 95, 284-291.

Vernia,S., Solaz-Fuster,M.C., Gimeno-Alcaniz,J.V., Rubio,T., Garcia-Haro,L., Foretz,M., de Cordoba,S.R., and Sanz,P. (2009). 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, 8247-8255.

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**, 16117-16125.

Viollet,B., Andreelli,F., Jorgensen,S.B., Perrin,C., Geloën,A., Flamez,D., Mu,J., Lenzner,C., Baud,O., Bennoun,M., Gomas,E., Nicolas,G., Wojtaszewski,J.F., Kahn,A., Carling,D., Schuit,F.C., Birnbaum,M.J., Richter,E.A., Burcelin,R., and Vaulont,S. (2003). The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J. Clin. Invest* **111**, 91-98.

Wang,C., Deng,L., Hong,M., Akkaraju,G.R., Inoue,J., and Chen,Z.J. (2001a). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-351.

Wang,G., Yang,J., and Huibregtse,J.M. (1999). Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell Biol.* **19**, 342-352.

Wang,M.Y. and Unger,R.H. (2005). Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **288**, E216-E221.

Wang,T., Yu,Q., Chen,J., Deng,B., Qian,L., and Le,Y. (2010). PP2A mediated AMPK inhibition promotes HSP70 expression in heat shock response. *PLoS. One.* **5**.

Wang,Z., Wilson,W.A., Fujino,M.A., and Roach,P.J. (2001b). Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Mol. Cell Biol.* **21**, 5742-5752.

Warden,S.M., Richardson,C., O'Donnell,J., Jr., Stapleton,D., Kemp,B.E., and Witters,L.A. (2001). Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem. J.* **354**, 275-283.

Welsh,M.J. and Smith,A.E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* **73**, 1251-1254.

West,R.W., Jr., Yocum,R.R., and Ptashne,M. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. *Mol. Cell Biol.* **4**, 2467-2478.

Wiatrowski,H.A., van Denderen,B.J., Berkey,C.D., Kemp,B.E., Stapleton,D., and Carlson,M. (2004). Mutations in the gal83 glycogen-binding domain activate

the snf1/gal83 kinase pathway by a glycogen-independent mechanism. *Mol. Cell Biol.* 24, 352-361.

Wilson,W.A., Hawley,S.A., and Hardie,D.G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol.* 6, 1426-1434.

Winston,F., Dollard,C., and Ricupero-Hovasse,S.L. (1995). Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11, 53-55.

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, 3737-3755.

Woods,A., Cheung,P.C., Smith,F.C., Davison,M.D., Scott,J., Beri,R.K., and Carling,D. (1996). Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro. *J. Biol. Chem.* 271, 10282-10290.

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, 2004-2008.

Woods,A., Munday,M.R., Scott,J., Yang,X., Carlson,M., and Carling,D. (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J. Biol. Chem.* 269, 19509-19515.

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, 28434-28442.

Woolhead,A.M., Scott,J.W., Hardie,D.G., and Baines,D.L. (2005). Phenformin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) activation of AMP-activated protein kinase inhibits transepithelial Na⁺ transport across H441 lung cells. *J. Physiol* 566, 781-792.

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, 9777-9788.

Xing,Y., Musi,N., Fujii,N., Zou,L., Luptak,I., Hirshman,M.F., Goodyear,L.J., and Tian,R. (2003). Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 28372-28377.

Xu,P., Duong,D.M., Seyfried,N.T., Cheng,D., Xie,Y., Robert,J., Rush,J., Hochstrasser,M., Finley,D., and Peng,J. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137, 133-145.

Yamauchi,T., Kamon,J., Minokoshi,Y., Ito,Y., Waki,H., Uchida,S., Yamashita,S., Noda,M., Kita,S., Ueki,K., Eto,K., Akanuma,Y., Froguel,P., Foufelle,F., Ferre,P., Carling,D., Kimura,S., Nagai,R., Kahn,B.B., and Kadowaki,T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8, 1288-1295.

Yang,B. and Kumar,S. (2010). Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death. Differ.* 17, 68-77.

Yang,X., Hubbard,E.J., and Carlson,M. (1992). A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* 257, 680-682.

Yang,X., Jiang,R., and Carlson,M. (1994). A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J.* 13, 5878-5886.

Ye,T., Garcia-Salcedo,R., Ramos,J., and Hohmann,S. (2006). Gis4, a new component of the ion homeostasis system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 5, 1611-1621.

Yeh,L.A., Lee,K.H., and Kim,K.H. (1980). Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge. *J. Biol. Chem.* 255, 2308-2314.

Young,E.T., Dombek,K.M., Tachibana,C., and Ideker,T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J. Biol. Chem.* 278, 26146-26158.

Zhang,S., Skalsky,Y., and Garfinkel,D.J. (1999). MGA2 or SPT23 is required for transcription of the delta9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151, 473-483.

Zhang,W., Na,T., Wu,G., Jing,H., and Peng,J.B. (2010). Down-regulation of intestinal apical calcium entry channel TRPV6 by ubiquitin E3 ligase Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 285, 36586-36596.

Zheng,X., Morrison,A.C., Feingold,E., Turner,S.T., and Ferrell,R.E. (2011). Association between NEDD4L gene and sodium lithium countertransport. *Am. J. Hypertens.* 24, 145-148.

Zhou,R., Patel,S.V., and Snyder,P.M. (2007). Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC. *J. Biol. Chem.* 282, 20207-20212.

Zou,M.H., Hou,X.Y., Shi,C.M., Nagata,D., Walsh,K., and Cohen,R.A. (2002). Modulation by peroxynitrite of Akt- and AMP-activated kinase-dependent Ser1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 277, 32552-32557.

Zou,M.H., Kirkpatrick,S.S., Davis,B.J., Nelson,J.S., Wiles,W.G., Schlattner,U., Neumann,D., Brownlee,M., Freeman,M.B., and Goldman,M.H. (2004). Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* 279, 43940-43951.

A yellow speech bubble with a tail pointing towards the bottom right, containing the text "ANEXO I".

ANEXO I

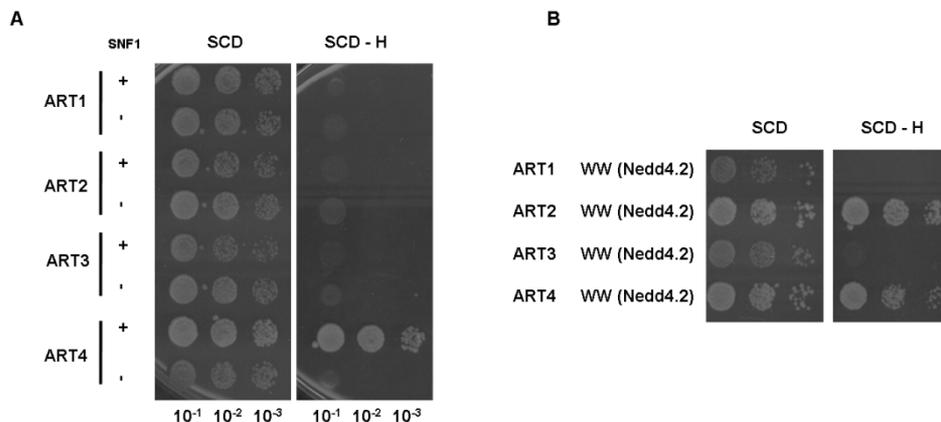


Figura anexa I. Ensayo de doble híbrido en levadura de la interacción entre Snf1 o WW-Nedd4.2 en combinación con ART1, 2, 3 y 4. (A) Análisis de crecimiento en medio sólido. La cepa THY.AP-4 transformada con los plásmidos pBTM116 y pBTM116-SNF1 (LexA) en combinación con pACTII-ART1, pACTII-ART2, pACTII-ART3 o pACTII-ART4 se creció hasta saturación en medio mínimo completo (SCD), se hicieron diluciones seriadas y se depositó una alícuota de estas diluciones en placas con y sin histidina. (B) Análisis de crecimiento en medio sólido. La cepa THY.AP-4 transformada con los plásmidos pBTM116-WW-Nedd4.2 (LexA) en combinación con pACTII-ART1, pACTII-ART2, pACTII-ART3 y pACTII-ART4 se creció hasta saturación en medio mínimo completo (SCD), se hicieron diluciones seriadas y se depositó una alícuota de estas diluciones en placas con y sin histidina.