

Curso 2012/13
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/37
I.S.B.N.: 978-84-15939-09-2

REBECA GONZÁLEZ FERNÁNDEZ

**Identificación de genes
regulados por SGK1.1**

Directores

**PABLO MARTÍN VASALLO
JULIO T. ÁVILA MARRERO**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Agradecimientos

A los Doctores Pablo Martín Vasallo y Julio Ávila Marero, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio. Al Dr. Pablo Martín Vasallo, por su dedicación y su inestimable ayuda en la interpretación de los resultados. Por su contante apoyo, sus acertados consejos y por estar siempre dispuesto a compartir sus conocimientos sobre ciencia y muchas otras cosas. Al Dr. Julio Ávila Marrero por su paciencia y dedicación a la hora de responder mis preguntas y solucionar mis dudas. Por sus ideas y consejos y porque su gran capacidad didáctica siempre consigue que todo parezca claro y sencillo.

A la Dra Cecilia Canessa por recibirme en su laboratorio y a la Dra María Francisca Arteaga Paz por dedicarme su tiempo. A ambas les debo que mi estancia en Yale fuera tan agradable como productiva.

A todos los profesores del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la ULL, especialmente a los Drs Celedonio González y Nélida Brito por permitirme el acceso a cuanto pudiera necesitar en su laboratorio

A todos mis compañeros de departamento, especialmente a Marcos y Mario por compartir sus ideas, los buenos y malos momentos y tantas visitas a los guachinches de la isla.

A todos los que forman o han formado parte del LBD: Mari Valle, Eugenia, Haridian, Elisa, Óscar, Deborah...Por su ayuda, su apoyo, sus consejos, su amistad y sobre todo por su gran contribución a hacerme disfrutar de la realización de esta tesis.

A mis padres y a toda mi familia, a Juan y a mis amigos por su apoyo y eterna comprensión. Por aguantar tantas conversaciones sobre PCRs y westerns sin entender nada, sólo para que pudiera desahogarme. Especialmente a Juan y a mi hermana Débora por recordarme que no todo es ciencia y a mi madre, por su constante ánimo y por tener la paciencia de leer esta tesis.

El anticuerpo anti-radixina utilizado en este trabajo nos fue cedido por los Drs Woodward y Crouch, Dundee University.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos FIS números PS09/00128, PI11/00141 y PI12/00729.

Durante la realización de esta tesis doctoral la autora ha sido financiada por becas de la Fundación Serono 2000 (2007-2009) y Merck/Serono (2010-2012). La estancia predoctoral en el laboratorio de la Dra C. Canessa, Yale University, por una Beca Internacional Bancaja, 2007.

Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro

René Descartes (1596- 1650)

Abreviaturas

A: SGK1.1S515D, constitutivamente activo.

aa: aminoácidos.

A-FF: SGK1.1FFS515D, constitutivamente activo que se expresa predominantemente en el núcleo.

ASIC: acid-sensing (proton-gated) ion channel 1.

BSA: albúmina de suero bobino.

°C: grados centígrados

cDNA: DNA complementario

cDNA_{dc}: DNA complementario de doble cadena

CHIP: C terminus of HSC70-Interacting Protein. E3 ubiquitina proteína ligasa

cm: centímetros

cm²: centímetros cuadrados

D.O.₆₀₀: densidad óptica a 600 nanómetros.

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

dUTP: desoxiuridina trifosfato.

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetracético

F: oligonucleótido sentido

g: aceleración de la gravedad (9.81 m/s²).

GSK3: glucógeno sintetasa kinasa 3

HeLa: Henriette Lacks. Línea celular de carcinoma cervical humano.

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactósido

iRNA: RNA interferente

Kb: kilobase

KDa: KiloDalton

LD-PCR: PCR de larga distancia

M: Molar

Medio LB: medio Luria Broth.

mg/mL: miligramos por mililitro

min: minutos

mm: milímetros

mM: milimolar

mRNA: RNA mensajero

N: normal

NA: SGK1.1K127A, constitutivamente no activo.

NA-FF: SGK1.1K127A, constitutivamente activo que se expresa predominantemente en el núcleo.

Nedd4-2: neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2.

ng/μL: nanogramo por microlitro

ng: nanogramo

NT: células no transfectadas

Pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDK1: 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1.

qRT-PCR: PCR a tiempo real semicuantitativa

R: oligonucleótido antisentido

Rictor: rapamycin-insensitive companion of mTOR.

RNA: ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

SDS: dodecil sulfato sódico

siRNA: ácido ribonucleico interferente pequeño

Tris: tris-hidroximetil amino metano

U/ μ L: unidades por microlitro

U: unidades

ug/mL: microgramos por mililitro

μ L: microlitro

μ M: micromolar

UV: ultravioleta

V: voltios

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

Introducción

1. SGK: descripción general, familia e isoformas	3
2. SGK: regulación de la expresión	6
2.1 Regulación transcripcional	6
2.2 Regulación por localización subcelular	9
2.3 Activación enzimática	10
2.4 Regulación por degradación	12
3. SGK: función	13
3.1 Regulación de canales y transportadores	14
Canal epitelial de sodio (ENaC)	14
Canal de potasio de la medula renal externa	15
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	17
Intercambiador Na ⁺ /H ⁺	17
Canal de K ⁺ inducido por voltaje	18
3.2 Papel de SGK en supervivencia y apoptosis	18
A través de FKHRL1	19
A través de AngII	19
A través de p53	20
A través de β-catenina	21
A través de NF-κB	22
3.3 Papel de SGK en el sistema nervioso	23
En aprendizaje, memoria y plasticidad neuronal	23
En enfermedades neuronales	25
En excitabilidad	26
4. Isoforma específica de cerebro: SGK1.1	26

Objetivo 33

Material y métodos

1. Generación de las construcciones	37
1.1 Mutación puntual	37
1.2 Purificación de los plásmidos	38
1.3 Secuenciación	38
2. Cultivo de líneas celulares	38

3. Trasfección	39
4. Extracción de RNA	40
5. Síntesis de cDNA	40
6. Amplificación del cDNA	42
7. Sustracción génica	42
7.1 Ligación de adaptadores	43
7.2 Primera hibridación	44
7.3 Segunda hibridación	44
7.4 PCR anidada	44
8. Muestreo	45
8.1 Clonaje en el vector pBSK+	45
8.2 Preparación de las sondas	46
8.3 Dot-blot	47
Paso a placa multipocillo	47
Preparación de la membrana	47
Desnaturalización	47
Hibridación con sondas	47
Detección de la sonda	48
Selección de clones positivos	48
8.4 Dot-blot para DNA	49
PCR de colonia	49
Preparación de membranas	49
Hibridación con sondas	49
Detección de la sonda	49
Extracción de plásmidos	50
8.4 Análisis de las secuencias obtenidas	50
9. PCR a tiempo real semi-cuantitativa (qRT-PCR)	50
10. Análisis de la longitud del mRNA de Brox humano	52
11. Generación del anticuerpo anti-Brox (AbBrox)	53
11.1 Construcción del plásmido	53
11.2 Expresión de proteínas en <i>E. Coli</i>	54
11.3 Purificación de proteínas recombinantes	54
11.4 Inducción de anticuerpos en conejos	55
11.5 Purificación del anticuerpo anti-Brox (sp-AbBrox)	55
Eliminación de anticuerpos contaminantes anti-Histidinas	55
Purificación de anticuerpos específicos	56

Concentración de anticuerpos	56
12. Western blot	57
12.1 Preparación de la muestra	57
12.2 Electroforesis en poliacrilamida-SDS	57
12.3 Transferencia	58
12.4 Detección	58
12.5 Normalización de los datos	59
12.6 Reciclaje de membranas	59
13. Inmunocitoquímica con fluorescencia	60
13.1 Microscopio de fluorescencia y análisis de imágenes	60
14. Inmunoprecipitación	61
14.1 Lisis de células	61
14.2 Recubrimiento de partículas magnéticas	61
14.3 Inmunoprecipitación	62
14.4 Identificación de las proteínas purificadas	63
15. Análisis estadístico	63

Resultados

1. Expresión de SGK1.1 activo y no activo	67
1.1 Validación de las construcciones	67
1.2 Validación de la transfección	67
Expresión por RT-PCR	68
Comprobación por western blot	69
2. Construcción de la genoteca	69
3. Muestreo	70
3.1 Dot-blot de colonia	70
3.2 Dotblot de DNA	72
3.3 Resultados de la secuenciación	73
4. Cuantificación como mRNA de la expresión de los genes encontrados	76
4.1 Análisis estadístico	76
Diferencia de medias	76
5. Cuantificación de la expresión como proteína de los genes regulados por SGK1.1	82
5.1 Análisis estadístico	82
Diferencia de medias	82

6. Inmunolocalización de las proteínas en las células transfectadas	84
6.1 Inmunofluorescencia de BAG-4	85
6.2 Inmunofluorescencia de PPP1CB	85
7. Caracterización de Brox	90
7.1 Estructura del gen Brox humano	90
7.2 Expresión de Brox en tejidos de rata	92
7.3 Anticuerpo anti-Brox(AbBrox)	93
7.4 Expresión de la proteína Brox en tejidos de rata	97
7.5 Inmunolocalización por fluorescencia de Brox	101
7.6 Inmunoprecipitación de Brox	104

Discusión

1. Del material utilizado	109
1.1 Del uso de células HeLa y las construcciones empleadas en su transfección	109
1.2 Del anticuerpo anti-Brox	109
2. De las técnicas utilizadas	110
2.1 De la transfección	110
2.2 De la sustracción	110
3. De los resultados	111
3.1 De los genes obtenidos en la sustracción	111
3.2 De las qRT-PCR en células transfectadas	113
3.3 De los WB en células transfectadas	115
3.4 De la inmunofluorescencia de células transfectadas	116
Inmunofluorescencia de BAG-4	117
Inmunofluorescencia de PPP1CB	117
3.5 Del gen y la proteína Brox humana	119
mRNA de Brox humano	119
Expresión de Brox en tejidos de rata	119
Inmunolocalización de Brox	120
Inmunoprecipitación de Brox	121
4. De los resultados tomados en su conjunto	121

Conclusiones	137
---------------------	-----

Bibliografía	141
---------------------	-----

Introducción

1. SGK: descripción general, familia e isoformas.

La kinasa dependiente de suero y glucocorticoides SGK, es una serin/threonin kinasa identificada en 1993 como un gen cuyo nivel de mRNA aumentaba drásticamente a los 30 minutos de exponer a las células a suero, glucocorticoides o a ambos a la vez [139]. SGK pertenece a la familia de las AGC protein kinasas que incluye otras como la protein kinasa A (PKA), la protein kinasa G (PKG), la protein kinasa C (PKC), o la protein kinasa B (PKB/Akt (murine thymoma viral oncogene homolog)) [110]. El dominio catalítico de SGK comparte un 45-55% de homología con el dominio catalítico de otras kinasas de la misma familia [139]. El gen de SGK codifica una proteína de aproximadamente 50kDa que se encuentra altamente conservada en eucariotas, desde levaduras hasta humanos. En *C. elegans* SGK forma parte de un complejo PKB que controla la resistencia al estrés. En levadura existen dos ortólogos, Ypk1 y Ypk2, cuyo dominio catalítico comparte un 55% de homología con el de SGK. La inactivación de estos dos genes es letal para la levadura pero puede ser revertida por la expresión de SGK1 de mamíferos [81]. Las proteínas de esta familia, incluida SGK, están relacionadas con la propagación de cascadas de señalización asociadas con el control del crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de la célula [65,66,128].

Existen tres isoformas de SGK (SGK1, SGK2 y SGK3) [62]. SGK1.1 es una isoforma de SGK1 que solamente se expresa en el cerebro. El gen que codifica SGK1 se encuentra en el cromosoma 6q23, el que codifica SGK2 en el 20q12 y el que codifica SGK3 en el 8q12.3. Las tres isoformas comparten el 80% de homología en la secuencia de aminoácidos de su dominio catalítico, pero difieren en la región N-terminal y en la distribución tisular, celular y subcelular en mamíferos [65].

La expresión del mRNA de SGK2 parece ser la más restrictiva, siendo más abundante en hígado, riñones y páncreas pero casi indetectable en

Introducción

placenta, pulmón y músculo esquelético. Por el contrario SGK1 y SGK3 tienen una distribución más ubicua [62]. SGK1 se expresa en todos los tejidos estudiados incluyendo cerebro, placenta, hígado, páncreas, riñón, corazón, pulmón y músculo esquelético. Sin embargo, dentro de estos tejidos el nivel de expresión varía entre los distintos tipos celulares. Por ejemplo, en páncreas hay niveles de expresión particularmente altos en las células acinares y en intestino la expresión es mayor en enterocitos que en células de la cripta, en la que es muy baja o nula [66]. SGK3 también se expresa en todos los tejidos estudiados siendo particularmente alto en corazón y bazo, tanto en adultos como en embriones.

En cuanto al N-termino, SGK2 tiene una región N-terminal relativamente corta (98 aminoácidos) que no contiene ningún dominio característico, mientras que SGK3 tiene un N-termino mayor que contiene un dominio homólogo a phox (dominio PX). Este dominio es característico de proteínas que participan en el tráfico intracelular como las nexinas. Los dominios PX son dominios presentes en proteínas que se unen a fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) y que se encuentran unidas a membranas endosómicas [128,147]. Estudios en la kinasa de supervivencia independiente de citoquinas (CISK), homólogo de SGK3 en ratón, demuestran que el dominio PX dirige la proteína al endosoma y que esta localización es dependiente de fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) [128,147].

Además, para cada isoforma se han identificado diferentes variantes. Existen cuatro variantes de SGK1 (1-4), dos variantes de SGK2 (α y β) y dos variantes de SGK3 (1 y 2). Mientras que Akt se localiza en la membrana plasmática por unión a $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ por su dominio homólogo a pleckstrina (PH), SGK carece de dominio PH e interacciona con fosfoinositoles monofosforilados como $\text{PtdIns}(3)\text{P}$, $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ y $\text{PtdIns}(5)\text{P}$ [20,108]. Las variaciones en la región N-terminal de las variantes de SGK les confieren especificidad y determinan su localización (Figura 1):

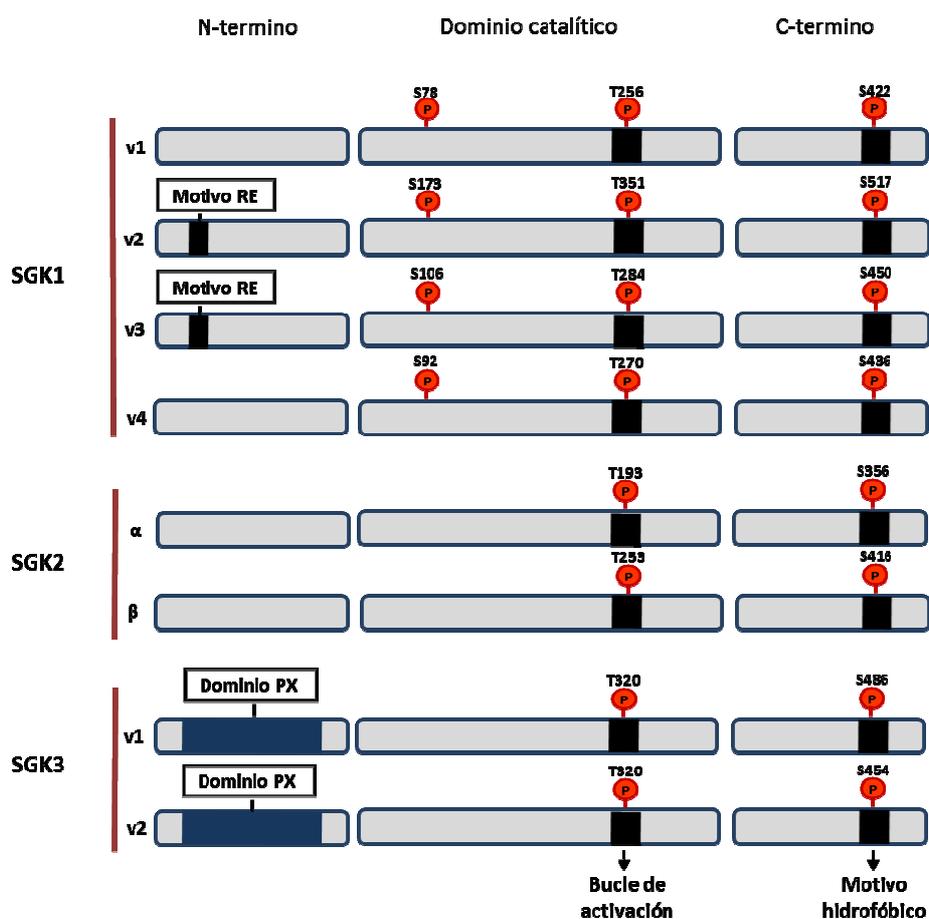


Figura 1. Isoformas y variantes de SGK. Las tres isoformas (SGK1, 2 y 3) poseen dos sitios de fosforilación necesarios para su activación, uno en el dominio hidrofóbico del C-terminal y otro en el bucle de activación del dominio catalítico. Todas las isoformas poseen diferentes variantes que difieren en la región N-terminal. (Modificado a partir de Bruhn, M.A, 2010 [20])

Las cuatro variantes de SGK1 se originan a partir de un mismo mRNA, por la presencia de diferentes inicios de traducción. De las 4 variantes, las dos mayores (49 y 47 KDa) son las de expresión más abundante, se localizan en la membrana del retículo endoplásmico (RE), estimulan ENaC y traslocan FoxO3 del núcleo al citoplasma, pero no fosforilan GSK3β. Las dos más pequeñas (45 y 42 KDa) se expresan menos, se localizan en el citoplasma y en el núcleo, no activan ENaC, tienen menor efecto sobre FoxO3 y fosforilan GSK3β [8].

Sin embargo, las tres isoformas comparten la misma secuencia consenso de fosforilación, R-X-R-X-X-(S/T)-phi, donde X es cualquier aminoácido, R arginina y phi un aminoácido hidrofóbico. Esta secuencia es también reconocida por Akt [21,71,81,128].

2. SGK: regulación de la expresión

De las tres isoformas, la más estudiada es SGK1 y el hecho de que su expresión se vea inducida por una gran variedad de estímulos así como las múltiples funciones que lleva a cabo sugiere que se encuentre regulada a varios niveles (Figura 2) [36,65]:

- La expresión de SGK1 se induce por un amplio número de estímulos extracelulares, hormonales y no hormonales.
- La localización subcelular de SGK1 está controlada por el ciclo celular, exposición a hormonas específicas y estímulos de estrés ambiental.
- SGK1 se activa enzimáticamente como un componente de la cascada de señalización de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K).
- SGK1 es ubiquitinada y degradada en la membrana del RE por la acción de las enzimas UBC6 y UBC7 y la ligasa HRD1.

2.1 Regulación transcripcional

La mayoría de las kinasas están reguladas de forma postraduccional por medio de fosforilación/defosforilación. Además, SGK1 puede ser regulada a nivel transcripcional [64]. Esto le permite estar disponible para sus sustratos sólo cuando las células necesitan responder a un estímulo determinado en un momento determinado. A pesar de que esto ocurre en muchos tipos celulares, la cinética y duración de la respuesta varía dependiendo del tipo de estímulo [36].

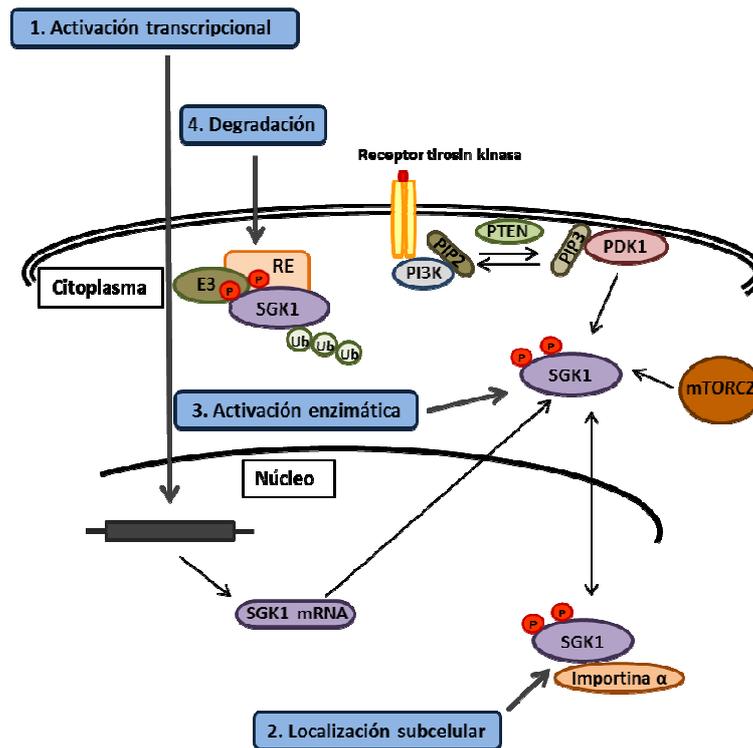


Figura 2. Mecanismos de regulación de SGK1. La kinasa es regulada tanto a nivel transcripcional como post traduccional (localización subcelular, activación enzimática y degradación). (Modificado a partir de Bruhn, M.A, 2010 [20])

El promotor de SGK1 contiene un elemento funcional de respuesta a glucocorticoides (GRE), además de otros tres GREs putativos cuya funcionalidad no ha sido probada. Como glucocorticoides y mineralocorticoides comparten el mismo receptor, es posible que uno de estos GRE medie la inducción de la expresión de SGK por aldosterona.

También se ha observado que en células de la granulosa de ratas adultas la actividad del promotor puede ser inducida por la hormona folículo estimulante (FSH). Esta activación se produce a través del factor transcripcional Sp1 que requiere un sitio de unión a DNA presente en el promotor de SGK. El promotor también contiene una secuencia consenso CREB (cAMP responsive element binding protein) que podría mediar la respuesta a FSH mediante la activación de PKA y la consecuente fosforilación de CREB. El promotor también contiene un elemento de

Introducción

regulación de estrés hiperosmótico que media la inducción de SGK en respuesta a sorbitol. Este elemento incluye el mismo sitio de unión para Sp1 que en la respuesta a FSH. Sp1 interacciona con otros factores transcripcionales y es probable que el control de la actividad del promotor de SGK por FSH y estrés hiperosmótico requiera diferentes interacciones Sp1 proteína-proteína. El promotor de SGK es también una diana transcripcional de varias proteínas, entre las que se encuentra la proteína supresora de tumores p53 [64,109].

Además de por los ya mencionados, la transcripción de SGK1 se ve estimulada dependiendo del tipo de tejido por cambios en el volumen celular, lesión isquémica del cerebro, consolidación de la memoria, vitamina D3, citocinas como TNF- α y TNF- β , virus de la hepatitis crónica o agentes que dañan el DNA [36,66,81]. Figura 3

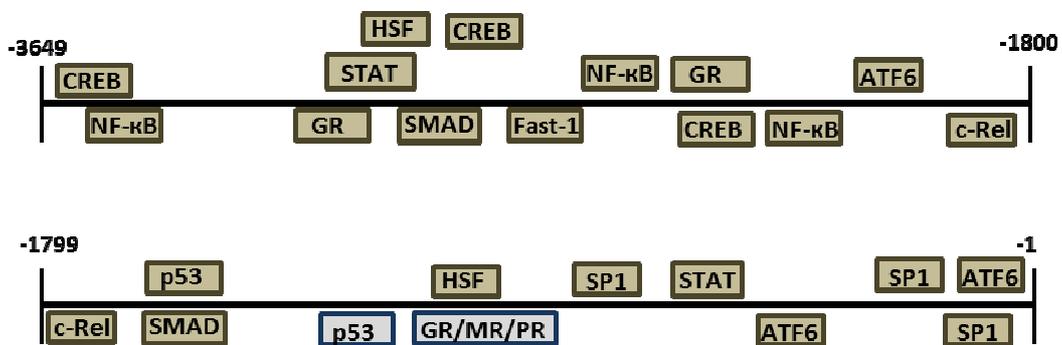


Figura 3. Esquema de la región promotora del gen SGK de rata. Las cajas grises indican los sitios de unión funcionales, mientras que las verdes indican regiones consenso de unión de factores transcripcionales conocidos. GR, Receptor de glucocorticoides; MR, receptor de mineralocorticoides; PR, receptor de progesterona; ATF6, factor activador de la transcripción 6; HSF, factor de choque térmico. (Modificado a partir de Firestone, G.L, 2003 [36])

Por el contrario, hasta la actualidad solo se ha descrito inhibición de la transcripción de SGK1 por heparina [31].

Aunque no se sabe mucho sobre la regulación transcripcional de SGK 2 y 3, parecen ser menos sensibles a la regulación por hormonas. La expresión de SGK2 no se estimula por suero en células H4IIE, mientras que SGK3 no aumenta su expresión en fibroblastos de rata tratados con suero o glucocorticoides [65,66].

2.2 Regulación por localización subcelular

Dependiendo del estímulo, SGK1 puede encontrarse en el núcleo, el citoplasma o la membrana plasmática [87]. SGK1 contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) a través de la cual interacciona con la importina- α para entrar al núcleo [87]. Esta compartimentalización permite regular la accesibilidad de la kinasa a sus sustratos. Esta regulación es especialmente importante cuando diferentes estímulos con funciones celulares diferentes pueden inducir un SGK1 activo. La regulación de la localización de SGK1 a nivel subcelular permite a las células integrar señales extracelulares de proliferación, estrés y diferenciación [36].

En células tumorales mamarias estimuladas con suero, cuando este estímulo produce proliferación, SGK1 se encuentra en el núcleo. Mientras que el tratamiento con glucocorticoides, que produce una detención del ciclo, hace que SGK1 se encuentre exclusivamente en el citoplasma [22]. De la misma manera, la localización de SGK1 varía en células de la granulosa durante el desarrollo del folículo. Durante las primeras fases, cuando se produce proliferación, SGK1 es predominantemente nuclear mientras que en las últimas fases de diferenciación, cuando ya no se produce crecimiento, se encuentra casi totalmente en el citoplasma [3]. Tanto FSH como la hormona luteinizante (LH) están implicadas en el control de la compartimentalización en células de la granulosa. Esto sugiere que las dianas de SGK1 involucradas en estados de no crecimiento se encuentren en el citoplasma mientras que las dianas corriente abajo de la señalización por factores de crecimiento sean nucleares [36].

La localización nuclear o citoplasmática de SGK1 también está sujeta a la fase del ciclo celular en la que se encuentre [22]. De esta manera SGK1 es predominantemente nuclear durante la fase S y G2/M y citoplasmática durante la fase G1. La interacción selectiva entre SGK1 y la importina- α podría controlar la localización subcelular durante las distintas fases del ciclo [8,21,66,128].

A diferencia de SGK1, SGK2 es predominantemente citoplasmática, mientras que la presencia de un dominio PX en SGK3 hace que se localice en el endosoma [147].

2.3 Activación enzimática

La actividad enzimática de SGK1 se controla como un componente de la cascada de señalización de PI3K. La inducción de la vía de PI3K aumenta la actividad catalítica de SGK1 de 3-12 veces [109,128]. Al contrario, al tratar las células con LY294002, un inhibidor químico de PI3K, se suprime la activación enzimática de SGK1.

Esto supone que, igual que otras kinasas de la familia como Akt, la activación de SGK1 requiere dos fosforilaciones realizadas por dos kinasas diferentes [15,50,110] (Figura 2). Sin embargo, a diferencia de Akt, no posee un dominio homólogo a plestrina [15,110]. SGK1 es primero fosforilada en la serina 422, en una región del extremo C-terminal denominada motivo hidrofóbico. Esta fosforilación la realiza el complejo mTORC2 [83] (mammalian target of rapamycin complex 2), figura 4. Este complejo está constituido por: mTOR, rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), Sin1 (stress activated-protein-kinase-interacting protein 1), mLST8/G β L y protor (protein observed with rictor) [41]. La fosforilación de este residuo transforma SGK1 en sustrato de la kinasa dependiente de fosfoinositol PDK-1. El dominio kinasa de PDK1 posee un bolsillo denominado dominio

Introducción

de unión a PIF (fragmento de interacción de PDK1). La unión, a través de este dominio, con SGK1 permite la fosforilación del residuo threonina 256 que se encuentra dentro del bucle de activación y activa, por tanto, a SGK1 como kinasa [16,36,81,114,128].

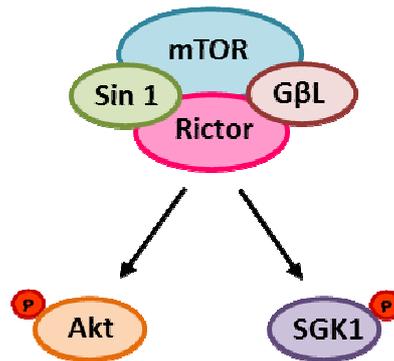


Figura 4. Complejo mTORC2. Esquema del complejo que fosforila a SGK1 y Akt dentro del motivo hidrofóbico. mTOR: mammalian target of rapamycin complex; Rictor: rapamycin-insensitive companion of mTOR. (Modificado a partir de Gao,D, 2010 [40]).

SGK2 y SGK3 poseen sitios de fosforilación equivalentes, $^{193}\text{Thr}/^{356}\text{Ser}$ y $^{253}\text{Thr}/^{419}\text{Ser}$ respectivamente, por lo que se cree que su activación pudiera producirse de manera similar a la de SGK1 [65].

Además, SGK1 puede ser activada de manera independiente de PDK1 a través de la fosforilación de su residuo Serina 78 [48]. La fosforilación de este residuo por la kinasa BMK-1/ERK5 (big mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 5) es responsable de la proliferación inducida por estimulación con factores de crecimiento [48]. La misma fosforilación llevada a cabo por p38 MAPKinasa media la señalización de supervivencia en respuesta a tratamientos con interleuquina 6 [96]

2.4 Regulación por degradación

SGK1 es regulada postranscripcionalmente debido a su rápida proteólisis [18]. Se ha observado que la vida media de SGK1 es menor que la de otras kinasas de la misma familia como Akt o SGK2. De hecho, en muchos tejidos se encuentra una abundante cantidad de mRNA de SGK mientras que la proteína es casi indetectable [11].

En el proceso de ubiquitinación participan tres tipos de enzimas: E1 que activa la ubiquitinación, E2 que transfiere la ubiquitina desde E1 hasta la proteína diana y E3 que es responsable de reconocer el sustrato [28]. En la región N-terminal de SGK1 se encuentra una pequeña hélice anfipática que no está presente en SGK2. Esta hélice sirve de señal para dirigir a la proteína al RE donde es ubiquitinada y degradada [11,18]. Las enzimas implicadas en el proceso de degradación de SGK1 han sido identificadas siendo, HRD1 la principal E3 y UBC6 y UBC7 las E2 [11].

Además, la proteína Rictor es capaz de actuar como E3 al formar un complejo con la proteína Cullin-1, una ubiquitin ligasa [40]. La formación de este complejo depende de la fosforilación del residuo Thr1135 de Rictor. Esta fosforilación no afecta a la actividad kinasa del complejo mTORC2, pero sí a la actividad E3 ligasa del complejo Rictor/Cullin-1. Se ha propuesto un modelo según el cual cuando la actividad de las AGC kinasas es baja, por ejemplo en ausencia de suero, el complejo mTORC2 está inactivo y, por tanto, también lo están SGK1 y Akt. En este contexto, Rictor no sería fosforilado, estaría formando parte del complejo Rictor/Cullin-1 y produciría la degradación por ubiquitinación de SGK1. Cuando la actividad de las AGC kinasas es alta, mTORC2 fosforila y activa Akt y SGK1. Las dos kinasas activadas son capaces de fosforilar a Rictor en la Thr1135. Esto hace que se disocie de Cullin-1, inactivándose el complejo E3 ligasa lo que estabiliza SGK1 (figura 5).

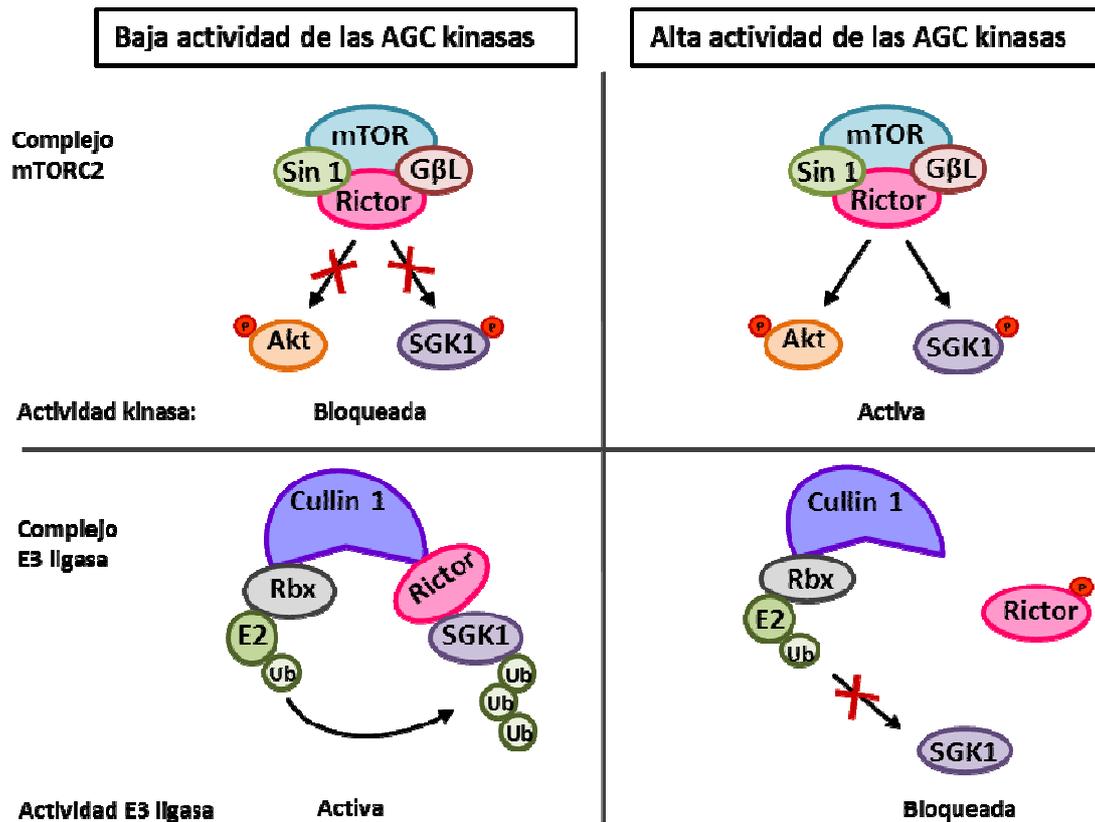


Figura 5. Modelo funcional de los complejos mTORC2 y Rictor/Cullin1 en la regulación de SGK1 (Modificado a partir de Gao,D, 2010 [40])

3. SGK: función

El papel enzimático de SGK1 como kinasa activa no está bien establecido debido, en parte, a que su alta homología con Akt dificulta su estudio. Ambas kinasas son dianas de productos de PI3K, ambas deben ser fosforiladas por PDK1 para activarse y además, se solapan en cuanto a distribución y especificidad de sustratos [9]. Estudios *in vitro* demuestran que SGK1 fosforila la glucogeno sintetasa kinasa 3 (GSK-3), la Raf kinasa B y el miembro de la familia de factores transcripcionales forkhead FKHRL1 (Forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1) que también son sustratos de Akt [9,36,81,128]. Sin embargo, para FKHRL1, ambas proteínas muestran preferencias distintas para los sitios de fosforilación por lo que se ha

postulado que SGK1 y Akt tengan un papel complementario y redundante en la supervivencia de la célula demostrándose que la fosforilación por ambas causa una mayor respuesta de supervivencia que la producida por cada kinasa por separado [36,85].

A pesar de la dificultad para determinar la acción de SGK1 por su similitud con Akt, SGK1 está asociada al control de la actividad y función de transportadores de membrana y proteínas de canales [69,81], transducción de señales para respuestas de supervivencia y proliferación [21,53], homeostasis del sodio [64] , etc.

3.1 Regulación de canales y transportadores

SGK1 participa en el transporte de electrolitos en el riñón y en el control de la presión sanguínea. Regula la actividad de muchos canales y transportadores como el canal epitelial de sodio ENaC [8,9] o la Na⁺/K⁺ ATPasa [132], canales de potasio dependientes de voltaje [65] y el intercambiador Na⁺,H⁺ [65].

Canal epitelial de sodio (ENaC)

SGK1 regula la actividad de ENaC en oocitos de *Xenopus* [6], células del túbulo colector cortical [104], células A6 [4], células del epitelio respiratorio [138] y neuronas [140]. La estimulación de la actividad de ENaC se realiza a través de la ubiquitin ligasa Nedd4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2). ENaC se describió como un canal compuesto por tres subunidades, α , β y γ , que contienen en su región C-terminal un motivo PY que es un motivo de interacción con proteínas con dominios ricos en triptófano (dominios WW) [23]. Posteriormente se describió en humanos otra subunidad, subunidad δ , que carece del motivo PY [133]. Esta subunidad se expresa fuera del epitelio, especialmente en sistema nervioso central (SNC) y páncreas [44]. Nedd4-2 se une a través de su dominio WW con el motivo PY de ENaC. Esta unión

Introducción

produce la ubiquitinación de las subunidades α y γ de ENaC y su consecuente internalización y degradación. SGK1 fosforila a Nedd4-2 lo que disminuye su interacción con ENaC y aumenta su expresión en la superficie de la célula. Este efecto inhibitorio de SGK1 podría deberse a que SGK1 aumenta la unión de Nedd4-2 con los miembros de la familia de proteínas reguladoras 14-3-3 (identificadas por primera vez como proteínas que eluyen en la fracción 14 de un homogenizado de cerebro bovino y encontradas en la posición 3.3 en electroforesis (Moore and Perez 1967)) de manera dependiente de fosforilación [65,66,81,128].

La aldosterona se libera cuando el organismo necesita más Na^+ o cuando la presión sanguínea baja y su aumento produce un incremento en la expresión de SGK. La interacción SGK1-Nedd4-2-ENaC supone por tanto, un nexo entre la regulación transcripcional inducida por aldosterona y la función de la maquinaria implicada en el transporte de Na^+ . Ratones knockout para SGK1 muestran que en condiciones de dieta baja en sal los ratones presentan pérdida de peso, aumento de la excreción de Na^+ , baja presión sanguínea y aumento de los niveles de aldosterona en sangre [35,94].

Canal de potasio de la medula renal externa (ROMK1)

La aldosterona no sólo estimula la absorción de Na^+ sino también la excreción de K^+ . Esta excreción se produce a través de ROMK1, expresado en la nefrona distal sensible a aldosterona (ASDN). SGK1 aumenta la actividad del canal, en parte, porque aumenta su presencia en la superficie. Este aumento de actividad requiere la unión entre ROMK1 y el factor 2 de regulación del intercambio Na^+/H^+ (NHERF2), proteína que media el tráfico de transportadores y canales a la membrana [150]. Además, SGK1 puede fosforilar directamente a ROMK1, esta fosforilación confiere carga negativa, lo que hace que ROMK1 sea más sensible a pH, y que aumente la actividad del canal a pH citosólico [65,67,71].

Introducción

Además, existen estudios que demuestran que WNK1 (with-no-lysine kinase) inhibe ROMK1. En respuesta a insulina o IGF, PI3K es estimulada desencadenándose la vía que lleva a la activación enzimática de SGK1 y Akt. Las kinasas activas fosforilan a WNK1 en el residuo Thr38 de manera dependiente de interstina, una proteína estructural en la endocitosis [27]. De esta manera, se estimula la endocitosis de ROMK1 y la consecuente disminución de actividad producida por SGK1, Figura 6. Este mecanismo de inhibición de ROMK1 a través de SGK1 parece contradecir los datos de otros autores que indican que SGK aumenta la actividad de ROMK1 y el hecho de que la aldosterona, que aumenta la expresión de SGK1, aumente la excreción de K^+ . Además de estimular SGK1, la aldosterona también estimula KS-WNK1 que tiene un efecto antagónico al producido por WNK1 sobre el canal, figura 6. La inhibición de SGK a través de la fosforilación de WNK1 se produce en presencia de insulina e IGF de manera que es posible que bajo diferentes estímulos SGK1 tenga una acción contraria sobre este canal [27].

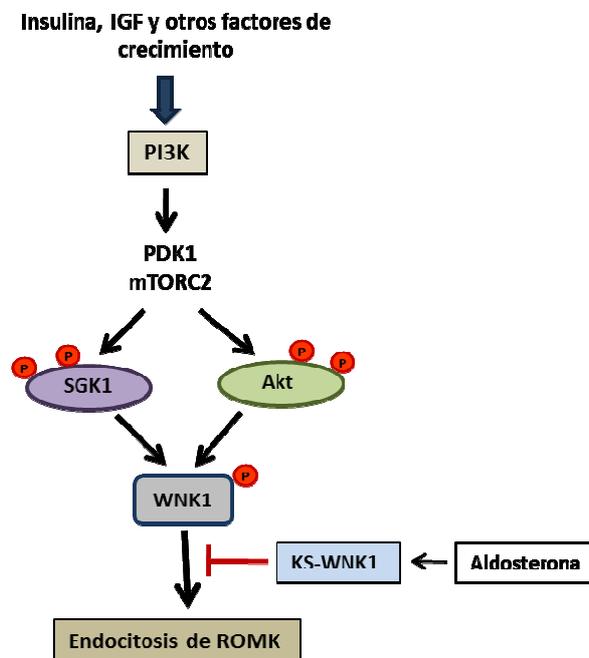


Figura 6. Esquema del efecto de SGK sobre ROMK. La insulina, IGF1 y otros factores de crecimiento producen la activación de SGK1 y Akt que fosforilan WNK1 aumentando la endocitosis del canal. La aldosterona inhibe esta endocitosis estimulando KS-WNK1 (Modificado a partir de Cheng,C.J, 2011 [27]).

Introducción

Estudios recientes muestran que la angiotensina II también inhibe ROMK. Esta inhibición se debe en parte a que la angiotensina aumenta el efecto inhibitorio de WNK4 sobre ROMK1. SGK1 puede revertir esta inhibición fosforilando WNK4 en los residuos Ser1169 y Ser1196. La familia de proteínas tirosina kinasas Src, suprime la fosforilación de WNK4 mediada por SGK1 aumentando así la inhibición de WNK4 sobre ROMK1 [149].

Na⁺/K⁺ ATPasa

La actividad de la bomba Na⁺/K⁺ de la membrana plasmática está regulada por glucocorticoides, efecto que podría deberse a la acción de SGK1. Las regiones promotoras de las subunidades α y β de la bomba Na⁺/K⁺ poseen elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). Esto produce una activación directa de la expresión de las subunidades en presencia de glucocorticoides y mineralcorticoides. Sin embargo, para que se produzca un aumento de actividad no sólo se necesita un aumento de expresión de las subunidades sino también que estas se ensamblen en la membrana celular [99]. Es en este punto donde actúa SGK1, ya que en ratones carentes de un SGK1 funcional no se produce un aumento de actividad de la bomba al tratar con glucocorticoides [131].

En células del epitelio renal de anfibios y sin gluco- o mineralcorticoides en el medio, SGK1 aumenta la actividad de la bomba de Na⁺ sin embargo, no se observa un aumento de síntesis ni incorporación a la membrana de nuevas bombas [5].

SGK1 comparte la capacidad de modular la actividad de la bomba con las otras dos isoformas, SGK2 y SGK3 [65].

Intercambiador Na⁺/H⁺

El intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE) participa en la reabsorción de Na⁺ y excreción de H⁺, contribuyendo a la regulación del pH citosólico. La actividad de la isoforma 3 de este intercambiador (NHE3) está regulada por

Introducción

glucocorticoides. Los glucocorticoides a través de SGK1 promueven la fosforilación de NHE3 en el residuo Ser663, su exocitosis y su consecuente aumento de actividad [65,102,134].

Canal de K⁺ inducido por voltaje (Kv)

SGK1 regula los canales dependientes de voltaje Kv1.3 [51], Kv1.5 [17] y Kv4.3 [13]. En células embrionarias de riñón (HEK), la sobreexpresión de cualquiera de las tres isoformas de SGK estimula los canales de K⁺. Este efecto es revertido por el tratamiento con inhibidores de PI3K [65-67].

Estudios realizados sobre el canal Kv1.5 demuestran que el aumento de actividad producido por SGK1 tiene lugar a través de la inhibición de Nedd4-2. Como ya mencionamos antes para otros canales, la inhibición de esta ubiquitin ligasa inhibe la endocitosis e impide la degradación del canal [17].

3.2 Papel de SGK1 en supervivencia y apoptosis

A pesar de que los ratones knockout de SGK presentan un desarrollo normal se ha demostrado que tanto SGK1 como SGK3 tienen efecto antiapoptótico [65,68,80,128]. Esto puede deberse a que su papel en proliferación y apoptosis no sea crucial o a que existan otras kinasas similares que reemplacen su función [65].

La capacidad de la célula de responder de forma apropiada a condiciones adversas está determinada por una red de vías de señalización intracelulares que desencadenan respuestas de proliferación, adaptación y supervivencia o promueven la muerte celular. Muchos estímulos de estrés ambiental, como la privación de nutrientes, activan cascadas intracelulares de protein kinasas. Se ha demostrado que la expresión de SGK1 se ve inducida por muchos estímulos de estrés como radiación UV, estrés oxidativo, estrés hiperosmótico o choque térmico. Esto sugiere que SGK1 participa en respuestas de supervivencia frente a múltiples tipos de estrés

Introducción

ambiental. Además, estas respuestas parecen ser dependientes de su activación enzimática [77].

En el caso de SGK3 se sabe que fosforila e inhibe la proteína proapoptótica Bad que una vez fosforilada se une a la chaperona 14-3-3. De esta manera, se impide su entrada en la mitocondria [65,80]

A través de FKHRL1

Como mencionamos anteriormente, SGK1 fosforila al miembro de la familia de factores transcripcionales forkhead FKHRL1. De esta forma SGK1 inhibe su actividad transcripcional ya que una vez fosforilado se produce su salida del núcleo [66]. Akt también fosforila FKHRL1. Sin embargo, las dos quinasas muestran una eficacia de fosforilación diferente de los tres residuos presentes en FKHRL1. Ambas quinasas fosforilan el residuo Thr32 por igual, pero varían en la preferencia por los dos residuos de serina: mientras que SGK1 fosforila la Ser315 Akt prefiere la Ser253. La fosforilación de los tres residuos parece ser necesaria para la completa represión de la transcripción dependiente de FKHRL1, evitando así que este factor transcripcional induzca apoptosis o detención del ciclo celular [85]. SGK1 actuaría así de nexo entre la activación de PI3K por factores de crecimiento y la regulación de la expresión de genes críticos en la respuesta de supervivencia.

A través de AngII

La angiotensina II (AngII) es un miembro del sistema renina-angiotensina-aldosterona que se encarga principalmente de regular la presión sanguínea. También actúa a través del receptor tipo 1 de AngII para promover crecimiento y respuestas de supervivencia en gran variedad de tipos celulares. Existen estudios que proponen que la AngII podría proteger a células derivadas de fibroblastos de la apoptosis inducida por ausencia de suero mediante la estimulación y/o activación de SGK1 [14]. La angiotensina II produce un aumento del nivel de SGK1, tanto en mRNA

Introducción

como en proteína. Mediante el tratamiento con inhibidores se determinó que el aumento de mRNA requiere la movilización del calcio intracelular y la activación de tirosin kinasas (Figura 7). Además, la angiotensina II también produce un aumento de SGK1 enzimáticamente activa ya que estimula la fosforilación dependiente de mTORC2 [14]

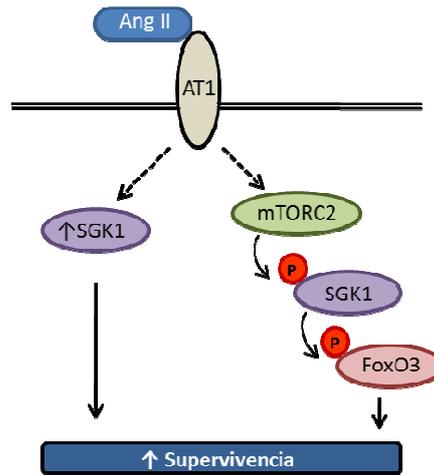


Figura 7. Posible vía de participación de SGK1 en la supervivencia mediada por AngII. La combinación del aumento de la expresión de SGK, mRNA y proteína, y la activación por fosforilación produciría un aumento de la supervivencia. (Modificado a partir de Baskin,R, 2012 [14])

A través de p53

El promotor de SGK1 contiene elementos de unión a p53, por tanto, SGK1 es regulada por p53 a nivel transcripcional [88]. p53 es uno de los principales reguladores de apoptosis ya que integra la vía extrínseca e intrínseca o mitocondrial. SGK1 es capaz de regular p53 a nivel post traduccional. SGK1 activa la E3 ubiquitin ligasa MDM2 (murine double minute 2) considerada el principal regulador de p53. La unión de MDM2 al dominio de transactivación localizado en la región N-terminal de p53 produce su ubiquitinación y permite su degradación por medio del proteosoma (Figura 8) [7].

Introducción

Parece existir por tanto, un mecanismo de feedback en la regulación de p53: p53 regula la expresión de SGK1 mientras que MDM2 y SGK1 disminuyen la expresión de p53 por ubiquitinación. [7].

Además, SGK1 está implicado en la inhibición, dependiente de p53, de FKHRL1. SGK1 es fuertemente inducida, de manera dependiente de p53, después del tratamiento con agentes que dañan el DNA. Esta inducción no se produce a nivel transcripcional, ya que el dominio de transactivación de p53 no es necesario. Parece que la activación de p53 permite la señalización por ERK1/2 que induce SGK1 que fosforila e inhibe FKHRL1. De esta manera, después del estrés, p53 inhibe la actividad transcripcional de FKHRL1 a través de SGK1 [148].

A través de β -catenina

La β -catenina forma parte de un complejo formado por la axina, GSK3 y APC (adenomatous polyposis coli). GSK3 fosforila a la β -catenina que una vez fosforilada es degradada, figura 8. Si la β -catenina no es degradada entra en el núcleo y promueve la expresión de genes implicados en la proliferación celular como Myc y la Ciclina D1. SGK1 fosforila e inhibe a GSK3 lo que conlleva un aumento de la expresión de β -catenina de manera similar al producido por una deficiencia parcial de APC. Una pérdida de función del gen *apc* (gen supresor de tumores) causa la aparición de múltiples pólipos que pueden resultar en el desarrollo de un cáncer de colon. Existen estudios que revelan que SGK está implicado en el desarrollo de tumores en animales deficientes en APC. Se ha observado que, en estos animales deficientes en APC, el número de tumores es menor cuando carecen de un SGK funcional [135].

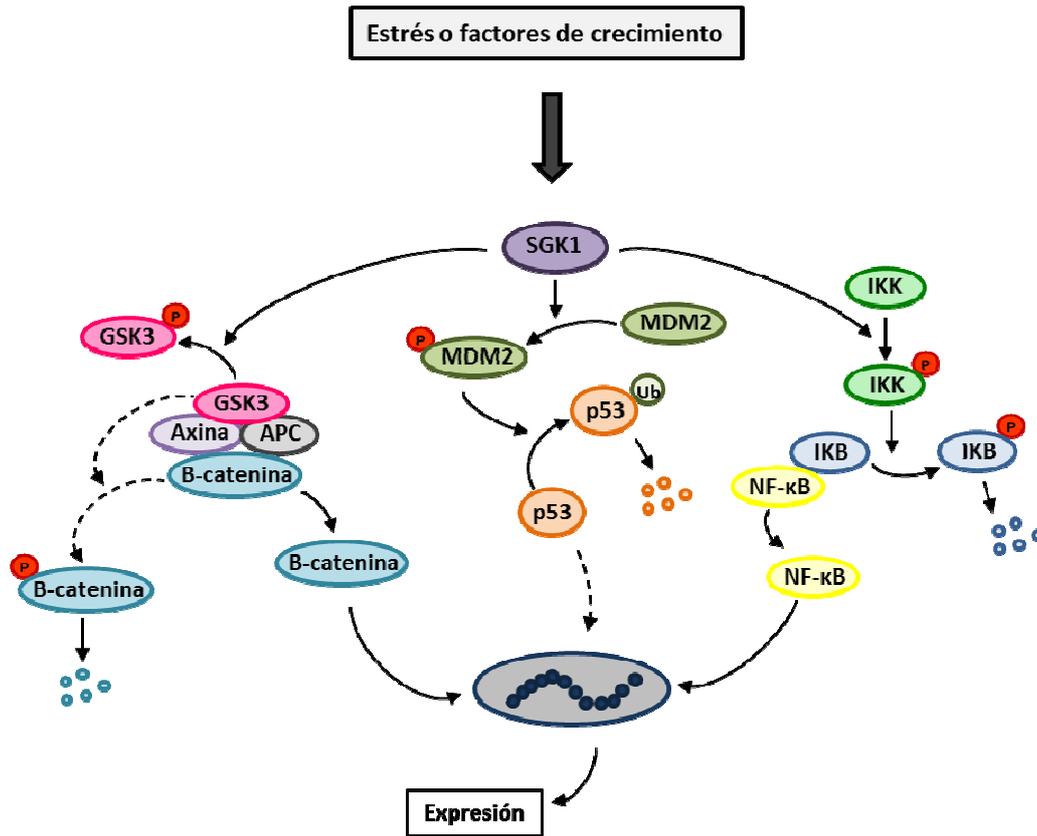


Figura 8. Regulación de factores de transcripción por SGK1. Efecto de SGK1 sobre la acción de β -catenina, p53 y NF κ B. (Modificado a partir de Lang,F, 2010 [68]).

A través de NF- κ B

En células de cáncer de mama, SGK1 también tiene un efecto antiapoptótico modulando NF- κ B (nuclear transcription factor KB). NF- κ B se encuentra en el citoplasma inhibido por la unión de I κ B (inhibidor de κ B). La fosforilación de I κ B por la kinasa IKK permite la liberación de NF- κ B y favorece la degradación del inhibidor por ubiquitinación. Una vez liberado NF- κ B entra en el núcleo y activa la transcripción de genes cuyos productos tienen función antiapoptótica como, por ejemplo, los miembros de la familia Bcl-2 [60]. SGK1 fosforila a la kinasa IKK β aumentando así su actividad y permitiendo la liberación de NF- κ B [152], figura 8.

Durante el desarrollo embrionario en *Xenopus*, SGK1 protege a las células del ectodermo de apoptosis. Se ha propuesto un modelo en el que la

Introducción

activación de SGK1 dependiente de PI3K en el endodermo y mesodermo induce la expresión de BMP7 a través de NF-κB. El BMP7 secretado actúa sobre las células del ectodermo inhibiendo la expresión de componentes del complejo DISC (Death-Inducing Signaling Complex) como FADD o la Caspasa 10 [34], figura 9.

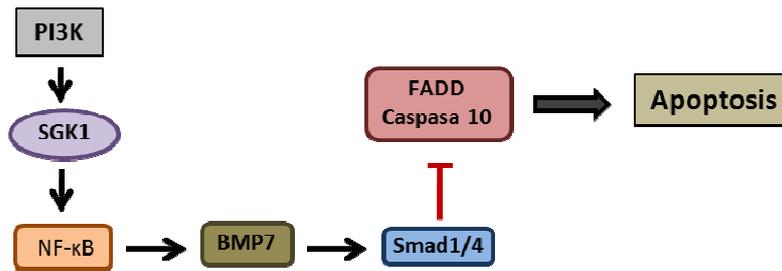


Figura 9. Posible modelo del efecto en supervivencia mediado por SGK1 en embriones de *Xenopus*. SGK1 inhibe la apoptosis al inhibir la expresión de componentes del complejo DISC. (Modificado a partir de Endo,T , 2011 [34])

3.3 Papel de SGK1 en el sistema nervioso

De todas las funciones de SGK1, su acción en el sistema nervioso es una de las más interesantes ya que su regulación del canal de potasio dependiente de voltaje está relacionada con la excitabilidad neuronal [10,70]. Además, estudios recientes relacionan SGK1 con la facilitación dependiente de actividad del aprendizaje y formación de la memoria, la consolidación de la memoria a largo plazo o la modulación de la plasticidad sináptica [70,74,75,86,130]. También se han encontrado altos niveles de SGK1 en isquemia [105], daño cerebral [57], varios modelos de Parkinson [122], esclerosis lateral amiotrófica [122], síndromes de Rett [106] y Huntington [117,136].

En aprendizaje, memoria y plasticidad neuronal

SGK1 parece participar en la consolidación de la memoria. Ratones deficientes en el receptor de glucocorticoides (GR) tienen afectada la

Introducción

memoria y el aprendizaje espacial [128]. Al mismo tiempo, se ha observado que SGK1 podría participar en la facilitación del aprendizaje dependiente de actividad, ya que existe una mayor expresión de SGK1, tanto de mRNA como de proteína, en el hipocampo de ratones de aprendizaje rápido que en el de ratones de aprendizaje lento [76,130].

Además, aunque SGK1 se expresa en varias regiones del cerebro, el entrenamiento enriquecedor aumenta preferentemente su expresión en el hipocampo [76].

Estudios en ratas demuestran que el ambiente en el que se crían influye en las propiedades moleculares, la estructura y electrofisiología del sistema nervioso. Esto es lo que se conoce como plasticidad sináptica y permite a las neuronas adaptarse a un nuevo ambiente. En animales criados en condiciones de microgravedad se observó una mayor expresión de SGK1 que en los animales controles. Además la expresión de SGK1 constitutivamente activo produce una mayor formación de dendritas y un mayor número de ramificaciones de las mismas [30].

En el cerebro, los receptores de glutamato tipo AMPA (ácido amino-hidroxi-metil-isoxazolepropiónico) se abren con la unión al glutamato y median la traducción de señales excitatorias en el sistema nervioso central. La familia de receptores tipo AMPA está constituida por 4 subunidades distintas denominados GluR 1-4. Estudios en GluR1 sugieren que su expresión es importante en la potenciación de neuronas del hipocampo a largo plazo. La PI3K media la llegada de los receptores AMPA a la superficie de la célula. SGK3 también aumenta la cantidad de GluR1 en la membrana y por tanto los efectos del glutamato mediados por la unión a su receptor. Esto probablemente se deba a que participe en la regulación del tráfico de receptores mediada por PI3K [126].

En enfermedades neuronales

La enfermedad de Huntington es una enfermedad progresiva y fatal causada por una expansión de tripletes CAG que se traduce como una región poliQ anormalmente larga en la proteína huntingtina [45,153]. Tanto los glucocorticoides como el IGF-1 tienen un efecto neuroprotector en neuronas con huntingtina poliQ. Ambas sustancias aumentan la expresión de SGK1. Se ha comprobado que tanto SGK1 como Akt fosforilan la huntingtina en el residuo Serina241 reduciendo la toxicidad del poliQ y aumentando la supervivencia de las neuronas estriadas que lo expresan [117,136].

También se ha observado un efecto neuroprotector de SGK1 en varios modelos de Parkinson, enfermedad degenerativa causada por la muerte de neuronas productoras de dopamina [43]. En estos modelos se observa un aumento de la expresión de SGK1. Al disminuir la expresión de SGK1 mediante el uso de siRNA aumenta la muerte celular en situaciones de estrés oxidativo [122].

Uno de los sustratos conocidos de SGK1 es la glucogeno sintetase kinase 3 (GSK-3) que también es sustrato de Akt. En mamíferos existen dos kinasas muy similares GSK3 α y GSK3 β . Esta última es particularmente abundante en sistema nervioso central y parece estar implicada en procesos de neurodegeneración [84]. Se ha demostrado que un aumento de actividad de GSK3 β induce apoptosis mientras que la activación de la vía PI3K/Akt protege a las neuronas mediante la inhibición de GSK3 β . Además, existen estudios que demuestran que GSK3 β fosforila a tau, una proteína asociada a microtúbulos cuya hiperfosforilación causa la acumulación de filamentos helicoidales insolubles característicos de Alzheimer [61]. SGK1 también es capaz de fosforilar a tau en el residuo Serina 214, aunque hay más kinasas capaces de fosforilarla y promover su agregación [128].

Introducción

En excitabilidad

La expresión de SGK1 se ve afectada por cambios en el volumen celular. En cerebro se ha observado que en estado de deshidratación se produce una mayor expresión de SGK1. Como se mencionó anteriormente, SGK1 regula el canal de K⁺ dependiente de voltaje Kv1.3 y podría, por tanto, afectar a la neuroexcitabilidad [39,137].

4. Isoforma específica de cerebro: SGK1.1

Recientemente se ha encontrado una isoforma de SGK1 denominada SGK1.1 que se expresa exclusivamente en cerebro [10]. Esta isoforma difiere de la canónica SGK1 en el extremo 5' debido a un procesamiento de mRNA diferente. SGK1.1 tiene un N-terminal codificado por exones diferentes, aunque comparte la misma región catalítica y el mismo motivo hidrofóbico en el C-terminal que SGK1 (exones 6-16) [10], figura 10.

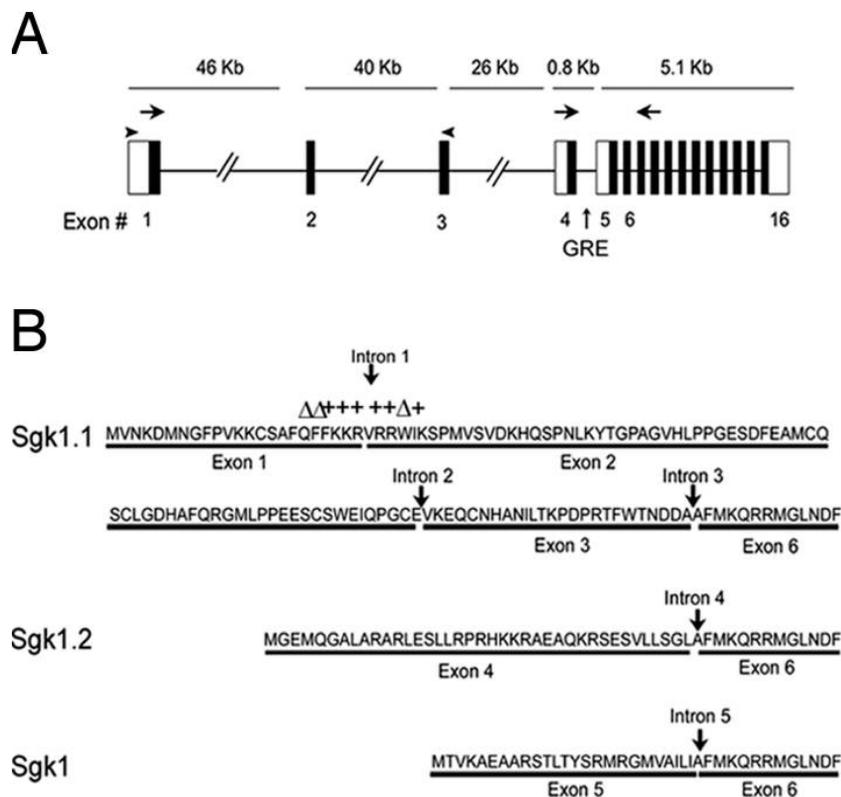


Figura 10. A) Esquema del gen de SGK1. B) Región N- terminal de las distintas isoformas de SGK1. [10]

El único promotor caracterizado experimentalmente está localizado en el intron 4, contiene una caja TATA cerca del origen de transcripción y es el que controla la transcripción de la isoforma canónica. Sin embargo, se ha encontrado una secuencia consistente con una caja TATA en la región corriente arriba del exon 1, [10].

Estudios en tejidos de ratón muestran que la expresión de SGK1.1 es exclusiva de cerebro y que supone aproximadamente 1/10 de la expresión de SGK1. Sin embargo, la expresión de SGK1.1 es mucho más estable que la de la proteína canónica debido a que carece, en su N-terminal, de señal de degradación por el proteosoma [10,11]. Estudios recientes muestran una alta expresión de SGK1.1 en las neuronas piramidales [140].

Una de las funciones más conocidas de SGK1 es la regulación del canal ENaC. Como ya se mencionó, SGK1 fosforila la ubiquitin ligasa Nedd4-2 disminuyendo su unión al C-terminal de las subunidades del canal y por tanto su endocitosis. En principio se pensó que SGK1.1 no tenía ningún efecto en la regulación de este canal. Sin embargo, tras el descubrimiento de la subunidad δ , se observó que SGK1.1 es capaz de aumentar la actividad de los canales ENaC que contienen esta subunidad o que están formados sólo por ella. Como ya se mencionó, esta subunidad carece de motivo PY y se expresa en SNC. El hecho de que SGK1.1 regule canales que sólo contienen la subunidad δ demuestra que la regulación no requiere la presencia de un motivo PY y, por tanto, parece ser independiente de Nedd4-2 [140].

SGK1.1 también regula el canal neuronal sensible a pH ASIC1 (acid-sensing (proton-gated) ion channel 1), perteneciente a la misma familia. SGK1.1 disminuye la actividad del canal al disminuir su expresión en la superficie celular. Esta disminución no se debe a una fosforilación directa de

Introducción

SGK1.1 sobre las subunidades del canal pero es dependiente de su actividad kinasa [10].

No se conoce la manera en la que SGK1.1 regula la expresión superficial de ASIC1, pero se cree que no es a través de Nedd4-2 ya que el C-terminal de este canal no contiene la región rica en prolina necesaria para la unión de la ligasa [10].

Recientemente se ha descrito que SGK1.1 también regula a los canales de K⁺ dependientes de voltaje Kv 7.2 y Kv3 cuando estos se encuentran formando un heterodímero. En muchas regiones del cerebro, los heterodímeros Kv7.2/3 regulan las corrientes M [89]. Esta corriente de potasio se activa a voltajes en el rango de los necesarios para iniciar un potencial de acción, por lo que participa en la excitabilidad neuronal. Los receptores muscarínicos inhiben esta corriente regulando los niveles de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, fosfolípido que activa el canal por unión directa [90]. SGK1.1 aumenta el nivel de corriente sin alterar la dependencia de voltaje de Kv7.2/3, la pendiente de la curva de activación o la tasa de activación/desactivación del canal. Esto sugiere que el aumento en la corriente mediado por SGK1.1 esté relacionado con un aumento de la abundancia de Kv7.2/3. El hecho de que se produzca una disminución en la corriente cuando se expresa Nedd4-2 que es revertido cuando se coexpresa SGK1.1 parece indicar que, igual que ocurría con ENaC, SGK1.1 impide la ubiquitinación y degradación del canal por la ligasa. El aumento de la corriente M disminuye la excitabilidad neuronal y hace que SGK1.1 proteja a las neuronas frente a la hiperexcitabilidad [98].

SGK1.1 carece del elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), de manera que no está regulada por glucocorticoides en el cerebro. Por el contrario, se ha observado que su expresión en neuronas aumenta con la despolarización de la membrana. La actividad neuronal dependiente de despolarización induce la transcripción de genes, estableciendo de ese modo

Introducción

cambios estructurales y funcionales característicos de la plasticidad neuronal [10,65].

SGK1.1 usa un cluster de residuos catiónicos y altamente hidrofóbicos para unirse a fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PtdIns 4,5 P₂) y, en condiciones normales, mantenerse anclada a la membrana plasmática (Figura 11). Si las condiciones cambian SGK1.1 puede ir al citosol y acumularse en el núcleo usando el mismo cluster como secuencia de localización nuclear [10].

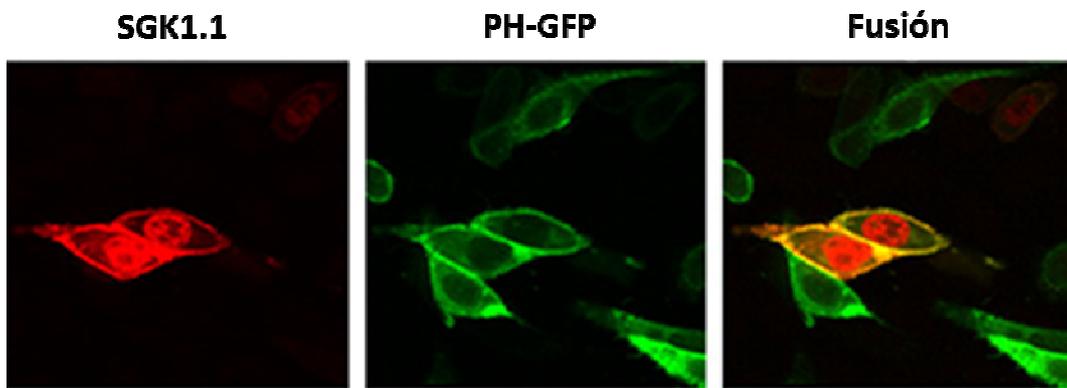


Figura 11. Localización subcelular de SGK1.1. Al comparar la localización de SGK1.1 con la del dominio PH observamos que SGK1.1 se localiza predominantemente en la membrana plasmática, aunque también se observa expresión en el núcleo. (Modificado de Arteaga, M.F, 2008 [10]).

En el núcleo SGK1.1 podría tener dianas específicas implicadas en la regulación de la transcripción que aún no han sido identificadas.

Objetivos

Objetivos

SGK es una serín/threonín kinasa dependiente de suero y/o glucocorticoides ubicuamente expresada en células y tejidos. SGK1.1 es una isoforma de SGK específica de cerebro, cuya expresión se ve incrementada por despolarización. La alta homología de SGK1.1 con SGK1 y otras kinasas de la misma familia nos llevan a suponer que esta nueva isoforma podría actuar en el núcleo regulando la transcripción de genes implicados en la supervivencia de la célula.

El objetivo de este trabajo es estudiar las variaciones en la transcripción inducidas por SGK1.1 mediante un análisis de expresión diferencial en el que utilizaremos células que expresen su forma constitutivamente activa respecto a aquellas que expresen su forma inactiva.

OBJETIVOS CONCRETOS:

1. Función de SGK1.1 en la regulación de la transcripción.
2. Determinación de genes cuya transcripción está regulada por SGK1.1.
3. Estudio de genes y productos cuya transcripción esté regulada por SGK1.1.

Material y métodos

1. Generación de las construcciones

1.1 Mutación puntual

Se realizaron cuatro construcciones diferentes mediante el uso del kit “QuikChange Site-Directed Mutagénesis kit (Stratagene)” según instrucciones del fabricante. Se usa un vector de doble cadena que contenga el inserto de interés (SGK1.1) y dos oligonucleótidos específicos, cada uno de una cadena, que introducen en la secuencia la mutación deseada:

- **S515D:** Mutación que origina una proteína SGK1.1 constitutivamente activa.
- **K127A:** Mutación que origina una proteína SGK1.1 constitutivamente inactiva.
- **FFS_{515D}:** Mutación de los residuos F₁₉F₂₀ dentro de la región hidrofóbica de SGK1.1 que produce una localización, predominantemente, nuclear de la proteína constitutivamente activa.
- **FFK_{127A}:** Mutación de los residuos F₁₉F₂₀ dentro de la región hidrofóbica de SGK1.1 que produce una localización, predominantemente, nuclear de la proteína constitutivamente inactiva.

Para cada construcción se prepararon dos reacciones en 24µL: buffer, 25ng DNA muestra, dNTPs 0,2µM, 2,5U PfuTurbo DNA polymerase. A cada reacción se le añadió 1µL (125ng) de uno de los oligonucleótidos. Se incubaron las reacciones a 95°C durante 30s y 4 ciclos de 95°C 30s, 55°C 1min y 68°C 6min. Tras los 4 ciclos, se mezclaron ambas reacciones y se realizaron 14 ciclos más. Esto se debe a que los oligonucleótidos reconocen la misma secuencia en cadenas complementarias por lo que tienen una alta complementariedad entre ellos. Amplificando por separado aumentamos la cantidad de molde de manera que al unir las hay menos probabilidades de que los oligonucleótidos se unan entre ellos. Tras la amplificación, el DNA

Material y métodos

parental es digerido añadiendo 2 μ L de Dpn I (10U/ μ L) a la mezcla de PCR. La enzima Dpn I es específica de DNA metilado y hemimetilado. El producto de esta digestión se usó para transformar por choque térmico, usando el vector pcDNA 3.1 TOPO (Invitrogen), células competentes XL1-Blue en medio LB-ampicilina, para la purificación del plásmido.

1.2 Purificación de los plásmidos

Se picaron colonias aisladas para crecerlas en cultivo líquido de medio LB-ampicilina (0.1mg/mL). El plásmido se purificó con el kit “Qiagen Plasmid Purification (Qiagen)” según instrucciones del fabricante. Así mismo, se prepararon varias alícuotas de 800 μ L de cultivo + 200 μ L de glicerol que fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

1.3 Secuenciación

Todas las construcciones fueron secuenciadas por el servicio de secuenciación de la Universidad de La Laguna con el fin de comprobar la presencia de las mutaciones

2. Cultivo de líneas celulares

Se usó la línea celular HeLa. El cultivo se realizó en medio F12K (Kaighn's modification of Ham's F12 medium, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma) a 37°C con 5% de CO₂. Se utilizaron diferentes soportes para el cultivo que incluyen Flask de 25 y 75 cm² o placas de 10 cm y 6mm de diámetro (Corning o Costar). El pase de células se realizó por tripsinización, siguiendo métodos estándar, o por raspado. Las células destinadas a inmunocitoquímica se crecieron en placas multipocillos sobre cubreobjetos de 15mm de diámetro recubiertos previamente con gelatina (0.25 mg/mL) y poly-L-lisina (10 μ g/mL) para mejorar la adhesión de las células. Todos los experimentos fueron realizados con las células

crecidas entre 90-95 % de confluencia. La conservación a largo plazo de las células se realizó en medio de cultivo con un 2% de dimetilsulfóxido en nitrógeno líquido.

3. Transfección

Las células fueron transfectadas cuando alcanzaron el 90-95% de confluencia. En primer lugar, se analizó, en células HeLa, la eficacia de transfección de varios lípidos expresando la proteína verde fluorescente (GFP) en el vector pcDNA 3.1 TOPO y observando la fluorescencia al microscopio. Los lípidos empleados fueron Fugene 6 (Promega), Fugene HD (Promega) y lipofectamin 2000 según instrucciones del fabricante, siendo este último el que presentaba un mayor número de células transfectadas y una menor mortalidad de las mismas. Por este motivo se eligió el lipofectamin 2000 como método de transfección para los diferentes plásmidos empleados en esta tesis (SGK1.1S515D, SGK1.1K127A, SGK1.1FFS515D, SGK1.1FFK127A o pcDNA 3.1 TOPO vacío). En algunos casos se emplearon, como control negativo, células sin transfectar en las que se realizó el mismo protocolo que para las transfectadas pero en las que se añadió agua en lugar de plásmido. Cada transfección fue realizada usando el sistema Lipofectamin 2000 (Invitrogen). En todos los casos se usó la mitad de la cantidad de DNA y lipofectamin recomendada para cada tamaño de cultivo ya que se comprobó que no afectaba al porcentaje de transfección pero sí producía una menor mortalidad.

Las células se mantuvieron en cultivo durante 12 horas, periodo tras el cual se sustituyó el medio por medio sin suero.

Tras cuatro horas de incubación con medio sin suero las células son levantadas en PBS 1x frío (NaCl 13.7mM; KCL 2.7mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1.8mM).

4. Extracción de RNA

Las células transfectadas, crecidas a punto de confluencia, se recolectaron y centrifugaron 5 minutos a 300g. La extracción de RNA destinado a la sustracción fue realizada mediante el kit “RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen)”, según instrucciones del fabricante, eluyendo el RNA obtenido en un volumen final de 50µl.

Para la extracción de RNA de células o tejidos destinados a qRT-PCR se usó el kit Aurum total RNA mini kit (BioRad) según instrucciones del fabricante. Los tejidos congelados en nitrógeno líquido fueron homogenizados en un mortero de porcelana antes de proceder a la extracción de RNA.

5 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA en las células o tejidos destinados a qRT-PCR se realizó usando el sistema IScript cDNA Synthesis (BioRad) según instrucciones del fabricante.

Sólo el cDNA destinado a la sustracción fue sintetizado usando el “kit Super SMART PCR cDNA Synthesis (Clontech)”, según instrucciones del fabricante. Este kit está especialmente diseñado para sintetizar los cDNAs provenientes de mRNAs de gran tamaño. Durante la síntesis el CDS primer (tabla 1) se une a la cola poli-A del mensajero incorporando al hacerlo una pequeña secuencia conocida.

La síntesis de la cadena se realizó mediante la PowerScript Reverse Transcriptase (Clontech) que debido a su alta capacidad de procesamiento permite sintetizar cDNAs de gran tamaño.

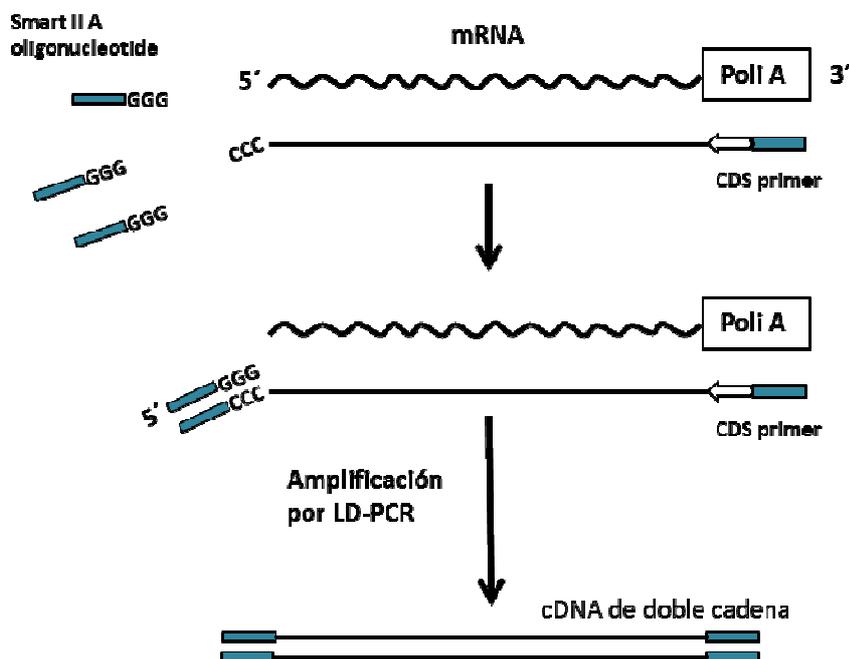


Figura 11. Esquema de síntesis del cDNA. (modificada a partir del Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit User Manual, Clontech)

Sólo al finalizar la síntesis de la cadena, debido a la actividad transferasa terminal de la enzima, ésta incorpora una pequeña secuencia (CCC) que es reconocida por el oligonucleotido SMART IIA (tabla 1). Al unirse a esta secuencia CCC el oligonucleotido SMART IIA incorpora la misma secuencia que el CDS había incorporado en el extremo contrario. De esta manera obtenemos fragmentos completos de cDNA flanqueados por secuencias conocidas (Figura 11).

Las muestras de cDNA sintetizadas fueron purificadas para eliminar pequeños fragmentos de cDNA, así como restos de nucleótidos no incorporados. Esta purificación se llevó a cabo con el kit “NucleoSpin extraction kit (Clontech)”

6. Amplificación del cDNA

Se realizó una LD-PCR con el oligonucleótido 5' PCR primer IIA (Tabla 1) que reconoce la pequeña secuencia incorporada en los extremos de la molécula de cDNA durante su síntesis. De esta manera amplificamos sólo aquellas moléculas de cDNAs que están completas. Para la amplificación se siguió el siguiente protocolo: 95°C 1min y **x** ciclos de: 95°C 15s, 65°C 30s y 68°C 6min. El número **x** de ciclos debe permitir la amplificación de todo el cDNA de la muestra sin llegar a saturación, ya que debemos mantener la proporción real de expresión entre los distintos genes.

Tras la amplificación, el cDNA_{dc} obtenido de las células transfectadas con las construcciones activa e inactiva de SGK1.1 se digirió con Rsa I para generar fragmentos de cDNA cortos con extremos romos, que serán necesarios para adjuntar los adaptadores de ligación y sustracción.

El cDNA digerido se purificó usando el kit "Nucleo trap PCR kit" (Clontech) y concentrado mediante Speed vacum (centrifugación al vacío) a una concentración final de 300 ng/μL.

7. Sustracción génica

Se realizó una sustracción génica entre células que expresan SGK1.1 activo y células que expresan SGK1.1 inactivo mediante el kit "Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit", según instrucciones del fabricante, figura 12

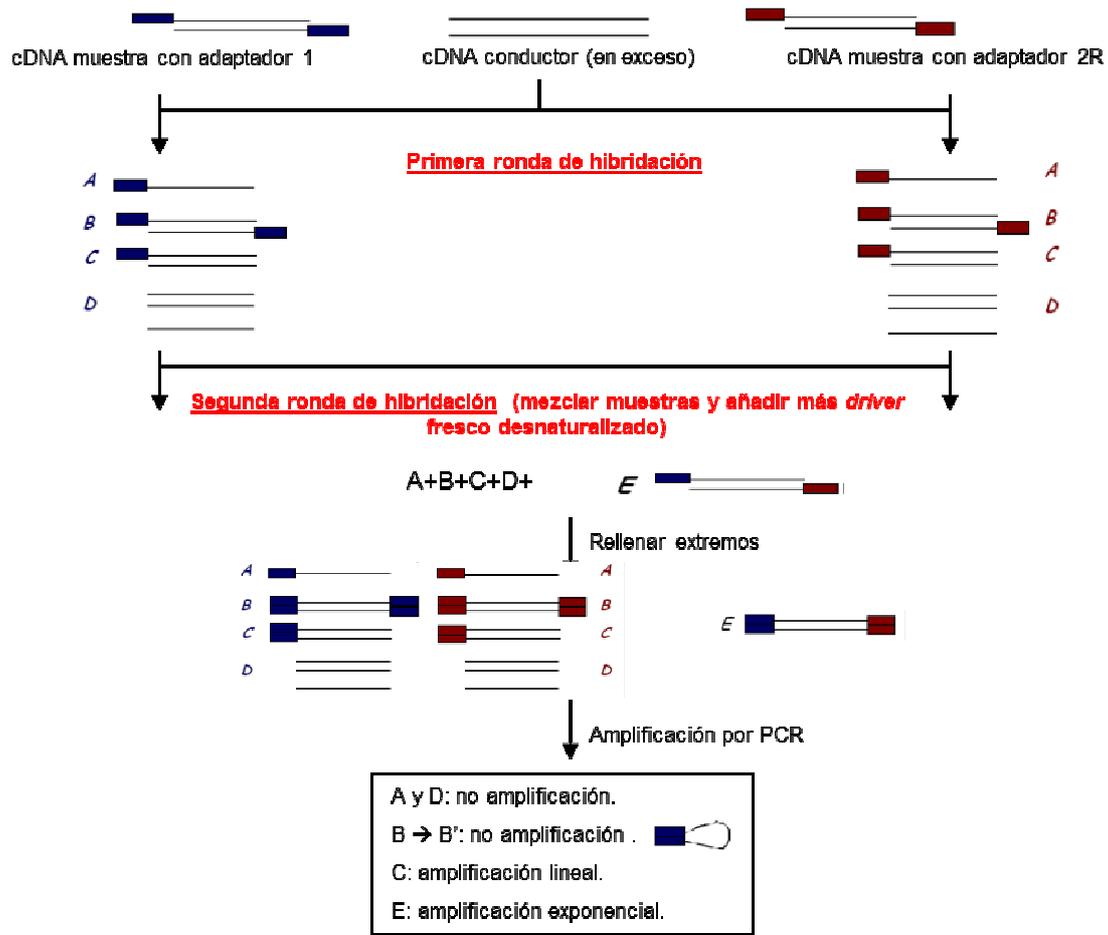


Figura 12. Esquema del proceso de hibridación sustractiva de supresión.
(Modificado a partir de Diatchenko,L, 1996 [81])

7.1 Ligación de adaptadores

Cada muestra de cDNA se diluyó 1:5 en agua bidestilada estéril y se dividió en dos. A cada una se le ligan dos adaptadores distintos de manera que obtenemos:

- cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{S515D} + Adaptador 1
- cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{S515D} + Adaptador 2R
- cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{K127A} + Adaptador 1
- cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{K127A} + Adaptador 2R

Material y métodos

La ligación se realizó según las instrucciones del kit usando la T4 DNA ligasa (Promega) a 16°C durante toda la noche.

7.2 Primera hibridación

La hibridación se realizó en ambos sentidos. Por un lado se usó el cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{S515D} como cDNA muestra y el cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{K127A} como conductor. Se hibridó por separado una dilución 1/200 de los cDNA muestra (SGK1.1_{S515D} + Adaptador 1 y SGK1.1_{S515D} + Adaptador 2R) con un exceso de cDNA conductor (SGK1.1_{K127A}) que no lleva ligado ningún adaptador. Por otro lado se consideró el cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{K127A} como muestra y el de células transfectadas con SGK1.1_{S515D} como conductor, realizándose el mismo proceso de hibridación.

Tras incubar 1 minuto y medio a 98°C se dejan 8 horas a 68°C.

7.3 Segunda hibridación

Tras las 8 horas, se mezclan las dos hibridaciones y se añade conductor fresco desnaturalizado a 98°C durante 2 minutos. Se incuba a 68°C durante toda la noche.

7.4 PCR anidada

Para la primera PCR se usó como molde 1µL de la dilución 1/200 usada para la hibridación. Se preparó la reacción en un volumen final de 25µL: DNA molde, 1x PCR reaction buffer, dNTPs 0.2mM, PCR primer 1 0.4mM (tabla 1) y 1x advantage cDNA polymerase mix. La reacción se incubó a 75°C durante 5 minutos para extender los adaptadores y 25 segundos a 94°C para desnaturalizar. Tras la desnaturalización, se practicó un protocolo de 27 ciclos de 94°C 10s, 66°C 30s y 72°C 1,5min.

Material y métodos

La segunda PCR se realizó en un volumen de 25 μ L, usando 1 μ l de una dilución 1/10 del producto de la primera PCR. Se preparó: DNA molde, 1x PCR reaction buffer, dNTPs 0.2mM, Nested PCR primer 1 0.4mM, Nested PCR primer 2R 0.4mM (tabla 1) y 1x advantage cDNA polymerase mix. La amplificación se realizó siguiendo un protocolo de 16 ciclos de 94°C 30s, 68°C 30s y 72°C 1.5min.

Oligonucleótido	Secuencia (5' \rightarrow 3')
CDS primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)N-1N
SMART IIA oligonucleotide	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
5' PCR primer IIA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
PCR primer 1	CTAATACGACTCACTATAGGGC
Nested PCR primer 1	TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT
Nested PCR primer 2R	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
Oligonucleótido T ₃	ATTACCCCTCACTAAAGGGA
Oligonucleótido T ₇	TAATACGACTCACTATAGGG

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados durante la sustracción y screening. En la tabla se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados donde: N = A, C, G o T y N-1 = A, G o C.

8. Muestreo

8.1 Clonaje en vector pBSK+

Sólo se clonó en el vector pBluescript II KS (+/-) de Stratagene el cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{S515D} sustraído contra el cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{K127A}. El cDNA específico obtenido de la sustracción en sentido contrario (cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{K127A} sustraído contra cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{S515D}) sólo se empleó para marcarlo como sonda.

Material y métodos

Para el clonaje, se cortaron tanto el cDNA como el plásmido con Eag I durante 1 hora y media a 37°C, posteriormente se trató el vector digerido con fosfatasa alcalina (Roche) durante 1 hora a 37°C e inactivamos 15 minutos a 65°C. Se ligó con T4-DNA Ligasa (Promega) a 16°C toda la noche.

El producto de la ligación se clonó en células competentes XL-2-Blue, mediante electroporación.

Para seleccionar aquellas colonias que presentan el plásmido con un fragmento de cDNA clonado, las células transformadas se crecieron en placas de LB- ampicilina (0.1mg/mL) y X-Gal (40µg/mL) e IPTG (0.2mM).

8.2 Preparación de sondas

El cDNA de las muestras transfectadas con SGK1.1_{S515D} (activo) o SGK1.1_{K127A} (no activo) después de la sustracción, se marcó con Digoxigenina-dUTP (Roche) en un volumen final de 20 µL. Para cada sonda se usó 1µg de DNA que se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos. Tras la desnaturalización, se añadió al DNA la mezcla de reacción: 1x hexanucleotide mix (Roche), 1x DIG DNA labeling mix (Roche), 2U klenow (Roche). Se incubó durante toda la noche a 37°C. Tras la incubación se añadió 1µL de EDTA 0,5M para parar la reacción.

Posteriormente la sonda se precipitó con etanol añadiendo 2,5 µL de LiCl 4M y 75 µL de etanol 100% frío. Se incubó durante 30 minutos a -70°C y se centrifugó 13000 rpm 10min. El pellet se lavó con 40 µL de etanol 70% frío y se centrifugó de nuevo. Se eliminó el etanol y la sonda se resuspendió en 50 µL de buffer TE (10mM Tris pH8, 1mM EDTA).

8.3 Dot-Blot

Paso a placa multipocillos

Las colonias con inserto se crecieron toda la noche a 37°C con agitación en placas de 96 pocillos con 100µl de LB-ampicilina (0.1mg/mL) por pocillo.

Preparación de la membrana

Los clones se chequearon mediante dot-blot en membrana de nylon (Nylon membranas, positively charged, Roche) usando como sondas las marcadas anteriormente.

Se prepararon duplicados de cada membrana dividida en 96 secciones y se pasó 1µl de cada pocillo de la placa a cada sección de la membrana respetando el orden. Se colocó cada membrana sobre una placa de LB-ampicilina (0.1mg/mL) incubando toda la noche a 37°C.

Desnaturalización

Las membranas se colocaron sobre papel de filtro empapado en SDS 10% durante 3min, NaOH 0.5N + NaCl 1.5M durante 5min, para desnaturalizar, Tris-HCl 0.5M pH 7.5 + NaCl 1.5M durante 5min, para neutralizar y SSC 2x durante 5min. Se secaron sobre un papel de filtro y se forzó el 'crosslinking' con luz UV.

Hibridación con sondas

Las membranas se lavaron con una solución de SSC 5x (3M NaCl, 300mM citrato trisódico), SDS 0.5% y EDTA 1mM pH 8 durante 30 minutos a 50°C. Tras el lavado se limpiaron las membranas de restos celulares con un papel empapado en la misma solución.

La membrana se prehibridó en solución de hibridación (SSC 5x, SDS 0,02%, N-Lauroil-sarcosine 0.1% y 1% Blocking reagent (Roche)) a 68°C

Material y métodos

durante al menos una hora. Preparamos una mezcla con sonda (26ng/ml), 50µl de 20x SSC y 50µl de DNA de salmón (10mg/ml). La mezcla se calentó a 98°C durante 5 minutos, y la añadimos a los tubos con solución de prehibridación fresca. Se hibridaron a 68°C durante toda la noche.

Se lavó 2 veces durante 15 minutos a 68°C con una solución de SSC 2x + SDS 0.1% y 2 veces, 15 minutos a 68°C con una solución de SSC 0.2x + SDS 0.1%.

Detección de la sonda

Las membranas se lavaron en una solución de ácido maléico 0.1M y Tween 20 0.3% durante 5 minutos. Se bloqueó incubando durante 30 minutos en solución de bloqueo (ácido maléico 0.1M + 1x Blocking reagent (Roche)). Se incubó otros 30 minutos con la solución de bloqueo que contiene el anticuerpo anti-digoxigenina-AP de Roche (1:10.000). Se lavaron 2 veces durante 15 minutos con ácido maléico 0.1M y Twen 0.3% y se equilibraron con la solución de detección (0.1M Tris pH 9.5, 0.1M NaCl).

Se reveló con CDP-Star de Roche, según instrucciones del fabricante.

Selección de clones positivos

Se seleccionaron aquellos clones en los que la señal de la membrana sondada con el cDNA sustraído de células transfectadas con SGK1.1 activo fue, al menos, el doble de la señal de la membrana sondada con cDNA sustraído de células transfectadas con SGK1.1 inactivo.

Los clones seleccionados se sembraron a partir de la placa multipocillos en placas de LB-ampicilina (0.1mg/mL) con el fin de obtener colonias aisladas.

8.4 Dot-blot para DNA

PCR de colonia

Para conseguir la amplificación de los insertos clonados en el vector se picaron colonias aisladas de aquellos clones seleccionados tras el dot-blot y se resuspendieron en 50 μ L de agua. Se usaron 5 μ L como molde para la reacción. La amplificación se llevó a cabo con oligonucleótidos específicos para los promotores T₃ y T₇ (tabla 1) que flanquean al inserto en el vector. La reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L conteniendo: DNA molde, 1x NH₄ reaction buffer, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0.05 mM, oligonucleótidos 0.1 μ M y Biotaq DNA polimerasa (Bioline) 1U.

La mezcla se incubó 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 95° 1 minuto, 52° 45 segundos, 72° 45 segundos y una extensión final de 72° 10 minutos.

Preparación de membranas

El producto de PCR se desnaturalizó con NaOH 0.6N (1:1). Se usó 1 μ l de esta mezcla de cada muestra para fijar en la membrana. Se neutralizó con Tris-HCl 0.5M pH 7.5 durante 5 minutos. Se lavaron con agua y se dejaron secar sobre un papel de filtro, antes del 'crosslinking' con luz UV.

Hibridación con sondas

La membrana se prehibridó en solución de hibridación a 68°C como mínimo 1 hora. Se hibridó con solución fresca que contenía la sonda marcada desnaturalizada durante toda la noche a 68°C. Se lavó 2 veces durante 15 minutos a 68°C con una solución de SSC 2x + SDS 0.1% y 2 veces, 15 minutos a 68°C con una solución de SSC 0.2x + SDS 0.1%.

Detección de la sonda

Las membranas se lavaron en una solución de ácido maléico 0.1M y Tween 20 0.3% durante 5 minutos. Se bloqueó incubando durante 30 minutos en solución de bloqueo (ácido maléico 0,1M + 1x Blocking reagent

Material y métodos

(Roche)). Se incubó otros 30 minutos con la solución de bloqueo que contiene el anticuerpo anti-digoxigenina-AP (1:10.000) de Roche. Se lavó 2 veces con ácido maléico 0,1M y Twen 0.3% y equilibró con la solución de detección.

Se reveló con CDP-Star de Roche, según instrucciones del fabricante.

Extracción de plásmidos

Los clones chequeados que mantuvieron una expresión al menos dos veces mayor en la sonda activa que en la inactiva, se cultivaron en medio líquido LB-ampicilina (0,1mg/mL) a 37°C en agitación durante toda la noche.

La extracción del plásmido se realizó con el kit “QIAprep Spin Miniprep Kit” de Qiagen, según instrucciones del fabricante.

Los plásmidos se cuantificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% antes de secuenciar.

8.5 Análisis de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa informático “nucleotide Blast”, para determinar la secuencia de nucleótidos con mayor homología.

9. PCR a tiempo real semi-cuantitativa (qRT-PCR)

La verificación de la diferencia de expresión para los genes obtenidos en la sustracción se realizó mediante qRT-PCR. Usando el programa Omiga, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la secuencia de humanos de cada uno de los genes estudiados así como para el gen de SGK1.1 (tabla 2). Para asegurar la amplificación específica del SGK1.1 transfectado y no del SGK1 endógeno de la célula, el primer SGK1.1-F se diseñó contra la región no común de ambas secuencias. Así mismo, se

Material y métodos

diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen de la β -actina que se usó como gen de referencia para estimar la expresión de los genes estudiados.

Gene	Oligonucleótido	Sequence (5'→3')	Tm
BAG4	BAG4-F	ACTGTCAGACTGAAGCACC	53.4°C
	BAG4-R	AACACTACGATTACCATCTCC	53.3°C
BROX	BROX-F	TTTGATCTCACCAAAAGACC	55.2°C
	BROX-R	GATGTAGCACCCAGTGTCC	56.3°C
LYCAT	LYCAT-F	GCAACATGGCTCACCTACC	62.8°C
	LYCAT-R	ATTCCACAGGAACATCCAGTCC	62.4°C
PPP1CB	PPP1CB-F	GGAGGATTGTCACCAGACC	57.8°C
	PPP1CB-R	AGACCATAGCAAATCACAGAGC	58.5°C
RDX	RDX-F	CGAGGAAGAACGTGTAACC	55.7°C
	RDX-R	CCTGCTTTAACATTCTCAGC	55.3°C
C6ORF62	C6ORF62-F	TACAGCTCCATGCTCCTCG	60.1°C
	C6ORF62-R	GCTCATCAGATTCTTTCCACC	47.6°C
SGK1	SGK1-F	ATTCTGAACAAGCCTCTCC	54.3°C
	SGK1-R	TAATCTCCATGAAGTCATCC	52.4°C
rBROX	rBrox-F	AAAGCGAACTATGGCCTGG	60.2°C
	rBrox-R	TTGGTGAGATCAAATGCAGC	59.8°C
β -Actin	ACT -F	CTTCCTTCCTGGGCATGG	61,6°C
	ACT -R	GCCGCCAGACAGCACTGT	63,7°C

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por qRT-PCR de los genes estudiados.

Todas las reacciones se llevaron a cabo usando el sistema CFX-96 (BioRad). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos y 45 ciclos de PCR realizados a 95°C durante 10 segundos, 59°C 20 segundos y 72°C durante 15 segundos. La curva de melting se llevó a cabo entre 65 y 95°C con un incremento de temperatura de 0.1°C/s leyendo cada 0.5°C. La reacción se realizó en un volumen final de 10 μ L y se usó 2x SYBR Green Supermix (100mM KCL, 40mM Tris-HCL pH 8.4, 0.4 mM de cada dNTP, iTaq DNA polimerasa 50 units/ml, 6mM MgCl₂,

SYBR Green I, 20nM fluoresceína, y estabilizadores; BIO-RAD) y una concentración final de 0.2 μ M de cada primer.

Cada gen fue analizado por triplicado en las 20 muestras diferentes de cada condición realizadas: células transfectadas con SGK1.1 activo (A), células transfectadas con SGK1.1 no activo (NA) y células sin transfectar (ST).

En el caso de las qRT-PCRs de tejidos de rata se diseñó un oligonucleótido específico para el gen Brox en este organismo (rBrox, Tabla 2). El oligonucleótido para la β -actina fue el mismo empleado para la amplificación en células humanas por compartir la misma secuencia.

10. Análisis de la longitud del mRNA de Brox humano

Para el estudio de la longitud del RNAm de Brox se diseñaron oligonucleótidos antisentido específicos contra la secuencia de los clones RGF-3 y RGF-4 obtenidos en la sustracción y que presentaban homología con la secuencia de Brox de *P. abelli* (Tabla 3). Para la amplificación por PCR se empleó como oligonucleótido sentido el Brox F2 diseñado para la amplificación específica de Brox humano y que aparece detallado en el siguiente apartado.

La amplificación se realizó mediante la enzima Green Taq (GenScript) según instrucciones del fabricante y el tamaño de los fragmentos amplificados se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

11. Generación del anticuerpo anti-Brox (AbBrox)

11.1 Construcción del plásmido

A partir del cDNA de células HeLa se amplificaron 3 fragmentos diferentes de cDNA de Brox utilizando las combinaciones de oligonucleótidos que se muestran en la tabla3:

- **Brox-A:** Se utilizaron los oligonucleótidos Brox F1 y Brox R1 para amplificar el fragmento completo del mRNA humano (1275pb).
- **Brox-B:** Se utilizaron los oligonucleótidos Brox F1 y Brox R2 para amplificar el fragmento correspondiente al extremo N-terminal del mRNA humano (591pb).
- **Brox-C:** Se utilizaron los oligonucleótidos Brox F2 y Brox R1 para amplificar el fragmento correspondiente al extremo C-terminal del mRNA humano (785pb).

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
BROX	BROX-F1	CGGGATCCCGGAGAAAATGACCCATTGG
	BROX-F2	CGGGATCCCGCTCCCAAACACTCATTACACC
	BROX-R1	CGGAATCCGCTGCTAGAGAAATTCTAAGTGC
	BROX-R2	CGGAATCCGCTGTTACTTCTTGAGCTTCAGC
	RGF3-R	GTGCCTAAAAGAAACAGGTCC
	RGF4-R	CCAACATGGTGAAATCACG

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los distintos fragmentos de Brox. Las dianas de las enzimas usadas para clonar aparecen en color: azul para EcoR1 y verde para BamH1.

La amplificación se realizó mediante la enzima Phusion (Finnzymes) según instrucciones del fabricante. Tras comprobar en un gel que los fragmentos Brox-A, B y C amplificados tenían el tamaño deseado, el producto de PCR se purificó mediante el kit Real Clean Spin (Real) según instrucciones del fabricante.

Los fragmentos digeridos con las enzimas BamH1 y EcoR1 se ligaron al vector pRSET-c previamente digerido con las mismas enzimas. La ligación se llevó a cabo en una proporción 1:5 usando la enzima T4 DNA ligasa (Promega) e incubando 2 horas a 22°C y toda la noche a 16°C.

Con el producto de la ligación se transformaron por electroporación células competentes XL2- Blue. Las células transformadas se crecieron en placas de LB- ampicilina (0.1mg/mL)-tetraciclina (12.5µg/mL) y X-Gal (40µg/mL) e IPTG (0.2mM), para seleccionar aquellas colonias que presentaban el plásmido.

11.2 Expresión de proteínas en E. Coli

Tras comprobar la fidelidad de la secuencia de los plásmidos por secuenciación, se transformaron en cepas bacterianas *E. Coli* K12 estirpe BL21(DE), deficiente en proteasas lon y ompT. Los cultivos bacterianos se crecieron a 37°C con agitación hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0.5. En ese momento se añadió IPTG a una concentración de 1mM y se mantuvieron en cultivo durante 4 horas. Tras este tiempo los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El pellet resultante se guardó a -20°C hasta el momento de la purificación de proteínas recombinantes.

11.3 Purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes Brox-a, b y c fueron purificadas usando las columnas HisTrap FF (GE Healthcare) según instrucciones del fabricante. El pellet de bacterias se lisó añadiendo 5ml de buffer de unión (20mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 0.5M NaCl, 30mM imidazol y 8M urea; pH 7.4) por gramo de peso húmedo y centrifugando a 9000 rpm durante 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante que se pasó por las columnas previamente equilibradas con buffer de unión. La elución se llevó a cabo en 5mL de buffer

Material y métodos

de elución (20mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 500mM imidazol y 8M urea; pH 7.4) recogiendo por separado cada mL. La concentración de proteínas se determinó mediante el método Bradford (1976) comparando las muestras con patrones de BSA a concentraciones conocidas.

11.4 Inducción de anticuerpos en conejos

Las proteínas Brox-a, b y c fueron inoculadas vía intradérmica con 500µL de solución de proteína (200µg) más un volumen de coadjuvante completo de Freund. Se realizaron 3 recuerdos con una dosis de 100µg de proteína y coadjuvante incompleto de Freund en la misma proporción. Los recuerdos se realizaron con 10 días de separación. A los 10 días de la última inoculación se sangraron los conejos. La sangre se incubó 1 hora a 37°C y se guardó toda la noche a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm a 4°C y el sobrenadante se almacenó a -20°C.

11.5 Purificación de anticuerpos anti-Brox (sp-AbBrox)

Eliminación de anticuerpos contaminantes anti-Histidinas

Se unió 1mg de la proteína dipeptidasa humana recombinante (Dp1) a una columna HisTrap FF (GE Healthcare) según instrucciones del fabricante. Esta proteína, expresada y purificada por el mismo método que Brox, contiene la misma secuencia de Histidinas. Tras unir la proteína se lavó con buffer de unión sin urea (20mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 0.5M NaCl, 30mM imidazol; pH 7.4). Se pasaron por la columna 1.6mL de suero Brox A+C diluidos en buffer fosfato (20mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 0.5M NaCl; pH 7.4) hasta un volumen final de 4mL. Se recogió y guardó el suero pasado por la columna (Brox). Se lavó la columna con buffer de unión y se eluyeron los anticuerpos anti His pegados a la proteína unida a la columna pasando 5mL de glicina 100mM pH 2.5. La columna se equilibró pasando 5mL de buffer

Material y métodos

de unión. El proceso se repitió 4 veces más de manera que se purificaron un total de 8mL de suero.

La eliminación de los anticuerpos anti-His del suero se comprobó mediante western blot contra Brox y Dp1.

Purificación de anticuerpos específicos

Los 4mL de suero recuperados tras pasar por la columna con Dp1 se pasaron por otra columna a la que previamente se había unido una mezcla de Brox B y C según instrucciones del fabricante. De nuevo se lavó la columna con buffer de unión sin urea y se eluyeron los anticuerpos unidos a las proteínas con 5mL de glicina 100mM pH 2.5. La solución de anticuerpos se equilibró añadiendo 1/10 de volumen de Tris 1M pH 8 y la columna lavando con buffer de unión. Tras equilibrar la columna se pasaron las otras muestras de suero siguiendo el mismo proceso. En todos los casos se comprobó por wester blot contra Brox que los anticuerpos específicos se eluyeron de la columna tras tratar con pH ácido (sp-AbBrox.).

Concentración de anticuerpos

Tras comprobar que todas las muestras de anticuerpos eluidos reconocían Brox, se mezclaron y concentraron mediante una columna de proteína A- Sepharosa de *S. aureus* (SIGMA). También se concentraron de esta forma las inmunoglobulinas totales presentes en los sueros preinmunes A y C. Las partículas retienen de 10-20mg/ml de anticuerpos. Se prepararon columnas de 200µl de partículas.

Se añadió a la muestra 1/10 de Tris 1M pH8 para equilibrar el pH antes de pasar la muestra varias veces por la columna. Posteriormente se lavó con 2mL de solución de lavado (0.02M NaH₂PO₄ + 0.15M NaCl pH8). La elución se realizó añadiendo 1mL de solución de elución (0.2M Na₂HPO₄ + 0.1M ácido cítrico pH 3). Se recogieron por separado alícuotas de 100µl en tubos eppendorf con 4µl de Sosa 2.5N para recuperar el pH. Las muestras se

Material y métodos

corrieron en geles de acrilamida al 10% seleccionando para su uso las elusiones que más anticuerpos contenía.

De nuevo, se comprobó por western blot que los anticuerpos reconocían la proteína Brox purificada así como la proteína en muestras de células HeLa y tejidos de rata.

12. Western blots

12.1 Preparación de las muestras

Las células HeLa se lavaron dos veces con PBS frío y se levantaron en la misma solución. Tras sedimentarlas centrifugando 3 minutos a 8000rpm se resuspendieron en tampón de carga LSB 3x (63mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 1.5% β-mercaptoetanol y 0.0025% de azul de bromophenol).

Los tejidos de rata empleados se trituraron en nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. El polvo obtenido se resuspendió en LSB 1x y se hirvió durante 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 10000rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

12.2 Electroforesis en poliacrilamida-SDS

Las proteínas se separaron según su peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE discontinua (Laemli, 1970) al 10% o 12% dependiendo del tamaño de las proteínas que se quiera separar.

Las muestras en tampón de carga se calentaron durante 5 minutos a 100°C antes de cargar. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein Standars Kaleidoscope (BioRad). La electroforesis se llevó a cabo en cubetas miniprotean (BioRad) entre 150-200V a

Material y métodos

temperatura ambiente, usándose el tampón de electroforesis a pH 8.3 (25mM Tris, 250mM glicina, 1% SDS) hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel.

12.3 Transferencia

Las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilideno difluorado (PVDF, Immobilon-P, Millipore) previamente hidratadas en metanol y equilibradas en tampón de transferencia pH 8.3 (20mM Tris, 132mM Glicina, 20% metanol). Las condiciones de transferencia fueron 100V 1 hora o 30V durante toda la noche.

12.4 Detección

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se lavaron en PBS y se bloqueó durante 1 hora en PBS /0.1% Tween-20 con 5% de leche desnatada (Sveltesse, Nestle). Los anticuerpos primarios utilizados (Tabla 4) se diluyeron en PBS /0.1% Tween-20 con 0.5% leche desnatada y se incubaron con las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 10 minutos con PBS-T se aplicaron los anticuerpos secundarios unidos a peroxidada en la misma solución que los primarios. Se utilizaron Anti-Mouse IgG-Peroxidase (Sigma) a 1:5000 y Anti-rabbit Ig Horseradish peroxidase (Amersham) a 1:50000. La incubación fue de 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS-T.

La actividad peroxidada se reveló mediante quimioluminiscencia con el sistema ECL Plus (Amersham) y se detectó mediante tiempos de exposición variables con películas Fuji RX o con el sistema Quantity One de BioRad.

Anticuerpo	M/ P	Western	IHQ	Procedencia
SGK ct	Rabbit polyclonal	1:5000	1:2000	Cecilia Canessa
RDX 215R+	Rabbit Monoclonal	1:1000		Woodward/ Crouch
PPP1CB	Rabbit Monoclonal	1:100.000	1:500	Abcam
SODD H300	Rabbit polyclonal	1:1000	1:500	S/C Biotechnology
β Tubulin	Mouse monoclonal	1:1000		S/C Biotechnology
V5-Probe	Mouse monoclonal		1:2000	S/C Biotechnology
AbBrox	Rabbit polyclonal	1:7000	1:500	P. Martín-Vasallo/J. Ávila
sp-AbBrox	Rabbit polyclonal	1:250	1:50	P. Martín-Vasallo/ J. Ávila

Tabla 4. Anticuerpos empleados en este trabajo. Anticuerpos empleados en esta tesis, concentración y procedencia.

12.5 Normalización de los datos

El uso del sistema de detección Quantity One de BioRad nos permitió obtener un valor numérico de expresión de las proteínas estudiadas. Este valor se obtuvo midiendo para cada caso la densidad de la banda deseada en cada carril. Con el fin de poder comparar muestras diferentes, la intensidad se midió al mismo tiempo de exposición en cada membrana y se normalizó con respecto a la intensidad de la β tubulina en el caso de células HeLa o con respecto al volumen total de proteínas cargadas por carril en el caso de tejidos.

12.6 Reciclaje de membranas

Las membranas de PVDF se reutilizaron eliminando el anticuerpo mediante tratamiento con una solución de 62.5mM Tris-HCl pH 6.7, 2% SDS, 100mM β -Mercaptoetanol durante 30 minutos a 50°C. Tras esta incubación las membranas se lavaron 4 veces durante 15 minutos en PBS a temperatura ambiente.

13. Inmunocitoquímica con fluorescencia

Las células crecidas sobre cubreobjetos de 15mm se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con metanol 100% frío incubando durante 6 minutos a -20°C. Tras la fijación se lavaron de nuevo 3 veces con PBS y se bloquearon 30 minutos en solución de bloqueo universal (1% BSA, 0.1% gelatina, 0.5% Triton X-100, 0.05% azida sódica, 0.01M PBS pH 7.4). Las células se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo a las concentraciones indicadas en la tabla 4 durante 1 hora a temperatura ambiente. Los controles negativos se incubaron sin anticuerpo primario.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las células se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-T (0.05M Tris, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.4) y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en solución de lavado durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Como anticuerpo secundario se usó Anti-rabbit IgG FITC conjugate (Sigma) ambos a una dilución 1:300. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos y se montaron los cristales en glicerol: PBS en una proporción 9:1.

13.1 Microscopio de fluorescencia y análisis de imágenes

Las muestras se examinaron con el microscopio de fluorescencia Olympus BX-50.

Las fotografías se tomaron usando una cámara digital Olympus Camedia C-3030ZOOM, y las imágenes fueron ensambladas utilizando el programa informático Adobe PhotoShop.

14. Inmunoprecipitación

14.1 Lisis de células

Soluciones de lisis:

- NP-40 (50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 1% Nonidet 40, inhibidor de proteasas Complete 1x)
- RIPA (50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 1% Nonidet 40, 0.5% deoxycolato sódico, 0.1% SDS, inhibidor de proteasas Complete 1x)

En ambos casos las placas de cultivo colocadas sobre hielo se lavaron 3 veces con PBS 1x frío. Se añadió a cada placa el buffer de lisis adecuado según su tamaño. Por lo general 500mL para placas de 60mm de diámetro. Se incubó durante 20 minutos periodo tras el cuál la solución de lisis es transferida a un tubo eppendorf y centrifugada a 12000g durante 2 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, el sobrenadante es transferido a un nuevo tubo. La conservación se realizó congelando a -80°C. La lisis también se llevó a cabo a partir de pellets de células. En estos casos se realizó el mismo protocolo pero añadiendo al pellet 200µL de buffer de lisis.

La eficacia de cada método de lisis fue analizada mediante western blot. Ambos métodos consiguieron liberar la proteína de interés. Se eligió para la lisis de células destinadas a inmunoprecipitación la solución NP-40 por ser menos agresiva.

14.2 Recubrimiento de partículas magnéticas

Usamos partículas magnéticas Dynabeads M-280 tosylactivated (Invitrogen). Para recubrir 1mg de partículas necesitamos 20µg de inmunoglobulinas purificadas, suficientes para retener de 1-10µg de

proteína diana. Se recubrieron partículas tanto con el anticuerpo sp-AbBrox como con las inmunoglobulinas totales del suero pre-inmune.

Se transfirió la cantidad necesaria de partículas a un tubo eppendorf, se colocó en el imán y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron las partículas con 1mL de solución B (0.1M buffer fosfato pH 7.4). Se añadió la cantidad de anticuerpo necesario diluido en solución B hasta el volumen final deseado (3mg de partículas=Volumen final 150 μ l). Se añadió solución C (solución B + 3M sulfato de amonio) para dejarla a una concentración final de 1.2M y se incubó 24 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación se eliminó el sobrenadante colocando el tubo eppendorf en el imán y se lavó con 1mL de solución D (PBS + 0.5% BSA pH 7.4). Se realizaron dos lavados más con 1mL solución E (PBS + 0.1% BSA pH 7.4) antes de resuspender las partículas en la cantidad de solución E necesaria para dejarlas a la concentración deseada.

14.3 Inmunoprecipitación

A la muestra de aproximadamente 2 millones de células lisadas en NP-40 (200 μ L) se añadieron las partículas recubiertas resuspendidas en buffer E hasta completar un volumen final de 500 μ L. Se incubó con agitación durante 2-4 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación se eliminó la muestra colocando el tubo eppendorf en el imán y se lavó 3 veces con 1mL de solución B. Se eluyó en 20 μ L de glicina 50mM pH 3 y se recuperó el sobrenadante. Se repitió la elución 2 veces más, obteniendo un volumen final de 60 μ L por elución. El pH de la muestra se equilibró añadiendo 1/10 de volumen de tris 0.5M pH 8 mientras que el de las partículas se recuperó lavando de nuevo 2 veces con 1mL de solución B. Este proceso se repitió, no más de 10 veces, reutilizando las mismas partículas y añadiendo muestra fresca cada vez.

Tras la inmunoprecipitación se comprobó por western blot la presencia de Brox en las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo sp-AbBrox y su ausencia en las muestras inmunoprecipitadas con el suero preinmune.

14.4 Identificación de las proteínas precipitadas

Para conocer la cantidad de muestra necesaria para la identificación por masas, se sometió a electroforesis en geles de acrilamida Mini-Protean TGX 10% (BIO-RAD) 30 μ L de cada inmunoprecipitación. Tras la electroforesis se fijó el gel mediante dos incubaciones de 30 minutos con solución de fijación (50% metanol, 7% ácido acético) y luego se tiñó incubando durante toda la noche en oscuridad con SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen). Después de la tinción se lavó dos veces durante 30 minutos con solución de lavado (10% metanol, 7% ácido acético). Antes de colocar sobre la lámpara de UV para la visualización se lavó dos veces durante 5 minutos con agua pura para evitar que los restos de acético dañen el equipo de imagen.

Las muestras de la inmunoprecipitación con sp-AbBrox y anticuerpos preinmunes fueron analizadas por el centro de Biología Molecular del Instituto Severo Ochoa de Madrid, para su identificación por LC-MS/MS: alta resolución, gradiente medio: LTQ-ORBITRAP-VELOS-PRO.

15. Análisis estadístico

Los datos obtenidos acerca de la expresión de los distintos genes en las muestras de células transfectadas con SGK1.1 activo, SGK1.1 no activo y células no transfectadas se valoraron estadísticamente usando el test t de student para muestras independientes. Las relaciones entre la expresión de los diferentes genes se analizó mediante el test de correlación de Pearson.

Material y métodos

En todos los casos se utilizó para el análisis el paquete estadístico Spss y se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0.05$.

Resultados

1. Expresión SGK1.1 activo y no activo

Con el fin de comprobar la correcta expresión de las construcciones empleadas para originar un SGK1.1/SGK1.1FF activo o no activo en células HeLa se procedió a analizar la presencia de las mutaciones introducidas así como la eficacia de la transfección de las mismas.

1.1 Validación de las construcciones

Cómo se explica en el apartado correspondiente del material y métodos, se generaron dos construcciones diferentes de SGK1.1 y dos de SGK1.1FF que fueron introducidas en el vector pcDNA 3.1 TOPO (Invitrogen). Cada construcción consistía en la introducción de una mutación puntual que conllevaba el cambio de un aminoácido en el producto final:

- **S515D**: que conlleva la expresión de una proteína constitutivamente activa.
- **K127A**: origina una proteína constitutivamente inactiva.
- **FF_{S515D}**: origina una proteína constitutivamente activa cuya expresión es predominantemente nuclear.
- **FF_{K127A}**: conlleva la expresión de una proteína constitutivamente inactiva con expresión es predominantemente nuclear.

Antes de proceder a la expresión en células HeLa, la presencia dentro del inserto de la mutación deseada en cada caso fue comprobada mediante secuenciación.

1.2 Validación de la transfección

Cómo se explica en el apartado correspondiente del material y métodos, se probó la eficiencia de transfección de 3 lípidos mediante la

Resultados

transfección de GFP. Se decidió usar lipofectamin 2000 por tener una eficacia de transfección mayor (aproximadamente un 80% de células transfectadas frente a no más de un 40% con los otros lípidos). Además, los sistemas Fugene 6 y Fugene HD producían una mayor mortalidad de las células en cultivo.

Se obtuvieron cuatro muestras de células HeLa transfectadas cada una con una construcción diferente de SGK1.1 además de un control negativo correspondiente a células HeLa transfectadas con el vector vacío. El resultado de la transfección fue analizado primero por PCR a tiempo real del cDNA obtenido de la transcripción reversa del RNA total de las células (Tabla 5) y complementariamente mediante western blot usando el anticuerpo anti-SGKct (Figura 13).

Expresión por RT-PCR

	Expresión relativa
SGK 1.1_{S515D}	52,851
SGK 1.1_{K127A}	4,419
SGK 1.1FF_{S515D}	18,301
SGK 1.1FF_{K127A}	14,359
pcDNA 3.1 –	0

Tabla 5. qRT-PCR. Expresión de SGK1.1 en células transfectadas con las distintas construcciones y con el vector vacío. Los valores corresponden a la expresión relativa a β -Actina x 100.

Usamos la expresión del gen de la β -actina como gen de referencia para determinar la diferencia de expresión de SGK1.1 entre las células transfectadas con las distintas construcciones y las transfectadas con el vector vacío, tabla 5. La expresión de SGK1.1 varía según la construcción transfectada pero en todos los casos es al menos cuatro veces mayor que en el control (tabla 5).

Resultados

Comprobación por WB

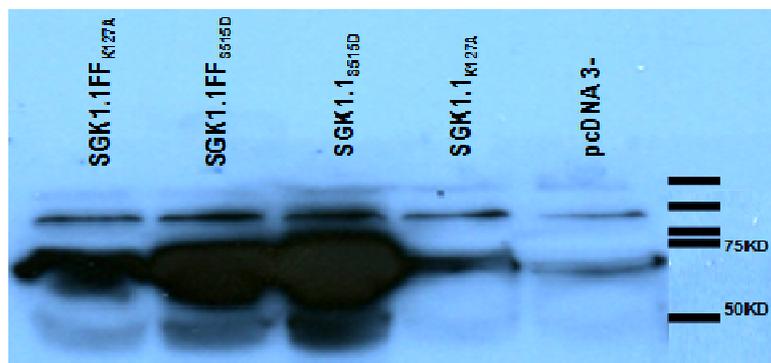


Figura 13. Western Blot con anti-SGK1 ct. La expresión de SGK1 en células transfectadas con SGK1.1FF_{K127A}, SGK1.1FF_{S515D}, SGK1.1_{S515D} y SGK 1.1_{K127A} es mayor que en el control negativo, pcDNA 3-.

Células transfectadas con las construcciones SGK1.1FF_{K127A}, SGK1.1FF_{S515D}, SGK1.1_{S515D} y SGK 1.1_{K127A} se lisaron en 25µl de volumen total y se sometieron a electroforesis; figura 13, líneas 1-4 respectivamente. Todas las muestras presentan una banda de mayor intensidad que la de la línea marcada como pcDNA 3.1-, que corresponde a la lisis de células transfectadas con el vector vacío.

2. Construcción de la genoteca

Con el fin de estudiar el efecto de SGK1.1 en la regulación de la expresión de genes en células HeLa, se realizó una hibridación sustractiva de supresión (SSH). El objetivo de esta técnica es eliminar mediante hibridación los cDNAs igualmente representados en dos poblaciones diferentes para luego amplificar por PCR los específicos de una sola condición. De esta manera se obtuvo un conjunto de cDNAs cuya expresión es mayor cuando las células expresan SGK1.1 activo.

Para comprobar que se haya producido la sustracción de los cDNAs igualmente representados, se corre en un gel de agarosa la muestra antes y después de la sustracción.

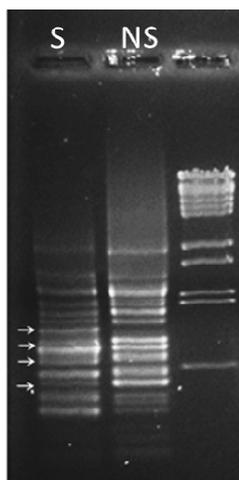


Figura 14. Electroforesis del cDNA de células transfectadas con SGK1.1S515D antes de sustraer (NS) y después de la sustracción (S). Se observa como el patrón de bandas cambia tras la sustracción. Algunos de los cambios más significativos se señalan con flechas.

Tras realizar la sustracción, el resultado de la PCR para amplificar los cDNAs con mayor expresión en presencia de SGK1.1 activo es sometido a electroforesis en gel de agarosa (línea marcada como S). En el mismo gel se carga como control la misma muestra pero sin sustraer (línea marcada como NS). En la figura 14 se aprecia como el patrón de bandas cambia sustancialmente tras realizar la sustracción.

3. Muestreo

Para poder identificar aquellos cDNAs con diferencia de expresión entre células que expresan SGK1.1 activo y células que expresan SGK1.1 no activo se realizaron dos muestreos mediante dot-blot. En primer lugar se realiza un dot-blot de colonia y sólo los clones positivos son sometidos a un segundo dot-blot realizado directamente con el inserto.

3.1 Dot-blot de colonia

Aquellos genes con una mayor expresión en células transfectadas con SGK1.1 activo presentan una mayor señal en la membrana sondada con la sonda activa (A = cDNA de células transfectadas con SGK1.1S515D después

Resultados

de la sustracción marcado con digoxigenina) que en la sondada con la sonda no activa (NA = cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{K127A} después de la sustracción marcado con digoxigenina).

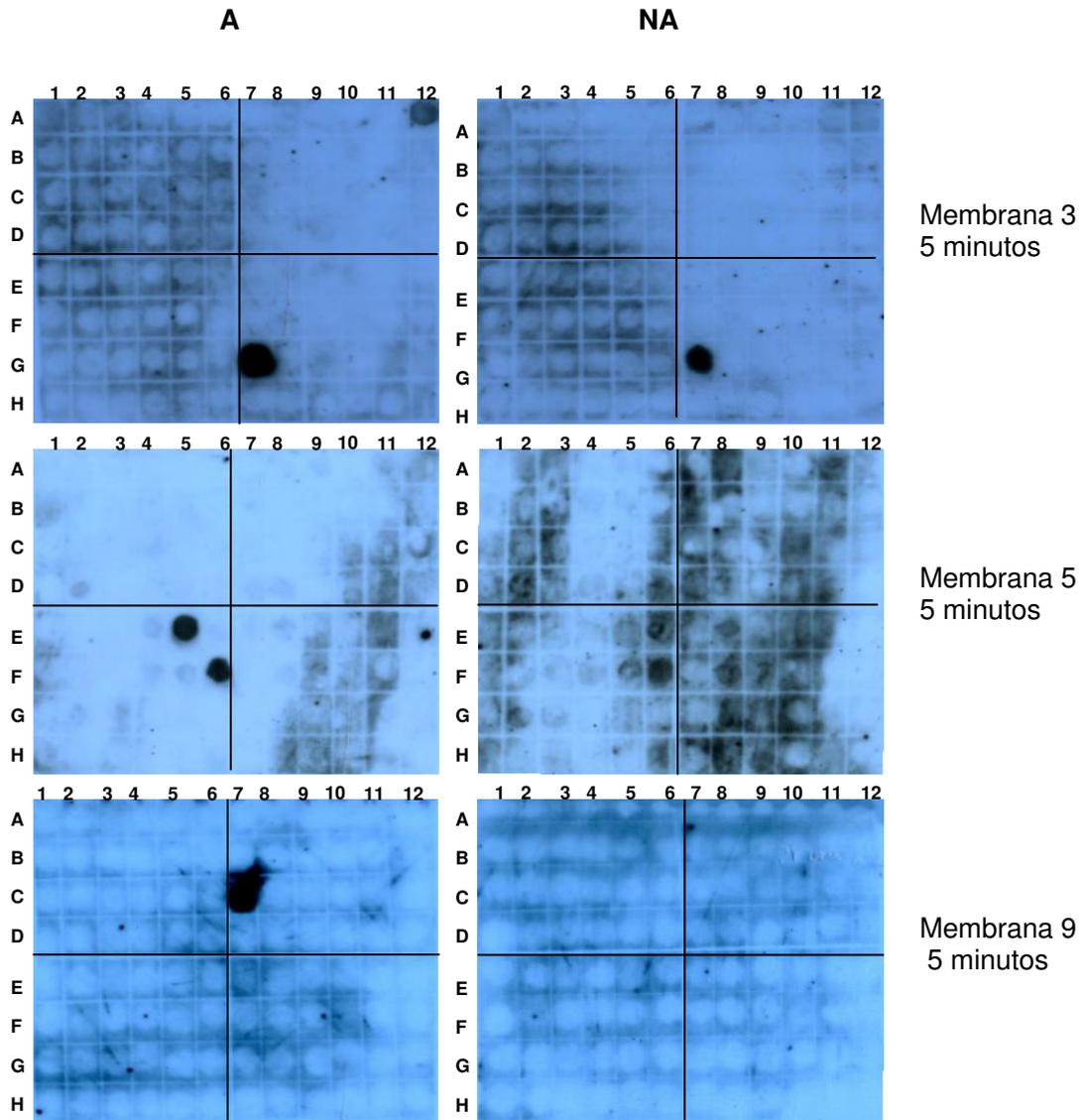


Figura 15. Resultado del Dot Blot de colonias para algunas de las membranas analizadas. Se muestran 3 pares de membranas diferentes. Cada par de membranas es idéntico, pero sondado con diferentes sondas (A= cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{S515D} después de la sustracción marcado con digoxigenina; NA= cDNA de células transfectadas con SGK1.1_{K127A} después de la sustracción marcado con digoxigenina). En cada una, la señal fue revelada tras 5 minutos de exposición. Los clones seleccionados fueron aquellos con una expresión mayor en la membrana sondada con la sonda activa (A).

Resultados

De las 960 colonias analizadas, se seleccionaron 27 como positivas. Estas mostraban una intensidad, al menos, dos veces mayor en la membrana A que en la NA, la figura 15 muestra algunos ejemplos de las seleccionadas.

3.2 Dot-blot de DNA

Para confirmar la diferencia en la expresión de las muestras, los 27 fragmentos de DNA que dieron positivos en el dot-blot de colonia se analizaron por dot-blot de DNA. Para ello se amplificaron los insertos mediante PCR con oligonucleótidos para los promotores T₃ y T₇ que flanquean al inserto en el vector.

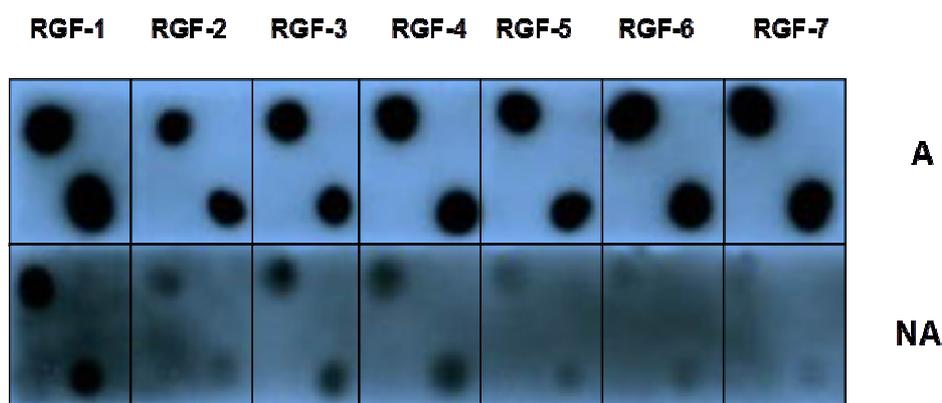


Figura 16. Dot Blot de DNA de las primeras 7 muestras hibridadas con las sondas activa (A) e inactiva (NA). Comprobamos que se mantiene la diferencia en intensidad observada en el dot blot de colonias.

En las 27 muestras chequeadas se observó una señal varias veces mayor en las membranas hibridadas con la sonda A con respecto a las hibridadas con la sonda NA (figura 16).

Resultados

3.3 Resultados de la secuenciación

Las secuencias obtenidas, usando oligonucleótidos del promotor T₃ o T₇, son las que se muestran en las figuras 17-25.

RGF-1

```
AACCNTGCAATGATTTTTACAAATATCTTTTCTAGTGGGTTTTTACTTAGAGGAAAGAACTTTGTAATA
GCTCTTAATGTTTATATATAAGAGAAGACAGAATGGAAGATGTTTTTTGAAGTCAAATATTGCATGATGT
AAAGAAAAAATTTAAACTTAAATGAGTAGGTTGTCCTGAATTACACTGGTAACTCTCTACTTCTTTATT
AAAGAAGTTATAGTAAGATGCCTTTGTTACCTGATTTTCAGTGTACATTGTTTTTATGTGGTTTTCTGATA
ATGTCCGTGCAGAATTGTATTGGTTTAGGCCAAAGGCCGTAGCAAAAACATAGAGAACAAATATGATCTT
AAAAATAGATTGTAACATTTTAAACAATTAGTTTAGTAATTTGGGAAATAGTGGATGCATAATACTTTAA
CAGAAGTCACACATCTGTAGGTTTATCTTTTGATTATTCTCCTGAGGCATTAGATAGTTTTTCTATTATA
AGTGACAGATTGACTCACTTAATATAAATAAGTAGCATACACTAAAAGCTTACTATGTGC
```

Figura 17. Secuencia del clon RGF-3. La secuencia muestra una homología del 94% con el cromosoma 1 ORF 58 de *Pongo abelii* (BRO1 domain and CAAX motif containing, Brox).

RGF-2

```
GGCCGCCCGGCAGGTACACAATATTGGTTCCTGGAAAAATAGCTGTTTCTTCATAAGATACCCAAGTGA
TAATTTTTTTTTCCCTAGACTGTCAGGCCATGAGTAAATACTAAATCTATTAGCTGTCCCACTCATAA
ACCAAACCAAACAAATACAAACAGATGAGGAGAGGAAATGTAGTAACAAATACTGGCTGGGTCTTATGA
TTGGGATGAGTGATTTTATAAGATAATATGGTGATAATTTTATTCTAGGATTTTATTTTATGGCCTAATA
TAGGAATGTTTAAAAAAGGCTCTTCTATGAAAATTAGAAATTTATACTTGAAATTTAAAGTCTAGAAGGG
GGAGGACCTTAAAGCTAAGCTACCAGTAAGACAATGAATAATTCAGAAGAGAACACTATTCTTTTACTTG
ACTGAGTGCCCAAGATGCCAATTTTCCATGAAAGTCTTTGATTTATATATCATGTACCTCGGCCGGCGGC
ACCGCAGGTGGAGCTCCAATTCGSCCTATAGTGAGTACGTATTACAATTCACCTGGCCGTACGTTTTTAC
AACGTACGATGACTTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGGCAGGCACATCCCCCCTTT
TACGCCCAGCTTGGCGTAATAGCGAAAGAAGGCCAGGACGATCAGACCTTTCCAACACAGGTTAGAGAC
ARCCTTGAATTGGG
```

Figura 18. Secuencia del clon RGF-2. La secuencia muestra una homología del 97% con el atanogen 4 asociado a BCL2 (BCL2-associated athanogene 4, BAG4).

RGF-3

```
GGTACATAAATCAGTGAGGTTTCCCTCTTAACATACAGAAGTACTAAATACTGCTTGCAGTATAATATTG
ATATTGGAAGCTGCAGTTTCCAGAATAAGTGGAGTAATAACTAAACAGACATTTAATTTTATTTCAATAT
CTATGGAAAAAACGCTTATTAAATCTCCCTGTATTTTATGTTGTCTTTATTACAGAATCACTTGTCTGTT
TGTGTGTGCCACTTACTGACAAAACTTTAAACAGTACTTGTATGCCAGCTCTCTACTCTGTGGCTGTGGG
ACCTGTTTCTTTTAGGCCTTGTGCTTATTAATCTACTTACTAAATTTTACATTGACATTTTTGGGGAT
GATAC
```

Figura 19. Secuencia del clon RGF-3. La secuencia muestra una homología del 94% con el cromosoma 1 ORF 58 de *Pongo abelii* (BRO1 domain and CAAX motif containing, Brox).

Resultados

RGF-4

```
tttttttcttttttttttttCCCTTGTTTGTGGTGGAGTCTCCCTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTG  
GCATGATCTCGGCTCACTGCAACCCCTCCACCTCCTGAATTAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAG  
TAGCTGGGATTACGGGCACGCACCCTACACCCAGATAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGTGATTTCA  
CCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAATCCTGACCTCAGCTGATCTGTCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCT  
GGGATTACAGGCGTGATCCACTGCACCTGGCCTCAGGTATGTTTTATCTATCTACACACAAAAAGTTTAT  
TTTCCTTCCTCTTATTTGATATCAGAAGAATGACAGGAATCAGTTTTTAACAGAGATAGTTTTCCGTTT  
CTCCATTGTGTTAATCAGAGCGCAGACTTACATTCTCAGTCATTTATCTTTTCTGGTGGAGAATAAAAAG  
TCACTTATAGTTAAAGATCAGAAAATTATCACACCAAATCCATAACATATGTTAGAATCAATAATTTACT  
CAAAAATCAGCTTTTATAGGTATGTTGGCACCT
```

Figura 20. Secuencia del clon RGF-4. La secuencia muestra una homología del 95% con el cromosoma 1 ORF 58 de *Pongo abelii* (BRO1 domain and CAAX motif containing, Brox).

RGF-5

```
CCCGGGCAGGTACAGCTGGTGCTTAGTTTTTTTTTAATCTAAATTTAATTACCTTATTGGATATTTGATA  
TTTGGTTATTTAATCACAGTCATCTTTAACAGCTTACACTGATTGGTGTTTTATCTCCTGTGATCCTTTG  
ATGGCTTTTTTTGCCACCATTTCACAGAGGTTTAGACAGCAGTAGTAGCTCCCTAGGAGAGTTTACTGA  
TGAAACAGCCTCTGCAAGATTTTAAAAGTTTTGTTCTTTTATAGACTGATTTAGAAAACAAATGATTAG  
TTAAAAAAGAAAATATACATTTGTTGGTAACATAATGTTATTTTTTAAAACCTGGACCTTTCTGGAAGGG  
CAGCATATAAAAACATCAGTCCCAGGAGGGGACAACAATACTACCTCACTACTACATCTGTGATGACTG  
GTTGTTCAAACACAATGGAGTGTGTAAGGTATATGTTTTATAATTCATAACCATAGCCTCGCTCATCAAG  
AAATACTTTCGAAATTTCAATTTCCCTTCAGAATATCTTAAGAGTGCTAAACTTTTTAACTGACCTTTAGT  
CGAGTCAAACGTGGGATTCGATTTGTATTTAAATTTGAAGCTCCTCACTGGTATATTATCATCCTGGA  
GGGGTGTGTATGGCTGAGCAGAGAGAGAGATGAGAGAAGAACTGTGTGTGTGAGWGGTAGTAGTGTA  
GTAGTTGAACAC
```

Figura 21. Secuencia del clon RGF-5. La secuencia muestra una homología del 98% con la radixina humana.

RGF-6

```
GGCGAGGTACTCTTTGGGCAATTAATGCCTTCTCTGTAATTACATCTCGTTTTTGCCTGACAGTGACCTA  
CCAGTAATTGCATCGTGCAATGCCATGAAAGGTAAACCACATTGTGAACTGAACTTACCAAGCAGATTC  
TGTGAGAAAGCACTTGGTTTGAGGCTGAACACTGTTGACACATCATTTTTATTGGAAGAGTATTAAGTGG  
TGCCCTTCTGAAACACACCAACCATATTCCTCTGCTCCCCAAAGCTGTTTCTGATCCTGCTGGGAGCA  
ACTAACTAGTTATTATGCACATCTGGTCCAGACCCAGCTCTTTAACTTCATGGTTTTACAGCTTGTTTTT  
ACTTNTTCCTTTCTTTTANTTCTCTTNATTTAAAACAATGCACCTTTATAAAGTATCGTA
```

Figura 22. Secuencia del clon RGF-6. La secuencia muestra una homología del 96% con la lisocardiopina aciltransferasa (LYCAT).

RGF-7

```
GGCGAGTACTTACTTTTAGAAATTAGAGACAGTAACTCCAAAAATGATTGTCCTTTTTCTTTCTTTTT  
TTTTTTACAATAAGGCTCTTGAAAATTGTCCATTACTTGTGTTTTCCCTATACATTCATCTGTGTGAAA  
GCCTTTTTCTTTTTGATTTAAAAAATTAACATAACAGTTAATGGTTTTAGAACTTAGAACTACTTAGAA  
TTAATGCTAAAGTGTGAGTAAGAAATTAATTTAGCTTCAATAATTGTGACTGGCCTCAGGAATTCCTCCT  
TCCACACCTGCCACCTCACCTCACCTCACCTCACCGACCGCACCAGAGCCAGAGCAGCTGCTTG  
TCTGCAGCAGGACACAGTTCCTACATACGTTTTAGTTTTTTCATGGTAAGCTCAATGGACTTTGAATTTG  
TTTACAGTGTGTATGTCCAATTGTTAAATGTACC
```

Figura 23. Secuencia del clon RGF-7. La secuencia muestra una homología de 98% con la lisocardiopina aciltransferasa (LYCAT).

RGF-13

```
GGGCCCCCTCGAGGCCGACGGTTTAAATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCCTGGGGATCCACTAG  
TTCTAGAGCGGCCCTATTTTAAAGCTTTAAAATTCCTTCTTGCCAGCATTTTTTTCAGCTAAAAAATCATT  
TCACGAATGGCCG
```

Figura 24. Secuencia del clon RGF-13. La secuencia muestra una homología del 100% con la subunidad catalítica β de la protein fosfatasa 1 (PPP1CB).

RGF-24

```
GCGAGTACTCAGAGATGGATTTTCATTCTTTGGCTCGGAATGATATTGAAAAATCGTCTGTCTCCTGTTT  
TCTAAGGTGGAAGAATCTGATGAGCCTTTTATGCCTGTTTCAGGCCAAATTTTGAGTTTCATCATGGTGA  
CTATTGAAAAACAGTTTCTGCATGTACTGAGCCGATGACAGACTGGAATCGTTGTGACAATCCTAACCAG  
TCAGTGTCTCTTCATTGACAGACAGCATTGCAGACTCCAAAAAACAATAAAGGGCTACAATCTTC  
AAGTTATTGCAGCATCTGGCTCTTAACACCACAGGAACAGCTCACCCACTGGGCAGTTGACACCATAGA  
GGATCACCTCCGCTCCTTATATGCCAGAGTAGAGTACCTGCCCGGGCGGCCACCAGGTTGGAGCTCCAA  
TTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGGTCGTGACTGGGAAAACCC  
TGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGTGC  
CCGCACCGATCTGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCTGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCG  
CATTAAAGCGCGGGGGTGTGGTGGGTTTAAACCGCCCGGCCAAGCCGTTGGGAACCCCGGGTTTAC  
ACTTTTGGCCAAGGCTGCCCTTACGCCCCGGCTCCTTTTTTCGCTTTTCTTTCCCTTTT
```

Figura 25. Secuencia del clon RGF-24. La secuencia muestra una homología del 93% con el cromosoma 6 ORF 62.

Mediante dot blot también se detectaron falsos positivos que resultaron contener como insertos fragmentos procedentes del vector utilizado en la transfección de las células HeLa.

4. Cuantificación como mRNA de la expresión de los genes encontrados

Con el fin de confirmar la diferencia de expresión de los genes obtenidos de la sustracción se procedió a analizar su expresión por qRT-PCR. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los 6 genes obtenidos así como para el gen de la β -actina, usado como gen de referencia (tabla 6). La expresión fue analizada en 20 cultivos independientes de células HeLa transfectadas con SGK1.1 activo (A) y 20 transfectadas con SGK1.1 no activo (NA). Como control, se analizó la expresión en 20 cultivos no transfectados en los que en lugar de plásmido se añadió agua (NT). Se analizó también la expresión de SGK1.1 como control de la transfección. Así mismo, con objeto de estudiar si la localización subcelular de SGK1.1 afecta a la regulación de los genes estudiados, se analizó la expresión de los mismos en 20 cultivos independientes de células HeLa transfectadas con SGK1.1FF activo (FF.A) y 20 transfectadas con SGK1.1FF no activo (FF.NA).

4.1 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados usando el paquete estadístico Spss. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

Diferencia de medias

Se analizó, usando la T de Student, la diferencia de medias de expresión entre los cuatro casos estudiados: células transfectadas con SGK1.1 y SGK1.1FF activo (A y A-FF, respectivamente), células transfectadas con SGK1.1 y SGK1.1FF no activo (NA y NA-FF, respectivamente) y células control no transfectadas (NT).

Resultados

	A	NA	A-FF	NA-FF	ST
BAG4	96.5 ± 13.9 ^a	41.3 ± 6.1 ^b	26.4 ± 1.6 ^c	29.7 ± 2.4 ^{b/c}	57.2 ± 13.3 ^b
Brox	178.8 ± 22.8 ^a	81.7 ± 13.8 ^b	44.9 ± 1.6 ^c	48.6 ± 4.3 ^c	232.3 ± 48.9 ^a
LYCAT	319.9 ± 47 ^a	196.6 ± 26.3 ^{b/c}	219.9 ± 18.0 ^{a/b/c}	192.1 ± 16.0 ^c	265.6 ± 27.9 ^{a/b}
PPP1CB	2492.9 ± 363.5 ^{a/c}	1528.0 ± 186.1 ^b	1696.7 ± 63.6 ^b	1950.6 ± 145.9 ^{a/b}	3411.6 ± 507.0 ^c
RDX	1355.0 ± 215 ^a	829.7 ± 142.8 ^b	1003.1 ± 52.2 ^{a/b}	842.6 ± 63.7 ^b	2905.8 ± 331.2 ^c
C6ORF62	4684.2 ± 638.8 ^a	4341.8 ± 676.6 ^a	4794.1 ± 408.3 ^a	6788.2 ± 434.4 ^b	4603.6 ± 739.5 ^a
SGK1.1	152235.4 ± 46665.3 ^a	36030.0 ± 8127.2 ^b	49423.5 ± 4659.9 ^b	12540.2 ± 1503.7 ^c	1.5 ± 0.3 ^d

Tabla 6. Medias ± error típico de la expresión relativa de los genes analizados en las muestras A (células transfectadas con SGK1.1 activo), NA (células transfectadas con SGK1.1 no activo), A-FF (células transfectadas con SGK1.1FF activo), NA-FF (células transfectadas con SGK1.1FF no activo) y NT (células no transfectadas). Las letras representan las diferencias estadísticamente significativas: diferentes letras entre dos valores supone que existen diferencias estadísticas en la expresión mientras que la misma letra indica que no hay diferencia estadística entre la expresión. N=20.

Resultados

SGK1.1. La expresión de SGK1.1 en NA y A-FF es mayor que en NA-FF y menor que en A. En las células control (NT) la expresión es estadísticamente menor que en las células transfectadas con cualquiera de las construcciones.

BAG-4. La expresión de BAG-4 en las células transfectadas con NA y NA-FF no se diferencia del control. La expresión de BAG-4 en células transfectadas con A-FF es estadísticamente inferior al control y a las células transfectadas con NA. La expresión en células transfectadas con A es estadísticamente mayor que en el control y que en las células transfectadas con las demás construcciones (figura 26).

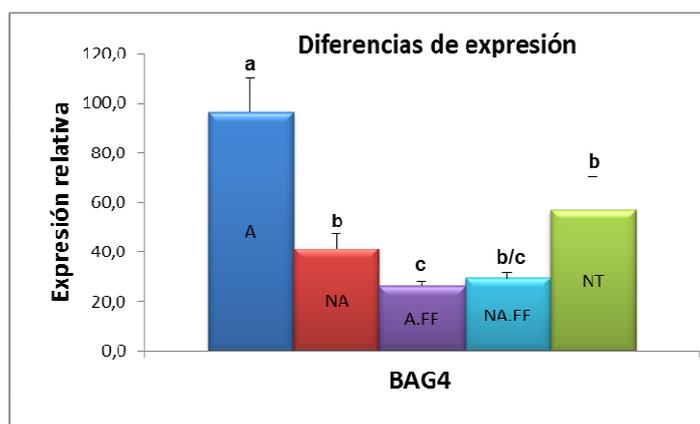


Figura 26. Diagrama de la expresión media relativa a actina de BAG-4 en las muestras A (células transfectadas con SGK1.1 activo), NA (células transfectadas con SGK1.1 no activo), A-FF (células transfectadas con SGK1.1FF activo), NA-FF (células transfectadas con SGK1.1FF no activo) y NT (células no transfectadas). Las letras representan las diferencias estadísticamente significativas: diferentes letras entre dos valores supone que existen diferencias estadísticas en la expresión mientras que la misma letra indica que no hay diferencia estadística entre la expresión. Las barras indican el error típico. N=20.

Brox. La expresión de Brox en células transfectadas con A no se diferencia de la expresión en el control sin embargo, ambas muestran una expresión mayor que la de las células transfectadas con NA, NA-FF y A-FF (Fig.27).

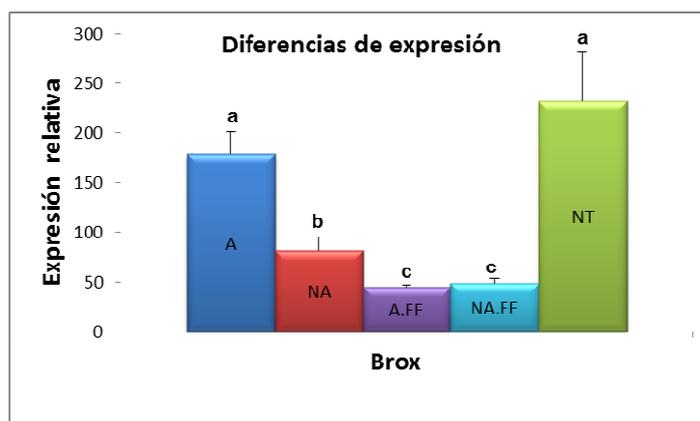


Figura 27. Diagrama de la expresión media relativa a actina de Brox en las muestras A (células transfectadas con SGK1.1 activo), NA (células transfectadas con SGK1.1 no activo), A-FF (células transfectadas con SGK1.1FF activo), NA-FF (células transfectadas con SGK1.1FF no activo) y NT (células no transfectadas). Las letras representan las diferencias estadísticamente significativas: diferentes letras entre dos valores supone que existen diferencias estadísticas en la expresión mientras que la misma letra indica que no hay diferencia estadística entre la expresión. Las barras indican el error típico. N=20.

LYCAT. La expresión de LYCAT es estadísticamente mayor en células transfectadas con A que en células transfectadas con NA y NA-FF. El valor de expresión de LYCAT en el control y en células transfectadas con A-FF es intermedio (figura 28).

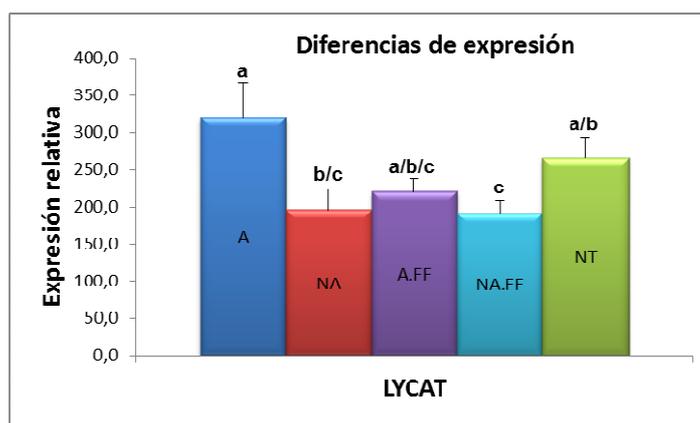


Figura 28. Diagrama de la expresión media relativa a actina de LYCAT en las muestras A (células transfectadas con SGK1.1 activo), NA (células transfectadas con SGK1.1 no activo), A-FF (células transfectadas con SGK1.1FF activo), NA-FF (células transfectadas con SGK1.1FF no activo) y NT (células no transfectadas). Las letras representan las diferencias estadísticamente significativas: diferentes letras entre dos valores supone que existen diferencias estadísticas en la expresión mientras que la misma letra indica que no hay diferencia estadística entre la expresión. Las barras indican el error típico. N=20.

Resultados

PPP1CB. La expresión de PPP1CB en células transfectadas con A y en células control (NT) es estadísticamente mayor que en las células transfectadas con NA y A-FF. En células transfectadas con NA-FF la expresión de PPP1CB es intermedia a la de las células transfectadas con las demás construcciones (figura 29).

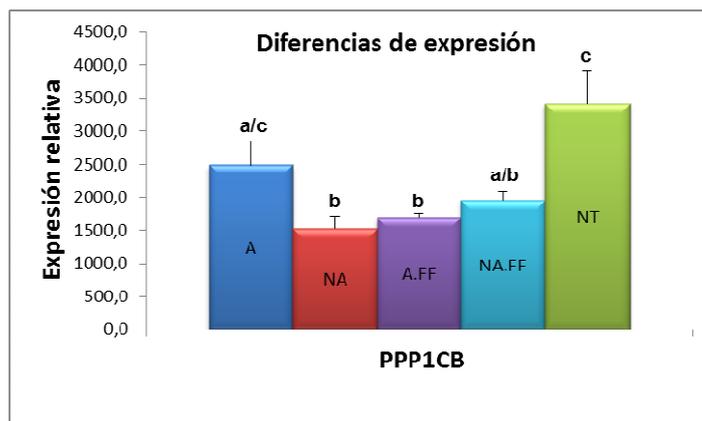


Figura 29. Diagrama de la expresión media relativa a actina de PPP1CB en las muestras A (células transfectadas con SGK1.1 activo), NA (células transfectadas con SGK1.1 no activo), A-FF (células transfectadas con SGK1.1FF activo), NA-FF (células transfectadas con SGK1.1FF no activo) y NT (células no transfectadas). Las letras representan las diferencias estadísticamente significativas: diferentes letras entre dos valores supone que existen diferencias estadísticas en la expresión mientras que la misma letra indica que no hay diferencia estadística entre la expresión. Las barras indican el error típico. N=20.

RDX. La expresión de RDX en células transfectadas con A es estadísticamente inferior que la expresión en células control, pero mayor que la expresión en células transfectadas con NA y NA-FF. La expresión en células transfectadas con A-FF es intermedia a la de las células transfectadas con las demás construcciones (figura 30).

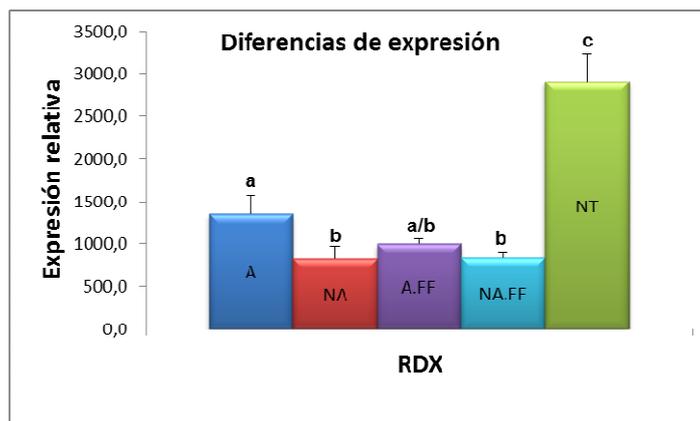


Figura 30. Diagrama de la expresión media relativa a actina de RDX en las muestras A (células transfectadas con SGK1.1 activo), NA (células transfectadas con SGK1.1 no activo), A-FF (células transfectadas con SGK1.1FF activo), NA-FF (células transfectadas con SGK1.1FF no activo) y NT (células no transfectadas). Las letras representan las diferencias estadísticamente significativas: diferentes letras entre dos valores supone que existen diferencias estadísticas en la expresión mientras que la misma letra indica que no hay diferencia estadística entre la expresión. Las barras indican el error típico. N=20.

C6ORF62. La expresión de C6ORF62 en células transfectadas con NA-FF es estadísticamente mayor que en las células control y las transfectadas con las demás construcciones cuyos niveles de expresión no presentan, en ninguno de los casos, diferencias significativas (figura 31).

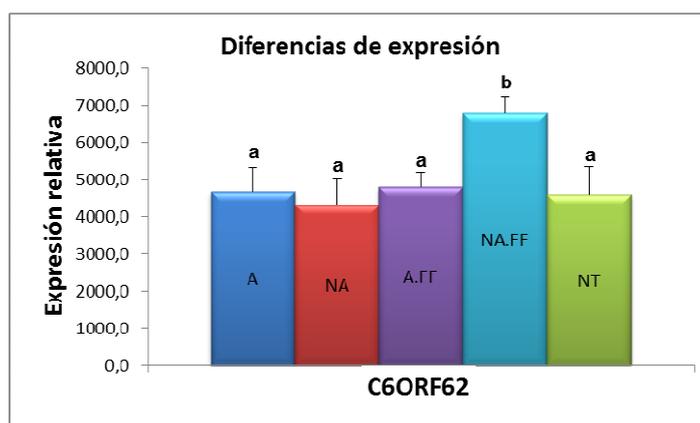


Figura 31. Diagrama de la expresión media relativa a actina de C6ORF62 en las muestras A (células transfectadas con SGK1.1 activo), NA (células transfectadas con SGK1.1 no activo), A-FF (células transfectadas con SGK1.1FF activo), NA-FF (células transfectadas con SGK1.1FF no activo) y NT (células no transfectadas). Las letras representan las diferencias estadísticamente significativas: diferentes letras entre dos valores supone que existen diferencias estadísticas en la expresión mientras que la misma letra indica que no hay diferencia estadística entre la expresión. Las barras indican el error típico. N=20.

Resultados

De los 6 genes identificados en la sustracción como genes que se expresaban más cuando SGK1.1 está activo, sólo C6ORF62 no se validó por PCR a tiempo real.

5. Cuantificación de la expresión como proteína de los genes regulados por SGK1.1

Una vez validada la expresión diferencial de los genes obtenidos en la sustracción por qRT-PCR se procedió a analizar la expresión de las proteínas mediante western blot. Para Brox se cuantificaron por separado las dos bandas correspondientes a la proteína (Brox-1 y Brox-2), así como la suma de las mismas (Brox). Además se analizó la expresión de SGK1 como control de la transfección. Se analizaron 8 cultivos para cada condición: células transfectadas con SGK1.1 activo (A), células transfectadas con SGK1.1 no activo (NA) y células control sin transfectar (NT).

En cada caso tras realizar la transfección las células fueron recolectadas y separadas en dos fracciones. Una se destinó para western blot y la otra para RT-PCR (Tablas 7 y 8, respectivamente).

5.1 Análisis estadístico

Los datos de expresión en western blot fueron analizados usando el paquete estadístico Spss. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Diferencia de medias

Se empleó el test de T de Student para comparar las medias de expresión en células transfectadas con SGK1.1 activo, células transfectadas con SGK1.1 no activo y células sin transfectar, figura 32.

Resultados

	A	NA	NT
BAG	0.73 ± 0.17 ^a	0.33 ± 0.09 ^a	0.08 ± 0.01 ^b
BROX-1	0.85 ± 0.16 ^a	0.37 ± 0.03 ^b	0.6 ± 0.1 ^a
BROX-2	0.91 ± 0.17 ^a	0.34 ± 0.03 ^b	0.56 ± 0.08 ^a
BROX	1.73 ± 0.31 ^a	0.71 ± 0.05 ^b	1.16 ± 0.19 ^a
PPP1CB	1.02 ± 0.19 ^a	0.94 ± 0.21 ^a	0.73 ± 0.08 ^a
RDX	0.51 ± 0.10 ^a	0.48 ± 0.05 ^a	0.58 ± 0.04 ^a
SGK1	2.10 ± 1.15 ^a	1.78 ± 0.82 ^a	0.23 ± 0.09 ^a

Tabla 7. Medias ± error típico de la expresión relativa de las proteínas analizadas en células transfectadas con SGK1.1 activo (A), no activo (NA) y células no transfectadas (NT). Las letras representan las diferencias estadísticamente significativas: diferentes letras entre dos valores supone que existen diferencias estadísticas en la expresión mientras que la misma letra indica que no hay diferencia estadística entre la expresión. N=8.

	A	NA	ST
BAG	69.1 ± 14.8 ^a	40.1 ± 12.5 ^{a/b}	28.9 ± 4.8 ^b
BROX	140.9 ± 36.2 ^{a/b}	58.0 ± 12.4 ^b	150.4 ± 33.5 ^a
PPP1CB	2303.6 ± 336.9 ^a	1544.9 ± 278.1 ^a	1672.0 ± 217.6 ^a
RDX	1162.1 ± 386.1 ^{a/b}	537.9 ± 55.0 ^b	1504.3 ± 140.5 ^a
SGK1	6023.6 ± 2327.2 ^a	3024.5 ± 965.2 ^a	337.9 ± 70.2 ^b

Tabla 8. Medias ± error típico de la expresión relativa de los genes analizados en células transfectadas con SGK1.1 activo (A), no activo (NA) y células no transfectadas (NT). Las letras representan las diferencias estadísticamente significativas: diferentes letras entre dos valores supone que existen diferencias estadísticas en la expresión mientras que la misma letra indica que no hay diferencia estadística entre la expresión. N=8.

SGK1. La expresión de SGK1 es mayor en las células transfectadas, tanto con SGK1.1 activo como con SGK1.1 inactivo, que la expresión en el control. Sin embargo, no existe diferencia significativa probablemente debido a la influencia de la desviación en un N=8 muestras.

BAG-4. La expresión de BAG-4 en las células transfectadas con SGK1.1 activo es algo mayor, aunque no estadísticamente diferente, a la expresión en células transfectadas con SGK1.1 no activo. En los dos casos la expresión es significativamente mayor al control.

Resultados

Brox. La expresión de Brox en células transfectadas con SGK1.1 inactivo es estadísticamente inferior que en células transfectadas con SGK1.1 activo y que en el control. Aunque la expresión en células transfectadas con SGK1.1 activo es mayor que en el control, la diferencia no es estadísticamente significativa.

PPP1CB. La expresión de PPP1CB es algo menor en el control que en las células transfectadas, pero no existen diferencias significativas.

RDX. La expresión de RDX es prácticamente igual en los tres casos.

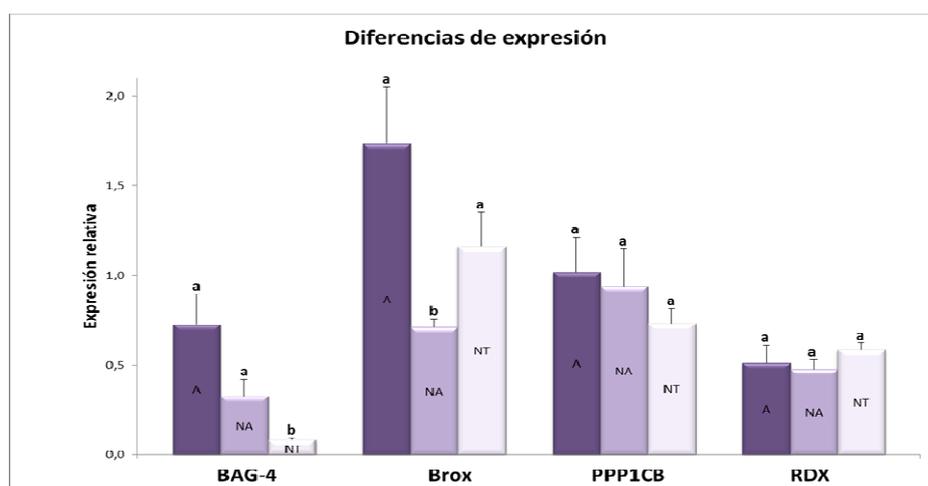


Figura 32. Diagrama de la expresión media, relativa a tubulina, de BAG-4, Brox, PPP1CB y RDX en WB de 8 cultivos independientes de células HeLa transfectadas con A (SGK1.1 activo), NA (no activo) y NT (no transfectadas). Las letras representan las diferencias estadísticamente significativas: diferentes letras entre dos valores supone que existen diferencias estadísticas en la expresión mientras que la misma letra indica que no hay diferencia estadística entre la expresión. Las barras indican el error típico. N=8.

6. Inmunolocalización de las proteínas en las células transfectadas

Con el fin de confirmar la diferencia de expresión de las proteínas observada por western-blot y estudiar la localización de las mismas, se realizaron ensayos de inmunolocalización con fluorescencia. El estudio se

realizó en células HeLa no transfectadas y transfectadas con SGK1.1 activo y no activo, usando anticuerpos específicos para cada proteína (Tabla 4). Así mismo, se realizaron controles negativos en las mismas células que sólo se incubaron con el anticuerpo secundario. Podemos observar en las células la presencia de lo que hemos denominado “agujeros”, que comentaremos en el apartado correspondiente de la discusión, figuras 33 y 34.

6.1 Inmunofluorescencia de BAG-4

La expresión y distribución de BAG-4 en células HeLa control (no transfectadas) se puede observar en la figura 33 paneles A y B. La inmunofluorescencia específica para BAG-4 se localiza fundamentalmente en la zona perinuclear, desde donde parece extenderse hacia el citoplasma. En el citoplasma la proteína no parece estar distribuida de forma uniforme sino en forma de ramificaciones, probablemente asociada al citoesqueleto. La localización en células transfectadas coincide con la del control, si bien la expresión es menor en las células transfectadas con SGK1.1 no activo y mayor en las transfectadas con SGK1.1 activo (figura 33 paneles E y F y figura 33 paneles C y D, respectivamente).

6.2 Inmunofluorescencia de PPP1CB

La expresión y distribución de PPP1CB en células HeLa control (no transfectadas) se puede observar en la figura 34 paneles A y B. La inmunofluorescencia específica para PPP1CB parece localizarse por toda la célula, donde tiene una distribución uniforme. La proteína parece encontrarse distribuida por igual por todo el citosol sin estar asociada a ningún orgánulo. De nuevo, la localización en células transfectadas coincide con la del control. Sin embargo existe una clara disminución de la señal en células transfectadas con SGK1.1 no activo (figura 34 paneles E y F y figura 34 paneles C y D, respectivamente).

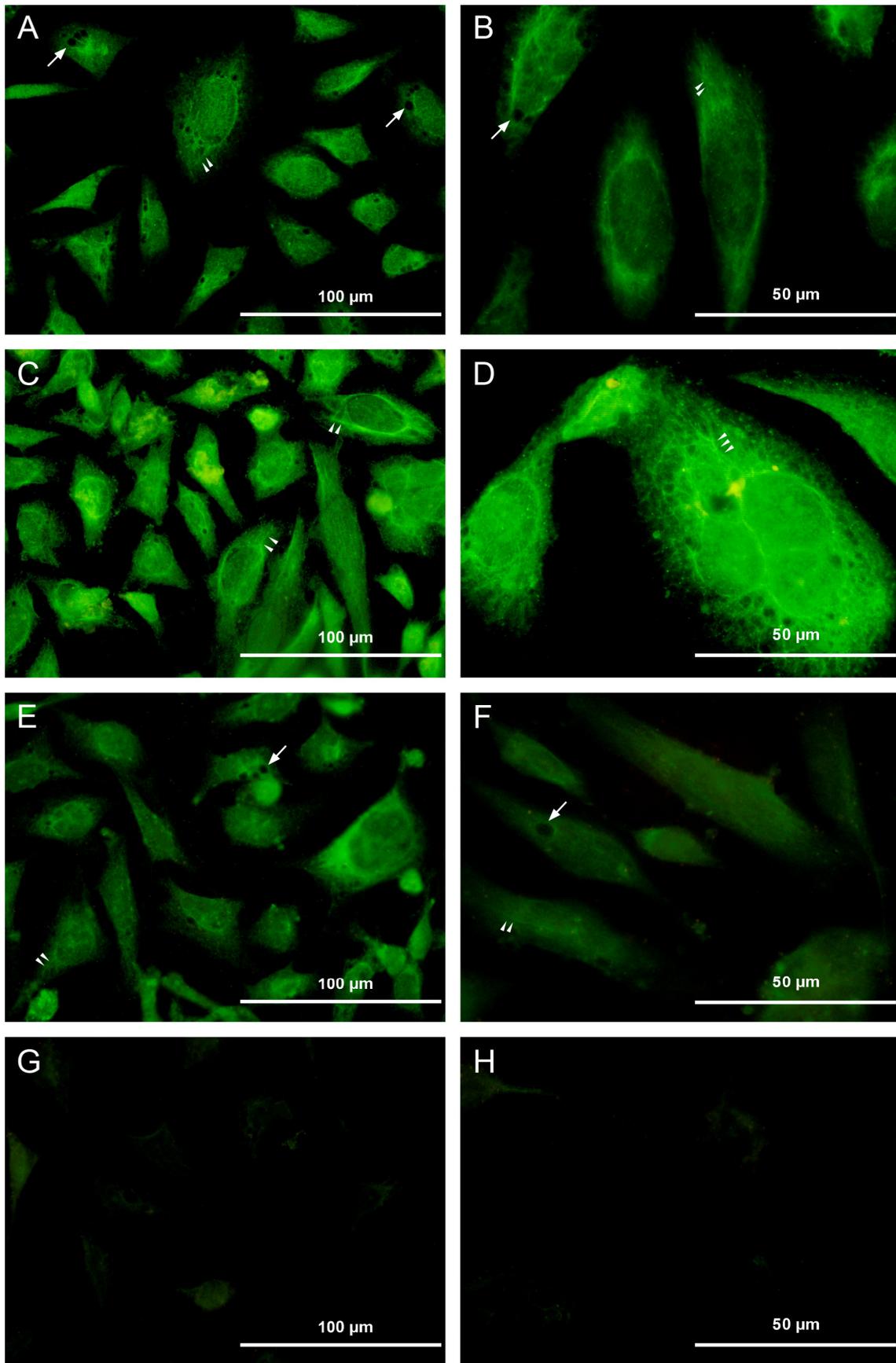


Figura 33. Inmunolocalización por fluorescencia de la proteína BAG-4. En las células control no transfectadas (A y B), BAG-4 se localiza en la zona perinuclear desde donde se extiende radialmente por el citoplasma con ramificaciones. En las células transfectadas (C-F) la distribución no varía, si bien la expresión es mayor en las células transfectadas con SGK1.1 activo (C y D) que en las transfectadas con SGK1.1 no activo (E y F). En el control negativo del anticuerpo secundario (G y H) se puede observar que el marcaje inespecífico del mismo es casi nulo. Las barras indican en cada caso el tamaño correspondiente (100 μ m o 200 μ m). Las puntas de flecha señalan el marcaje específico de BAG4 y las flechas los agujeros presentes en la célula.

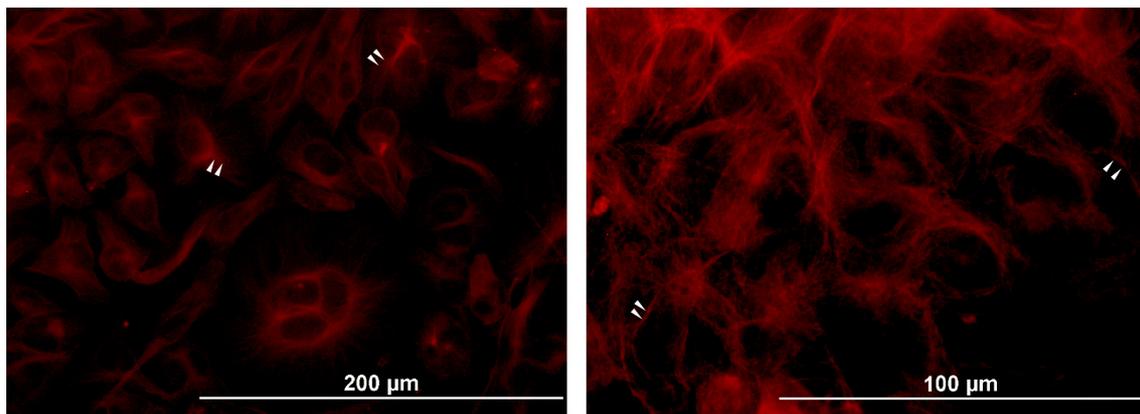


Figura 33-A. Inmunolocalización por fluorescencia de la tubulina. Observamos en células HeLa el marcaje específico para la β -tubulina, proteína que forma parte de los microtúbulos. Las barras indican en cada caso el tamaño correspondiente (100 μ m o 200 μ m). Las puntas de flecha señalan el marcaje específico del citoesqueleto.

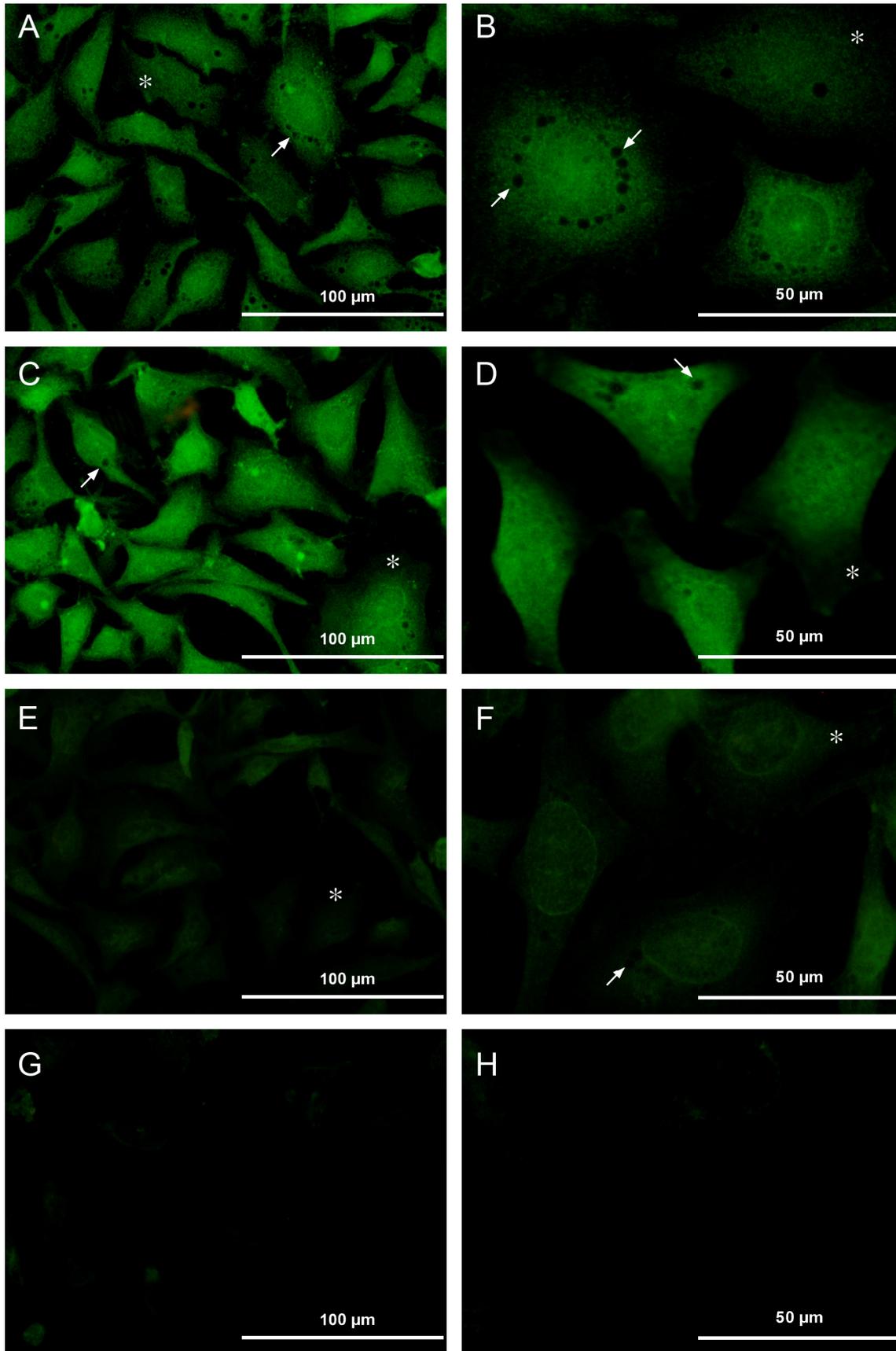


Figura 34. Inmunolocalización por fluorescencia de la proteína PPP1CB. En las células control no transfectadas (A y B), PPP1CB se localiza por toda la célula, donde tiene una distribución uniforme. En las células transfectadas (C-F) la distribución no varía, si bien la expresión en las células transfectadas con SGK1.1 no activo (E y F) es menor que la expresión en las células no transfectadas (A y B) y que en las transfectadas con SGK1.1 activo (C y D). En el control negativo del anticuerpo secundario (G y H) se puede observar que el marcaje inespecífico del mismo es casi nulo. Las barras indican en cada caso el tamaño correspondiente (100 μ m o 200 μ m). Los asteriscos señalan el marcaje específico de PPP1CB y las flechas los agujeros presentes en la célula.

7. Caracterización Brox

Uno de los genes identificados en la sustracción como genes cuya expresión se ve inducida por SGK1.1 fue Brox (BRO1 domain and CAAX motif containing). La proteína Brox pertenece a una familia de proteínas caracterizadas por contener un dominio Bro1. Además Brox contiene un motivo CAAX de unión a lípidos isoprenoides. El dominio Bro1 se une a proteínas del sistema ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) y, por tanto, es característico de proteínas que regulan el tráfico al endosoma. Otros miembros más conocidos de la familia son Alix (apoptosis-linked gene-2 interacting protein X) o RHPN 1 y 2. Sin embargo, la proteína Brox humana es poco conocida.

7.1. Estructura del gen Brox humano

Al realizar el análisis de la secuencia de los clones RGF-1,3 y 4 con la base de datos, estos mostraron homología con el cromosoma 1 ORF 58 de *Pongo abelii* (BRO1 domain and CAAX motif containing, Brox), pero no con ninguna secuencia de humanos (Figuras 17, 19 y 20).

Se compararon las secuencias del ARNm de los 3 clones y de *Homo sapiens* con la secuencia de *Pongo abelii*, figura 35.

El ARNm de *Pongo abelii* tiene una longitud total de 4399pb, mientras que el humano tiene una longitud de sólo 1686pb que corresponden, casi en su totalidad, con la ORF. Las dos secuencias comparten un 98% de homología. Los clones RGF-1, 3 y 4 obtenidos de la sustracción del ADNc de células HeLa, presentan homología con distintas regiones del ARNm de *Pongo abelii* (RGF-1 entre 2602 y 3156; RGF-3 entre 3362 y 3722; RGF-4 entre 1954 y 2549).

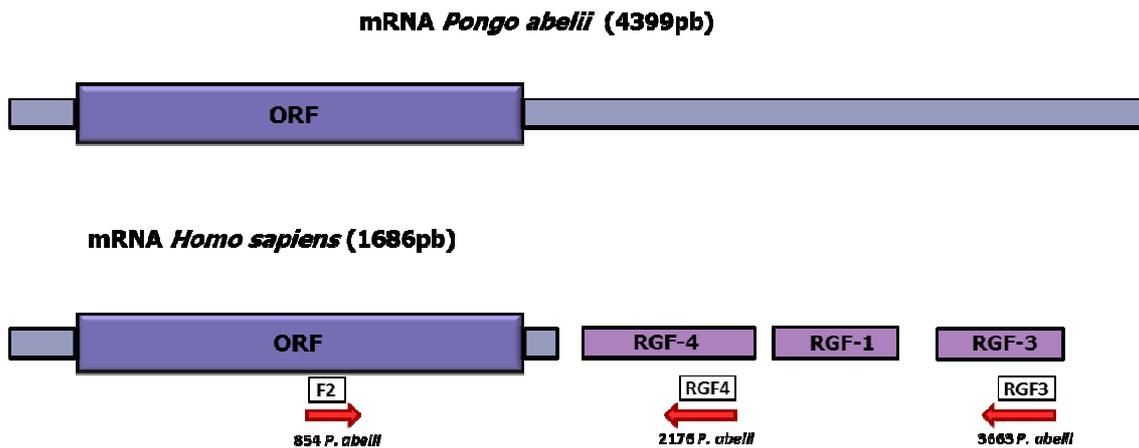


Figura 35. Comparación del ARNm de *Pongo abelii* con el de humano y con los clones RGF-1, 3 y 4 obtenidos en la sustracción. Representados con flechas rojas aparecen los oligonucleótidos empleados para la amplificación y la posición que ocupan dentro de la secuencia de *P. abelii*.

Con el fin de comprobar el tamaño real del RNAm de humanos se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos contra la secuencia de los clones RGF3 y 4 y contra la secuencia de Brox humano (F2) (Tabla 3). La amplificación se realizó a partir del cDNA de células de la granulosa humanas. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 2800pb al utilizar la pareja de oligonucleótidos F2-RGF3 y un fragmento de aproximadamente 1300pb al emplear la pareja F2-RGF4 (figura 36). El tamaño de ambos fragmentos coincide con el esperado según el apareamiento de los oligonucleótidos en la secuencia de *P. abelii*, figura 35.

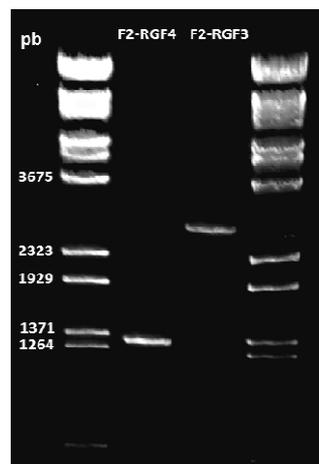


Figura 36. Electroforesis de los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos F2-RGF3 y F2-RGF4. Se usó λ DNA + Bst II como marcador de peso molecular. En cada carril aparece una única banda cuyo tamaño coincide con el esperado según la secuencia de *P. abelii*.

7.2 Expresión de Brox en tejidos de rata

Se analizó la expresión de Brox por qRT-PCR en diferentes tejidos de rata. En la tabla 9 se muestran las expresiones relativas a β -actina para cada tejido analizado.

Tejido	Expresión BROX
Bazo	28062
Cerebelo	3096
Cerebro	2038
Corazón	9172
Estómago	1239
Glándula Suprarenal	3768
Hígado	9594
Intestino	7196
Músculo rojo	12645
Ovario	1411
Páncreas	4596
Pulmón	9628
Riñón	17115
Testículo	2521
Útero	10083
Vesícula	12733

Tabla 9. Expresión de Brox en los distintos tejidos. Los valores de gen Brox en los distintos tejidos se muestran como expresión relativa a β -actina x 10^5 .

Destaca la expresión en bazo, muy superior a la de otros tejidos. También presentan una alta expresión el riñón, músculo y la vesícula mientras que cerebro, cerebelo, ovario, estómago y testículo muestran una expresión baja.

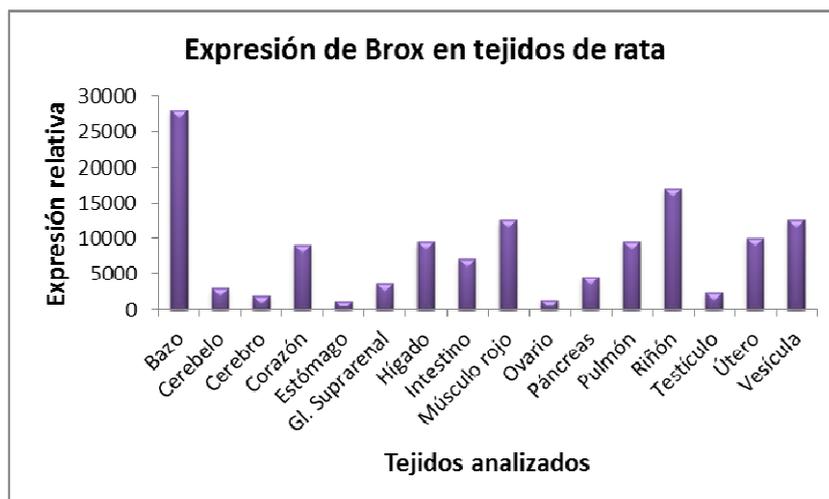


Figura 37. Expresión de Brox en los distintos tejidos. Diagrama de la expresión, relativa a actina, de Brox en tejidos de rata.

7.3 Anticuerpo anti- Brox (AbBrox)

Con objeto de obtener anticuerpos específicos contra Brox, se sintetizaron péptidos de la proteína entera o troncada a partir del cDNA de Brox. (figura 38).

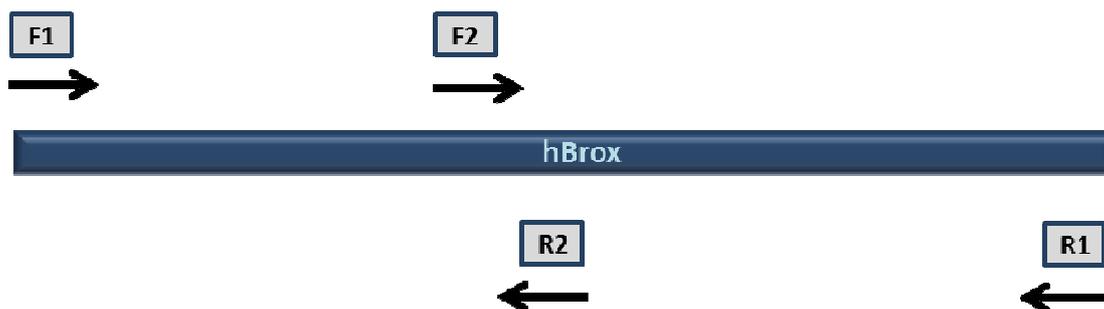


Figura 38. Esquema de la síntesis de los distintos péptidos de Brox. Se muestra el sitio de unión de los distintos oligonucleótidos empleados para la síntesis y posterior expresión de los diferentes fragmentos de la proteína Brox humana.

Resultados

Se diseñaron tres plásmidos de expresión diferentes:

- **Brox-A:** Se clonó el fragmento completo del mRNA humano para obtener una proteína de 449 aminoácidos con un peso molecular de 50,9 KDa.
- **Brox-B:** Se clonó el fragmento correspondiente al extremo N-terminal del mRNA humano para obtener una proteína de 258 aminoácidos con un peso molecular de 29,1 KDa.
- **Brox-C:** Se clonó el fragmento correspondiente al extremo C-terminal del mRNA humano para obtener una proteína de 286 aminoácidos con un peso molecular de 32,3 KDa.

En todos los casos, la proteína mayoritaria presente en los extractos de *E. Coli* BL21(DE3) inducida con IPTG correspondía con la proteína codificada por el plásmido (figura 39).

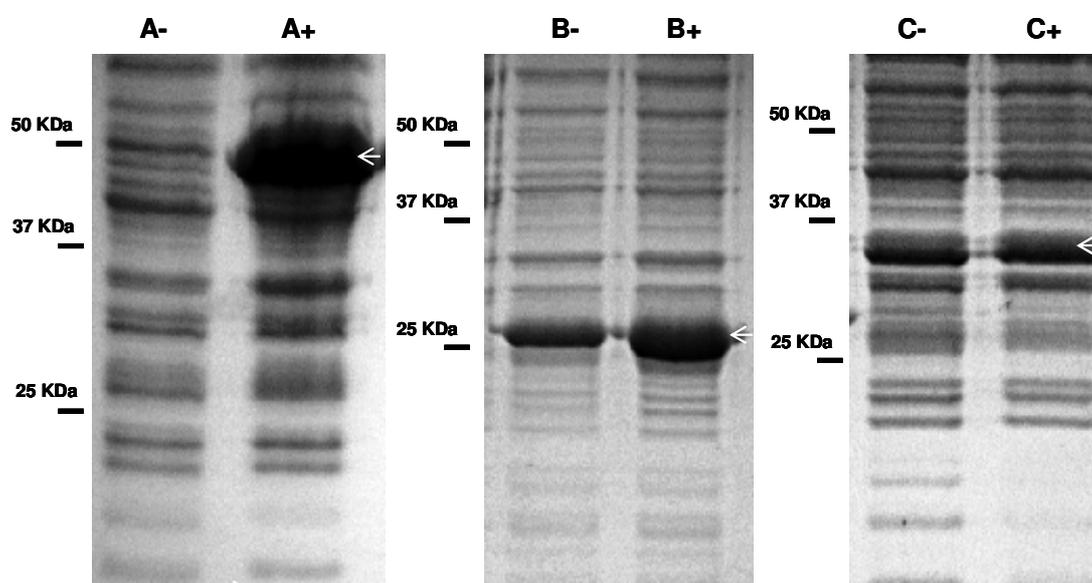


Figura 39. Inducción de la expresión de proteínas por IPTG. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de los extractos de *E. Coli* BL21(DE3) antes (-) y después (+) de inducir la expresión de las proteínas A (completa), B(N-terminal) y C (C-terminal). Se observa una fuerte inducción de la expresión tras añadir IPTG para las muestras A y B y una inducción más débil para la muestra C.

Resultados

Tal y como se explica en el material y métodos, estas proteínas fueron purificadas mediante columnas de histidina (figura 40). Una vez purificadas y cuantificadas fueron empleadas para inducir anticuerpos en conejos.

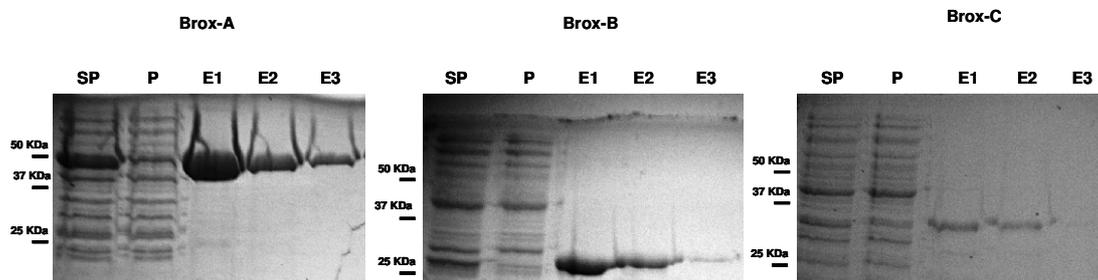


Figura 40. Purificación proteínas por columnas de Histidina. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de los extractos de *E. Coli* BL21(DE3) inducido por IPTG antes (SP) y después (P) de pasar las muestras por la columna de Histidina. Se puede observar como tras pasar por la columna desaparece la banda de inducción. Las proteínas retenidas en la columna son eluidas. En la foto se muestran las 3 primeras eluciones (E1-3).

Con objeto de comprobar la especificidad de los sueros obtenidos (Sueros A, B y C), se realizaron westerns blot usando una dilución 1:5000 de los mismos. Cada suero se probó frente a las tres proteínas purificadas (A, B y C) y frente a una muestra de células HeLa no transfectadas (NT), figuras 41-43.

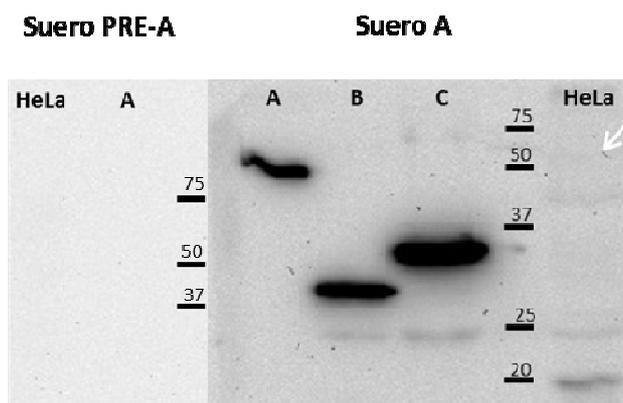


Figura 41. Western blot con las proteínas expresadas en *E. Coli* y células HeLa no transfectadas. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de las proteínas purificadas A, B y C y células HeLa. Las membranas se sondaron con el suero A pre-immune (PRE-A) y el suero post-inmunización (A), ambos a una dilución 1:5000. La flecha indica la banda correspondiente a Brox en células HeLa.

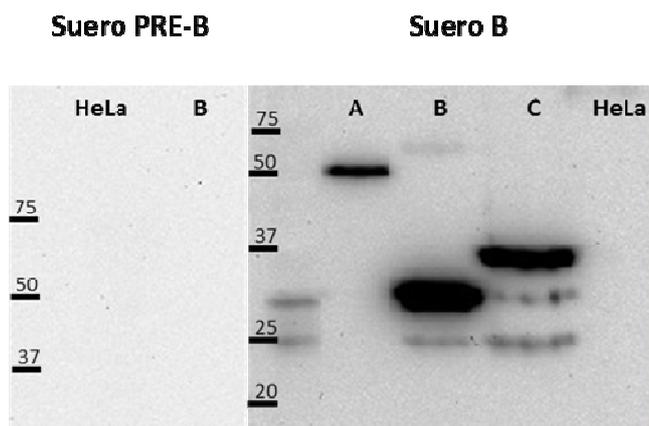


Figura 42. Western blot con las proteínas expresadas en *E. Coli* y células HeLa no transfectadas. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de las proteínas purificadas A, B y C y células HeLa. Las membranas se sondaron con el suero B pre-inmune (PRE-B) y el suero post-inmunización (B), ambos a una dilución 1:5000.

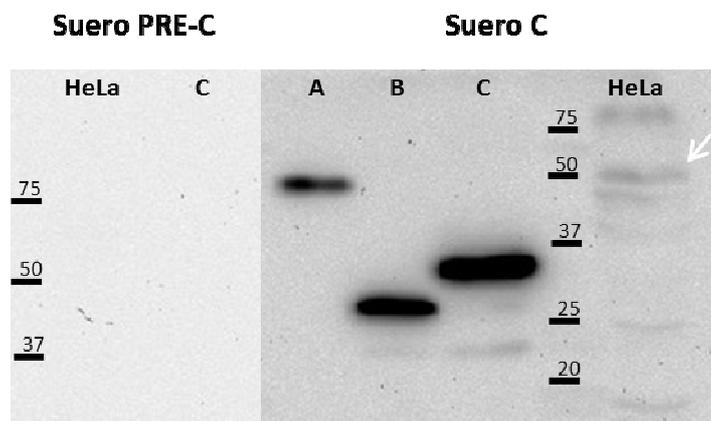


Figura 43. Western blot con las proteínas expresadas en *E. Coli* y células HeLa no transfectadas. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de las proteínas purificadas A, B y C y células HeLa. Las membranas se sondaron con el suero C pre-inmune (PRE-C) y el suero post-inmunización (C), ambos a una dilución 1:5000. La flecha indica la banda correspondiente a Brox en células HeLa.

Como podemos observar en las figuras 41-43 todos los sueros reconocen las tres proteínas purificadas. Sólo el suero B no reconoce ninguna proteína en células HeLa. Los sueros pre-inmunes no reconocen las proteínas utilizadas para la inmunización ni ninguna banda en los carriles con células HeLa. Esta reacción cruzada se debe, en parte, a que entre las tres proteínas existe solapamiento en la secuencia. Además las proteínas pinchadas contenían la cola de Histidinas necesaria para su purificación que también es inmunógena. Por este motivo y con el fin de eliminar ruido de

Resultados

fondo en los sucesivos experimentos, el suero fue purificado de estos anticuerpos contra Histidinas. Tal y como se explica en el material y métodos, para la purificación se empleó la proteína recombinante Dp1, que contenía la misma cola de Histidinas. El resultado de la purificación se comprobó por western blot.

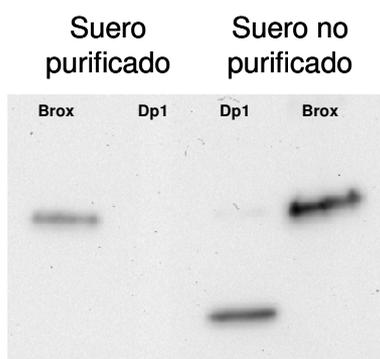


Figura 44. Western blot con las proteínas Brox y Dp1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de las proteínas purificadas Brox y Dp1. Las membranas se sondaron con el suero antes y después de purificar frente a Dp1. Se observa como después de eliminar los anticuerpos contra Histidinas el suero deja de reconocer Dp1.

La figura 44 muestra como el suero sin purificar reconoce las dos proteínas. Tras eliminar los anticuerpos que reconocen la cola de histidinas el suero deja de reconocer Dp1.

7.4 Expresión de la proteína Brox en tejidos de rata

La expresión de la proteína Brox en diferentes tejidos de rata fue analizada por western blot. Como se muestra en la figura 45 se observó que al realizar el western blot con el suero sin purificar aparecían varias bandas en cada carril. Además, el número e intensidad de las bandas variaba según el tejido. Con el fin de esclarecer las bandas que correspondían con Brox y si estas eran las mismas observadas en células HeLa, se realizó el experimento con el suero purificado tal y como se detalla en el apartado correspondiente del material y métodos.

Resultados

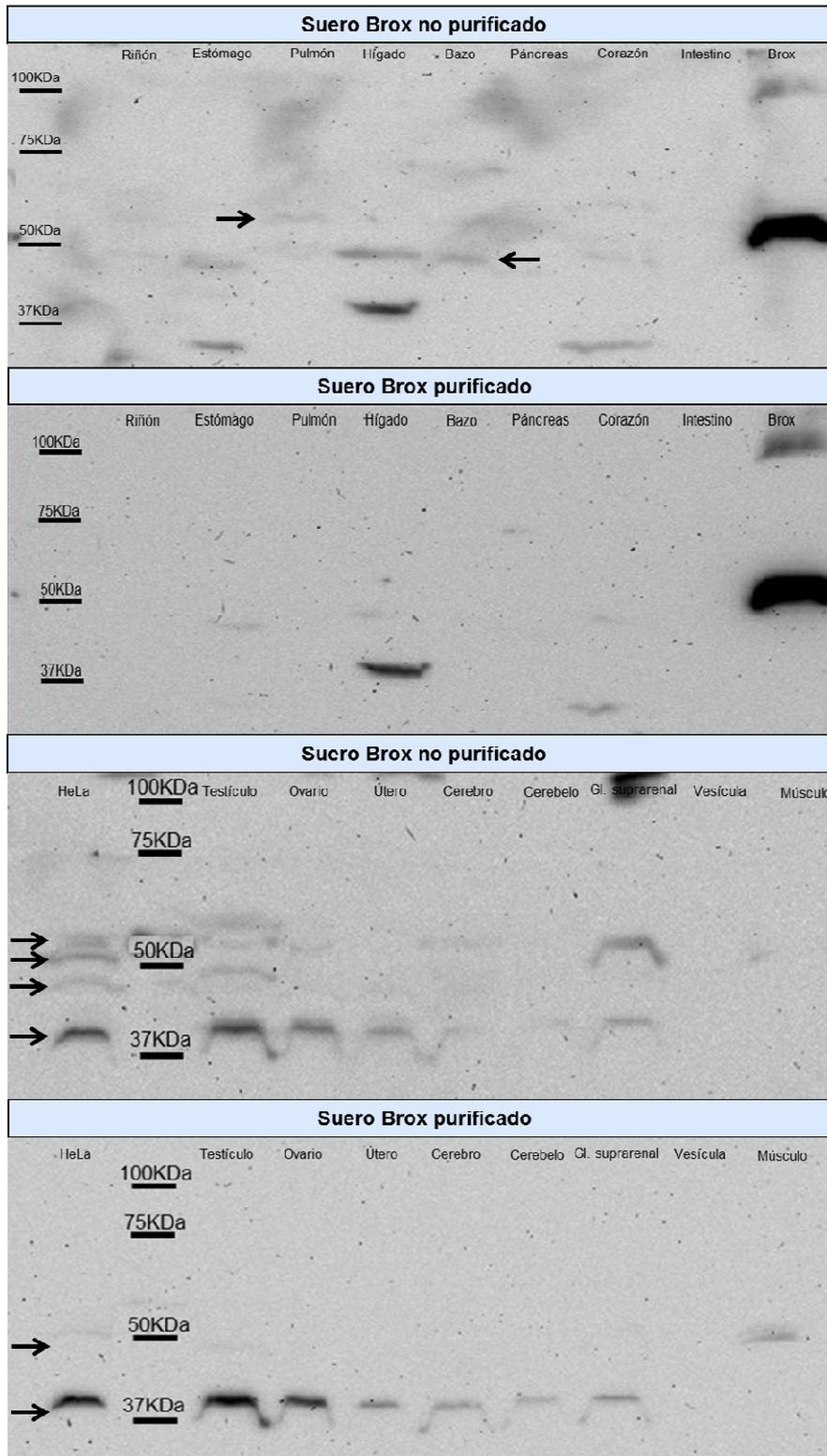


Figura 45. Western blot de tejidos de rata. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de los diferentes tejidos de rata, así como de células HeLa. La misma membrana se sondó con sp-AbBrox (1:300) y con AbBrox (1:5000). Las flechas indican algunas de las bandas inespecíficas que desaparecen al purificar el suero.

Resultados

Tras identificar las bandas específicas se cuantificó la expresión de cada una de ellas en los diferentes tejidos de rata (tabla 10). Brox-1 corresponde con la banda más alta (50KDa) y Brox-2 con la más baja (40KDa). Para tener un valor de expresión total en cada tejido se realizó la suma de la expresión de ambas proteínas (Brox).

Tejido	Brox-1	Brox-2	Brox
Bazo	6.6	6	12.6
Cerebelo	13.9	20.2	34.0
Cerebro	10.4	16.6	27
Corazón	6.2	5.3	11.5
Estómago	7.5	5.9	13.4
Glándula Suprarrenal	14.4	26.0	40.4
Hígado	6.8	41.9	48.7
Intestino	5.9	5.7	11.6
Músculo rojo	20.4	10.3	30.8
Ovario	17.9	96.4	114.2
Páncreas	8.4	8.1	16.4
Pulmón	7.3	7.7	15
Riñón	4.9	4.7	9.6
Testículo	11.7	82.3	94.1
Útero	15.6	29.7	45.3
Vesícula	15.5	16.2	31.7

Tabla 10. Expresión de Brox en tejidos de rata. Las muestras de tejidos se sometieron a electroforesis y los valores de expresión se normalizaron en cada caso para la cantidad de proteínas totales en el carril.

A diferencia de la cantidad de mRNA, la cantidad de proteína es más homogénea entre los diferentes tejidos. Vemos como algunos tejidos cuyo nivel de mRNA era bajo, por ejemplo, ovario, cerebelo y testículo tienen un nivel de expresión de proteína alto. Por el contrario, otros tejidos como bazo o riñón que tienen una mayor cantidad de mRNA expresan menos proteína.

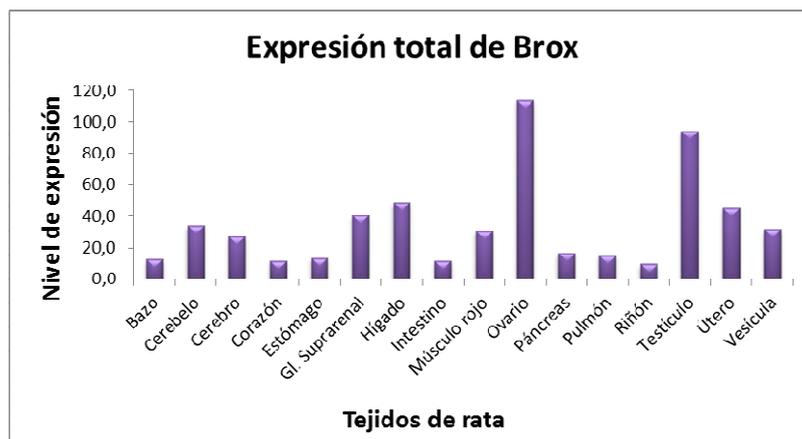


Figura 46. Expresión de Brox en los distintos tejidos. Diagrama de la expresión total de la proteína Brox en tejidos de rata.

Cuando estudiamos la expresión de Brox-1 y Brox-2 en células HeLa observamos que había diferencia de expresión entre las células transfectadas con SGK1.1-A, SGK1.1-NA y células sin transfectar. Sin embargo, dentro de cada grupo estudiado la expresión de Brox-1 era prácticamente igual a la de Brox-2 (A; Brox-1 = 0.85, Brox-2 = 0.91. NA; Brox-1 = 0.37, Brox-2 = 0.34. NT; Brox-1 = 0.6, Brox-2 = 0.56). Por el contrario, en tejidos observamos que la expresión de las dos proteínas no es igual en la mayoría de los tejidos (Figura 47). Más aún, existen tejidos en los que la proteína de 50KDa es la más abundante, como por ejemplo músculo y estómago, y tejidos como ovario, testículo e hígado en los que la proteína de 40KDa tiene una expresión mucho mayor.

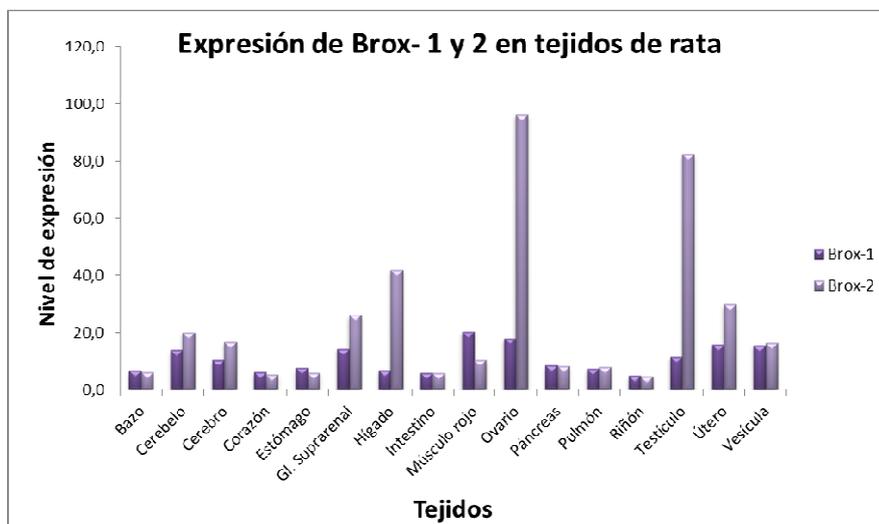


Figura 47. Expresión de Brox en los distintos tejidos. Diagrama de la expresión de la proteína Brox en tejidos de rata.

7.5 Inmunolocalización por fluorescencia de Brox

La expresión y distribución de Brox en células HeLa se determinó mediante el uso del anticuerpo purificado sp-AbBrox, figura 48 paneles A y B. En el control (no trasfectadas) se puede observar que la inmunofluorescencia específica para Brox parece localizarse en torno al núcleo y en el citoplasma. En el citoplasma el marcaje presenta aspecto granular. La proteína no se distribuye de forma homogénea sino asociada a vesículas. La localización de Brox no se ve afectada por la transfección, aunque se observa una disminución de la señal en las células trasfectadas con SGK1.1 no activo (figura 48 paneles E y F) con respecto a las trasfectadas con SGK1.1 activo (figura 48 paneles C y D) y a las no trasfectadas (figura 48 paneles A y B).

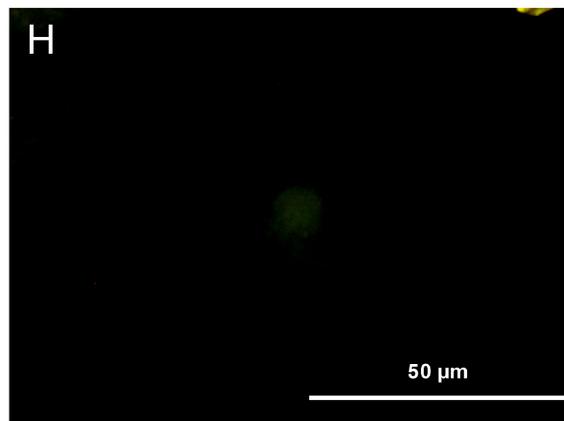
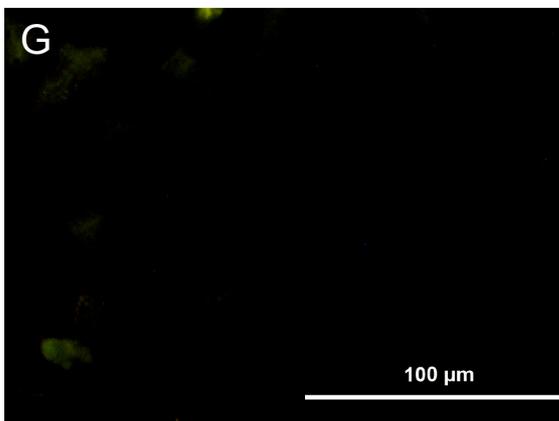
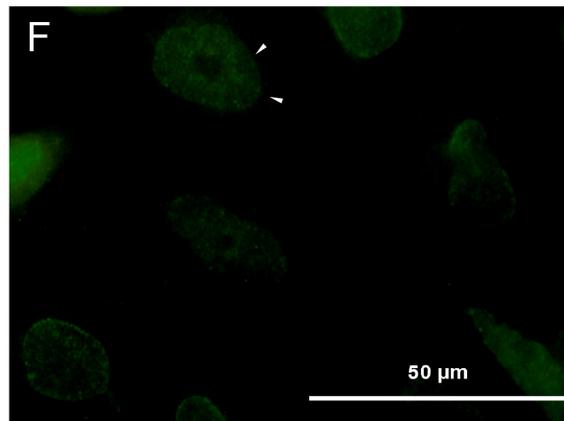
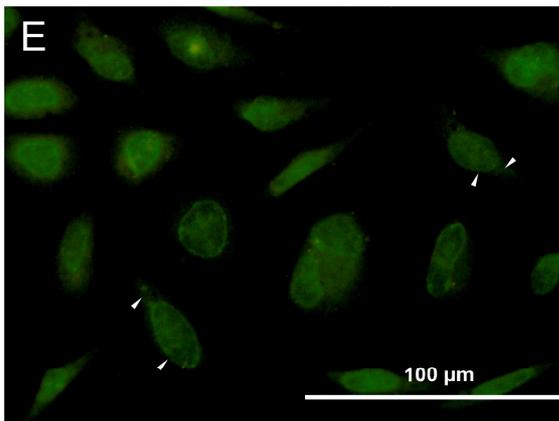
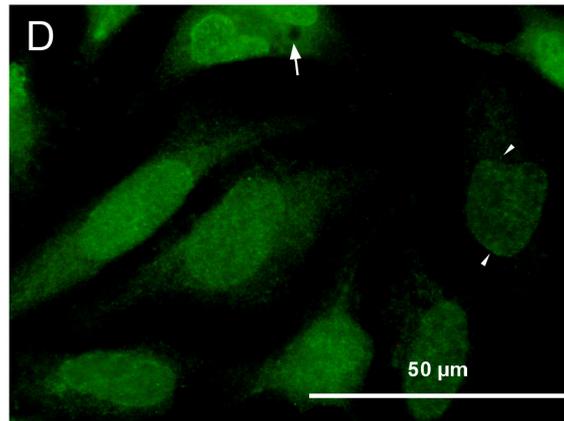
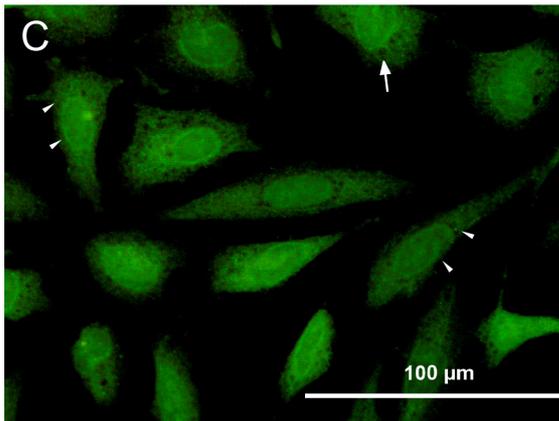
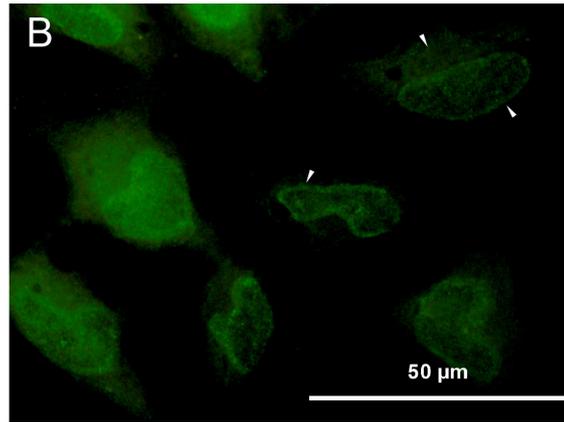
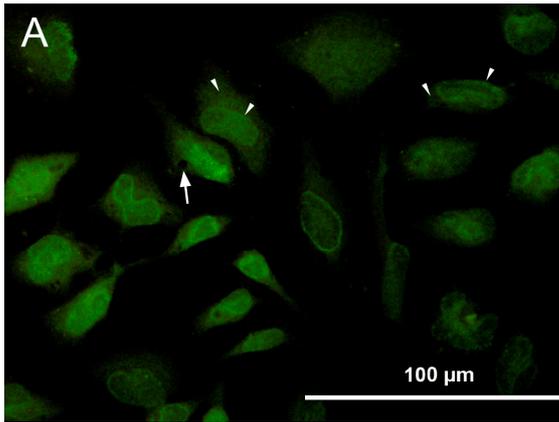


Figura 48. Inmunolocalización por fluorescencia de la proteína Brox. En las células control no transfectadas (A y B), Brox se localiza en la zona perinuclear y en el citoplasma, donde presenta un marcaje de aspecto granular propio de vesículas como envuelta nuclear, retículo endoplásmico o aparato de Golgi. En las células transfectadas (C-F) la distribución no varía, si bien la expresión en las células transfectadas con SGK1.1 no activo (E y F) es menor que la expresión en las células no transfectadas (A y B) y que en las transfectadas con SGK1.1 activo (C y D). En el control negativo del anticuerpo secundario (G y H) se puede observar que el marcaje inespecífico del mismo es casi nulo. Las barras indican en cada caso el tamaño correspondiente (100 μ m o 200 μ m). Las puntas de flecha señalan el marcaje específico de Brox y las flechas los agujeros presentes en la célula.

7.6 Inmunoprecipitación de Brox

Se realizó una inmunoprecipitación para poder asegurar que las dos bandas identificadas en el western blot como Brox-1 (50KDa) y Brox-2 (40KDa) correspondían realmente a la proteína Brox. Para ello, tal y como se detalla en el material y métodos, se emplearon partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos. Se recubrieron con el suero Brox purificado para inmunoprecipitar la proteína Brox recombinante (Control positivo) y una muestra de células HeLa. También se usaron partículas recubiertas con inmunoglobulinas totales purificadas del suero Pre-inmune contra una muestra de células HeLa (Control negativo).

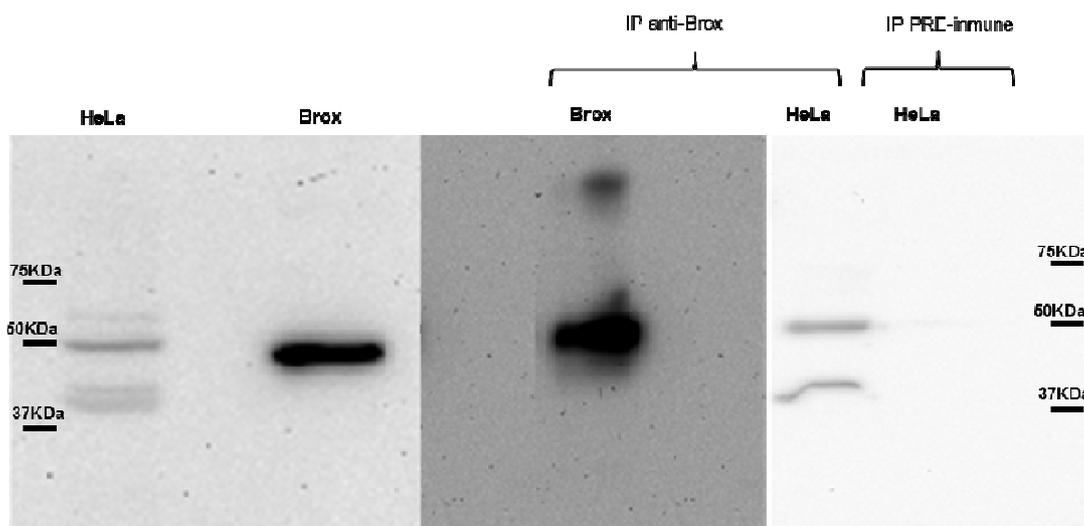


Figura 49. Western blot de muestras inmunoprecipitadas. Como referencia se añadieron células HeLa y proteína Brox recombinante, sin inmunoprecipitar. El carril 3 corresponde a la inmunoprecipitación de la proteína recombinante con anticuerpo anti-Brox. El carril 4 corresponde a la inmunoprecipitación de células HeLa con anticuerpos anti-Brox. El carril 5 corresponde a la inmunoprecipitación de células HeLa con anticuerpos pre-inmunes. Las membranas se sondaron con suero Brox sin purificar a 1:5000.

Al estudiar el resultados de las inmunoprecipitaciones mediante wester blot con suero sin purificar (figura 49) observamos que los anticuerpos purificados son capaces de inmunoprecipitar la proteína recombinante (carril 3). Estos mismos anticuerpos purificados

Resultados

inmunoprecipitan dos proteínas de aproximadamente 40 y 50 KDa en células HeLa (carril 4) que no inmunoprecipitan con los anticuerpos obtenidos del suero pre-inmune carril 5. Las proteínas inmunoprecipitadas coinciden con las detectadas en tejidos usando el suero purificado.

Discusión

1. Del material utilizado

1.1 Del uso de células HeLa y las construcciones empleadas en su transfección

El objeto de este estudio es la identificación de genes cuya expresión está regulada por SGK1.1. Para ello hemos generado una librería de sustracción de células HeLa que fueron transfectadas con dos construcciones distintas de SGK1.1, SGK1.1_{S515D} (forma activa) y SGK1.1_{K127A} (forma inactiva) [10]. Se decidió emplear células HeLa debido a que es una línea celular bien establecida, con un crecimiento rápido, resistentes y que no expresan SGK1.1. Transfectar la forma inactiva responde a la necesidad de sustraer SGK durante el proceso y que de esta manera no se genere un exceso de ruido de fondo.

Las otras dos construcciones de SGK1.1, SGK1.1_{FF/S515D}, SGK1.1_{FF/K127A} [10], no fueron usadas para la sustracción. En células transfectadas con estas construcciones se analizó la expresión de los genes seleccionados en la sustracción para determinar si el hecho de que posean una mutación que dirige su expresión mayoritariamente al núcleo afecta a la activación de dichos genes [10].

1.2 Del anticuerpo anti-Brox

Hemos fabricado anticuerpos específicos contra la proteína Brox, utilizando como inmunógenos la proteína completa y la región C terminal de la misma.

Los anticuerpos obtenidos son eficaces a altas diluciones en inmunoblots, inmunoprecipitación e inmunohistoquímica, lo cual los hace útiles no sólo para estudios de localización y cuantificación de la proteína sino también para estudios funcionales. Además, los anticuerpos obtenidos

no han mostrado especificidad de especie, como demuestra el hecho de tener una reactividad idéntica en células humanas y tejidos de rata y de ratón. Esta inespecificidad facilita su uso en investigación.

2. De las técnicas utilizadas

2.1 De la transfección

El uso de lípidos es un método sencillo y eficaz para la transfección de células en cultivo [91,119], si bien hay que tener en cuenta que un exceso de los mismos puede ser tóxico para las células. En este trabajo ensayamos la eficacia de transfección de varios lípidos en distintas condiciones mediante transfección de la proteína verde fluorescente (GFP) y observación al microscopio de fluorescencia.

Decidimos usar el sistema Lipofectamin 2000 (Invitrogen) por ser el que mayor eficiencia de transfección presentaba bajo nuestras condiciones, consiguiéndose, aproximadamente, un 80-85% de células transfectadas y una mortalidad a las 16 horas próxima al 10%.

2.2 De la sustracción

La generación de librerías de sustracción es un método eficaz en el estudio de la regulación molecular de procesos regulados mediante expresión diferencial de genes que deben ser identificados para su estudio [32,54,118].

La base de las técnicas de sustracción consiste en la hibridación del DNA de una población (“tester”) con un exceso de DNA de otra población (“driver”) para luego separar aquella fracción de DNA que no haya hibridado y, por tanto, que sólo estuviera representada en una de las poblaciones. Si bien la técnica es altamente efectiva, también necesita de una gran cantidad

de cDNA inicial, es muy laboriosa y precisa mucho tiempo debido a que las distintas técnicas de sustracción requieren, en muchos casos, la separación de las fracciones no hibridadas, lo cual conlleva muchas veces la pérdida de genes con baja expresión o la realización de múltiples rondas de hibridación [32].

La técnica elegida para este trabajo, hibridación sustractiva de supresión (SSH) [32], combina técnicas de sustracción por hibridación con técnicas de PCR. Esto permite partir de una cantidad de cDNA menor y amplificar específicamente el cDNA exclusivo de una sola población, por lo que no sólo resuelve los problemas del método sino que es, además, altamente efectiva, sobre todo en la identificación de genes nuevos o de baja expresión que, de otra manera y usando técnicas como los microarrays, serían casi imposibles de identificar [26,32,118].

3. De los resultados

3.1 De los genes obtenidos en la sustracción

De los 27 clones que muestran una expresión diferencial entre una y otra condición, sólo el análisis de 9 presenta una alta homología con genes humanos conocidos. Estos 9 clones codificaban para 6 proteínas distintas. Esto supone que algunos clones obtenidos de manera independiente contenían secuencias para los mismos genes. Esto nos hace pensar que la sustracción se ha realizado correctamente, ya que un gen que estuviera igualmente representado en ambas poblaciones y no hubiese sido eliminado durante la sustracción tendría menos probabilidades de ser detectado más de una vez. Además, los otros 18 clones que no mostraban homología con ninguna secuencia humana resultaron ser fragmentos cortos de vector. Al comprobar la eficacia de la transfección en las células destinadas a la sustracción vimos que era mayor en aquellas transfectadas con SGK1.1S515D.

Discusión

Esta muestra de células contenía, por tanto, más vector de manera que es posible que quedaran fragmentos del mismo sin sustraer.

RGF-2 codifica la proteína BAG-4, localizada en el citosol, de 60kDa y que interacciona a través de su dominio BAG con el dominio ATPasa de otras proteínas como la proteína de choque térmico 70 (Hsc70/Hsp70) o el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF-R1), motivo por el que también se conoce a BAG como SODD, silenciador de dominios de muerte [33,59].

Los clones RGF-1, 3 y 4 presentan homología con la proteína Brox (proteína que contiene el dominio Bro1 y el motivo CAAX). El dominio BRO-1 es característico de proteínas que participan en el tráfico de vesículas al retículo endoplásmico.

RGF-5 codifica la radixina, una proteína de la familia ERM (Ezrina-Radixina-Moesina). Las proteínas de esta familia poseen 3 dominios característicos: un un dominio globular en su N-terminal, un dominio de unión a membrana y un dominio C-terminal que contiene una secuencia consenso de unión a actina. Esto les permite actuar como nexo entre la membrana plasmática y los filamentos de actina y participar en la adhesión célula-célula y célula-sustrato. Además, por medio de su dominio globular puede interaccionar con muchas moléculas de adhesión incluidas en la membrana, como el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato [82].

Los clones RGF-6 y 7 presentan una alta homología con LYCAT, lisocardiopina aciltransferasa, enzima que participa en la generación de fosfolípidos a partir de glicerol-3-fosfato [2]. Además, LYCAT convierte el ácido lisofosfatídico en ácido fosfatídico, sustrato que participa en la síntesis de triglicéridos y en la síntesis de moléculas de señalización como el fosfatidilinositol (PI).

RGF-13 codifica la subunidad catalítica de la protein fosfatasa 1 isoforma β , una de las 3 subunidades que la forman. Es una fosfatasa específica de serin/threonin-proteínas, involucrada en procesos celulares como síntesis de proteínas o división celular.

RGF-24 muestra una alta homología con el llamado ORF 62 del cromosoma 6 y que codifica una proteína de función desconocida. Nuestro análisis de la secuencia revela que es una proteína soluble que no presenta homología con ningún dominio característico.

3.2 De las qRT-PCR en células transfectadas

El análisis de la expresión de los 6 genes identificados en la sustracción muestra que, en todos los casos, existe alguna relación entre el incremento o disminución de su expresión con la actividad o inactividad de SGK1.1 como kinasa o la localización subcelular de la misma.

La expresión de BAG-4 se ve inducida por SGK1.1 de manera dependiente de su actividad kinasa, como demuestra el hecho de que su expresión aumente al transfectar SGK1.1 activo pero que no se vea afectada al transfectar SGK1.1 no activo. El efecto sobre la expresión de BAG-4 parece además depender de la localización de SGK1.1 ya que al dirigir a la proteína al núcleo no sólo no se produce un aumento de expresión sino que se observa una disminución de la misma. Esta disminución podría deberse a que al forzar la entrada al núcleo de SGK1.1 encuentre dianas no naturales que afecten negativamente a la expresión de BAG-4.

La expresión de Brox y PPP1CB no se ve afectada al transfectar SGK1.1 activo. Esto podría deberse a que SGK1.1 no sea la única kinasa que actúa en la regulación de la expresión de estos genes. La vía que conduce a la expresión de estos genes estaría ya activada en la célula y por tanto, aunque se sobreexpresen SGK1.1 activo no se obtiene una mayor expresión.

Discusión

Sin embargo, al transfectar SGK1.1 inactivo se produce una disminución de la expresión de Brox y PPP1CB probablemente porque SGK1.1 este interfiriendo en las rutas que llevan a su expresión. SGK1.1 no activo podría estar inhibiendo la transcripción génica mediante un mecanismo de competición por unión de sustrato con otras posibles kinasas que reconozcan el mismo sustrato y participen en la regulación de estos genes.

La inhibición de Brox parece depender de la localización de SGK1.1, ya que tanto la forma activa como la no activa que se dirigen al núcleo, disminuyen su expresión. Puede que al forzar la entrada al núcleo de SGK1.1 activo encuentre dianas no naturales que regulen negativamente la expresión de Brox.

La expresión de LYCAT se ve afectada por la expresión de SGK1.1 de forma débil. Al transfectar SGK1.1 activo, la expresión de LYCAT aumenta ligeramente. Al transfectar SGK1.1 inactivo, la expresión es algo más baja. Esto podría deberse a que SGK1.1 esté regulando algún factor que controla la expresión de LYCAT, pero que no sea la principal kinasa que lo regula o que éste no sea el principal factor que controla la expresión de LYCAT.

En el caso de la radixina, la sobreexpresión de SGK1.1, tanto activo como inactivo, produce una disminución de su expresión. Esto sólo podría explicarse si SGK1.1 actuara inhibiendo un co-activador de la expresión de RDX. Al transfectar SGK1.1 activo se fosforilaría e inactivaría y como consecuencia se produciría una disminución de la expresión de RDX. Al transfectar SGK1.1 no activo se produce una inhibición mayor. SGK1.1 no activo puede originar una inhibición por competición por unión de sustrato con otras kinasas que sea mayor que la producida por actividad enzimática.

Con respecto a la C6ORF62, la interpretación de los resultados es más complicada, ya que no tenemos información del gen o de la proteína. La expresión sólo se ve afectada cuando transfectamos SGK1.1 no activo y lo

dirigimos al núcleo. La única conclusión que podemos formular es que la expresión de C6ORF62 esté regulada por algún factor transcripcional o complejo regulador nuclear cuya acción se vea afectada por SGK1.1.

3.3 De los WB en células transfectadas

Los datos de la expresión de las proteínas PPP1CB y RDX muestran que no existen diferencias de expresión entre las células transfectadas y el control. El estudio del mRNA en esas mismas células mostró que la expresión de RDX en células transfectadas con SGK1.1 activo es menor que en el control pero mayor que en las transfectadas con SGK1.1 inactivo. Sin embargo las diferencias de expresión de proteína son más pequeñas y no llegan a ser estadísticamente significativas. El estudio de la expresión del mRNA de PPP1CB mostró que es mayor en las células transfectadas con SGK1.1 activo y en el control que en las células transfectadas con SGK1.1 inactivo. La expresión como proteína en células transfectadas es algo mayor que en el control, sin embargo las diferencias no llegan a ser significativas.

El hecho de que las diferencias de expresión observadas en el mRNA no se mantengan en la proteína se debe a que éste puede sufrir modificaciones post-transcripcionales. El mRNA puede no llegar a traducirse por efecto, por ejemplo, de iRNA. Además, las proteínas también están sujetas a modificaciones post-traduccionales que pueden hacer que se degraden rápidamente y por ello el nivel de mRNA sea mayor que la proteína encontrada.

En el caso de BAG-4 y Brox, sí se observa una diferencia de expresión de proteína entre las células transfectadas. Para Brox, la diferencia de expresión coincide con la encontrada para en mRNA. La expresión al transfectar SGK1.1 activo es igual que en el control, pero al transfectar SGK1.1 no activo disminuye significativamente. Esto demuestra que SGK1.1 no activo está interfiriendo en los mecanismos de expresión de Brox

y esta interferencia se traduce en una menor cantidad de proteína. En el caso de BAG-4 observamos una mayor expresión de la proteína en las células transfectadas con SGK1.1 activo y una menor expresión en las transfectadas con SGK1.1 no activo. Estas diferencias coinciden con las encontradas en RT-PCR. Sin embargo, la expresión de BAG-4 en las células control (no transfectadas) es menor de lo esperado. Como ya mencionamos, las proteínas sufren regulaciones post-traduccionales. SGK1 regula la expresión de muchas proteínas controlando su degradación por el proteosoma. SGK1.1 podría tener una acción similar. La cantidad de proteína RDX, PPP1CB y BAG-4 podría verse afectada de forma post-traducciona por la acción de otras kinasas o de la propia SGK1.1. Además, sabemos que SGK1 se expresa en respuesta a estímulos de estrés. Al ser BAG-4 una proteína antiapoptótica su expresión en células transfectadas podría estar siendo estabilizada porque la propia sobreexpresión de SGK1.1 induzca en la célula un “falso” estado de estrés. En las células transfectadas habría una mayor cantidad de proteína, en relación a la cantidad de mRNA, que en las no transfectadas porque la célula estaría respondiendo al supuesto estrés que le indica la mayor expresión de SGK1.1.

3.4 De la inmunofluorescencia de células transfectadas

Mediante inmunohistoquímica con fluorescencia se determinó la expresión y localización de las proteínas identificadas en esta tesis cuya expresión es regulada por SGK1.1. El experimento se realizó en células HeLa no transfectadas y transfectadas con SGK1.1 activo y no activo, usando anticuerpos específicos para cada proteína y controles negativos para el anticuerpo secundario empleado. Independientemente del anticuerpo primario empleado, en todas las muestras se observa la presencia de “agujeros”. Suponemos que son debidos a una lipidificación por el uso de lipofectamina en la transfección. Estos son siempre más abundantes en las muestras de células control (NT). En estas células el lipofectamin 2000 se combinó con agua en lugar de plásmido. Es posible que en estos casos no se formaran micelas y el lípido entrara en las células, o quedara alrededor de

Discusión

las mismas, a modo de gotas que en la fotografía parezcan agujeros. En las células transfectadas no quedaría tanta cantidad de lípido sin formar micelas y por eso el número de estos agujeros es mucho menor.

Inmunofluorescencia de BAG-4

El estudio de localización subcelular de BAG4, realizado mediante inmunolocalización por fluorescencia con anticuerpos específicos, muestra que su localización es, principalmente, perinuclear. Otros autores han descrito anteriormente una localización citoplasmática de BAG4 con mayor presencia en la región perinuclear [73]. En nuestras células, la proteína no parece estar distribuida por todo el citoplasma sino formando ramificaciones. Creemos, por tanto, que podría estar asociada al citoesqueleto. En la figura 50 se muestra un esquema de los patrones de localización de cada proteína basados en nuestros resultados de inmunocitoquímica. Otros autores han encontrado una distribución de BAG4 que varía de nuclear, citoplasmática o asociada a membrana plasmática en función del tipo celular y/o estímulos que reciba la célula [116]. Puede que la localización observada en este trabajo esté sujeta a nuestras condiciones sin embargo, no se produce un cambio de localización en función de la presencia y/o actividad de SGK1.1. Parece por tanto que, al menos bajo nuestras condiciones, SGK1.1 no afecta a la localización subcelular de BAG4. Sin embargo, sí parece afectar a sus niveles de expresión, tal y como se había observado por wester blot y q RT-PCR. La cantidad de señal observada en las células transfectadas con SGK1.1 activo es mayor que en las no transfectadas o transfectadas con SGK1.1 inactivo. Esto confirma que SGK1.1 activo produce un aumento de la expresión de BAG4.

PPP1CB

PPP1CB parece encontrarse por igual en toda la célula mostrando una distribución uniforme. En el citoplasma la proteína parece encontrarse distribuida por igual sin estar asociada a ningún orgánulo, figura 50.

Discusión

Nuestros datos de localización coinciden con los esperados para esta proteína que según la bibliografía se expresa tanto en el núcleo como en el citoplasma y la membrana plasmática. Parece que, de nuevo, la expresión de SGK1.1 activo/inactivo no afecta a la localización de la proteína. Sin embargo existe una evidente disminución de la señal en células transfectadas con SGK1.1 no activo. Los datos de expresión de PPP1CB obtenidos de la inmunofluorescencia coinciden con los observados para el RNAm por qRT-PCR, a pesar de que por western blot no existiera una diferencia significativa de expresión entre ninguno de los tres casos estudiados.

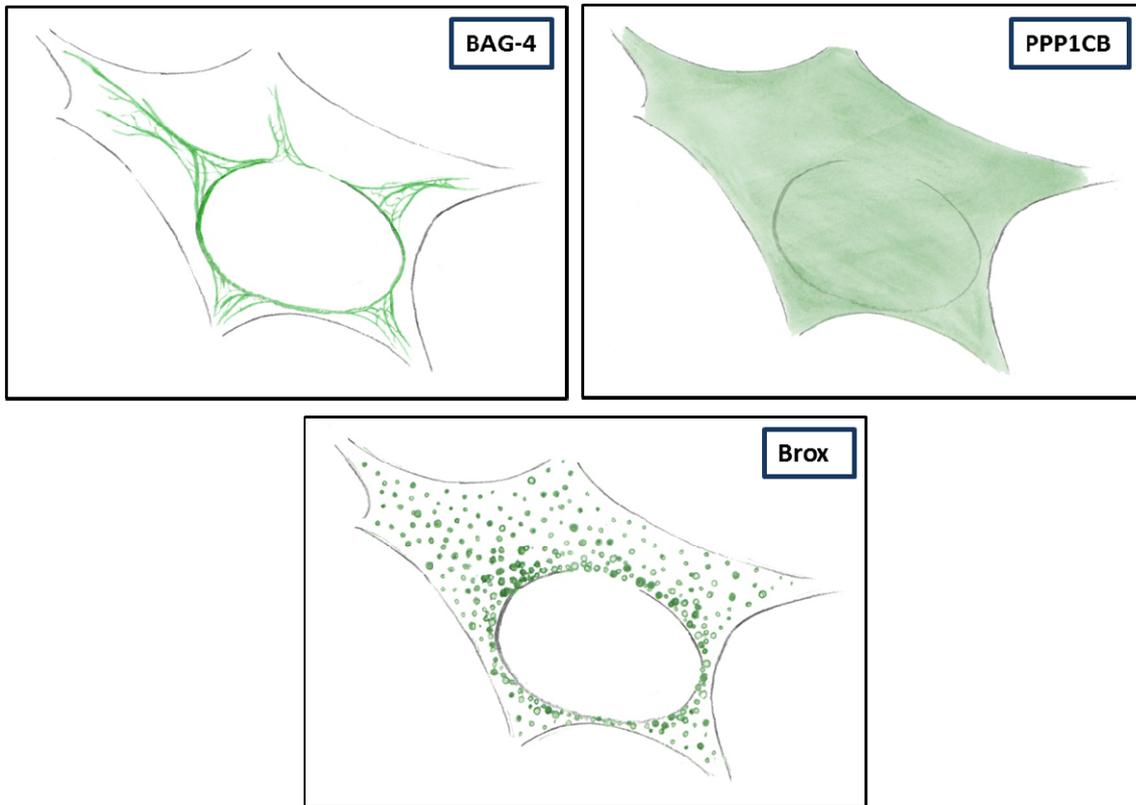


Figura 50. Modelos de expresión subcelular característico. BAG-4 adopta un patrón de expresión ligado al citoesqueleto, Brox muestra una localización característica de proteínas vesiculares y PPP1CB presenta una distribución homogénea en toda la célula.

3.5 Del gen y la proteína Brox humana

mRNA de Brox humano

Los clones RGF1, 3 y 4 no mostraban homología con ninguna secuencia en humano sin embargo, presentan una alta homología con el cromosoma 1 ORF 58 de *Pongo abelii* (orangután) que codifica para la proteína Brox. El mRNA de Brox humano comparte una homología del 98% con el de *P. abelii* pero es más pequeño (1686pb frente a 4399pb), figura 35.

Además, en la base de datos hay anotadas otras secuencias humanas, FLJ21487 y FLJ40817 (acceso AK025140 y AK098136, respectivamente), que presentan una alta homología con los clones obtenidos en esta tesis (98-99%) y con la secuencia de Brox de *P. abelii* (99-96%), pero no con la de humanos.

El hecho de que la PCR realizada con un oligonucleótido complementario a la secuencia de los clones RGF3/4 y otro complementario a la de Brox humano amplificara un fragmento con el mismo tamaño que el esperado para la secuencia de *P. abelii*, confirma que la secuencia del RNAm de Brox humano está mal anotada en la base de datos y que su tamaño es al menos de 3722 pb.

Expresión de Brox en tejidos de rata

Al analizar los datos de la expresión total de Brox en tejidos de rata sorprende que en algunos tejidos, como bazo y riñón, la cantidad de mRNA sea mayor que la cantidad de proteína expresada, mientras que en otros tejidos, como ovario y testículo, la cantidad de mRNA es más baja que la expresión de la proteína. Como sabemos, la cantidad de mensajero no siempre se corresponde con la expresión de proteína, debido a que ésta última está sometida a regulaciones post-traduccionales. Estos mecanismos de regulación post-traduccional pueden variar de un tejido a otro de manera

Discusión

que en algunos tejidos la expresión de la proteína sea más estable que en otros.

Cuando tenemos en cuenta la expresión por separado de las dos bandas de Brox (Brox-1 y Brox-2), parece que en aquellos tejidos en los que la cantidad de RNAm es menor que la cantidad de proteína total (cerebelo, cerebro, glándula suprarrenal, ovario y testículo) la expresión de Brox-2 es considerablemente mayor que la expresión de Brox-1. En aquellos tejidos en los que la cantidad de mensajero es mayor que la cantidad de proteína total (bazo, corazón, pulmón, riñón y vesícula), la expresión de Brox-1 y Brox-2 es similar. Esto puede deberse a que la regulación post-traducciona de Brox-1 y Brox-2 sea diferente. Las diferencias entre las dos proteínas pueden hacer que una sea más estable que la otra. Teniendo en cuenta que Brox participa en el tráfico de vesículas, otra posibilidad es que Brox-2 esté acumulada en algún orgánulo. Esto explicaría que a pesar de tener menos mRNA (no se estarían expresando proteínas nuevas) la cantidad de proteína total sea mayor.

Además, como ya mencionamos, encontramos tejidos en los que la expresión de Brox-1 y Brox-2 es similar, tejidos en los que la expresión de Brox-1 es mayor y tejidos en los que es mayor la expresión de Brox-2. Por lo general, parece que en los tejidos con fibras móviles (corazón, estómago y músculo) se expresa más Brox-1 mientras que en tejidos secretores (glándula suprarrenal, hígado, ovario, testículo y útero no grávido ni en parto) es mayor la expresión de Brox-2.

Inmunolocalización de Brox

La distribución de Brox en células HeLa se estudió mediante inmunofluorescencia usando el anticuerpo sp-AbBrox. Encontramos que Brox se localiza en torno al núcleo y en el citoplasma, donde el marcaje presenta aspecto granular, figura 50. Pensamos que este aspecto granular pueda deberse a que se encuentre asociada a vesículas. Otros autores

determinaron una distribución de Brox difusa por el citoplasma aunque más abundante en la zona perinuclear. Con estudios de comarcaje determinaron que coincidía parcialmente con proteínas del Golgi [55]. La localización no se ve afectada por la transfección, aunque, tal y como se determinó por qRT-PCR y western blot, existe una menor expresión de Brox en células transfectadas con SGK1.1 no activo

Inmunoprecipitación de Brox

Los anticuerpos sp-AbBrox usados para inmunoprecipitar fueron purificados usando la proteína recombinante entera, identificada por Maldi-Tof como Brox. Partículas magnéticas recubiertas con estos anticuerpos fueron capaces de inmunoprecipitar la proteína recombinante (control positivo). Partículas magnéticas recubiertas con los anticuerpos presentes en el suero preinmune no inmunoprecipitaron en células HeLa ninguna proteína que el suero Brox fuera capaz de reconocer (control negativo). En la inmunoprecipitación de células HeLa realizada con partículas recubiertas con anticuerpos anti-Brox purificado (sp-AbBrox), el suero Brox sólo reconoció dos bandas que coinciden en tamaño con las observadas en western-blot de células HeLa y tejidos de rata.

Mediante el uso de controles positivos y negativos durante el proceso de inmunoprecipitación, podemos asegurar que las 2 bandas inmunoprecipitadas corresponden con las dos bandas (Brox1 y Brox-2) identificadas en western-blot de células HeLa y tejidos de rata.

4. De los resultados tomados en su conjunto

SGK1, al igual que Akt, se activa como componente de la cascada de señalización de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) y está relacionada con la propagación de cascadas de señalización implicadas en el crecimiento, diferenciación y supervivencia de la célula [36,65,128]. SGK1.1 es una isoforma que se expresa exclusivamente en cerebro. Igual que SGK1, esta

Discusión

isoforma regula la actividad de los canales ENaC, ASIC1 y Kv7.2/3 aumentando o disminuyendo su expresión en la superficie de la célula. Sin embargo, a diferencia de SGK1, sólo parece hacerlo a través de la regulación de la ubiquitin ligasa Nedd4-2 en el caso de Kv7.2/3. Hasta el momento, no se conocían otras funciones de SGK1.1 ni otras proteínas implicadas en su acción. En esta tesis encontramos 5 genes cuya expresión está regulada por SGK1.1. Parece por tanto, que SGK1.1 podría regular la acción de factores transcripcionales de la misma manera que SGK1. Además, proteínas como la radixina o BAG-4 también están implicadas en la vía de señalización de PI3K y participan en procesos de respuesta frente a apoptosis. Es posible que SGK1.1 también esté implicada en procesos de crecimiento y supervivencia. Sin embargo, el hecho de que SGK1.1 sea una proteína con una función poco conocida sólo nos permite especular sobre su función y su relación con los genes cuya expresión regula a través de la función de estos y de SGK1. (Figura 51).

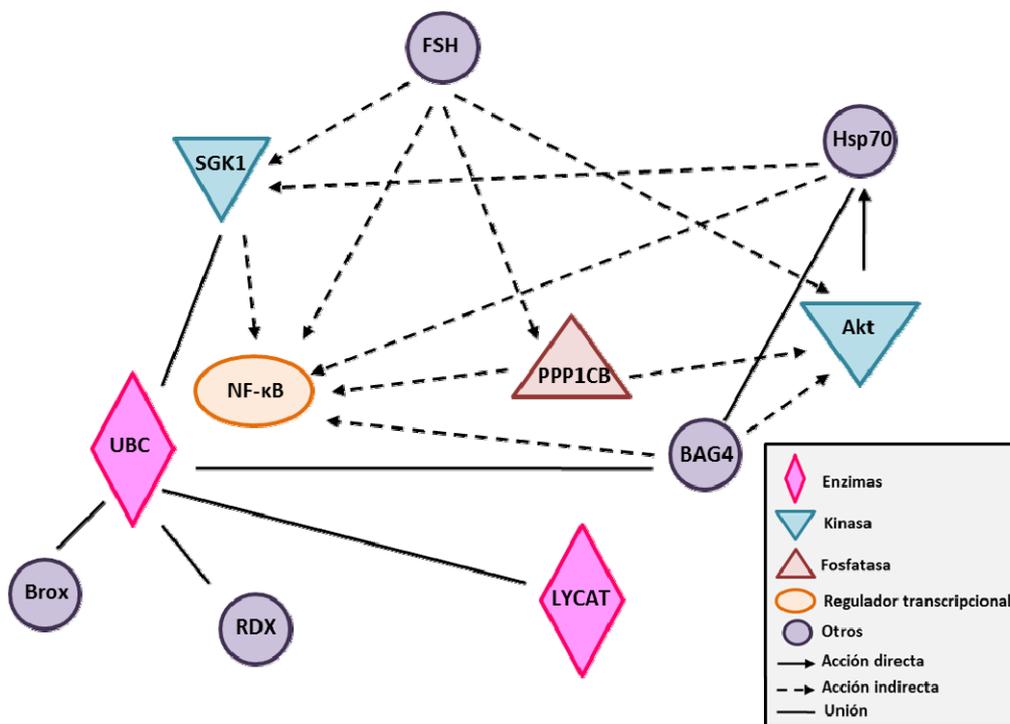


Figura 51. Esquema de las interacciones conocidas entre las proteínas estudiadas. En rosa aparecen las enzimas, en azul las quinasas, en rojo las fosfatasas, en naranja los reguladores transcripcionales y en violeta otros. Las flechas continuas indican interacciones directas y las discontinuas indirectas. Las líneas indican unión. (Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com/>)

Al observar el esquema de las interacciones conocidas entre las proteínas estudiadas (Figura 51), parece existir una relación entre SGK1, Brox, RDX, BAG-4 y LYCAT con la ubiquitina C (UBC). Sin embargo, sólo se conoce el hecho de que estas proteínas se unen a UBC. Esta unión podría indicar que esta ubiquitina esté implicada en la degradación de cada una de las proteínas. Alternativamente y dado que BAG-4 se considera una cochaperona y Brox interacciona con miembros del sistema ESCRT, es posible que esta interacción se deba a la participación de las mismas en los procesos de degradación de otras proteínas.

BAG-4 pertenece a la familia BAG (Bcl-2-associated athanogene). Esta familia está constituida por seis proteínas diferentes, BAG1-6. Los 6 BAGs se diferencian en la región N-terminal. Estas diferencias podrían otorgar especificidad en su función o localización [33,59]. Sin embargo, todos los miembros de esta familia contienen un dominio BAG y se identificaron en primer lugar como proteínas capaces de interaccionar con la proteína antiapoptótica Bcl-2 [33,59]. Posteriormente se encontró que también interaccionan con el dominio ATPasa de la proteína de choque térmico 70 (Hsc70/Hsp70) modulando, positiva o negativamente, su función. Por esto los miembros de esta familia han sido caracterizados como co-chaperonas [33,59]. El dominio BAG se encuentra en el extremo C-terminal, contiene entre 110-124 aa y está formado por tres α hélices antiparalelas, cada una de entre 30-40 aa. α 1 y α 2 interaccionan con la serin-threonin-kinasa Raf-1 y α -2 y α -3 con el dominio ATPasa [33]. Además de tener un efecto aditivo a la inhibición de la apoptosis mediada por Bcl-2, se sabe que BAG 1 promueve crecimiento estimulando a Raf-1 [33].

Sin embargo, la familia de proteínas Bcl2 no sólo está formada por miembros que inhiben apoptosis, como Bcl-2, sino también por miembros que promueven apoptosis como Bim, Bax o BH3 [1,129]. En células progenitoras hematopoyéticas, las citoquinas promueven supervivencia regulando de manera negativa a Bim. Se ha propuesto un modelo (figura

52) según el cual, en presencia de IL-3, Hsc70 está asociada a BAG4 y CHIP (C terminus of HSC70-Interacting Protein) y tiene baja afinidad de unión al mRNA. De esta manera, el mRNA de Bim es más susceptible a la unión de agentes desestabilizantes que producen su degradación por ribonucleasas [92]. En ausencia de IL-3, Hsc70 se une a Hsc40 y Hip, la asociación de este complejo con el mRNA de Bim lo protege de las ribonucleasas [92]. La activación de Ras es esencial para la disminución del mRNA de Bim ya que su expresión disminuye la cantidad de mRNA de Bim.

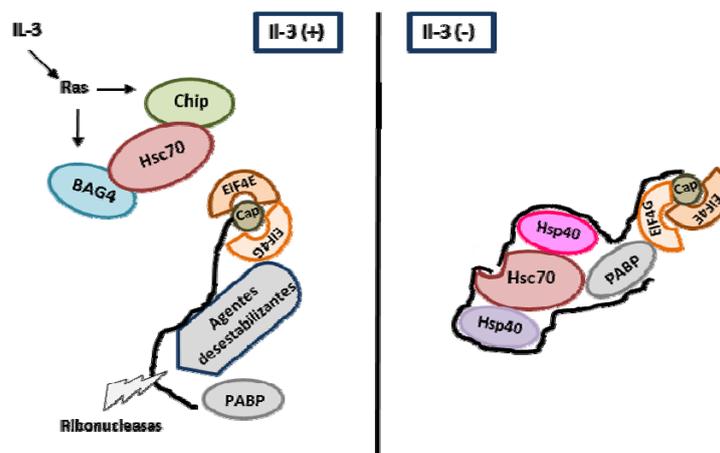


Figura 52. Modelo de la respuesta a IL-3. En presencia de IL-3 Hsc70 está asociada a BAG-4 y CHIP y tiene baja afinidad por el RNA. El mRNA de Bim se une a agentes desestabilizantes y es diana de ribonucleasas. En ausencia de IL-3, el complejo Hsc70/Hsc40/Hip se asocia al mRNA de bim y lo protege (Modificado a partir de Matsui,H, 2007 [92])

Además, BAG4 previene la señalización constitutiva de receptores con dominio de muerte como el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF-R1) o el receptor de muerte 3 (DR3) [97]. Estos receptores pueden causar una apoptosis inadecuada si se activan de manera independiente de su ligando. BAG4 regula negativamente su función previniendo su agregación y manteniéndolos inactivos en estado monomérico. BAG4 se disocia de los receptores cuando se unen sus ligandos [59].

Como ya se mencionó, las proteínas BAGs son consideradas co-chaperonas. Para las células es importante producir proteínas con un plegamiento correcto y eliminar aquellas con daños irreparables. Para

eliminar las proteínas mal plegadas la principal vía es el sistema ubiquitina-proteosoma [28,103]. En los últimos años, muchos estudios indican que existe además una vía de degradación lisosomal denominada macro-autofagia [29,47]. En un principio esta vía se consideró inespecífica, pero en la actualidad parece que elimina sustratos de manera selectiva [63]. La unión y liberación de sustratos a Hsp70 está regulada por un ciclo de consumo de ATP controlado por factores de intercambio de nucleótidos (NEFs) [38]. La hidrólisis del ATP a ADP estabiliza la unión de Hsp70 a su sustrato, mientras que la liberación del ADP y la unión de un nuevo ATP produce que el sustrato se suelte. Las proteínas de la familia BAG actúan como NEFs y median la liberación de los sustratos unidos a la chaperona, incluso, según el tipo de sustrato, BAG1 puede participar en la degradación mediada por el proteosoma o en la mediada por lisosomas [38].

Como ya mencionamos, BAG4 previene la señalización constitutiva de receptores con dominio de muerte. Recientemente se ha descubierto que el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF-R1) podría formar trímeros antes de la unión del ligando a través de un dominio de ensamblaje previo a la unión de ligando presente en la región extracelular del receptor [127]. Este dominio es necesario para la unión sin ligando y para la correcta señalización después de su unión. *In vitro*, BAG4 es capaz de separar receptores en presencia de ATP a través de cambios conformacionales en el receptor y, al igual que BAG1 en la modulación de Hsp70, actuar como NEF [127].

BAG4 también es un inhibidor de la actividad catalítica de SKIP (inositol polyphosphate 5-phosphatase, 5-ptase) que podría promover la degradación del PI(3,4,5)P₃ producido después de la estimulación con factores de crecimiento [107]. En ausencia de BAG4, el aumento de actividad 5-ptase reduce la activación de Akt, lo que reduce la señalización de Akt al citoesqueleto de actina. Muchas 5-ptases que degradan PI(3,4,5)P₃ e inhiben la señalización por Akt regulan la dinámica de la actina lo que

supone una nueva función de BAG4 en la regulación de la señalización de la vía PI3K/Akt y, por tanto, en la regulación de la migración celular [116].

Aunque no sabemos nada de la función de SGK1.1 en respuestas de supervivencia, sabemos que SGK1 disminuye apoptosis a través, por ejemplo, de NF- κ B. Como se mencionó en la introducción, SGK1 fosforila a la kinasa IKK β aumentando así su actividad y permitiendo la liberación de NF- κ B [152]. Una vez liberado, NF- κ B entra en el núcleo y activa la transcripción de genes con función antiapoptótica como los miembros de la familia Bcl-2 [60]. Es posible, que en cerebro SGK1.1 también participe en respuestas de supervivencia produciendo un aumento de la transcripción de BAG4, a través de NF- κ B o de otro factor transcripcional.

Las proteínas de la familia ERM, incluida la radixina, actúan como nexo entre la membrana plasmática y los filamentos de actina y participan en la formación del microvilli, adhesión celular, movilidad, fagocitosis... La fosforilación de residuos de Thr en el C-terminal de estas proteínas es necesaria para su función [19]. Esta fosforilación la efectúan kinasas como Rho o Akt. Estudios recientes muestran que, en melanocitos, SCF (stem cell factor) induce la fosforilación del residuo Thr de las proteínas ERM y la activación de Rac1. Este efecto se produce a través de la activación de PI3K. Las proteínas fosforiladas son necesarias para la proliferación y migración de melanocitos inducida por SCF [58].

Existen más ejemplos de la implicación de las proteínas de la familia ERM en estos procesos. Las células T expresan CD43, que regula muchas de sus funciones, como su activación, proliferación, apoptosis y migración. Recientemente se ha determinado que CD43 regula el tráfico de las células T, especialmente a los nódulos linfáticos [100]. Para migrar, los linfocitos cambian de morfología, pasando de esférica a polarizada e induciéndose la formación de un urópodo en el polo posterior de la célula (complejo del polo distal, DPC) importante en la producción de interleucina II e interferon γ .

Discusión

En las células en migración, CD43 se localiza en el urópodo y DPC. Esta localización es dependiente de la fosforilación del residuo Ser76 dentro de la cola citoplasmática de CD43, que requiere la interacción con ERM. La alteración de esta unión se traduce en una pérdida de localización de CD43 y una disminución en la producción de IL-II [24].

En cuanto a su implicación en procesos de apoptosis, la radixin participa en la respuesta de supervivencia de la célula que se inicia para contrarrestar la disminución de volumen producida por estímulos apoptóticos [144]. Para esto, se produce un aumento de la actividad de la subunidad NHE1 del intercambiador Na^+/H^+ [95]. La entrada de Na^+ y salida de H^+ produce una alcalinización del medio intracelular que protege de la apoptosis inhibiendo a las caspasas [93]. Pero además, esta activación produce una respuesta pro supervivencia en la que está implicada PI3-K y que termina en la activación de Akt que inhibe estímulos apoptóticos producidos por proteínas como bad o bax. La activación de esta respuesta depende de la interacción entre NHE1 y ERM [120,144], Figura 53.

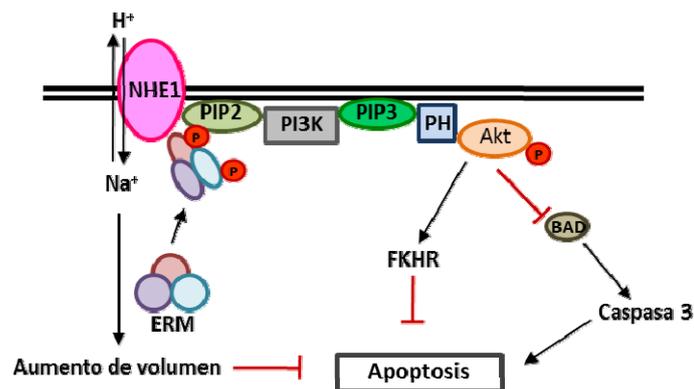


Figura 53. Esquema de la acción de ERM en respuesta a estímulos apoptóticos. Los estímulos apoptóticos producen una disminución de volumen citoplasmático. Se produce un aumento de actividad la subunidad NHE1 del intercambiador Na^+/H^+ que contrarresta este efecto y produce una alcalinización del medio intracelular. Además, se estimula la fosforilación de ERM que se unen a la cola citosólica de NHE1 lo que produce la estimulación de la vía PI3K/Akt que inhibe la apoptosis. (Modificado a partir de Wu, K.L, 2004 [144]).

Además, estudios realizados en ezrina demuestran que esta participa en la activación de Akt mediada por PI3-K [42,113]. El dominio globular presente en el extremo amino terminal interacciona con p85, subunidad reguladora de PI3-K, y con el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, al que también está unido SGK1.1. Esto sugiere que la ezrina permite a PI3-K mantenerse anclado en las proximidades de su sustrato. El dominio globular está conservado en los miembros de la familia ERM [42].

Recientemente, se ha descrito que SGK1 podría estar implicada en la regulación de procesos de migración [121]. Puede que SGK1.1 también regule este tipo de procesos y por ello afecte a la expresión de la radixina. Por otro lado, teniendo en cuenta que la radixina participa en respuestas de supervivencia y parece que en la activación de PI3K, puede resultar extraño que SGK1.1 disminuya su expresión. Existen estudios que demuestran que en células Jurkat la ezrina y la moesina son fosforiladas por la kinasa ROCK (Rho kinase) de manera dependiente de Rho. Esta fosforilación facilita la agregación del receptor de Fas y la activación de la caspasa 8 e inducción de apoptosis [49]. En estas células no se expresa la radixina, pero es probable que igual que la ezrina y la moesina, también participe en respuestas pro-apoptóticas y puede que por eso su expresión se vea inhibida por SGK1.1.

La lisocardiopina aciltransferasa, convierte el ácido lisofosfatídico en ácido fosfatídico sustrato que participa en la síntesis de moléculas de señalización como el fosfatidilinositol (PI) [2].

El PI es el fosfolípido menos abundante de la membrana, pero tiene un papel importante en la transducción de señales. La mayor parte del PI de mamíferos es 1-stearoil-2-arachidonoil. Se cree que éste se forma por remodelación de ácidos grasos después de la síntesis de PI. Las reacciones de remodelación incluyen la hidrólisis de un acil-éster unido en la posición sn-1 o sn-2 del PI recién formado y la incorporación del ácido graso

Discusión

apropiado en la posición. La deficiencia en LYCAT altera la composición de ácidos grasos de PI, pero no la de otros fosfolípidos. LYCAT podría actuar como una lisoPI aciltransferasa que cataliza la incorporación de ácido esteárico en la posición sn-1 del PI durante el proceso de remodelación de ácidos grasos in vivo. Por técnicas inmunohistoquímicas se ha visto que esta remodelación de LYCAT sobre el PI podría ocurrir en la membrana del RE [56]. De hecho, LYCAT presenta una secuencia de localización al retículo endoplásmico en su C-terminal. En la actualidad, se están estudiando las aciltransferasas como proteínas con un papel importante en la regulación del tráfico de proteínas, clasificación y desarrollo [25]. Algunas aciltransferasas parecen ser importantes en la regulación del desarrollo embrionario y la organogénesis. Estudios en *Zebrafish* que carecen de LYCAT muestran que se produce una reducción en el linaje endotelial y hematopoyético y ausencia de endocardio [146].

Otras proteínas identificadas en este trabajo como proteínas cuya expresión está regulada por SGK1.1 participan en el tráfico y clasificación de proteínas. Sin embargo la implicación de LYCAT en estos procesos no ha sido estudiada en profundidad.

La protein fosfatasa 1 es específica de serín/treonín proteínas y participa en procesos celulares como la síntesis proteica, metabolismo del glucógeno o división celular. Se ha descrito que los tres miembros de la familia de PP1, incluida la proteína fosfatasa β , interaccionan con BRCA1, gen implicado en el desarrollo de un alto porcentaje de cáncer de mama familiar. Al estudiar la expresión de PP1 α y β en tumores de mama determinaron que su nivel de expresión era variable, presentando valores de expresión o muy bajos o mayores que la media [143]. No está descrita ninguna relación directa de la subunidad catalítica β con SGK. Sin embargo, se ha descrito su participación en procesos de reparación del ADN actuando sobre la nucleofosmina (NPM). Ésta es una fosfoproteína nucleolar indispensable en procesos celulares como biogénesis de ribosomas, progreso

Discusión

del ciclo celular, apoptosis y diferenciación celular. PP1 β es responsable de la defosforilación de al menos tres residuos de NPM: Thr199, Thr234 y Thr237. Tras la defosforilación, NPM forma un complejo con pRB (retinoblastoma tumor suppressor protein) que se disocia de E2F1 lo que conlleva su activación transcripcional [79]. Además, la protein fosfatasa 1 es capaz de defosforilar p53 en las Ser15 y 37 y atenuar su actividad transcripcional y la apoptosis dependiente de p53 [78].

De nuevo, es posible que SGK1.1 participe en respuestas de supervivencia y este regulando la expresión de PPP1CB como parte de esos mecanismos.

Además, sabemos que la protein fosfatasa 1 es la principal fosfatasa encargada de defosforilar Akt en la Thr450 [145]. Puede que también esté implicada en la defosforilación de SGK1.1. En ese caso, es posible que el aumento o disminución de la expresión de PPP1CB esté relacionado con la actividad o inactividad de SGK1.1 de manera que exista entre ellas un mecanismo de regulación por retroalimentación.

La proteína Brox posee un dominio Bro-1. La primera proteína conocida con dominio Bro-1 fue Alix, que actúa como un adaptador multifuncional en muchos procesos biológicos como muerte celular, endocitosis de receptores, clasificación de proteínas en el endosoma o adhesión celular. Además, Alix también contiene en su región central un dominio V que se asocia con el motivo YPXnL encontrado en las proteínas Gag de retrovirus y que participa en la gemación vírica, figura 54 [37,125]. En el genoma de humanos se han encontrado cuatro proteínas que contienen dominios Bro-1 [151]. PTPN23, (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23) que codifica una putativa proteína tirosina fosfatasa, HD-PTP (His domain-containing protein tyrosine phosphatase), que, al igual que Alix, posee un dominio V y una región central rica en prolina. HD-PTP es, por tanto, un parálogo funcional de Alix. RHPN1 y RHPN2 que son

Discusión

proteínas de unión a Rho-GT que participan en la dinámica del citoesqueleto [111]. Brox que carece del dominio V y de la región rica en prolina. Estudios de las secuencias de estas proteínas indican que el dominio Bro-1 de Brox es menos similar que el de Alix y HD-PTP y, por tanto, también más alejado del de levaduras. Además, Brox posee una característica única, la presencia en el C-terminal de una secuencia de tetrapéptidos, Cys-Tyr-Ile-Ser, que forman un motivo CAAX, figura 54. Existen estudios que demuestran que Brox es farnesilado en el residuo Cys408 *in vivo*. Esta farnesilación podría afectar a su localización, ya que mientras que el WT tiene una localización perinuclear, la sustitución de la Cys408 por Ser produce una distribución difusa [55].

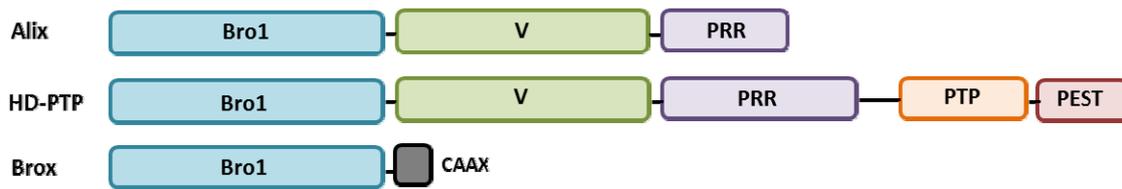


Figura 54. Esquema de las proteínas humanas con dominio Bro-1. Representación esquemática de Alix, HD-PTP y Brox donde: Bro-1= dominio Bro-1, V= dominio V, PRR= región rica en prolina, PTP= dominio protein tyrosin fosfatasa, PEST= motivo PEST y CAAX= motivo CAAX. (Modificado a partir de Ichioka, F, 2008, [55])

Se ha determinado que el dominio Bro-1 es necesario y suficiente para la interacción con CHMP4 (charged multivesicular body protein 4), proteína 4 de interacción con los cuerpos multivesiculares del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT-III) [12,52]. Este complejo tiene un papel importante en la liberación de partículas virales, citoquinesis, biogénesis de cuerpos multivesiculares y autofagia. En mamíferos está formado por diferentes complejos de proteínas como ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y el complejo VPS4-LIP5, además de otras proteínas asociadas como las proteínas con dominio Bro-1 Alix, HD-PTP y Brox [112]. La familia ESCRT-III está formada por las proteínas

Discusión

cargadas de cuerpos multivesiculares (CHMP1-7) y por IST-1 (increased sodium tolerance-1). Ambas poseen un N-terminal básico y un C-terminal ácido. Las interacciones entre estos segmentos polarizados mantienen las proteínas CHMP en estado de auto-inactivación como monómeros solubles [72,123]. Se sabe que Brox, al igual que Alix, interacciona con CHMP4b y con el HIV [55,101]. Estudios recientes sobre la interacción de Brox con otros miembros de la familia CHMP demuestran que no sólo interacciona con CHMP4b sino también con CHMP5 [101]. Las interacciones se producen, principalmente, por contactos hidrofóbicos entre Brox y el C-termino de las dos CHMP. Sin embargo, mientras que CHMP4b tiene un C-termino formado por α -hélices, igual que los otros miembros de la familia, el C-termino de CHMP5 tiene una estructura β -plegada. El C-termino de CHMP4b y CHMP5 se unen a Brox por el mismo sitio, pero emplean conformaciones diferentes para posicionar dos residuos hidrofóbicos equivalentes en la zona de interacción. Aunque CHMP5 no es esencial para la función de ESCRT-III en la escisión de la membrana y formación de cuerpos multivesiculares, si es esencial en la regulación de la función de los endosomas tardíos y lisosomas [101]. La deficiencia en CHMP5 produce que Brox y CHMP4b se disocian una vez que la escisión de la membrana se ha completado. RHPN2, otra proteína con dominio Bro-1, parece no interaccionar con CHMP4A y no se ha encontrado ninguna relación entre ella y el sistema ESCRT, aunque se localiza en endosomas tardíos y esta localización esta mediado por su dominio Bro-1 [124].

Como mencionamos, Alix interacciona con el motivo YPXnL de las proteínas Gag de HIV-1, por su dominio V. Brox carece de este dominio, pero también interacciona con el HIV-1. Parece que existe interacción entre el dominio NC (nucleocápside) de Gag y el dominio Bro-1, que es capaz, por sí sólo, de interaccionar con el HIV-1, de estimular la producción de partículas virales (VLP; virus-like particles) y de promover su liberación del citosol [115].

Discusión

SGK1.1, igual que SGK1, regula la actividad de canales. En cerebro, aumenta la expresión superficial de ENaC y disminuye la de ASIC1 pero, a diferencia de SGK1, esta regulación no parece depender de Nedd4-2. Brox también se expresa en cerebro, concretamente en el cortex, hipocampo y ventrículo lateral. Es posible que SGK1.1 participe en la regulación de la expresión de Brox como parte de un mecanismo de regulación de la expresión superficial de estos u otros receptores.

En cerebro, la expresión de SGK1.1 se incrementa con la despolarización de la membrana [10]. Sabemos que la transcripción de genes mediada por despolarización neuronal dependiente de actividad, está relacionada con la plasticidad sináptica. En respuesta a estímulos exteriores se produce la despolarización de la membrana y la entrada de Ca^{2+} , se inician una serie de cascadas de señalización que llevan a la activación de quinasas que fosforilan y activan factores transcripcionales como CREB, NF- κ B o MEF2 (myocyte enhancer factor 2) y estos factores transcripcionales activan la expresión genes. Los genes inducidos por actividad pueden actuar modulando la expresión de otros genes o afectar directamente a las propiedades neuronales [46,141,142]. El promotor de SGK1 contiene una secuencia consenso CREB [36] y su expresión en sistema nervioso está relacionada con la formación de la memoria, su consolidación a largo plazo y la modulación de la plasticidad sináptica [70]. La expresión de SGK1.1 y, de forma indirecta, la de los genes cuya expresión regula, aumenta con la despolarización. Así pues, es posible que la expresión de los genes mencionados en esta tesis, o al menos alguno de ellos, esté regulado por despolarización mediada por SGK1.1 como coactivador, y estén implicados en plasticidad neuronal y, por consiguiente, en parámetros más complejos del funcionamiento cerebral.

Conclusiones

Conclusiones

1. SGK1.1 regula en células HeLa la expresión de, al menos, seis genes: BAG4 (atanogen 4 asociado a Bcl-2), Brox (Proteína que contiene el dominio Bro1 y el motivo CAAX), LYCAT (lisocardiolipinaaciltransferasa), PPP1CB (subunidad catalítica β de la protein fosfatasa 1), RDX (Radixina) y C6ORF62 (ORF 62 del cromosoma 6). Esta regulación se ajusta a los siguientes patrones:
 - a. A nivel transcripcional, SGK1.1 constitutivamente activo incrementa la expresión de estos genes respecto a su forma inactiva. SGK1.1 en su forma inactiva disminuye notablemente la expresión de los genes mencionados
 - b. A nivel traduccional, SGK1.1 incrementa la expresión de BAG4 y Brox. En PPP1CB y RDX, la variación en los niveles de proteína no es estadísticamente significativa.

2. La localización subcelular de BAG4, Brox y PPP1CB, presenta los siguientes patrones: BAG4 presenta una distribución perinuclear y radial ramificada, sugerente de una asociación al citoesqueleto. Brox presenta un patrón vesicular, más abundante en la región perinuclear y que se extiende a todo el citoplasma. PPP1CB presenta una distribución difusa por toda la célula.
La intensidad de la fluorescencia en los tres casos indica un incremento de la expresión de estas proteínas en las células transfectadas con SGK1.1 activo respecto al no activo.

3. Hasta lo que sabemos, Brox es un gen conservado en eucariotas, previamente mal anotado en la base de datos del genoma humano en NCBI (ID: 148362). Basándonos en la estructura del gen Brox de *Pongo abelii* (orangután), podemos confirmar que el mRNA de Brox humano se extiende más de 3.7 Kb, sin la cola poli A.

Conclusiones

4. El gen Brox en humano codifica para una proteína con un peso molecular teórico estimado de la traducción de la secuencia del ORF de 50kDa. Sin embargo, en esta tesis hemos demostrado la existencia de al menos dos péptidos distintos, denominados Brox-1 y Brox-2 con un Mr estimado mediante electroforesis en SDS de 50kDa y 40kDa respectivamente.

5. El mRNA de Brox en rata es más abundante en bazo y riñón, menos abundantes en vesícula biliar, músculo rojo, útero, corazón, hígado, intestino, pulmón y páncreas y escaso en glándula suprarrenal, testículo y ovario, cerebro, cerebelo y estómago.

6. La proteína Brox en rata se expresa mayoritariamente en ovario y testículo, menos en hígado, glándula suprarrenal, cerebro, cerebelo, útero, vesícula y músculo rojo y escasamente en bazo, corazón, estómago, intestino, páncreas, pulmón y riñón.
La proporción Brox-1/Brox 2, es muy variable, dependiendo de los tejidos.

Bibliografía

Bibliografia

1. **Adams,J.M. and Cory,S.** (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281:1322-1326.
2. **Agarwal,A.K., Barnes,R.I., and Garg,A.** (2006). Functional characterization of human 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase isoform 8: cloning, tissue distribution, gene structure, and enzymatic activity. *Arch.Biochem.Biophys.* 449:64-76.
3. **Alliston,T.N., Gonzalez-Robayna,I.J., Buse,P., Firestone,G.L., and Richards,J.S.** (2000). Expression and localization of serum/glucocorticoid-induced kinase in the rat ovary: relation to follicular growth and differentiation. *Endocrinology*. 141:385-395.
4. **Alvarez,d.I.R., Zhang,P., Naray-Fejes-Toth,A., Fejes-Toth,G., and Canessa,C.M.** (1999). The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J.Biol.Chem.* 274:37834-37839.
5. **Alvarez,d.I.R. and Canessa,C.M.** (2003). Role of SGK in hormonal regulation of epithelial sodium channel in A6 cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 284:C404-C414.
6. **Alvarez,d.I.R., Gimenez,I., Forbush,B., and Canessa,C.M.** (2006). SGK1 activates Na⁺-K⁺-ATPase in amphibian renal epithelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 290:C492-C498.
7. **Amato,R., D'Antona,L., Porciatti,G., Agosti,V., Menniti,M., Rinaldo,C., Costa,N., Bellacchio,E., Mattarocci,S., Fuiano,G., Soddu,S., Paggi,M.G., Lang,F., and Perrotti,N.** (2009). Sgk1 activates MDM2-dependent p53 degradation and affects cell proliferation, survival, and differentiation. *J.Mol.Med.(Berl)*. 87:1221-1239.
8. **Annunziata,C.M., Kleinberg,L., Davidson,B., Berner,A., Gius,D., Tchabo,N., Steinberg,S.M., and Kohn,E.C.** (2007). BAG-4/SODD and associated antiapoptotic proteins are linked to aggressiveness of epithelial ovarian cancer. *Clin.Cancer Res.* 13:6585-6592.
9. **Arteaga,M.F. and Canessa,C.M.** (2005). Functional specificity of Sgk1 and Akt1 on ENaC activity. *Am.J.Physiol Renal Physiol.* 289:F90-F96.
10. **Arteaga,M.F., Wang,L., Ravid,T., Hochstrasser,M., and Canessa,C.M.** (2006). An amphipathic helix targets serum and glucocorticoid-induced kinase 1 to the endoplasmic reticulum-associated

Bibliografia

- ubiquitin-conjugation machinery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103:11178-11183.
11. **Arteaga,M.F., Alvarez,d.l.R., Alvarez,J.A., and Canessa,C.M.** (2007). Multiple translational isoforms give functional specificity to serum- and glucocorticoid-induced kinase 1. *Mol.Biol.Cell.* 18:2072-2080.
 12. **Arteaga,M.F., Coric,T., Straub,C., and Canessa,C.M.** (2008). A brain-specific SGK1 splice isoform regulates expression of ASIC1 in neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105:4459-4464.
 13. **Babst,M.** (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic.* 6:2-9.
 14. **Baltaev,R., Strutz-Seebom,N., Korniychuk,G., Myssina,S., Lang,F., and Seebom,G.** (2005). Regulation of cardiac shal-related potassium channel Kv 4.3 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch.* 450:26-33.
 15. **Baskin,R. and Sayeski,P.P.** (2012). Angiotensin II mediates cell survival through upregulation and activation of the serum and glucocorticoid inducible kinase 1. *Cell Signal.* 24:435-442.
 16. **Bayascas,J.R.** (2010). PDK1: the major transducer of PI 3-kinase actions. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 346:9-29. doi: 10.1007/82_2010_43.:9-29.
 17. **Biondi,R.M., Kieloch,A., Currie,R.A., Deak,M., and Alessi,D.R.** (2001). The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J.* 20:4380-4390.
 18. **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.
 19. **Bogusz,A.M., Brickley,D.R., Pew,T., and Conzen,S.D.** (2006). A novel N-terminal hydrophobic motif mediates constitutive degradation of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *FEBS J.* 273:2913-2928.
 20. **Bretscher,A.** (1989). Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor. *J.Cell Biol.* 108:921-930.

Bibliografia

21. **Bruhn,M.A., Pearson,R.B., Hannan,R.D., and Sheppard,K.E.** (2010). Second AKT: the rise of SGK in cancer signalling. *Growth Factors*. 28:394-408.
22. **Brunet,A., Park,J., Tran,H., Hu,L.S., Hemmings,B.A., and Greenberg,M.E.** (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol.Cell Biol.* 21:952-965.
23. **Buse,P., Tran,S.H., Luther,E., Phu,P.T., Aponte,G.W., and Firestone,G.L.** (1999). Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, in mammary tumor cells. A novel convergence point of anti-proliferative and proliferative cell signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 274:7253-7263.
24. **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.
25. **Cannon,J.L., Mody,P.D., Blaine,K.M., Chen,E.J., Nelson,A.D., Sayles,L.J., Moore,T.V., Clay,B.S., Dulin,N.O., Shilling,R.A., Burkhardt,J.K., and Sperling,A.I.** (2011). CD43 interaction with ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins regulates T-cell trafficking and CD43 phosphorylation. *Mol.Biol.Cell.* 22:954-963.
26. **Cao,J., Liu,Y., Lockwood,J., Burn,P., and Shi,Y.** (2004). A novel cardiolipin-remodeling pathway revealed by a gene encoding an endoplasmic reticulum-associated acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase (ALCAT1) in mouse. *J.Biol.Chem.* 279:31727-31734.
27. **Cao,W., Epstein,C., Liu,H., DeLoughery,C., Ge,N., Lin,J., Diao,R., Cao,H., Long,F., Zhang,X., Chen,Y., Wright,P.S., Busch,S., Wenck,M., Wong,K., Saltzman,A.G., Tang,Z., Liu,L., and Zilberstein,A.** (2004). Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC.Genomics.* 5:26.
28. **Cheng,C.J. and Huang,C.L.** (2011). Activation of PI3-kinase stimulates endocytosis of ROMK via Akt1/SGK1-dependent phosphorylation of WNK1. *J.Am.Soc.Nephrol.* 22:460-471.
29. **Ciechanover,A. and Iwai,K.** (2004). The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB.Life.* 56:193-201.

Bibliografia

30. **Cuervo,A.M.** (2004). Autophagy: many paths to the same end. *Mol.Cell Biochem.* 263:55-72.
31. **David,S., Stegenga,S.L., Hu,P., Xiong,G., Kerr,E., Becker,K.B., Venkatapathy,S., Warrington,J.A., and Kalb,R.G.** (2005). Expression of serum- and glucocorticoid-inducible kinase is regulated in an experience-dependent manner and can cause dendrite growth. *J.Neurosci.* 25:7048-7053.
32. **Delmolino,L.M. and Castellot,J.J., Jr.** (1997). Heparin suppresses *sgk*, an early response gene in proliferating vascular smooth muscle cells. *J.Cell Physiol.* 173:371-379.
33. **Diatchenko,L., Lau,Y.F., Campbell,A.P., Chenchik,A., Moqadam,F., Huang,B., Lukyanov,S., Lukyanov,K., Gurskaya,N., Sverdlov,E.D., and Siebert,P.D.** (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:6025-6030.
34. **Doong,H., Vrailas,A., and Kohn,E.C.** (2002). What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett.* 188:25-32.
35. **Endo,T., Kusakabe,M., Sunadome,K., Yamamoto,T., and Nishida,E.** (2011). The kinase SGK1 in the endoderm and mesoderm promotes ectodermal survival by down-regulating components of the death-inducing signaling complex. *Sci.Signal.* 4:ra2.
36. **Eylenstein,A., Gehring,E.M., Heise,N., Shumilina,E., Schmidt,S., Szteyn,K., Munzer,P., Nurbaeva,M.K., Eichenmuller,M., Tyan,L., Regel,I., Foller,M., Kuhl,D., Soboloff,J., Penner,R., and Lang,F.** (2011). Stimulation of Ca²⁺-channel Orai1/STIM1 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1). *FASEB J.* 25:2012-2021.
37. **Faresse,N., Lagnaz,D., Debonneville,A., Ismailji,A., Maillard,M., Fejes-Toth,G., Naray-Fejes-Toth,A., and Staub,O.** (2012). Inducible kidney-specific *Sgk1* knockout mice show a salt-losing phenotype. *Am.J.Physiol Renal Physiol.* 302:F977-F985.
38. **Firestone,G.L., Giampaolo,J.R., and O'Keeffe,B.A.** (2003). Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell Physiol Biochem.* 13:1-12.

Bibliografia

39. **Fisher,R.D., Chung,H.Y., Zhai,Q., Robinson,H., Sundquist,W.I., and Hill,C.P.** (2007). Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell*. 128:841-852.
40. **Gamerdinge,r,M., Carra,S., and Behl,C.** (2011). Emerging roles of molecular chaperones and co-chaperones in selective autophagy: focus on BAG proteins. *J.Mol.Med.(Berl)*. 89:1175-1182.
41. **Gamper,N., Fillon,S., Feng,Y., Friedrich,B., Lang,P.A., Henke,G., Huber,S.M., Kobayashi,T., Cohen,P., and Lang,F.** (2002). K⁺ channel activation by all three isoforms of serum- and glucocorticoid-dependent protein kinase SGK. *Pflugers Arch*. 445:60-66.
42. **Gao,D., Wan,L., and Wei,W.** (2010). Phosphorylation of Rictor at Thr1135 impairs the Rictor/Cullin-1 complex to ubiquitinate SGK1. *Protein Cell*. 1:881-885.
43. **Garcia-Martinez,J.M. and Alessi,D.R.** (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem.J*. 416:375-385.
44. **Gautreau,A., Pouillet,P., Louvard,D., and Arpin,M.** (1999). Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:7300-7305.
45. **Gazewood,J.D., Richards,D.R., and Clebak,K.** (2013). Parkinson disease: an update. *Am.Fam.Physician*. 87:267-273.
46. **Giraldez,T., Afonso-Oramas,D., Cruz-Muros,I., Garcia-Marin,V., Pagel,P., Gonzalez-Hernandez,T., and Alvarez,d.I.R.** (2007). Cloning and functional expression of a new epithelial sodium channel delta subunit isoform differentially expressed in neurons of the human and monkey telencephalon. *J.Neurochem*. 102:1304-1315.
47. **Gusella,J.F. and MacDonald,M.E.** (1998). Huntingtin: a single bait hooks many species. *Curr.Opin.Neurobiol*. 8:425-430.
48. **Hara,T., Nakamura,K., Matsui,M., Yamamoto,A., Nakahara,Y., Suzuki-Migishima,R., Yokoyama,M., Mishima,K., Saito,I., Okano,H., and Mizushima,N.** (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 441:885-889.

Bibliografia

49. **Hayashi,M., Tapping,R.I., Chao,T.H., Lo,J.F., King,C.C., Yang,Y., and Lee,J.D.** (2001). BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J.Biol.Chem.* 276:8631-8634.
50. **Hebert,M., Potin,S., Sebbagh,M., Bertoglio,J., Breard,J., and Hamelin,J.** (2008). Rho-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *J.Immunol.* 181:5963-5973.
51. **Hemmings,B.A. and Restuccia,D.F.** (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* 4:a011189.
52. **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.
53. **Henne,W.M., Buchkovich,N.J., and Emr,S.D.** (2011). The ESCRT pathway. *Dev.Cell.* 21:77-91.
54. **Hertweck,M., Gobel,C., and Baumeister,R.** (2004). C. elegans SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev.Cell.* 6:577-588.
55. **Hillmann,A., Dunne,E., and Kenny,D.** (2009). cDNA amplification by SMART-PCR and suppression subtractive hybridization (SSH)-PCR. *Methods Mol.Biol.* 496:223-43. doi: 10.1007/978-1-59745-553-4_15.:223-243.
56. **Ichioka,F., Kobayashi,R., Katoh,K., Shibata,H., and Maki,M.** (2008). Brox, a novel farnesylated Bro1 domain-containing protein that associates with charged multivesicular body protein 4 (CHMP4). *FEBS J.* 275:682-692.
57. **Imae,R., Inoue,T., Nakasaki,Y., Uchida,Y., Ohba,Y., Kono,N., Nakanishi,H., Sasaki,T., Mitani,S., and Arai,H.** (2012). LYCAT, a homologue of C. elegans acl-8, acl-9, and acl-10, determines the fatty acid composition of phosphatidylinositol in mice. *J.Lipid Res.* 53:335-347.
58. **Imaizumi,K., Tsuda,M., Wanaka,A., Tohyama,M., and Takagi,T.** (1994). Differential expression of sgk mRNA, a member of the Ser/Thr protein kinase gene family, in rat brain after CNS injury. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 26:189-196.

Bibliografia

59. **Jeon,S., Kim,N.H., Kim,J.Y., and Lee,A.Y.** (2009). Stem cell factor induces ERM proteins phosphorylation through PI3K activation to mediate melanocyte proliferation and migration. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22:77-85.
60. **Kabbage,M. and Dickman,M.B.** (2008). The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell Mol.Life Sci.* 65:1390-1402.
61. **Karin,M. and Lin,A.** (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat.Immunol.* 3:221-227.
62. **Kaytor,M.D. and Orr,H.T.** (2002). The GSK3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease. *Curr.Opin.Neurobiol.* 12:275-278.
63. **Kobayashi,T., Deak,M., Morrice,N., and Cohen,P.** (1999). Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem.J.* 344 Pt 1:189-97.:189-197.
64. **Kraft,C., Peter,M., and Hofmann,K.** (2010). Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat.Cell Biol.* 12:836-841.
65. **Lang,F. and Cohen,P.** (2001). Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci.STKE.* 2001:re17.
66. **Lang,F., Henke,G., Embark,H.M., Waldegger,S., Palmada,M., Bohmer,C., and Vallon,V.** (2003). Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase - implications for transport, excitability and cell proliferation. *Cell Physiol Biochem.* 13:41-50.
67. **Lang,F., Bohmer,C., Palmada,M., Seebohm,G., Strutz-Seebohm,N., and Vallon,V.** (2006). (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev.* 86:1151-1178.
68. **Lang,F., Artunc,F., and Vallon,V.** (2009). The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 18:439-448.
69. **Lang,F., Perrotti,N., and Stournaras,C.** (2010). Colorectal carcinoma cells--regulation of survival and growth by SGK1. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 42:1571-1575.

Bibliografia

70. **Lang,F., Strutz-Seebohm,N., Seebohm,G., and Lang,U.E.** (2010). Significance of SGK1 in the regulation of neuronal function. *J.Physiol.* 588:3349-3354.
71. **Lang,F. and Vallon,V.** (2012). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in the regulation of renal and extrarenal potassium transport. *Clin.Exp.Nephrol.* 16:73-80.
72. **Lang,F. and Shumilina,E.** (2013). Regulation of ion channels by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *FASEB J.* 27:3-12.
73. **Lata,S., Roessle,M., Solomons,J., Jamin,M., Gottlinger,H.G., Svergun,D.I., and Weissenhorn,W.** (2008). Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J.Mol.Biol.* 378:818-827.
74. **Lau,P.P. and Chan,L.** (2003). Involvement of a chaperone regulator, Bcl2-associated athanogene-4, in apolipoprotein B mRNA editing. *J.Biol.Chem.* 278:52988-52996.
75. **Lee,C.T., Tyan,S.W., Ma,Y.L., Tsai,M.C., Yang,Y.C., and Lee,E.H.** (2006). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the MAPK/ERK signaling pathway that mediates memory formation in rats. *Eur.J.Neurosci.* 23:1311-1320.
76. **Lee,C.T., Ma,Y.L., and Lee,E.H.** (2007). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase1 enhances contextual fear memory formation through down-regulation of the expression of Hes5. *J.Neurochem.* 100:1531-1542.
77. **Lee,E.H., Hsu,W.L., Ma,Y.L., Lee,P.J., and Chao,C.C.** (2003). Enrichment enhances the expression of sgk, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur.J.Neurosci.* 18:2842-2852.
78. **Leong,M.L., Maiyar,A.C., Kim,B., O'Keeffe,B.A., and Firestone,G.L.** (2003). Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 278:5871-5882.
79. **Li,D.W., Liu,J.P., Schmid,P.C., Schlosser,R., Feng,H., Liu,W.B., Yan,Q., Gong,L., Sun,S.M., Deng,M., and Liu,Y.** (2006). Protein serine/threonine phosphatase-1 dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to modulate its transcriptional and apoptotic activities. *Oncogene.* 25:3006-3022.

Bibliografia

80. **Lin,C.Y., Tan,B.C., Liu,H., Shih,C.J., Chien,K.Y., Lin,C.L., and Yung,B.Y.** (2010). Dephosphorylation of nucleophosmin by PP1beta facilitates pRB binding and consequent E2F1-dependent DNA repair. *Mol.Biol.Cell.* 21:4409-4417.
81. **Liu,D., Yang,X., and Songyang,Z.** (2000). Identification of CISK, a new member of the SGK kinase family that promotes IL-3-dependent survival. *Curr.Biol.* 10:1233-1236.
82. **Loffing,J., Flores,S.Y., and Staub,O.** (2006). Sgk kinases and their role in epithelial transport. *Annu.Rev.Physiol.* 68:461-90.:461-490.
83. **Louvet-Vallee,S.** (2000). ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol.Cell.* 92:305-316.
84. **Lu,M., Wang,J., Jones,K.T., Ives,H.E., Feldman,M.E., Yao,L.J., Shokat,K.M., Ashrafi,K., and Pearce,D.** (2010). mTOR complex-2 activates ENaC by phosphorylating SGK1. *J.Am.Soc.Nephrol.* 21:811-818.
85. **Lucas,J.J., Hernandez,F., Gomez-Ramos,P., Moran,M.A., Hen,R., and Avila,J.** (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* 20:27-39.
86. **Luft,F.C.** (2007). SGK1 survival through various lives may save us all. *J.Mol.Med.(Berl).* 85:657-659.
87. **Ma,Y.L., Tsai,M.C., Hsu,W.L., and Lee,E.H.** (2006). SGK protein kinase facilitates the expression of long-term potentiation in hippocampal neurons. *Learn.Mem.* 13:114-118.
88. **Maiyar,A.C., Phu,P.T., Huang,A.J., and Firestone,G.L.** (1997). Repression of glucocorticoid receptor transactivation and DNA binding of a glucocorticoid response element within the serum/glucocorticoid-inducible protein kinase (sgk) gene promoter by the p53 tumor suppressor protein. *Mol.Endocrinol.* 11:312-329.
89. **Maiyar,A.C., Leong,M.L., and Firestone,G.L.** (2003). Importin-alpha mediates the regulated nuclear targeting of serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by recognition of a nuclear localization signal in the kinase central domain. *Mol.Biol.Cell.* 14:1221-1239.

Bibliografia

90. **Marrion,N.V., Smart,T.G., Marsh,S.J., and Brown,D.A.** (1989). Muscarinic suppression of the M-current in the rat sympathetic ganglion is mediated by receptors of the M1-subtype. *Br.J.Pharmacol.* 98:557-573.
91. **Marrion,N.V.** (1997). Control of M-current. *Annu.Rev.Physiol.* 59:483-504.:483-504.
92. **Marucci,G., Lammi,C., Buccioni,M., Dal,B.D., Lambertucci,C., Amantini,C., Santoni,G., Kandhavelu,M., Abbracchio,M.P., Lecca,D., Volpini,R., and Cristalli,G.** (2011). Comparison and optimization of transient transfection methods at human astrocytoma cell line 1321N1. *Anal.Biochem.* 414:300-302.
93. **Matsui,H., Asou,H., and Inaba,T.** (2007). Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol.Cell.* 25:99-112.
94. **Matsuyama,S., Llopis,J., Deveraux,Q.L., Tsien,R.Y., and Reed,J.C.** (2000). Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat.Cell Biol.* 2:318-325.
95. **McDonald,F.J.** (2008). A new SGK1 knockout mouse. *Am.J.Physiol Renal Physiol.* 294:F1296-F1297.
96. **McManus,M.L., Churchwell,K.B., and Strange,K.** (1995). Regulation of cell volume in health and disease. *N.Engl.J.Med.* 333:1260-1266.
97. **Meng,F., Yamagiwa,Y., Taffetani,S., Han,J., and Patel,T.** (2005). IL-6 activates serum and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 289:C971-C981.
98. **Miki,K. and Eddy,E.M.** (2002). Tumor necrosis factor receptor 1 is an ATPase regulated by silencer of death domain. *Mol.Cell Biol.* 22:2536-2543.
99. **Miranda,P., Cadaveira-Mosquera,A., Gonzalez-Montelongo,R., Villarroel,A., Gonzalez-Hernandez,T., Lamas,J.A., Alvarez,d.l.R., and Giraldez,T.** (2013). The Neuronal Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1.1 Reduces Neuronal Excitability and Protects against Seizures through Upregulation of the M-Current. *J.Neurosci.* 33:2684-2696.

Bibliografia

100. **Mobasheri,A., Avila,J., Cozar-Castellano,I., Brownleader,M.D., Trevan,M., Francis,M.J., Lamb,J.F., and Martin-Vasallo,P.** (2000). Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci.Rep.* 20:51-91.
101. **Mody,P.D., Cannon,J.L., Bandukwala,H.S., Blaine,K.M., Schilling,A.B., Swier,K., and Sperling,A.I.** (2007). Signaling through CD43 regulates CD4 T-cell trafficking. *Blood.* 110:2974-2982.
102. **Mu,R., Dussupt,V., Jiang,J., Sette,P., Rudd,V., Chuenchor,W., Bello,N.F., Bouamr,F., and Xiao,T.S.** (2012). Two distinct binding modes define the interaction of Brox with the C-terminal tails of CHMP5 and CHMP4B. *Structure.* 20:887-898.
103. **Musch,M.W., Lucioni,A., and Chang,E.B.** (2008). Aldosterone regulation of intestinal Na absorption involves SGK-mediated changes in NHE3 and Na⁺ pump activity. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol.* 295:G909-G919.
104. **Nandi,D., Tahiliani,P., Kumar,A., and Chandu,D.** (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J.Biosci.* 31:137-155.
105. **Naray-Fejes-Toth,A., Helms,M.N., Stokes,J.B., and Fejes-Toth,G.** (2004). Regulation of sodium transport in mammalian collecting duct cells by aldosterone-induced kinase, SGK1: structure/function studies. *Mol.Cell Endocrinol.* 217:197-202.
106. **Nishida,Y., Nagata,T., Takahashi,Y., Sugahara-Kobayashi,M., Murata,A., and Asai,S.** (2004). Alteration of serum/glucocorticoid regulated kinase-1 (sgk-1) gene expression in rat hippocampus after transient global ischemia. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 123:121-125.
107. **Nuber,U.A., Kriaucionis,S., Roloff,T.C., Guy,J., Selfridge,J., Steinhoff,C., Schulz,R., Lipkowitz,B., Ropers,H.H., Holmes,M.C., and Bird,A.** (2005). Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 14:2247-2256.
108. **Ooms,L.M., Horan,K.A., Rahman,P., Seaton,G., Gurung,R., Kethesparan,D.S., and Mitchell,C.A.** (2009). The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem.J.* 419:29-49.
109. **Pao,A.C., McCormick,J.A., Li,H., Siu,J., Govaerts,C., Bhalla,V., Soundararajan,R., and Pearce,D.** (2007). NH2 terminus of serum

Bibliografia

- and glucocorticoid-regulated kinase 1 binds to phosphoinositides and is essential for isoform-specific physiological functions. *Am.J.Physiol Renal Physiol.* 292:F1741-F1750.
110. **Park,J., Leong,M.L., Buse,P., Maiyar,A.C., Firestone,G.L., and Hemmings,B.A.** (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 18:3024-3033.
111. **Pearce,L.R., Komander,D., and Alessi,D.R.** (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 11:9-22.
112. **Peck,J.W., Oberst,M., Bouker,K.B., Bowden,E., and Burbelo,P.D.** (2002). The RhoA-binding protein, rhophilin-2, regulates actin cytoskeleton organization. *J.Biol.Chem.* 277:43924-43932.
113. **Peel,S., Macheboeuf,P., Martinelli,N., and Weissenhorn,W.** (2011). Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem.Sci.* 36:199-210.
114. **Perez,O.D., Kinoshita,S., Hitoshi,Y., Payan,D.G., Kitamura,T., Nolan,G.P., and Lorens,J.B.** (2002). Activation of the PKB/AKT pathway by ICAM-2. *Immunity.* 16:51-65.
115. **Peterson,R.T. and Schreiber,S.L.** (1999). Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr.Biol.* 9:R521-R524.
116. **Popov,S., Popova,E., Inoue,M., and Gottlinger,H.G.** (2009). Divergent Bro1 domains share the capacity to bind human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid and to enhance virus-like particle production. *J.Virol.* 83:7185-7193.
117. **Rahman,P., Huysmans,R.D., Wiradjaja,F., Gurung,R., Ooms,L.M., Sheffield,D.A., Dyson,J.M., Layton,M.J., Sriratana,A., Takada,H., Tiganis,T., and Mitchell,C.A.** (2011). Silencer of death domains (SODD) inhibits skeletal muscle and kidney enriched inositol 5-phosphatase (SKIP) and regulates phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling to the actin cytoskeleton. *J.Biol.Chem.* 286:29758-29770.
118. **Rangone,H., Poizat,G., Troncoso,J., Ross,C.A., MacDonald,M.E., Saudou,F., and Humbert,S.** (2004). The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin. *Eur.J.Neurosci.* 19:273-279.

Bibliografia

119. **Rebrikov,D.V.** (2008). Identification of differential genes by suppression subtractive hybridization: an overview. *CSH.Protoc.* 2008:pdb.top21. doi: 10.1101/pdb.top21.:db.
120. **Rosser,M.P., Xia,W., Hartsell,S., McCaman,M., Zhu,Y., Wang,S., Harvey,S., Bringmann,P., and Cobb,R.R.** (2005). Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system. *Protein Expr.Purif.* 40:237-243.
121. **Schelling,J.R. and Abu Jawdeh,B.G.** (2008). Regulation of cell survival by Na⁺/H⁺ exchanger-1. *Am.J.Physiol Renal Physiol.* 295:F625-F632.
122. **Schmidt,E.M., Gu,S., Anagnostopoulou,V., Alevizopoulos,K., Foller,M., Lang,F., and Stournaras,C.** (2012). Serum- and glucocorticoid-dependent kinase-1-induced cell migration is dependent on vinculin and regulated by the membrane androgen receptor. *FEBS J.* 279:1231-1242.
123. **Schoenebeck,B., Bader,V., Zhu,X.R., Schmitz,B., Lubbert,H., and Stichel,C.C.** (2005). Sgk1, a cell survival response in neurodegenerative diseases. *Mol.Cell Neurosci.* 30:249-264.
124. **Shim,S., Kimpler,L.A., and Hanson,P.I.** (2007). Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic.* 8:1068-1079.
125. **Steuve,S., Devosse,T., Lauwers,E., Vanderwinden,J.M., Andre,B., Courtoy,P.J., and Pirson,I.** (2006). Rhoophilin-2 is targeted to late-endosomal structures of the vesicular machinery in the presence of activated RhoB. *Exp.Cell Res.* 312:3981-3989.
126. **Strack,B., Calistri,A., Craig,S., Popova,E., and Gottlinger,H.G.** (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell.* 114:689-699.
127. **Strutz-Seebohm,N., Seebohm,G., Mack,A.F., Wagner,H.J., Just,L., Skutella,T., Lang,U.E., Henke,G., Striegel,M., Hollmann,M., Rouach,N., Nicoll,R.A., McCormick,J.A., Wang,J., Pearce,D., and Lang,F.** (2005). Regulation of GluR1 abundance in murine hippocampal neurones by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 3. *J.Physiol.* 565:381-390.

Bibliografia

128. **Takada,H., Chen,N.J., Mirtsos,C., Suzuki,S., Suzuki,N., Wakeham,A., Mak,T.W., and Yeh,W.C.** (2003). Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol.Cell Biol.* 23:4026-4033.
129. **Tessier,M. and Woodgett,J.R.** (2006). Serum and glucocorticoid-regulated protein kinases: variations on a theme. *J.Cell Biochem.* 98:1391-1407.
130. **Thomas,S., Quinn,B.A., Das,S.K., Dash,R., Emdad,L., Dasgupta,S., Wang,X.Y., Dent,P., Reed,J.C., Pellecchia,M., Sarkar,D., and Fisher,P.B.** (2013). Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert.Opin.Ther.Targets.* 17:61-75.
131. **Tsai,K.J., Chen,S.K., Ma,Y.L., Hsu,W.L., and Lee,E.H.** (2002). sgk, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* %19;99:3990-3995.
132. **Ullrich,S., Zhang,Y., Avram,D., Ranta,F., Kuhl,D., Haring,H.U., and Lang,F.** (2007). Dexamethasone increases Na⁺/K⁺ ATPase activity in insulin secreting cells through SGK1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* %19;352:662-667.
133. **Verrey,F., Loffing,J., Zecevic,M., Heitzmann,D., and Staub,O.** (2003). SGK1: aldosterone-induced relay of Na⁺ transport regulation in distal kidney nephron cells. *Cell Physiol Biochem.* 13:21-28.
134. **Waldmann,R., Champigny,G., Bassilana,F., Voilley,N., and Lazdunski,M.** (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J.Biol.Chem.* 270:27411-27414.
135. **Wang,D., Sun,H., Lang,F., and Yun,C.C.** (2005). Activation of NHE3 by dexamethasone requires phosphorylation of NHE3 at Ser663 by SGK1. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 289:C802-C810.
136. **Wang,K., Gu,S., Nasir,O., Foller,M., Ackermann,T.F., Klingel,K., Kandolf,R., Kuhl,D., Stournaras,C., and Lang,F.** (2010). SGK1-dependent intestinal tumor growth in APC-deficient mice. *Cell Physiol Biochem.* 25:271-278.
137. **Warby,S.C., Doty,C.N., Graham,R.K., Shively,J., Singaraja,R.R., and Hayden,M.R.** (2009). Phosphorylation of huntingtin reduces the accumulation of its nuclear fragments. *Mol.Cell Neurosci.* 40:121-127.

Bibliografia

138. Warntges,S., Friedrich,B., Henke,G., Durantón,C., Lang,P.A., Waldegger,S., Meyermann,R., Kuhl,D., Speckmann,E.J., Obermüller,N., Witzgall,R., Mack,A.F., Wagner,H.J., Wagner,A., Broer,S., and Lang,F. (2002). Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflugers Arch.* 443:617-624.
139. Watt,G.B., Ismail,N.A., Caballero,A.G., Land,S.C., and Wilson,S.M. (2012). Epithelial Na(+) channel activity in human airway epithelial cells: the role of serum and glucocorticoid-inducible kinase 1. *Br.J.Pharmacol.* 166:1272-1289.
140. Webster,M.K., Goya,L., Ge,Y., Maiyar,A.C., and Firestone,G.L. (1993). Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol.Cell Biol.* 13:2031-2040.
141. Wesch,D., Miranda,P., Afonso-Oramas,D., Althaus,M., Castro-Hernandez,J., Dominguez,J., Morty,R.E., Clauss,W., Gonzalez-Hernandez,T., Alvarez,d.l.R., and Giraldez,T. (2010). The neuronal-specific SGK1.1 kinase regulates {delta}-epithelial Na⁺ channel independently of PY motifs and couples it to phospholipase C signaling. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 299:C779-C790.
142. Winter,S.L., Bosnoyan-Collins,L., Pinnaduwege,D., and Andrulis,I.L. (2007). The interaction of PP1 with BRCA1 and analysis of their expression in breast tumors. *BMC.Cancer.* %19;7:85.:85.
143. Wu,K.L., Khan,S., Lakhe-Reddy,S., Jarad,G., Mukherjee,A., Obejero-Paz,C.A., Konieczkowski,M., Sedor,J.R., and Schelling,J.R. (2004). The NHE1 Na⁺/H⁺ exchanger recruits ezrin/radixin/moesin proteins to regulate Akt-dependent cell survival. *J.Biol.Chem.* 279:26280-26286.
144. Xiao,L., Gong,L.L., Yuan,D., Deng,M., Zeng,X.M., Chen,L.L., Zhang,L., Yan,Q., Liu,J.P., Hu,X.H., Sun,S.M., Liu,J., Ma,H.L., Zheng,C.B., Fu,H., Chen,P.C., Zhao,J.Q., Xie,S.S., Zou,L.J., Xiao,Y.M., Liu,W.B., Zhang,J., Liu,Y., and Li,D.W. (2010). Protein phosphatase-1 regulates Akt1 signal transduction pathway to control gene expression, cell survival and differentiation. *Cell Death.Differ.* 17:1448-1462.
145. Xiong,J.W., Yu,Q., Zhang,J., and Mably,J.D. (2008). An acyltransferase controls the generation of hematopoietic and endothelial lineages in zebrafish. *Circ.Res.* 102:1057-1064.

Bibliografia

146. **Xu,J., Liu,D., Gill,G., and Songyang,Z.** (2001). Regulation of cytokine-independent survival kinase (CISK) by the Phox homology domain and phosphoinositides. *J.Cell Biol.* %20;154:699-705.
147. **You,H., Jang,Y., You-Ten,A.I., Okada,H., Liepa,J., Wakeham,A., Zaugg,K., and Mak,T.W.** (2004). p53-dependent inhibition of FKHRL1 in response to DNA damage through protein kinase SGK1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:14057-14062.
148. **Yue,P., Sun,P., Lin,D.H., Pan,C., Xing,W., and Wang,W.** (2011). Angiotensin II diminishes the effect of SGK1 on the WNK4-mediated inhibition of ROMK1 channels. *Kidney Int.* 79:423-431.
149. **Yun,C.C., Palmada,M., Embark,H.M., Fedorenko,O., Feng,Y., Henke,G., Setiawan,I., Boehmer,C., Weinman,E.J., Sandrasagra,S., Korbmacher,C., Cohen,P., Pearce,D., and Lang,F.** (2002). The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na⁺/H⁺ exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K⁺ channel ROMK1. *J.Am.Soc.Nephrol.* 13:2823-2830.
150. **Zhai,Q., Landesman,M.B., Robinson,H., Sundquist,W.I., and Hill,C.P.** (2011). Structure of the Bro1 domain protein BROX and functional analyses of the ALIX Bro1 domain in HIV-1 budding. *PLoS.One.* 6:e27466.
151. **Zhang,L., Cui,R., Cheng,X., and Du,J.** (2005). Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I{kappa}B kinase. *Cancer Res.* 65:457-464.
152. **Zheng,Z. and Diamond,M.I.** (2012). Huntington disease and the huntingtin protein. *Prog.Mol.Biol.Transl.Sci.* 107:189-214. doi: 10.1016/B978-0-12-385883-2.00010-2.:189-214.