



β 2-quimerina en la respuesta a insulina

Pablo Luis Zini

Máster en Investigación Biomédica IBGM-2016

Tutora: María José Caloca Roldán

Cotutora: Irene Cózar Castellano

Índice

| | |
|--|----|
| Índice..... | 1 |
| Abreviaturas..... | 3 |
| 1. Introducción..... | 4 |
| 1.1. La GTPasa Rac | 4 |
| 1.1.2. Ciclo de activación de Rac..... | 4 |
| 1.2. Quimerinas | 5 |
| 1.2.1. Estructura y mecanismo de acción de las quimerinas..... | 5 |
| 1.2.1.1. Dominio C1..... | 6 |
| 1.2.1.2. Dominio GAP..... | 6 |
| 1.2.1.3. Dominio SH2..... | 6 |
| 1.2.2. Regulación de las quimerinas..... | 7 |
| 1.2.3. Función biológica de β 2-quimerina..... | 7 |
| 1.3. Función de la insulina | 8 |
| 1.3.1. Señalización de insulina | 8 |
| 1.3.1.1. Ruta PI3K/AKT..... | 9 |
| 1.3.1.2. Ruta de las MAPK..... | 10 |
| 1.4. β 2-quimerina en la respuesta a insulina..... | 10 |
| 2. Hipótesis..... | 11 |
| 3. Objetivos..... | 11 |
| 4. Materiales y métodos..... | 12 |
| 4.1. Línea celular y condiciones de cultivo..... | 12 |
| 4.2. Extracción de ARN..... | 12 |
| 4.2.1. Q-RT-PCR..... | 12 |
| 4.3. Transfección..... | 13 |
| 4.4. Generación de líneas estables..... | 13 |
| 4.5. Estimulación con insulina y preparación de lisados celulares..... | 14 |
| 4.6. Purificación de GST-PBD..... | 14 |
| 4.7. Ensayo de activación de Rac (“Pull Down”)..... | 16 |
| 4.8. Geles, transferencia y revelado..... | 16 |
| 4.8.1. Análisis por densitometría..... | 17 |
| 4.8.2. Análisis estadístico..... | 17 |
| 4.9. Microscopía confocal..... | 17 |
| 5. Resultados..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 5.1. Análisis de la expresión endógena de la β 2-quimerina en células HepG2..... | 18 |
| 5.2. Generación de células HepG2 que expresan de forma estable β 2-quimerina..... | 19 |
| 5.3. Efecto de β 2-quimerina en la señalización de insulina..... | 20 |
| 5.3.1. Efecto de β 2-quimerina en la ruta de PI3K..... | 20 |
| 5.3.1.1. Estudio del efecto de β 2-quimerina en la fosforilación de AKT en respuesta a la estimulación con insulina a distintos tiempos (“Time course”)..... | 20 |
| 5.3.1.2. Estudio del efecto de β 2-quimerina la fosforilación de AKT en respuesta a la estimulación con distintas concentraciones de insulina. | 21 |
| 5.3.2. Efecto de β 2-quimerina en la ruta de las MAPKs..... | 22 |
| 5.3.2.1. Estudio del efecto de β 2-quimerina en la fosforilación de ERK en respuesta a la estimulación con insulina a distintos tiempos (“Time course”)..... | 23 |
| 5.3.2.2. Estudio del efecto de β 2-quimerina en la fosforilación de ERK en respuesta a la estimulación con distintas concentraciones de insulina..... | 23 |
| 5.4. Ensayo de Pull Down para la detección de Rac activado..... | 24 |
| 5.5. Localización Subcelular de β 2-quimerina tras la estimulación con insulina..... | 25 |
| 6. Discusión..... | 27 |
| 7. Conclusiones..... | 28 |
| 8. Bibliografía..... | 29 |

Abreviaturas

| | |
|--|---|
| ADN: Ácido desoxirribonucleico | MAPK: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógeno |
| AKT: serina-treonina quinasas específicas | MEK: proteínas quinasa responsables de la fosforilación de ERKs |
| ARN: Ácido ribonucleico | PAK: Kinasas activadas por p21 |
| BCR: Región de ruptura BCR | PBD: Dominio de Unión a p21 |
| BSA: Albúmina de suero bovino | PBS: Tampón fosfato salino |
| DAG: Diacilglicerol | PCK: Proteína quinasa C |
| DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol | PDK1: cinasa dependiente de fosfoinositidos-1, |
| DGKs: diacilglicerolquinasas | PHLPP (PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases) |
| DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco | PI3K: fosfatidil-inositol-3-quinasa |
| EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético | PIP3: fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato |
| EGF: Factor de crecimiento epidérmico | PIP3: PI3,4,5- trifosfato |
| EGFP: Proteína fluorescente verde estimulada | PKDs: proteínas quinasa D |
| EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico. | PMA: Acetato de forbol miristato |
| ERK: quinasa regulada extracelularmente | PP2: protiena fosfatasa 2. |
| GAP: Proteína Activadora de GTPasas | PTB: dominio de unión a fosfotirosinas (PTB) |
| GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa | Raf: serina-treonina quinasas citosólicas específicas activadas por Ras |
| GDI: Inhibidores de la Disociación de nucleótidos de guanina | Ras: proteína GTPasa RAS (rats sarcoma) |
| GEF: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina | SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| GFP: Proteína Fluorescente Verde | Ser: Serina |
| GLUT4: Transportador de glucosa | SH2: dominio de homología 2 a Src (Src Homology 2) domain |
| Grb2: Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento | Sos: hijo de Sevenless |
| GST: Glutathione S transferase | TBST: Tampón salino Tris con Tween 20 |
| IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido | Thr: treonina |
| IR: Receptor de Insulina | Tyr: tirosina |
| IRS-1: Sustrato Receptor de Insulina | |

1. Introducción

1.1. La GTPasa Rac

Rac es una GTPasa de pequeño tamaño que pertenece a la familia de las Rho GTPasas que, a su vez, constituyen un subgrupo de la superfamilia de proteínas Ras.

Rac desempeña un papel fundamental en una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo la reorganización del citoesqueleto de actina, la transformación celular, la inducción de síntesis de ADN. Además, Rac regula respuestas biológicas específicas de determinados tipos celulares, como la producción de radicales superóxido, la guía y crecimiento axonal, la migración celular, la fagocitosis de macrófagos, y la formación de la sinapsis inmune en linfocitos T. Se ha observado también la implicación de las proteínas de la subfamilia Rac en diversos procesos patológicos, lo que hace más relevante el conocimiento de su función y regulación (Yang y Kazanietz, 2007; Bosco et al., 2008).

1.1.1. Ciclo de activación de Rac

Como la mayoría de GTPasas pequeñas, Rac actúa como un interruptor molecular ciclando entre un estado activo unido a GTP y una forma inactiva unida a GDP. La forma unida a GTP de Rac interactúa con numerosos efectores y así coordinan la activación de múltiples cascadas de señalización que influyen en diversos procesos fisiológicos (Yang y Kazanietz, 2007). El control de este ciclo es el principal mecanismo de regulación de estas GTPasas. Este control lo ejercen tres clases de proteínas reguladoras: los denominados factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), que estimulan el intercambio de GDP por GTP y con ello activan Rac; las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs), que inactivan Rac acelerando la capacidad intrínseca de hidrólisis de GTP; y los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs), que pueden inhibir el intercambio de GTP y la hidrólisis del GTP unido (Van Aelst y D'Souza-Schorey, 1997; Zubeldia-Brenner et al., 2014) (Figura 1).

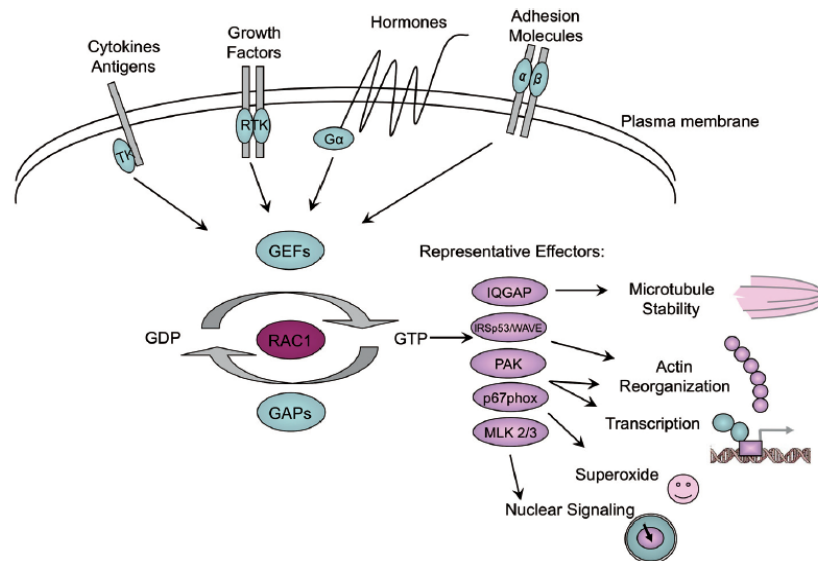


Figura1. Representación gráfica del ciclo de activación de Rac y de su regulación mediante los GEFs, las GAPs y los GDIs. Rac actúa como un transductor de señales mediante la recepción de información a través de la activación de GEFs. Rac-GTP adopta una conformación activa capaz de unir moléculas efectoras que regulan diversas funciones celulares (Bosco et al., 2008).

La importancia de este ciclo de regulación se demuestra por numerosos trabajos en los que se ha demostrado que un incremento anormal de la actividad de los GEFs, o la pérdida de la actividad de los GAPs, se asocia a disfunciones drásticas de la activación de Rac y es causante de diversas patologías, como alteraciones en el desarrollo y cáncer (Ligeti et al., 2012). El análisis de la secuencia del genoma humano ha demostrado que dominios GEF y GAP se encuentran en una gran cantidad de proteínas, indicando que la regulación de la proteína Rac tiene gran relevancia en varios procesos (Sahai y Marshall, 2002). Además el gran número de proteínas GEFs y GAPs demuestra que la actividad de las proteínas de la familia Rho a la que pertenece Rac, necesita ser regulada de manera muy estricta. Una de las familias Rac-GAP que recibieron una atención significativa en los últimos años es la familia de quimerinas (Sosa et al., 2009).

1.2. Quimerinas

Las quimerinas recibieron su nombre por parecer una 'quimera' entre el dominio C1 presente en varios miembros de proteínas quinasas C (PKCs) y el dominio GAP de BCR, una proteína implicada en la translocación del cromosoma Filadelfia en la leucemia mieloide crónica (Yang y Kazanietz, 2007). Esta familia se compone de cuatro miembros en mamíferos referidos como α 1-, α 2-, β 1- y β 2-quimerinas que se originan en eventos de corte y empalme diferencial de dos loci, CHN1 (en el caso de las alfa-quimerinas) y CHN2 (en el caso de las β -quimerinas).

Cada una de las isoformas de las quimerinas se encuentra preferentemente en determinados tipos celulares. Las isoformas α -quimerinas se expresan en su gran mayoría en las células del cerebro. En el caso de α 1-quimerina, se ha descrito su expresión en las células piramidales del hipocampo, las células granulares del giro dentado, en neuronas corticales y en las neuronas de Purkinje del cerebelo. La expresión de α 2-quimerina se ha detectado mayoritariamente en los cuerpos neuronales, dendritas y axones. En cuanto a las isoformas β -quimerinas, la expresión de β 1-quimerina se ha descrito únicamente en testículo, mientras que la expresión de β 2-quimerina se ha detectado a nivel de ARN mensajero en una amplia gama de tejidos y líneas celulares (Yang y Kazanietz, 2007).

1.2.1. Estructura y mecanismo de acción de las quimerinas

Las cuatro isoformas de las quimerinas tienen un dominio GAP en la región C-terminal y un dominio C1, que presenta un alto grado de homología a los dominios C1 de las isoenzimas de PKC. Las isoformas α 2- y β 2- quimerina presentan además un dominio SH2 en su región N-terminal, que se cree está involucrado en las interacciones heteromoleculares (Yang y Kazanietz, 2007; Caloca et al., 2008) (Figura 2).

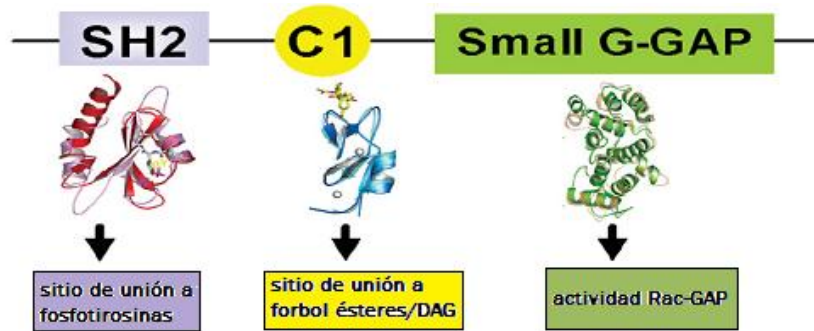


Figura 2. Representación de los diferentes dominios presentes en las quimerinas junto con sus funciones principales. El dominio SH2 se encarga de reconocer y unir específicamente proteínas con fosfotirosinas. El dominio C1 es imprescindible para unirse a los ésteres de forbol y DAG. El dominio GAP inactiva Rac acelerando la tasa de hidrólisis de GTP.

1.2.1.1. Dominio C1

El dominio C1 es una unidad estructural de 50 aminoácidos originalmente definida como un módulo de unión a lípidos en las isoenzimas PKCs. Posteriormente este dominio se ha encontrado en otras moléculas como PKDs, RasGRPs, DGKs, Munc-13 y las quimerinas, que en conjunto constituyen los denominados nuevos receptores para DAG. El dominio C1 se une a ésteres de forbol y a DAG. Esta unión en las quimerinas es crucial para su translocación a las membranas desde el citosol. El dominio C1 de las quimerinas tiene aproximadamente un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con el dominio C1 de las PKCs. De hecho las características de unión de ésteres de forbol en quimerinas y PKC son similares, incluyendo la dependencia de zinc, la estereoespecificidad de alta afinidad, y la unión con diacilglicerol. Además de estas secuencias, presenta aminoácidos hidrofóbicos que serán los encargados de la inserción de la quimerina en la membrana plasmática (Ahmed et al., 1993; Jacobs y Hall, 2005).

1.2.1.2. Dominio GAP

Este dominio en las quimerinas se compone por 150 aminoácidos, que entre las isoformas α y β -quimerinas comparten un 77% de homología. Este dominio es el encargado de acelerar la hidrólisis de GTP a GDP y en las quimerinas es específico para la GTPasa Rac (Caloca et al., 2003).

1.2.1.3. Dominio SH2

El dominio SH2 presente en la región N-terminal comparte con un 82% de homología entre α 2- y β 2-quimerinas, y aunque presentan pequeñas diferencias en la composición de aminoácidos, los residuos de arginina y las secuencias de unión a fosfotirosinas permanecen conservados. Se sospecha que en quimerinas, posiblemente este dominio pueda estar involucrado en las interacciones con proteínas de fosfotirosina, aunque su función sigue siendo esencialmente desconocida (Yang y Kazanietz, 2007; Caloca et al., 2008; Zubeldia-Brenner et al., 2014).

1.2.2. Regulación de las quimerinas

Varios estudios que incluyen la resolución de la estructura cristalina de $\beta 2$ -quimerina, estudios bioquímicos y técnicas de inmunofluorescencia han permitido establecer un modelo de activación de las quimerinas. Según este modelo, en condiciones basales las quimerinas se encontrarían en una conformación inactiva, autoinhibida, en el citoplasma. Tras la estimulación de receptores que resultan en la generación de DAG, se produce un cambio conformacional que expone el dominio C1, facilitando su unión al ligando, su inserción en la membrana y la asociación con Rac (Yang y Kazanietz, 2007) (Figura 3).

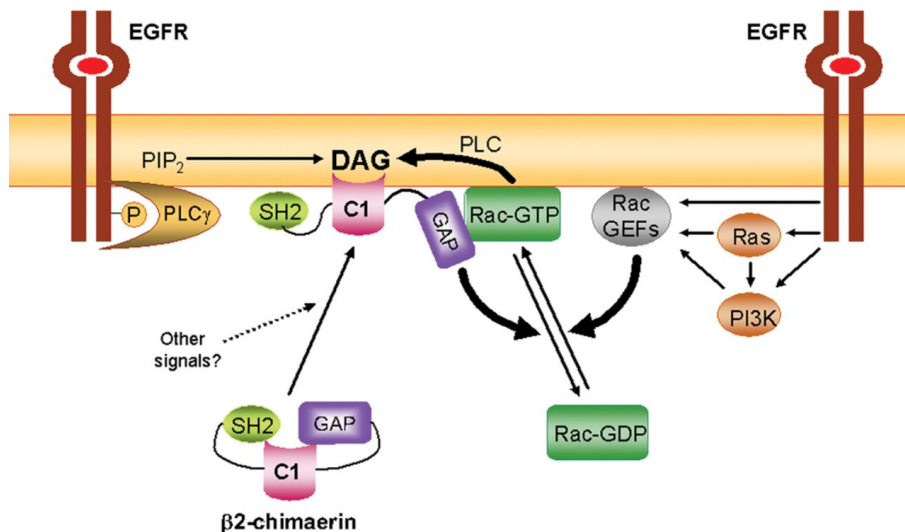


Figura 3. Modelo de activación de las quimerinas. La estimulación de receptores acoplados a la generación de DAG, como el receptor de EGF (EGFR), desencadena señales aún desconocidas que producen un cambio alostérico en las quimerinas. Tras este cambio, las quimerinas se traslocan a la membrana donde se unen a Rac y lo inactivan (Yang y Kazanietz, 2007).

Es importante destacar que este modelo describe la activación de las quimerinas exclusivamente en la membrana plasmática. Sin embargo, varios estudios muestran que las quimerinas se traslocan también a la región perinuclear, donde colocalizan con marcadores del aparato de Golgi y retículo endoplasmático, aunque la función en estos compartimentos está sin dilucidar (Caloca et al., 2001)

1.2.3. Función biológica de $\beta 2$ -quimerina

Las funciones biológicas de las quimerinas descritas hasta el momento están ligadas a su actividad como reguladores negativos específicos de la GTPasa Rac. Se ha demostrado la relevancia de estas proteínas en el desarrollo, la guía de axones, el metabolismo, la migración celular, y activación de las células T.

De entre las quimerinas, una de las más estudiadas por su papel inhibitorio de Rac ha sido $\beta 2$ -quimerina. Utilizando como modelo el pez cebra, se ha demostrado que $\beta 2$ -quimerina tiene un papel fundamental en el desarrollo temprano y que la regulación de Rac ejercida por esta proteína, es clave en los movimientos morfogénicos durante la epibolia de este pez. (Leskow et al., 2006). También se ha postulado que $\beta 2$ -quimerina puede ser relevante en la aterogénesis, al participar en el control de la migración y proliferación de células del músculo liso (Yang y Kazanietz, 2007).

Una de las funciones mejor descritas de β 2-quimerina es su papel como supresor de tumores. La primera asociación entre esta proteína y el cáncer se descubrió al comprobar que la expresión de β 2-quimerina está disminuida en glioblastomas, cáncer de mama y adenocarcinomas de duodeno en comparación con la expresión en tejido normal, sugiriendo que β 2-quimerina tienen un importante papel antitumoral (Yang et al., 2005) Este papel antitumoral ha sido demostrado recientemente en estudios in vivo, donde se ha comprobado que la eliminación de β 2-quimerina en modelos animales de cáncer de mama acelera la aparición de tumores (Casado-Medrano et al., 2016).

También a nivel génico se ha visto que la desregulación del gen *CHN2* se asocia con patologías humanas, incluyendo la esquizofrenia, el accidente cerebrovascular isquémico, el cáncer y la resistencia a la insulina (Yang y Kazanietz, 2007; Suliman et al., 2009; Gutierrez-Uzquiza et al., 2013).

En el presente trabajo se ha tratado de estudiar la relación de β 2-quimerina con la señalización de insulina por lo que en el siguiente apartado se describirá brevemente la función y vías de señalización de la insulina así como los datos que sugieren la relación de β 2-quimerina con patologías que se dan en la desregulación de esta vía.

1.3. Función de la insulina

El papel central in vivo de la insulina es el control de la homeostasis de la glucosa en el cuerpo. La insulina ejerce su efecto sobre tres tejidos principales: el hígado, la grasa y el músculo esquelético. La resistencia a la acción normal de la insulina contribuye a la patogénesis de una serie de trastornos humanos comunes, incluyendo la diabetes mellitus Tipo II (no insulino-dependiente), la hipertensión y el síndrome metabólico, lo que constituye un problema importante de salud pública. A pesar de que el defecto primario en la patogénesis de estos síndromes no se conoce, una combinación de factores genéticos y ambientales, probablemente contribuyan a la manifestación de estos trastornos metabólicos progresivos. Hoy en día se tiene un gran interés en la comprensión de los mecanismos moleculares de la acción de la insulina y los factores que contribuyen a la resistencia de esta con el fin de identificar dianas terapéuticas para el tratamiento de estas patologías (Zierath, et al 2000).

1.3.1. Señalización de insulina

La insulina es una hormona sintetizada por las células β del páncreas y secretada a la sangre para posteriormente unirse al receptor de la insulina (IR) presente en los tejidos diana: hígado, músculo y tejido adiposo. El IR es una proteína heterotetramérica compuesta por dos subunidades extracelulares idénticas (subunidades alfa) y dos subunidades transmembrana también idénticas (subunidades beta) unidas por puentes disulfuro. Las unidades alfa contienen los sitios de unión de la insulina. Tras la unión de la insulina a su receptor, las subunidades beta se autofosforilan, produciéndose un aumento de la actividad catalítica tirosina quinasa que provoca la fosforilación de diversos sustratos proteicos endógenos, denominados IRS-1 (insulin receptor substrate-1), IRS-2, IRS-3, IRS-4, GAB1, Cbl y Shc, que actúan como unidades de anclaje para otras proteínas de distintas cascadas de señalización. Dos vías principales de transducción de señales son activadas por acción de la insulina: la vía de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/AKT y la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Figura 4).

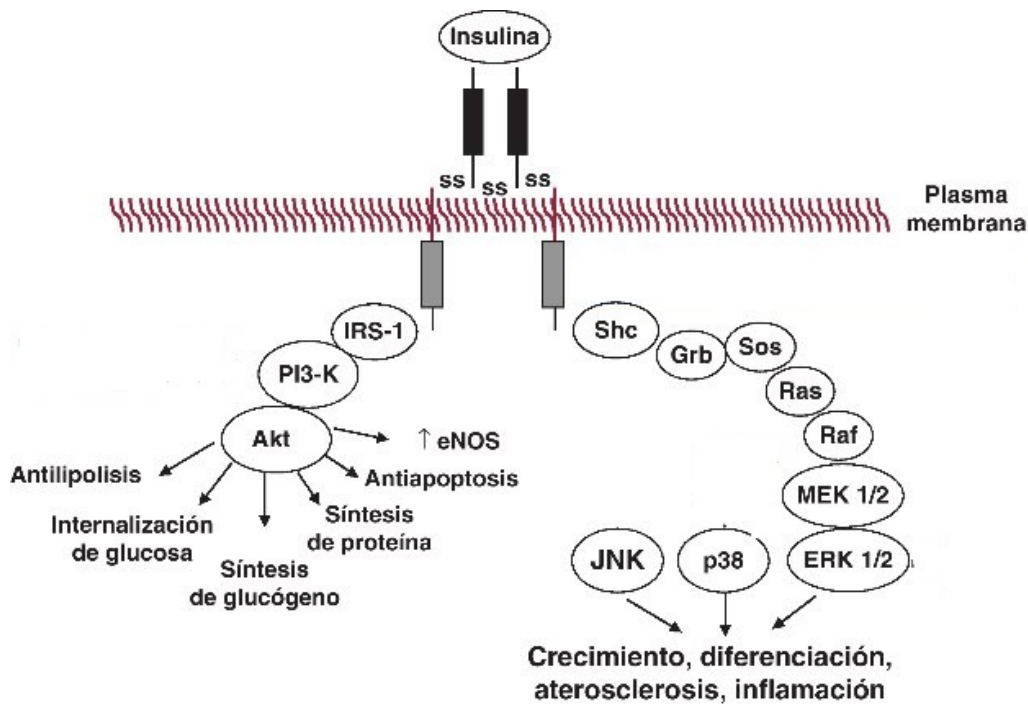


Figura 4. Vía de señalización de la insulina. Tras la unión a su receptor, la insulina induce la dimerización y activación de una cascada de reacciones de fosforilación que lleva a la activación de dos grandes vías; la vía de las MAPK y la vía PI3K/AKT (modificado de Saltiel y Kahn, 2001).

1.3.1.1. Ruta PI3K/AKT

La serina/treonina quinasa AKT es una diana de PI3K, y se la ha implicado como el componente principal de la vía de señalización de la insulina en el transporte de la glucosa y los demás acontecimientos producidos por la acción de la insulina: síntesis de glucógeno, síntesis proteica, síntesis de ácidos grasos, crecimiento celular, transcripción y expresión génica (Zierath et al., 2000)

Esta vía se inicia cuando el receptor de insulina activo y autofosforilado, interacciona con IRS y lo fosforila. Las proteínas IRS contienen un dominio amino-terminal de homología a pleckstrina (dominio PH) altamente conservado, seguido por un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB), que en conjunto permiten el acoplamiento de IRS al IR activo. Adicionalmente, los IRSs contienen entre 8 y 18 sitios potenciales de fosforilación muchos de los cuales funcionan como sitios de anclaje para otras proteínas como PI3K, Grb2, entre muchas otras (Olivares Reyes y Arellano Plancarte, 2008).

Como describimos con anterioridad, AKT es una de las moléculas clave que se activa, cascada abajo de la vía de la PI3K, ya que la interacción entre el dominio PH de AKT y el fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) generado por la actividad catalítica de PI3K induce un cambio conformacional en AKT, que permite co-reclutar PDK1 para acceder al bucle de activación y fosforilar el residuo de Thr³⁰⁸. La fosforilación de Thr³⁰⁸ activa a AKT unas 100 veces, pero la máxima actividad de AKT requiere la fosforilación de la Ser⁴⁷³.

Tras la fosforilación y la activación, AKT se disocia de la membrana y se transloca al citosol y al núcleo donde activa diversas rutas de señalización a través de la fosforilación de una gran variedad de sustratos. La señalización de AKT es terminada por

desfosforilación de Thr³⁰⁸ y Ser⁴⁷³ a través de la acción de las fosfatasas PP2 y PHLPP, respectivamente.

AKT está involucrada en diferentes procesos celulares. Uno de sus papeles claves es, como ya se ha citado, la regulación de la absorción de glucosa en tejidos sensibles a la insulina. Esto es mediado por la translocación de GLUT4 desde compartimentos intracelulares vesiculares a la membrana plasmática. También se ha confirmado que desarrolla un papel importante en su acción en la supervivencia celular, en la angiogénesis, y en el crecimiento celular (Hers et al., 2011)

1.3.1.2. Ruta de las MAPK

Como ocurre con otros factores de crecimiento, la insulina estimula la cascada de las proteínas quinasas MAPK. La fosforilación en residuos de Tyr del dominio citoplasmático del receptor de insulina, promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS. SOS es un factor GEF capaz de activar a Ras. Una vez activado, Ras estimula una cascada de serina quinasas a través la activación secuencial de Raf, MEK1/2 y ERK1/2. ERK1/2 activado puede traslocarse al núcleo, donde cataliza la fosforilación de factores de transcripción. Alternativamente a esta vía de señalización que lleva a la activación de ERK, la insulina es capaz de activar a estas proteínas por una vía independiente de Shc, pero que depende de la activación del IRS (sustrato del receptor de insulina). Una vez activo IRS, une el complejo Grb2/SOS, activándose entonces Ras y la cascada de MAPK descritas anteriormente. Las MAPK tienen una amplia gama de sustratos potenciales, incluyendo factores de transcripción y otras quinasas, que participan principalmente en la regulación de la expresión genética en tejidos sensibles a la insulina, pero no en la regulación del transporte de glucosa (Saltiel y Kahn, 2001; Olivares Reyes y Arellano Plancarte, 2008).

En este trabajo estudiamos la respuesta de estas dos grandes vías dadas por medio de la estimulación de insulina, analizando el comportamiento de las mismas en células que sobreexpresan β 2-quimerina ya que, como se describe en ciertas patologías, cada vía puede presentar diferencias selectivas en respuesta a la insulina (Montagnani et al., 2002).

1.4. β 2-quimerina en la respuesta a insulina

En la identificación de genes susceptibles a complicaciones diabéticas e insulinoresistencia se han encontrado un grupo acotado de genes relacionados con estas enfermedades, entre ellos el que codifica para la β 2-quimerina, el gen CHN2. Este gen se encontró significativamente asociado con, graves casos de complicaciones diabéticas como la retinopatía y la nefropatía provocada por esta enfermedad (Hu et al., 2011). Asimismo, en un estudio de diabetes familiar se observó una translocación cromosómica que producía una haploinsuficiencia en el gen CHN2 y, por tanto, una disminución en su expresión que se observó en varios tejidos incluidos tejidos sensibles a la insulina como el hígado, el tejido adiposo, y el músculo (Suliman et al., 2009). Estos pacientes presentaban resistencia a la insulina, lo que sugiere que β 2-quimerina esta de algún modo relacionada con patologías que se producen por la desregulación de la señalización de insulina.

2. Hipótesis

Los estudios descritos en el apartado anterior apoyan la hipótesis de que β 2-quimerina está implicada en patologías relacionadas a la vía de señalización de insulina. Como se ha mencionado, la expresión reducida del gen CHN2 contribuye a la resistencia insulínica y patologías en el metabolismo de la glucosa, debida a la interrupción de los genes INSR y CHN2. Puesto que β 2-quimerina y Rac, GTPasa sustrato de β 2-quimerina, participan en el control de las rutas de las MAPK y PI3K en respuesta a factores de crecimiento (Bruinsma y Baranski, 2007), nuestra hipótesis es que β 2-quimerina también puede participar en la regulación de estas vías de señalización en respuesta a insulina. En este contexto, una alteración de los niveles de expresión de β 2-quimerina podría modificar la respuesta a insulina mediante la desregulación de estas rutas. Con el fin de comprobar esta hipótesis se han llevado a cabo los objetivos que se describen a continuación.

3. Objetivos

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar la relación de β 2-quimerina con la señalización de insulina. Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de β 2-quimerina en las rutas de señalización activadas por insulina en células de hígado
 - 1.2. Efecto de β 2-quimerina en la ruta de PI3K
 - 1.3. Efecto de β 2-quimerina en la ruta de las MAPK

2. Estudiar los mecanismos moleculares utilizados por β 2-quimerina para regular las vías de señalización de insulina
 - 2.1.- Análisis del efecto de la activación de Rac
 - 2.2.- Análisis del efecto de la insulina en la localización subcelular de β 2-quimerina

4. Materiales y métodos

4.1. Línea celular y condiciones de cultivo

Se han utilizado las células HepG2, una línea celular epitelial derivada de un hepatocarcinoma humano. Para el mantenimiento de estas células se ha utilizado el medio DMEM suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal, 1% de Glutamina y 1% Estreptomicina/Penicilina (todos los materiales de Life technologies™). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmosfera humidificada con un 10% de CO₂.

4.2. Extracción de ARN

Para la realización de la extracción del ARNm, se utilizó el reactivo TRIZOL® (Life Technologies) siguiendo los siguientes pasos:

Homogeneizado de la muestra

Se utilizaron células HepG2 cultivadas en una placa de 100 mm. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo de la placa y se añadió 1 ml de reactivo TRIzol directamente sobre las células, a continuación se lisan las células directamente en la placa de cultivo pipeteando varias veces.

Separación de fases

Tras incubar la muestra homogeneizada durante 5 minutos a temperatura ambiente se añadió 0,2 ml de cloroformo y se agitó el tubo enérgicamente durante 15 segundos. Tras 2-3 minutos a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. De la mezcla de fases obtenidas, el ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa (fase superior) siendo esta de aproximadamente del 50% del volumen total. Se recoge la fase acuosa con cuidado de no tocar la interface ni la fase orgánica, y se la coloca en un nuevo tubo.

Aislamiento de ARN

Para precipitar el ARN, se añadió a la muestra 0,5 ml de isopropanol al 100% y tras 10 minutos a temperatura ambiente se centrifuga la muestra a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. El ARN sedimentado se lava con 1 ml de etanol 75%, se centrifuga a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C y el pellet de ARN se resuspende en agua libre de Rnasa.

4.2.1. Q-RT-PCR

Se utilizó el kit QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (Qiagen 204143) que utiliza SYBR Green I, un colorante fluorescente que se une a todas las moléculas de ADN de doble cadena, dando una emisión fluorescente en la unión.

Se preparó la solución de reacción en un volumen final de 10 µl, añadiendo 5 µl de master mix, 0,5µM de primer forward, 0,5 µM de primer reverse, 0,1 µl de QuantiTect RT-mix, y 150 ng de RNA. Además se utilizaron copias exponenciales crecientes de β2-quimerina (15-150.000), para la realización de una recta patrón. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos específicos para la amplificación de β2-quimerina: 5'-GCAGCGGATGAGATACTC-3, (forward) y 5'-CACACACAGAA GTGTAAC-3' (reverse). Para la amplificación de GAPDH se utilizaron los siguientes oligonucleótidos;

5´-TGC ACC ACC AAC TGC TTA G -3, (forward) y 5´-GGA TGC AGG GAT GAT GTT C-3´ (reverse).

A continuación se programa el termociclador con una etapa de incubación inicial de 15 min a 95°C para activar la HotStarTaq ADN polimerasa, luego se programa el ciclo con las siguientes fases: una fase de desnaturalización de 15s a 94°C; una fase de anillamiento de 30s a 50–60°C; y una fase de extensión de 30s a 72°C, este ciclo se realiza durante 30-40 veces.

La adquisición de datos se debe realizar durante la etapa de extensión midiendo la fluorescencia emitida. Se finaliza realizando el análisis de la curva de melting del producto de PCR; donde se registran los valores en un rango de temperatura que va desde los 65°C a 95°C en aumentos progresivos de 5°C. Los productos de la amplificación se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

4.3. Transfección

Se utilizaron los vectores de expresión pEGFP y pEGFP-β2-FL, disponibles en el laboratorio, para la expresión de la proteína fluorescente verde (EGFP) y β2-quimerina etiquetada con EGFP respectivamente. Se realizó la transfección de las células HepG2 utilizando dos reactivos: uno no liposomal, FuGene 6 (Roche Molecular Biochemicals), y lipofectamine 2000 (Invitrogen™), que se basa en la formación de liposomas.

La transfección de las células HepG2 mediante FuGene 6 se realizó en placas de 35 mm, preparando una solución de 100 µl de DMEM libre de suero por placa, al cual se añaden 6 µl de FuGene y 2 µl del plasmido correspondiente. Trascorridos 15-45 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se añade a la placa correspondiente, gota a gota, agitando la placa para asegurar una mezcla adecuada.

Para la realización de la transfección por medio de lipofectamine 2000, se preparan dos soluciones, en la primera se añade 2 µl del plasmido en 250 µl de DMEM libre de suero, mezclando suavemente y dejando reposar 5 minutos. En la segunda solución se mezclan 6 µl de lipofectamine 2000 en 250 µl de DMEM libre de suero, mezclando y dejando reposar en las condiciones de la solución anterior. Tras la incubación, ambas soluciones se mezclan y se incuban 20 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales la mezcla se añade gota a gota a placas de 35 mm, agitando la placa para asegurar una mezcla homogénea.

Tras la transfección, las células se mantuvieron 48 horas en las condiciones de cultivo descritas y se analizó la expresión de las proteínas correspondientes mediante western blot y microscopía de fluorescencia.

4.4. Generación de líneas estables

Las células HepG2 se cultivaron en placas de 100 mm y se transfectaron con los plásmidos pEGFP y pEGFP-β2-FL utilizando FuGene como se describió en el apartado anterior, ajustando los volúmenes en la proporción correspondiente. Trascorridas 48h, se reemplazó el medio de cultivo por el mismo medio suplementado con 600 µg/ml de geneticina (Invitrogen), ya que los plásmidos incluyen un gen de resistencia a geneticina, de manera que sólo las células transfectadas sobreviven. Trascorrida una semana las células fueron separadas por citometría de flujo para obtener las células que expresan EGFP-β2-quimerina (denominadas células HepG2-β2-quimerina) y la línea control que expresa EGFP (denominada HepG2-GFP). Ambas líneas celulares se cultivaron en el

medio descrito suplementado con 600 µg/ml de geneticina y se mantuvieron a 37°C en una atmosfera humidificada con un 10% de CO₂.

4.5. Estimulación con insulina y preparación de lisados celulares

Para la estimulación con insulina se sembraron 75×10^4 células en placas de 35. Tras 24h las células se incubaron en DMEM sin suero durante toda la noche. A continuación, las células se estimularon con 100 nM de insulina a distintos tiempos (0, 1, 5, 10, 15 y 30 minutos) o con dosis crecientes de insulina (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 nM) durante 5 min. Tras la estimulación, las células se lavaron con solución salina tamponada (PBS) y se lisaron en 200 µl de tampón de lisis que contiene 20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5 mM EDTA, 100nM Na₃VO₄, 100nM DTT, 10% NaDOC, 1mM NaF e inhibidores de proteasas- (Cøplete, Roche Molecular Biochemicals). Los lisados se incubaron en hielo 10 minutos y luego se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 rpm. Se recogió el sobrenadante al que se añadió una cantidad igual de tampón de muestra de Laemmli (SPLB) 2x, hirviendo esta mezcla durante 5 minutos.

4.6. Purificación de GST-PBD

Se lleva a cabo la purificación del dominio de unión a Rac de Pak (RBD) para su utilización en los ensayos de “pull-down”, ya que esta molécula se une a la forma activada de Rac. El RBD está fusionado a GST, por lo que se utiliza el proceso de purificación estándar para este tipo de proteínas de fusión que se describe a continuación.

Crecimiento de E.coli e inducción:

Utilizamos 1L de medio Luria-Bertani (LB) conteniendo 50 µg/ml de ampicilina, ya que las bacterias que portan el plásmido que codifica para la expresión de la proteína GST-PBD son resistentes a este antibiótico. Se siembra un preinoculo de 100ml que se mantiene toda la noche a 37°C en un agitador orbital (200 rpm). Al día siguiente se realiza una dilución 1:10 del preinóculo en medio fresco y se incuba 2-3 horas a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,4-0,7. En este momento, cuando el cultivo está en fase exponencial, se induce la expresión de la proteína de fusión añadiendo IPTG (Boehringer Mannheim) a una concentración final de 0,5 mM y se incuba a 37°C durante 4-5 horas. Tras este tiempo el cultivo se centrifuga a 6000x g durante 15 minutos a 4°C., recogiendo el “pellet” bacteriano.

Purificación.

El “pellet” bacteriano se resuspende en 40 ml de PBS conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (Cøplete, Roche Molecular Biochemicals). Las bacterias se sonicán durante 90 segundos en pulsos de 15 segundos con 1 minuto de pausa por pulso. A continuación, se añade Triton X-100 al 1% incubando en hielo 30 minutos. Tras este tiempo se centrifuga la mezcla a 10000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante (el sobrenadante resultante contiene las proteínas solubles, entre las que se encuentra de forma mayoritaria la proteína de fusión expresada) al que se añaden 800 µl de glutatión sefarosa (GE Healthcare). en PBS al 50 %, y se incuba 1-2

horas a 4°C en rotación. Transcurrido ese tiempo se centrifuga a 2000 rpm 5 minutos y se realizan 3 lavados del pellet con PBS frío.

Elución del complejo PBD-GST con glutatión.

El complejo PBD-GST se eluye de la matriz de glutatión sefarosa con 400 µl de una solución 10mM de glutatión reducida en 50mM Tris-HCl pH 8.0. Se incuba 10 min a temperatura ambiente y se centrifuga durante 5min a 1500rpm y 4°C. Se recoge el sobrenadante repitiendo este proceso un total de tres veces, obteniendo 1,2ml finales de sobrenadante con la proteína GST-PBD eluida.

Eliminación del glutatión

Para eliminar el glutatión añadido en el paso anterior se utiliza una columna de desalado PD-10 (GE- Healthcare). La columna se equilibra primero con PBS. A continuación se añade la solución de GST-RBD de un volumen total de 2.5 ml. Se eliminan los primeros 2,5 ml de la elucción y se recolectan los siguientes 3,5 ml donde se encuentra nuestra proteína de interés. Se añade glicerol con una concentración final del 20% para conservar a -80°.

Cuantificación de la concentración de GST-RBD

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford usando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD), realizando una curva patrón con cantidades conocidas y crecientes de albúmina bovina sérica (BSA). La absorbancia del patrón y de la muestra se determinó a 595nm por espectrofotometría.

Para evaluar la calidad de la purificación se corrió la proteína purificada en un gel de poliacrilamida al 10%, visualizando la proteína por medio de la tinción del gel con azul de Coomassie (Figura 5).

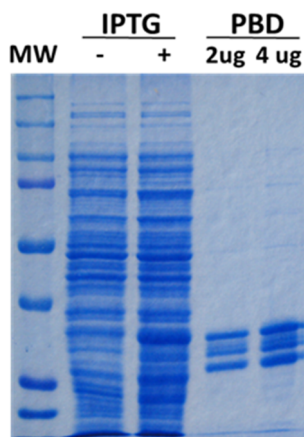


Figura 5. Gel de poliacrilamida con tinción de coomassie de la purificación del dominio de unión a Rac de PAK (PBD). Se puede apreciar la inducción de la expresión del PBD en los lisados de *E. coli* tras la incubación con IPTG (comparar los dos primeros carriles). En el tercer y cuarto carril se muestra el PBD a diferentes concentraciones tras su purificación. MW: pesos moleculares.

4.7. Ensayo de activación de Rac (“Pull Down”)

Para determinar los niveles de activación de Rac se sembraron 1×10^6 células en de 35 mm y se estimularon con insulina como se describió anteriormente. Las células se lavaron con PBS a 4° C y se lisaron con 400 μ l de un tampón que contiene 20mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0,5 % Tritón X-100, 5mM β -glicerofosfato, 1mM ditiotreitól y una mezcla de inhibidores de proteasas (Cøplete, Roche Molecular Biochemicals) al que se añadió 10 μ g de GST-PAK por cada muestra. Se recogió el contenido de los pocillos con un rascador de goma llevándolos a un tubo eppendorf y dejándolo incubar en hielo durante 10 min. Centrifugamos a una temperatura de 4°C y 12000rpm durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un eppendorf nuevo en hielo. Tomamos una alícuota del sobrenadante (40 μ l) en otro eppendorf con 40 μ l de SPLB 1x para diluir al 50% la muestra y la hervimos a 100°C durante 5 minutos; este será el lisado total que se usará de control de los niveles de Rac en las muestras.

Para precipitar el complejo GST-RBD-Rac-GTP se incubaron los extractos con 20 μ l de glutatión sefarosa (40 μ l al 50%) durante 1-2 h a 4°C en rotación. Tras este tiempo se centrifugan las muestras a 10000rpm y 4°C durante 5 minutos y eliminamos el sobrenadante. El pellet se lavó con el tampón de lisis varias veces antes de añadirles tampón de muestra (SPLB 5x) y hervir durante 5 minutos. Se analizó la cantidad de Rac-GTP unido con anticuerpos específicos mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot.

4.8. Geles, transferencia y revelado

Para la realización de esta técnica se han utilizado geles de poliacrilamida al 10% para los lisados totales y al 12 % para las muestras de pull down. Los lisados celulares preparados como se indicó anteriormente y un marcador de pesos moleculares (Invitrogen) se separaron mediante electroforesis (SDS-PAGE). Una vez finalizada la electroforesis, se procede a la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa para la posterior inmunodetección. Acabada la transferencia, se comprueba la eficiencia de la misma sumergiendo la membrana en una solución de rojo Ponceau al 5%. Esta solución tiñe las bandas de proteína de un color rojo, permitiendo comprobar si las proteínas se han transferido correctamente. Para la inmunodetección se realizaron los siguientes pasos:

Bloqueo de la membrana

Los lugares de unión inespecíficos se bloquean sumergiendo la membrana de nitrocelulosa en solución tamponada de TBS-T (25mM Tris-HCl /0,1% de Tween-20) con 5% de leche desnatada (solución de bloqueo), incubando 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital. Pasado este tiempo, la membrana se lava 3 veces durante 5 minutos con TBS-T en un agitador orbital.

Incubación con el anticuerpo primario

Los anticuerpos primarios utilizados han sido anticuerpo anti-RAC producido en raton (BD bioscience), anticuerpo anti-p-AKT y anti-AKT producidos en conejo (Cell Signalling), anticuerpo anti-GFP (Covance) producido en raton y anti -p-ERK y anti-ERK producidos en conejo (Cell Signalling). Los anticuerpos se diluyen en solución de 5% BSA en una proporción de 1:1000. La incubación se realiza durante toda la noche a 4°C

en un agitador orbital. Después de este tiempo, la membrana se lava 3 vez durante 5 minutos con TBS-T en un agitador orbital.

Incubación con el anticuerpo secundario

Los anticuerpos secundarios utilizados han sido anti-conejo (1:5.000) y anti-ratón (1:3000) conjugados con una peroxidasa (HRP) (GE Healthcare), preparados en solución de bloqueo. Se incubó el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura en agitación. Pasado este tiempo se lava la membrana como se ha descrito anteriormente.

Revelado

Una vez incubada la membrana de nitrocelulosa con los anticuerpos, revelamos la membrana por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (GE Healthcare) sobre placas fotográficas en cámara oscura.

4.8.1. Análisis por densitometría

Para el análisis por densitometría de los geles de western blot se usó el software Quantity One de BioRad y su aplicación para medir volúmenes. Los valores obtenidos de este proceso fueron posteriormente analizados con Excel para realizar la representación gráfica.

4.8.2. Análisis estadístico

Se analizaron los datos por medio del test estadístico de la T de Student (T test), para muestras no apareadas, con una distribución de dos colas. Los valores de $P \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

4.9. Microscopía confocal

Para este análisis, las células HepG2-GFP y las células HepG2- β 2-quimerina, fueron cultivadas sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro. Una vez alcanzada una confluencia de 50 % las células se estimularon con 100nM de insulina a distintos tiempos (0, 1, 5, 10, 15 y 30 minutos) a 37 °C. Tras la estimulación, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% en PBS durante 15 min. Tras la fijación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se procedió a la tinción de los núcleos con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 100 ng/ml. Una vez realizada esta tinción, las células se lavaron con PBS y los cristales se montaron sobre un portaobjetos utilizando medio de montaje (Mowiol). Las células se analizaron en el microscopio confocal Leica TCS SP5 en el Servicio de microscopía del IBGM y las imágenes se procesaron utilizando el programa ImageJ.

5. Resultados

5.1. Análisis de la expresión endógena de la β 2-quimerina en células HepG2

En este estudio se han utilizado las células HepG2. Esta línea celular deriva de un hepatocarcinoma humano; y como se ha descrito, es uno de los tejidos blancos de la acción insulinica. Como otras consideraciones a tener en cuenta, las células HepG2 se pueden cultivar con éxito a gran escala, son células adherentes, de tipo epitelial que crecen como monocapas y en pequeños agregados; son de fácil manejo y presentan condiciones mínimas de cultivo.

Como ya se ha comentado con anterioridad, se sabe que β 2-quimerina tiene un nivel de expresión elevado en cerebelo y a nivel de ARN se ha detectado en varias líneas celulares, pero su expresión en células HepG2 es desconocida. Por este motivo, en primer lugar se analizó la expresión endógena de β 2-quimerina en estas células mediante PCR cuantitativa. Para este análisis se aisló ARN de células HepG2 y se realizó una RT-PCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen que codifica para β 2-quimerina (*CHN2*), tal y como se describe en materiales y métodos. Como control de carga y calidad del ARN se amplificó el gen housekeeping o gen constitutivo que codifica para la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Figura 6).

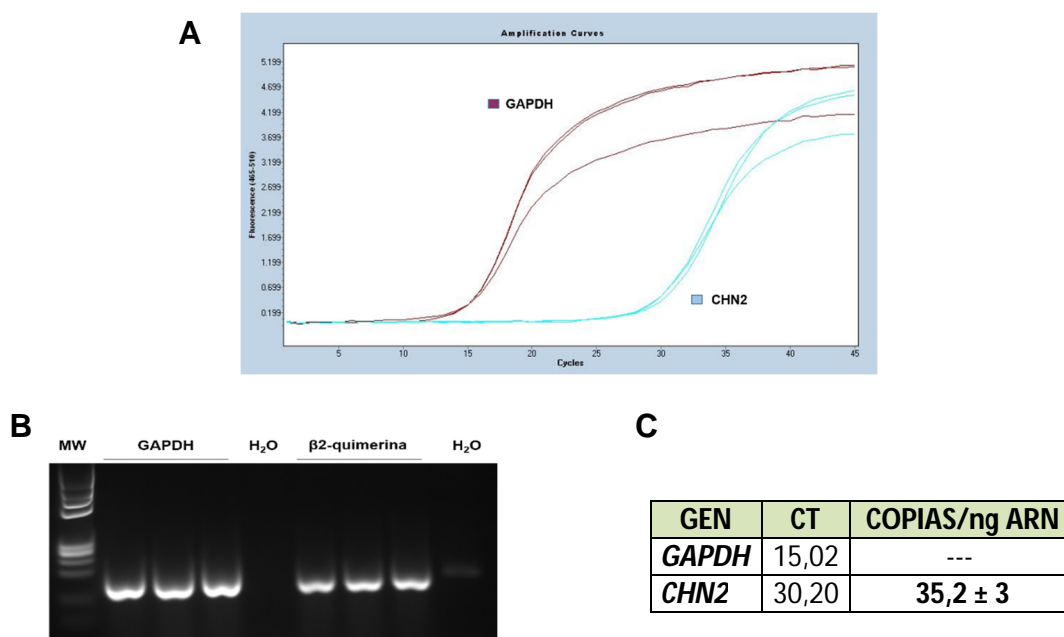


Figura 6. Análisis de la expresión de β 2-quimerina en células HepG2 mediante Q-PCR. **A)** Curvas de ciclos de amplificación donde se observan en rojo las curvas correspondientes a GAPDH y en turquesa las curvas correspondientes a β 2-quimerina. **B)** Gel de agarosa al 2%, donde observamos las bandas correspondientes al amplicon del housekeeping GAPDH y los correspondientes a β 2-quimerina. **C)** Tabla de resultados del análisis realizado para la obtención del número de copias de β 2-quimerina en células HepG2.

Como puede verse en la figura 5A, se detectó la expresión de β 2-quimerina en las células HepG2 aunque a unos niveles más bajos que GAPDH. Se comprobó que la amplificación detectada correspondiera con los fragmentos de banda esperados mediante el análisis de los productos de la RT-PCR en un gel de agarosa (Figura 5B). Para calcular el número de copias del gen *CHN2* se realizó una curva patron con diversas diluciones de un plásmido que contiene el ADNc de β 2-quimerina, de manera que se añade un número de copias conocidas de β 2-quimerina. Por medio de este análisis, mediante los datos de CT obtenidos para cada muestra, se obtuvo un resultado de $35,2 \pm 3$ copias de β 2-quimerina/ ng ARN (Figura 5C).

5.2. Generación de células HepG2 que expresan de forma estable β 2-quimerina

Considerando la baja expresión endógena del gen de la β 2-quimerina en las células HepG2, se decidió expresar de manera ectópica esta proteína. Para ello, en primer lugar se realizaron transfecciones transitorias por medio utilizando Lipofectamina y Fugene como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, por estos métodos los niveles de células transfectadas con el plásmido de expresión de β 2-quimerina fueron muy bajos, por lo que se decidió generar una línea que expresara de manera estable β 2-quimerina, que hemos denominado HepG2- β 2-quimerina. Además, se generó una línea control que expresa de manera estable GFP (células HepG2-GFP).

En la figura 7 A, podemos apreciar la detección de la proteína GFP (aprox. 27 KDa) y la banda que se corresponde con nuestra proteína de interés, la GFP- β 2-quimerina (con un peso molecular total de unos 75KDa). Se comprobó también la localización subcelular por medio del etiquetado con GFP que presentan las proteínas, por medio de microscopía de fluorescencia. Se presenta en la figura 7 B, cómo la línea con GFP presenta esta proteína por toda la célula y se observa la distribución citosólica de GFP- β 2-quimerina, como se corresponde por lo descrito para esta proteína en estado de reposo.

Una vez comprobados tanto la expresión como la correcta localización subcelular de las proteínas en las líneas celulares generadas, las mismas se han utilizado para el estudio del efecto de β 2-quimerina en la respuesta a insulina.

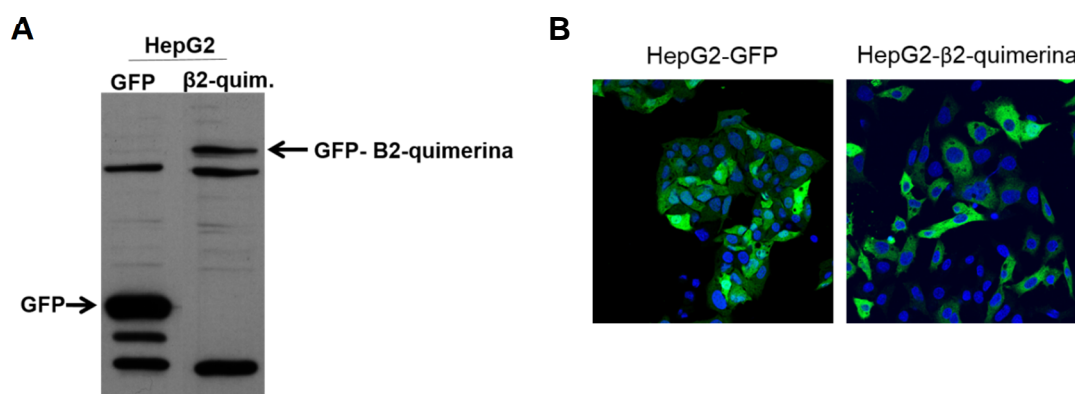


Figura 7. Análisis de la expresión y localización subcelular de β 2-quimerina y GFP en las líneas HepG2- β 2-quimerina y HepG2-GFP. A) Análisis por western blot de la expresión de β 2-quimerina y de GFP en las células transfectadas. B) Análisis por microscopía de fluorescencia de la localización subcelular de β 2-quimerina y GFP.

5.3. Efecto de β 2-quimerina en la señalización de insulina

La regulación de la respuesta a la insulina es sumamente importante para el metabolismo energético, el crecimiento y la proliferación celular. Lo que hace que existan muchas formas de regular la señalización de la insulina en varios pasos de la cascada de señalización. En nuestro caso, poder apreciar esta regulación por parte de la β 2-quimerina sobre los actores más importantes de las dos vías principales que genera esta hormona, la ruta de PI3K/AKT y la de las MAPK, nos dará indicios de relación que pueda existir.

5.3.1. Efecto de β 2-quimerina en la ruta de PI3K

Para realizar este estudio, en primer lugar se evaluó la respuesta a insulina de las células HepG2. Para ello, se llevó a cabo una estimulación con insulina 100nM a distintos tiempos y se estudió el estado de activación de la ruta de PI3K mediante el análisis de la fosforilación de AKT. Como esta descrito, se observó una respuesta rápida en la fosforilación de AKT, detectándose dicha fosforilación tras 1 min de estimulación. A los 5 min se alcanza el máximo nivel de fosforilación, que se mantiene en niveles semejantes hasta los 15 min, decayendo ligeramente tras 30 min de estimulación (Figura 8). Comprobamos que la línea estable HepG2-GFP tenía un comportamiento similar al de las células HepG2, sin que haya diferencias significativas con respecto a los tiempos de estimulación estudiados (Figura 8), por lo que en los experimentos sucesivos se utilizó esta línea estable como control.

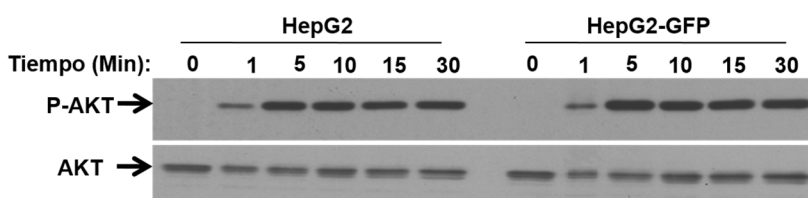


Figura 8. Western blot de células HepG2 y HepG2-GFP estimuladas a distintos tiempos con insulina. Las células HepG2 se estimularon con 100nM de insulina a los tiempos indicados. En el panel superior se muestran las bandas correspondientes a la proteína AKT fosforilada. En el panel inferior se muestran los niveles de AKT totales.

5.3.1.1. Estudio del efecto de β 2-quimerina en la fosforilación de AKT en respuesta a la estimulación con insulina a distintos tiempos (“Time course”)

Se llevó a cabo un estudio en el cual las células HepG2-GFP, y las HepG2- β 2-quimerina, fueron estimuladas con 100nM de insulina a distintos tiempos, para la observación de la fosforilación de AKT, según protocolo descrito con anterioridad.

El análisis de western blot llevado a cabo, muestra una similitud con el ensayo realizado para evaluar la respuesta a insulina en las células HepG2, presentando también la máxima fosforilación al minuto 5 de estimulación con una declinación leve al minuto 30. Este comportamiento fue visto en las dos líneas celulares, sin cambios aparentes entre

ellas. Este ensayo ha sido realizado 3 veces para poder calcular los análisis estadísticos correspondientes.

Los cálculos de densitometría entre las bandas de p-AKT con respecto al AKT total y su valor promedio entre los ensayos, arrojaron una diferencia que se presenta desde el minuto 5 como una tendencia creciente en las líneas HepG2- β 2-quimerina de mayor fosforilación de AKT con respecto a las HepG2-GFP, diferencia que se presenta significativamente estadística a los 15 minutos de estímulo, presentando un valor de significancia del 0,003 en el T-test (Figura 9).

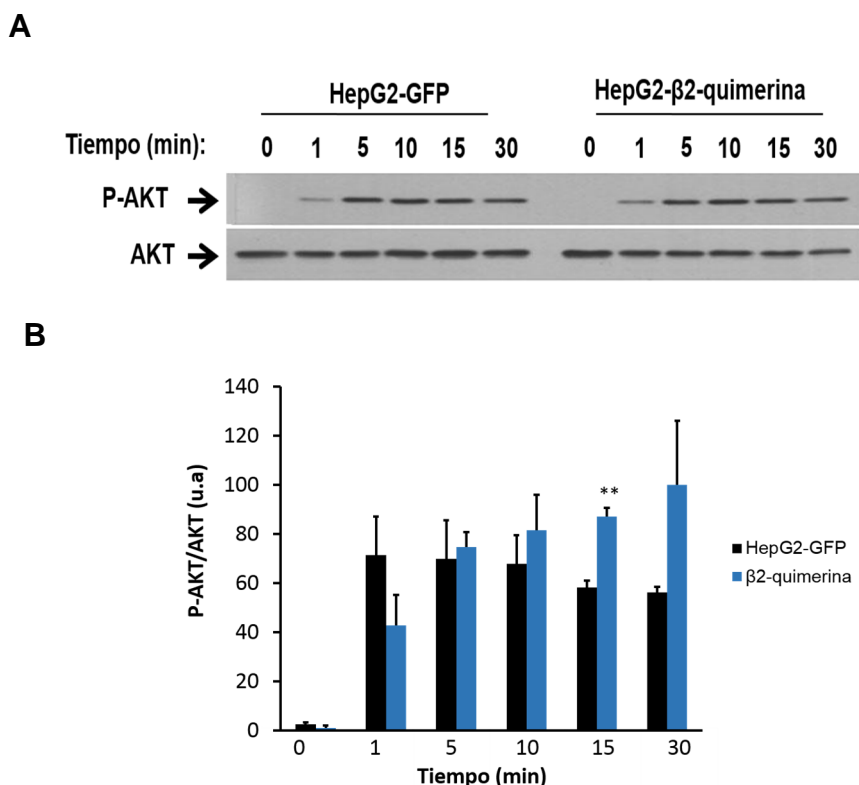


Figura 9. Efecto de la insulina en la fosforilación de AKT en células HepG2 –GFP y HepG2- β 2-quimerina. A) Western blot de los lisados celulares tras la estimulación con insulina (100 nM) a los tiempos indicados. La flecha superior indica las bandas correspondientes a AKT en estado fosforilado. En el panel inferior se muestran los niveles de AKT totales. B) Representación gráfica de los promedios de P-AKT/AKT a distintos tiempos de estimulación con insulina (a.u.; unidades arbitrarias). ** $p \leq 0,01$.

5.3.1.2. Estudio del efecto de β 2-quimerina la fosforilación de AKT en respuesta a la estimulación con distintas concentraciones de insulina.

Los ensayos anteriormente presentados se realizaron con una concentración saturante de insulina, ello puede que no permita apreciar respuestas diferenciales que deban darse en las células a concentraciones variables de esta hormona, algo que se aproxime más a lo que pueda pasar en el entorno celular.

Por ello hemos realizado una estimulación con gradientes crecientes de insulina durante 5 minutos, evaluando nuevamente las respuestas que esto pueda tener en la fosforilación de AKT

Como era de esperar, la fosforilación de AKT inducida por insulina se da de una manera dependiente de la dosis en estas células. La variación que se presenta entre ellas es llamativa, viéndose una clara diferencia de respuesta en concentraciones más bajas de

insulina, donde la línea transfectadas con $\beta 2$ -quimerina presenta un aumento del AKT fosforilado y una tendencia a mantenerse así en respuesta al aumento de la concentración de insulina. En la representación gráfica donde están plasmado las diferencias porcentuales, vemos que a la concentración de 0,1nM de insulina la diferencia es estadísticamente significativa, con un valor de 0,002 para el T test (Figura 10).

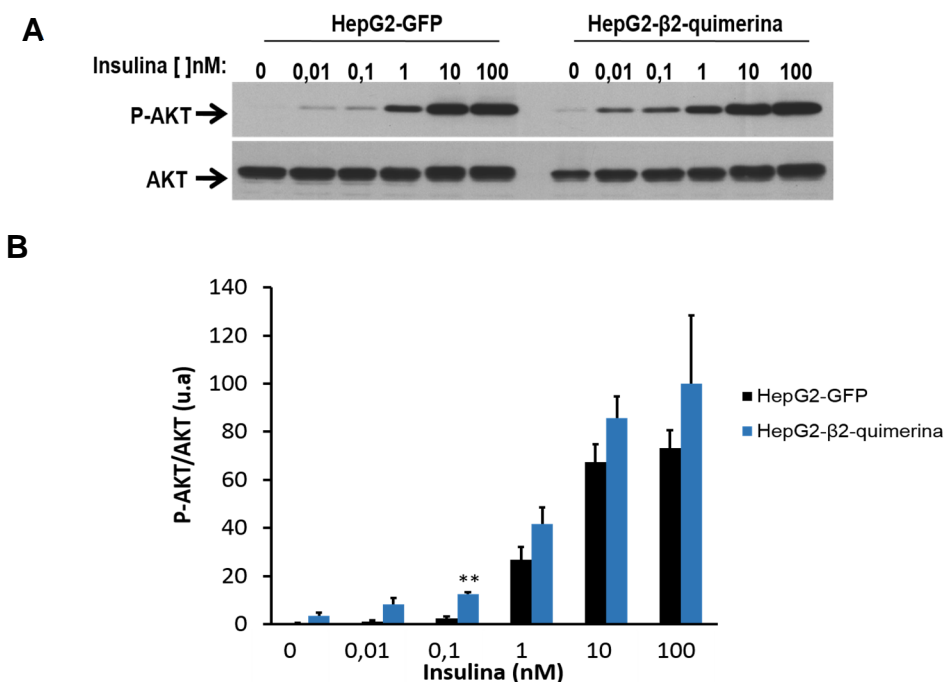


Figura 10. Efecto de la insulina sobre la fosforilación de AKT en células HepG2 –GFP y HepG2- $\beta 2$ -quimerina. A) Western blot de los lisados celulares tras la estimulación a concentraciones crecientes de insulina. La flecha superior indica las bandas correspondientes a AKT en estado fosforilado. En el panel inferior se muestran los niveles de AKT totales. B) Representación gráfica de los promedios de P-AKT/AKT a concentraciones crecientes de insulina (a.u.; unidades arbitrarias). ** $p \leq 0,01$.

5.3.2. Efecto de $\beta 2$ -quimerina en la ruta de las MAPKs

Los efectos de la insulina en la regulación de la síntesis de proteínas son mediados principalmente a través de la activación de la vía MAPK, como la segunda vía de señalización más importante sobre la estimulación de insulina, la cual participa principalmente en la regulación de la expresión génica pero no así en la regulación del transporte de glucosa.

Para el estudio de esta vía de señalización, hemos evaluado la fosforilación de ERK sabiendo que es el efector directo de esta, para la realización de sus múltiples funciones.

5.3.2.1. Estudio del efecto de β 2-quimerina en la fosforilación de ERK en respuesta a la estimulación con insulina a distintos tiempos (“Time course”)

Como en el ensayo descrito con anterioridad se estimularon las líneas celulares en cuestión con una concentración de 100nM de insulina a distintos tiempos, esperando observar la fosforilación de ERK con respecto al ERK total.

Se logra ver que la activación de ERK a distintos tiempo adquiere una forma típica de campana, aumentando de forma creciente su activación hasta llegar al máximo a los 10 minutos, a partir de ese momento desciende progresivamente. En el análisis estadístico del promedio de la densitometría de ERK en estas líneas celulares, se observa una disminución de la fosforilación de ERK en la línea celular HepG2- β 2-quimerina desde el minuto 5 en adelante con respecto al control. Es necesario aclarar que estas diferencias no llegan a ser significativas desde el punto de vista estadístico. La disminución de la activación de ERK era algo esperado, ya que según se sabe las quimerinas inhiben las vías de proliferación y crecimiento celular. Aun así, este estudio, hasta el momento, no se había realizado con respecto a la estimulación de insulina (Figura 11).

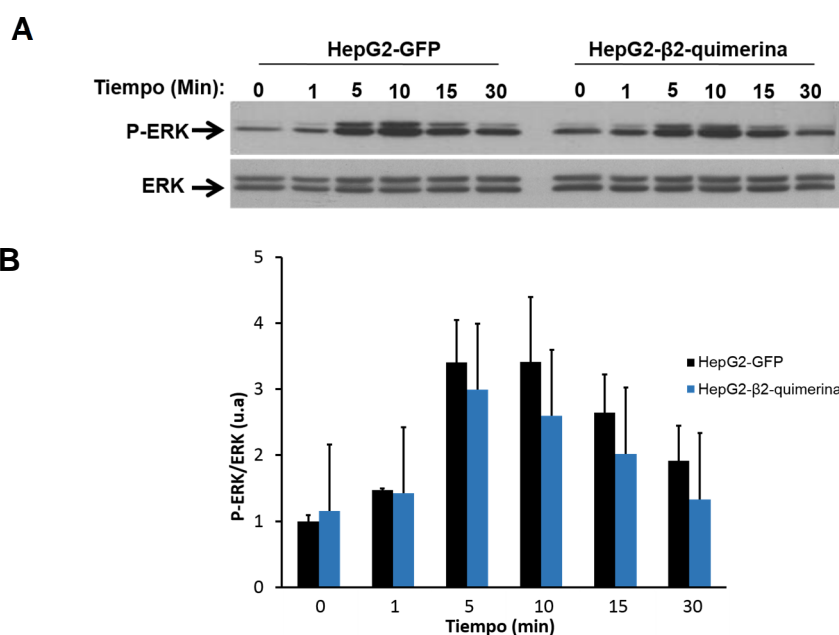


Figura 11. Efecto de la insulina en la fosforilación de ERK en células HepG2 –GFP y HepG2- β 2-quimerina. A) Western blot de los lisados celulares tras la estimulación con insulina (100 nM) a los tiempos indicados. La flecha superior indica las bandas correspondientes a ERK en estado fosforilado. En el panel inferior se muestran los niveles de ERK totales. B) Representación gráfica de los promedios de P-ERK/ERK a distintos tiempos de estimulación con insulina (a.u.; unidades arbitrarias).

5.3.2.2. Estudio del efecto de β 2-quimerina en la fosforilación de ERK en respuesta a la estimulación con distintas concentraciones de insulina

Se ha seguido el mismo procedimiento para el análisis de la fosforilación de ERK en condiciones variables de concentración, según el protocolo descrito, y llevando a cabo el análisis de los datos por medio de la densitometría, como en los anteriores ensayos.

La fosforilación de ERK inducida por insulina presenta un aumento paulatino a medida que crece la concentración estimulante, sin verse diferencias entre las líneas estudiadas. Sin embargo, en el análisis estadístico se da una leve tendencia al aumento de fosforilación, desde la concentración más baja aplicada. Esto difiere claramente del ensayo realizado a distintos tiempos de concentración. Aun así, ninguno de los valores arrojados ha sido estadísticamente significativos (Figura 12).

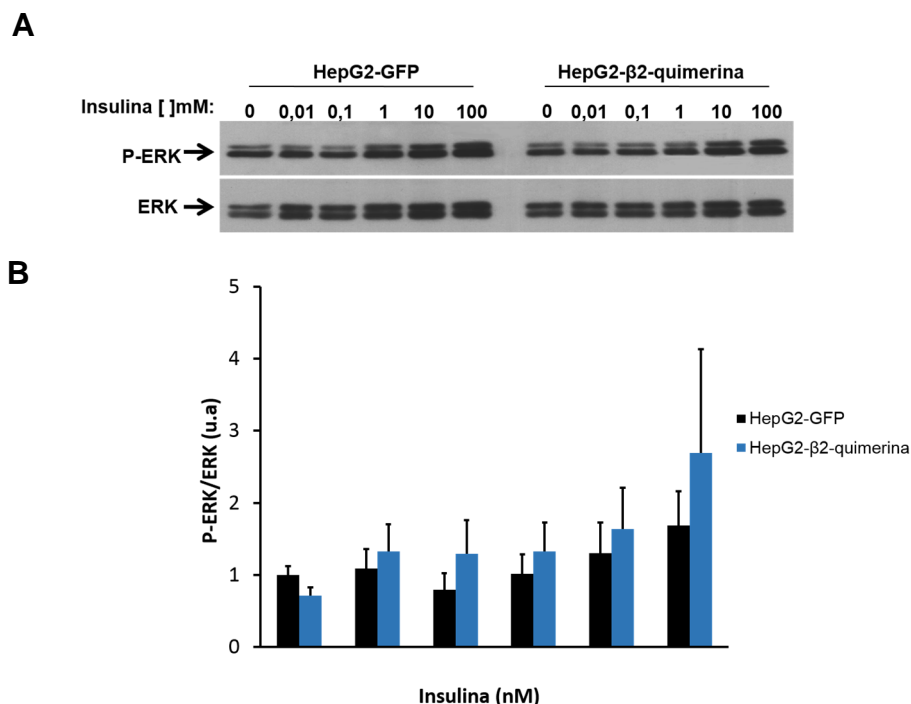


Figura 12. Efecto de la insulina sobre la fosforilación de ERK en células HepG2 –GFP y HepG2-β2-quimerina. A) Western blot de los lisados celulares tras la estimulación a concentraciones crecientes de insulina. La flecha superior indica las bandas correspondientes a ERK en estado fosforilado. En el panel inferior se muestran los niveles de ERK totales. B) Representación gráfica de los promedios de P-ERK/ERK a concentraciones crecientes de insulina (a.u.; unidades arbitrarias).

5.4. Ensayo de Pull Down para la detección de Rac activado

Se realizó un ensayo Pull down para la detección de Rac activado (Rac-GTP) en las líneas generadas; sabiendo que la β2-quimerina, en respuesta a estímulos inhibe la actividad de Rac por medio de su dominio GAP. Se espera ver una disminución de la activación de Rac activado, por medio de la estimulación de insulina.

Previamente al ensayo de pull down, se realiza en las líneas celulares una estimulación de insulina a distintos tiempos como se ha descrito con anterioridad. Esto tiene como propósito encontrar variaciones en la activación de Rac, aplicando como estímulo 100nM de insulina. De ser así cabría esperar que Rac pueda ser el intermediario en las vías de señalización en estudio.

Como puede verse en la figura 13, la activación de Rac en las células HepG2 –GFP y HepG2-β2-quimerina no presentan variaciones demostrables entre ellas en ninguno de los tiempos estudiados (Figura 13).

Este resultado tampoco puede ser concluyente, considerando que no se logró realizar duplicados que fueran suficientes para el estudio estadístico, lo cual nos hubiera permitido describir con más eficiencia la actividad de Rac.

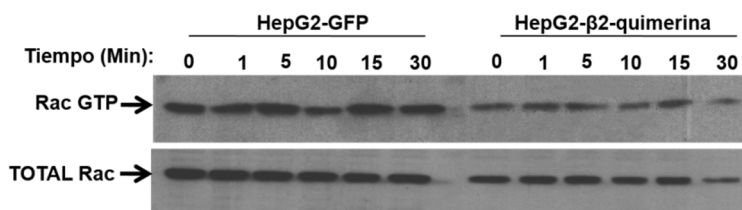


Figura 13. Western Blot del pull down realizado en células HepG2 –GFP y HepG2-β2-quimerina. Se muestra la cantidad de Rac activo y la cantidad total de Rac en el lisado celular tras la estimulación de insulina a distintos tiempos.

5.5. Localización Subcelular de β2-quimerina tras la estimulación con insulina

En estado de reposo la β2-quimerina se encuentran en estado inactivo en el citosol. Sin embargo, en presencia de un estímulo, la conformación de la β2-quimerina cambia y se activa, dejando libre su dominio C1 y translocando a la membrana donde su dominio GAP se asocia con Rac.

Para comprobar si la estimulación con insulina también produce esta translocación, hemos analizado la localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia, y los cambios en dicha localización en respuesta al estímulo con insulina a distintos tiempos como en los ensayos anteriores; ayudándonos de la fluorescencia que emite GFP (Figura 14).

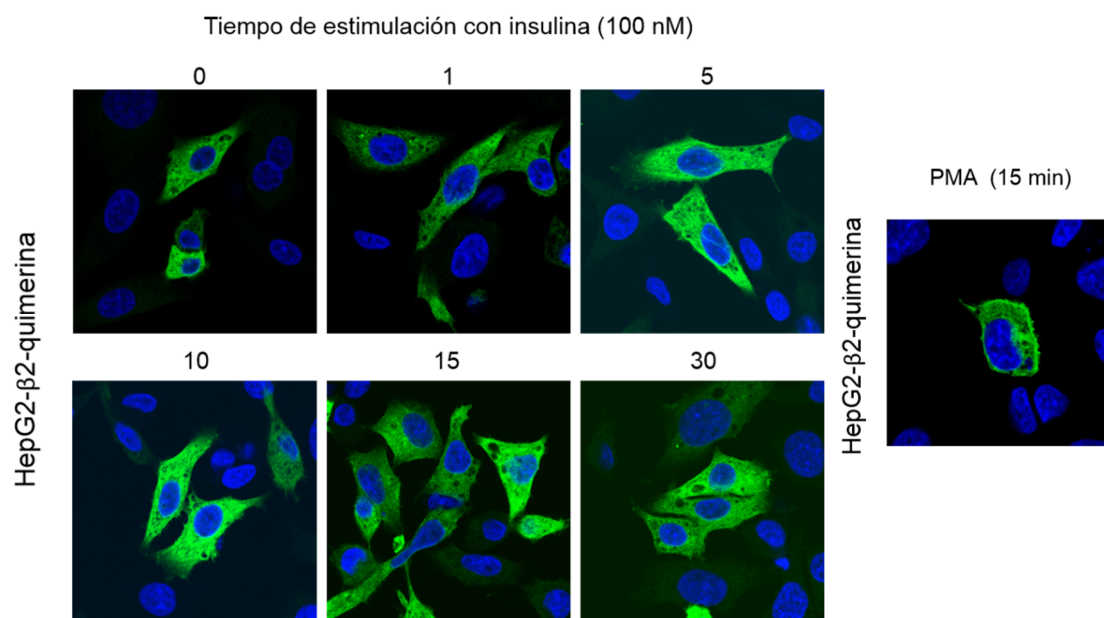


Figura 14. Imágenes de fluorescencia de células HepG2- β2-quimerina estimuladas con insulina. En el panel de la izquierda se muestra las células a los distintos tiempos de estimulación con insulina 100nM. A la derecha se muestra las células estimuladas con PMA por 15 min, como control positivo.

Como puede verse en la figura 14, no logra verse ningún tipo de translocación en β 2-quimerina o cambios de posicionamientos subcelulares que puedan apreciarse, debido a la estimulación de insulina, observándose la fluorescencia a mayoritariamente en el citosol en todas las condiciones de estímulo. A modo de control positivo, para corroborar que β 2-quimerina podía traslocarse en éstas células, se estimularon las células con PMA un análogo de DAG, que promueve el cambio conformacional de las quimerinas y la migración de las mismas desde el citosol a la membrana y regiones perinucleares. En la figura 14, se puede apreciar que, como era de esperar, el PMA indujo la translocación de β 2-quimerina a la membrana plasmática (panel derecho),

Este resultado nos demuestra que la estimulación de insulina no provoca cambios en el posicionamiento subcelular de la β 2-quimerina, con lo cual suponemos que la acción que pueda llevar a cabo la β 2-quimerina sobre la señalización de Insulina no necesite de una translocación o cambio de posicionamiento celular.

6. Discusión

La insulina circulante es necesaria para regular el metabolismo de los nutrientes. Las personas con resistencia a la insulina están predispuestas a desarrollar diabetes tipo 2 y otras enfermedades metabólicas asociadas a la desregulación del metabolismo de la glucosa. Esto no es un problema menor, ya que hoy en día nos encontramos ante una epidemia con respecto a la diabetes de tipo 2 y enfermedades relacionadas, como principales causas de morbilidad y la mortalidad en todo el mundo. En estos trastornos, los tejidos como el músculo, la grasa y el hígado se vuelven menos sensibles a la insulina. La fisiopatología de la resistencia a la insulina implica una compleja red de vías de señalización, activada por el receptor de la insulina, que regula los metabolismos intermedios y su organización en las células. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que otros numerosos eventos de señalización intervienen en la acción de la insulina, y son importantes en esta compleja vía (Saltiel y Kahn, 2001).

Teniendo en cuenta los datos recientes que sugieren que alteraciones en β 2-quimerina contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina (Suliman et al., 2009), en este trabajo hemos estudiado el efecto de esta proteína en las rutas de señalización activadas por insulina, centrándonos en células de hígado. Debido a la baja expresión de esta proteína en la línea celular utilizada (células HepG2), se ha utilizado como aproximación experimental la generación de líneas estables que expresan de forma ectópica esta proteína. Hay que aclarar que las células HepG2 son de origen tumoral, por lo que la baja expresión de β 2-quimerina en estas células no es representativa de los niveles de expresión en tejido normal, ya que debido al carácter antitumoral de la proteína se encuentra frecuentemente inhibida en varios tumores (Yang y Kazanietz, 2007; Casado-Medrano et al., 2016).

En este trabajo hemos comprobado que la sobreexpresión de β 2-quimerina en las células HepG2 provoca cambios visibles en el comportamiento de la acción de la insulina en sus vías de señalización clásica.

En los estudios realizados en las líneas celulares generadas, hemos visto dos tendencias claras. En primer lugar hemos observado un aumento de la fosforilación de AKT en las células que expresan β 2-quimerina tanto en los estudios de respuesta a la estimulación de insulina a distintos tiempos como en los estudios de dosis-respuesta. Estos resultados, nos sugieren que la sobreexpresión de β 2-quimerina produce un aumento de la sensibilidad de células de hígado a la acción de la insulina.

En segundo lugar, los resultados de los estudios del efecto de β 2-quimerina en la ruta de las MAPKs, han sido contradictorios. En la respuesta a la estimulación de insulina a distintos tiempos se ha observado una menor activación de ERK en las células que expresan β 2-quimerina respecto a las células control. Sin embargo en los estudios de dosis-respuesta vimos un aumento de la fosforilación de ERK en dicha línea celular. No obstante estos cambios no resultaron estadísticamente significativos, lo que indica que β 2-quimerina no participa en el control de la ruta de ERK en respuesta a insulina, a diferencia de lo que se ha observado en otros modelos celulares en respuesta a factores de crecimiento (Bruinsma y Baranski, 2007).

Este comportamiento diferencial entre las vías de señalización de insulina ya se han descrito en la bibliografía (Montagnani et al., 2002). En este trabajo se demostró que en el caso de animales insulinoresistentes y en modelos *in vitro*, se puede ver una reducción de la activación de la señalización de la insulina a través de la vía de AKT, que da lugar a una disminución de la captación de glucosa, y la reducción de la utilización de glucosa en los tejidos diana de la insulina. Sin embargo, al mismo tiempo, estos autores comprobaron que la vía de las MAPKs se mantiene inalterada tras la estimulación con insulina. Este desequilibrio selectivo de las dos vías de transducción de señal en situaciones como la insulinoresistencia puede conducir a una disminución del transporte y la homeostasis de la glucosa y al mismo tiempo mantener normales la proliferación y el crecimiento celular.

Las funciones biológicas descritas hasta el momento de β 2-quimerina están ligadas a su actividad como reguladores negativos específicos de la GTPasa Rac (Yang y Kazanietz, 2007). En contra de lo esperado, en este trabajo no hemos observado que la expresión de β 2-quimerina produzca cambios en la activación de Rac en respuesta a la estimulación de insulina. Este resultado nos indica que el aumento en la fosforilación de AKT en las células que expresan β 2-quimerina no depende de Rac.

La activación de β 2-quimerina por ciertos estímulos implica la redistribución celular de esta proteína desde el citosol a la membrana plasmática (Kazanietz, 2002). En nuestro estudio, no se han observado cambios de posicionamiento de β 2-quimerina dentro de la célula tras la estimulación con insulina, distribuyéndose mayoritariamente en el citosol tanto en condiciones basales como tras la estimulación con insulina a distintos tiempos.

En conjunto, con estos resultados, una hipótesis a manejar pueda ser que la acción de la β 2-quimerina sobre la señalización de la insulina sea mediada sin necesidad de que esta se transloque, comportándose como una molécula adaptadora que se una a otro factor que realice la acción sobre la vía de AKT, sin la intervención de Rac.

7. Conclusiones

1. La sobreexpresión de β 2-quimerina en las células HepG2, ejerce un efecto activador de la señalización de insulina a través de la vía de PI3K/AKT.
2. La sobreexpresión de β 2-quimerina en las células HepG2 no afecta a la activación de la ruta de las MAPKs en respuesta a la insulina.
3. El efecto de β 2-quimerina en la activación de AKT en respuesta a insulina es independiente de la activación de Rac y no requiere una redistribución de β 2-quimerina a la membrana plasmática.

8. Bibliografía

- Ahmed, S.; Lee, J.; Kozma, R.; Bests, A.; Monfries, C.; Lim, L. 1993. A Novel Functional Target for Tumor-promoting Phorbol Esters and Lysophosphatidic Acid the p21rac-GTPase activating protein β -chimaerin. *J. Biol. Chem.* Vol. 268, No. 15, pag. 10709-10712.
- Bosco, E. E.; Mulloy, J.C.; Zheng, Y. 2008. A "Rac" of All Trades. *Cell. Mol. Life Sci.* vol.1, pag. 1-5.
- Bruinsma, S.P.; Baranski, T.J.. 2007. β 2-Chimaerin in cancer signaling: Connecting cell adhesion and MAP kinase activation. *Cell Cycle.* Vol. 6, No. 20, pag. 2440-2444.
- Caloca, M.J.; Delgado, P.; Alarcón, B.; Bustelo, X.R. 2008. Role of chimaerins, a group of Rac-specific GTPase activating proteins, in T-Cell receptor signaling. *Cell Signal.*;vol. 20, No. 4, Pag. 758–770.
- Caloca, M.J.; Wang, H.; Delemos, A.; Wang, S.; Kazanietz, M.G. 2001. Phorbol esters and related analogs regulate the subcellular localization of beta 2-chimaerin, a non-protein kinase C phorbol ester receptor. *J Biol Chem.* Vol. 276 No. 21, pag. 18303-18312.
- Caloca, M.J.; Wang, H.; Kazanietz, M.G. 2003. Characterization of the Rac-GAP (Rac-GTPase-activating protein) activity of beta2-chimaerin, a 'non-protein kinase C' phorbol ester receptor. *Biochem J.* vol. 375, No. 2, Pag. 313-321.
- Casado-Medrano, V.; Barrio-Real, L.; García-Rostán, G.; Baumann, M.; Rocks, O.; Caloca, M.J. 2016. A new role of the Rac-GAP β 2-chimaerin in cell adhesion reveals opposite functions in breast cancer initiation and tumor progression. *Oncotarget.* Vol. 7, No. 19, pag. 28301-28319.
- Gutierrez-Uzquiza, A.; Colon-Gonzalez, F.; Leonard, T.A.; Canagarajah, B.J.; Wang, H.B.; Mayer, B.J.; Hurley, J.H.; Kazanietz, M.G. 2013. Coordinated activation of the Rac-GAP β 2-Chimaerin by an atypical proline-rich domain and diacylglycerol. *Nat Commun.* vol 4, 1849.
- Hers, I.; Vincent, E.E.; Tavaré, J.M. 2011. AKT signalling in health and disease. *Cell. Signal.* Vol. 23, pag. 1515–1527
- Hu, H.; Juvekar, A.; Lyssiotis, C.A.; Asara, J.M.; Cantley, L.C.; Wulf, G.M. 2016. Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of Aldolase from the Actin Cytoskeleton. *Cell.* Vol. 164, pag. 433–446
- Jacobs, t.; Hall, C. 2005. Rho GAPs – regulators of Rho GTPases and more, in *Rho Family GTPases.* (Manser E., ed.). Vol. 3, pag. 93–112
- Olivares Reyes, J.A.; Arellano Plancarte, A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB.* Vol 27 No. 1, pag. 9-18.
- Kazanietz, M.G. 2002. Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol* vol. 61, pag. 759-767
- Leskow, F.C.; Holloway, B.A.; Wang, H.; Mullins, M.C.; Kazanietz, M.G. 2006. The zebrafish homologue of mammalian chimerin Rac-GAPs is implicated in epiboly progression during development. *Proc Natl Acad Sci* Vol. 103 No 14, pag. 5373-5378.

- Ligeti, E.; Welti, S.; Scheffzek, K. 2012. Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiol Rev.* Vol. 92, No 1, pag. 237-272.
- Montagnani, M.; Golovchenko, I.; Kim, I.; Koh, G.Y.; Goalstone, M.L.; Mundhekar, A.N. Johansen, M.; Kucik, D.F.; Quon, M.J.; Draznin, B. 2002. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Enhances Mitogenic Actions of Insulin in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, No. 3, pag. 1794–1799.
- Sahai, E.; Marshall, C.J. 2002. Rho–GTPases and cáncer. *Nat. Rev. Ca.* Vol. 2, pag. 133-142.
- Saltiel, A.R.; Kahn, C.R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* Vol. 414, pag. 799-806
- Sosa, M.S.; Lewin, N.E.; Choi, S.H.; Blumberg, P.M.; Kazanietz, M.G. 2009. Biochemical characterization of hyperactive β 2-chimaerin mutants revealed an enhanced exposure of C1 and Rac-GAP domains. *Biochemistry.* Vol. 48 No. 34, pag. 8171–8178.
- Suliman, S.G.I.; Stanik, J.; McCulloch, L.J.; Wilson, N.; Edghill, E.L.; Misovicova, N.; Gasperikova, D.; Sandrikova, V.; Elliott, K.S.; Barak, L.; Ellard, S.; Volpi, E.V.; Klimes, I.; Gloyn, A.L. 2009. Severe Insulin Resistance and Intrauterine Growth Deficiency Associated With Haploinsufficiency for INSR and CHN2. *Diabetes.* Vol. 58, pag. 2954–2961.
- Van Aelst, L.; D'Souza-Schorey, C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* Vol 11, pag. 2295–2322.
- Wang, Z.G.; Cheng, Y.; Yu, X.C.; Ye, L. B.; Xia, Q.H.; Johnson, N.R.; Wei, X.; Chen, D.Q.; Cao, G.; Fu, X.B.; Li, X.K.; Zhang, H.Y.; Xiao, J. 2015. bFGF Protects Against Blood-Brain Barrier Damage Through Junction Protein Regulation via PI3K-AKT-Rac1 Pathway Following Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol.* Vol. 1, pag. 1-14.
- Yang, C.; Kazanietz, M.G. 2007. Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac. *Biochem. J.* Vol. 403, pag. 1–12.
- Yang, C.; Liu, Y.; Leskow, F.C.; Weaver, V.M.; Kazanietz, M.G. 2005. Rac-GAP-dependent Inhibition of Breast Cancer Cell Proliferation by 2-Chimerin. *J Biol Chem.* Vol. 280, No. 26, pag. 24363–24370.
- Zierath, J.R.; Krook, A.; Wallberg-Henriksson, H. 2000. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia.* Vol. 43, pag. 821-835.
- Zubeldia-Brenner, L.; Gutierrez-Uzquiza, A.; Barrio-Real, L.; Wang, H.; Kazanietz, M.G.; Coluccio Leskow, F. 2014. β 3-Chimaerin, a novel member of the chimaerin Rac-GAP family. *Mol Biol Rep.* Vol. 41, pag. 2067–2076.