

UCH-FC
DOC-B.Mol.
1928
c 1

***Megalina: Modelo de estudio de nuevos
aspectos del tráfico intracelular constitutivo en
células polarizadas***

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y

Neurociencias.

Facultad de Ciencias

Por

María Isabel Yuseff Sepúlveda

Enero, 2005

Dirección de Tesis: Dr María Paz Marzolo

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

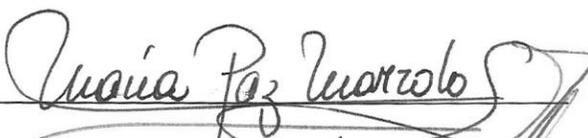
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

MARIA ISABEL YUSEFF SEPULVEDA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de la tesis rendido el Día 26 de Noviembre de 2004.

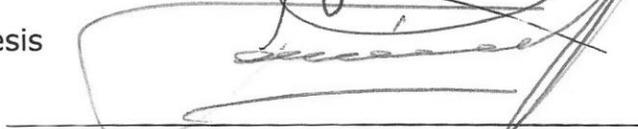
Director de Tesis

Dra. María Paz Marzolo

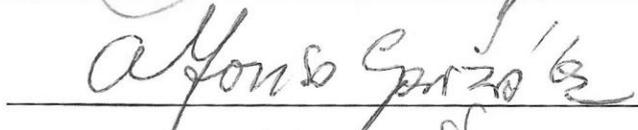


Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Juan Fernández



Dr. Alfonso González



Dra. María Rosa Bono



Dr. Marco Tulio Núñez



*Con cariño, le dedico esta tesis
a mi marido Antonio*

Agradecimientos

A Antonio por su amor, comprensión y apoyo constante, especialmente en los momentos difíciles.

A mis padres y hermanos, por su cariño.

A María Paz por recibirme en el laboratorio, guiarme en la tesis y entregarme una formación científica muy valiosa.

Al Dr. Guojun Bu de la Washington University en St Louis, USA, por recibirme en su laboratorio, motivarme y también guiarme en esta tesis.

A todos los miembros del laboratorio por su amistad y colaboración desinteresada.

A mi compañero de doctorado, Patricio Rojas, por su ayuda y amistad sincera.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por CONICYT, mediante una beca de apoyo de tesis doctoral (2002), una beca de mantención para estudiantes de doctorado (1999) y a través de los proyectos Regulares de Fondecyt # 1990600 y # 1020746. También fue financiada con el Proyecto de Incentivo a la Cooperación Internacional # 7990029, Proyecto DIPUC 497 y el proyecto Fogarty Internacional Research Collaboration Award (FIRCA) # TW06456.

ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo

BN: línea celular de saco vitelino de rata

BSA: albúmina de suero bovino

β -ME: beta mercaptoetanol

CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CHO: línea celular de ovario de hamster

Ci: Curie

CKII: Caseína quinasa II

CMV: citomegalovirus

DMEM: medio Tagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxiribonucleico

dNTPs: desoxinucleótidos

D.O.: densidad óptica

DOC: Desoxicolato

EDTA: ácido etilen-diamino-tetra-acético

GFP: proteína fluorescente verde

GSL: glicosfingolípidos

GPI: glicosilfosfatidilinositol

HA: hemaglutinina del virus de la influenza

Hepes: N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[2-etanosulfonic acid]

h: hora

IAA: alcoholisoamílico

IF: Inmunofluorescencia

kDa: kilo Daltons

Lat B: Latrunculina B

LB: Luria Broth

LDL-R: Receptor de LDL

LLC-PK1: línea celular epitelial proveniente de riñón de cerdo

LRP: Receptor relacionado con el receptor de LDL

MDCK: línea celular epitelial proveniente de riñón de perro

min: minutos

mM: milimolar

μ M: micromolar

ng: nanogramos

nm: nanómetros

PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida

pb: pares de bases

PBS: tampón o buffer fosfato salino

PCR: reacción de polimerasa de DNA en cadena

PEG: polietilenglicol

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PM: peso molecular

PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoruro

PSA: persulfato de amonio

RE: retículo endoplásmico

RBP: retinol binding protein

RNA: ácido ribonucleico

RNAasa: ribonucleasa

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecilsulfato de sodio

TE: Tris EDTA

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: N,N,N',N'-teterametilendiamina

TER: resistencia transpitelial

TGN: Trans-Golgi Network

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

Tun: tunicamicina

TX-100: Tritón X-100

RESUMEN

Megalina es un receptor endocítico de la superficie celular que pertenece a la familia de receptores LDL-R. Su expresión está restringida a células de epitelio de absorción, como el túbulo proximal del riñón, pulmón y tiroides. En estos tejidos, megalina se localiza en la cara apical donde interacciona con diversos ligandos que no sólo comprenden lipoproteínas, sino que también, complejos de vitaminas y hormonas, entre otros. El hecho que ratones *knock-out* para megalina muestren defectos en el desarrollo neuronal, sugiere que la función del receptor es fundamental durante el desarrollo. Por otro lado, una de las características más relevantes de megalina, en el adulto, es su alta actividad endocítica. En tejidos como el túbulo proximal del riñón, megalina es el principal receptor encargado de la recaptación de sustancias vitales filtrados por el glomérulo, como complejos de vitamina D. Adicionalmente, en algunos tejidos este receptor no transporta sus ligandos hacia la vía degradativa sino que promueve la transcitosis de algunos de ellos, como la tiroglobulina y RBP.

La regulación del tráfico celular de este receptor aún no ha sido explorada completamente y constituye el objetivo central de esta tesis. Se postuló que en el dominio citosólico de megalina existirían motivos que podrían regular el tráfico celular del receptor. Entre ellos se destacan (a) un motivo rico en prolinas, ATPPPSP, que constituye un motivo de unión a dominios SH3, (b) un motivo SEV que constituye un sitio interacción con

dominios PDZ, (c) cuatro potenciales motivos de endocitosis mediada por clatrina (LL, NPXY, NxxY y YXX ϕ) y (d) motivos de consenso de fosforilación por PKC, PKA y CK-II. Este trabajo se centró en la caracterización detallada de los motivos presentes en el dominio citosólico de megalina involucrados con la regulación del tráfico de este receptor, tanto a nivel de su endocitosis como localización polarizada.

En relación con la localización polarizada de megalina, este receptor resultó ser un excelente modelo de estudio puesto que se encontró que en el dominio citoplasmático existía información para su destinación a la superficie apical de células epiteliales. Este hallazgo representa el primer ejemplo de una proteína con un dominio de transmembrana que contiene información apical en este dominio celular.

En este trabajo también se revelaron dos propiedades de megalina no descritas previamente. La primera, es la asociación del receptor con microdominios lipídicos ricos en colesterol y glicoesfingolípidos, que conforman las denominados "balsas lipídicas", y la segunda es la interacción con proteínas del citoesqueleto. Se caracterizaron ambos tipos de interacciones y se encontró que los motivos de unión a dominios SH3 y PDZ, presentes en el dominio citosólico del receptor participan en la asociación con proteínas del citoesqueleto de actina. A su vez, la asociación de megalina a balsas lipídicas está regulada por la integridad del citoesqueleto de actina y no es un requisito para la destinación apical del receptor.

Uno de los objetivos principales de este trabajo consistió en estudiar los motivos involucrados en la endocitosis de megalina. Primero, se mostró que la internalización del receptor es un proceso mediado por clatrina y que está regulada, en parte, por el primer motivo NPxY del dominio citosólico. Por otro lado, se encontró que el motivo de unión a dominios SH3 modula la velocidad inicial de internalización del receptor y que el motivo de unión a dominios PDZ es requerido para mediar la degradación eficiente de ligandos.

Evidencias anteriores del laboratorio mostraban que el dominio citosólico de megalina era fuertemente fosforilado *in vivo*. Sin embargo, la naturaleza de esta fosforilación y su potencial función no habían sido descritas. Un hallazgo importante, obtenido en esta tesis, fue la identificación del motivo principal de fosforilación del dominio citosólico, el cual corresponde a un residuo de serina que se encuentra dentro de un motivo del tipo PPPSP. Los datos muestran que la fosforilación del motivo PPPSP podría ser mediada por Caseína quinasa II (CK-II), y que regularía negativamente la internalización de megalina.

De los estudios del dominio citoplasmático de megalina realizados en esta tesis se obtuvo información novedosa y relevante con respecto a la función y tráfico de megalina, contribuyendo no sólo al campo de estudio del receptor, sino a aspectos más amplios del tráfico de proteínas en células polarizadas y no polarizadas.

SUMMARY

Megalin is a cell surface endocytic receptor that belongs to the LDL-R family. Its cellular expression is restricted to absorptive epithelia such as the kidney proximal tubule, lung and the thyroid gland. In these tissues, megalin is localized along the apical surface, where it interacts with diverse ligands that not only comprise lipoproteins, but also include vitamin complexes, hormones, among others. The fact that *knock-out* mice show important abnormalities in neuronal development suggests that the function of this receptor is of fundamental importance during development. On the other hand, one of the most relevant characteristics of megalin, in adults, is its high endocytic activity. In tissues, such as the proximal tubule, megalin is considered the main receptor responsible for the retrieval of vital elements from the glomerular filtrate, such as vitamin D complexes. Additionally, in other tissues this receptor does not transport its ligands to the degradative pathway and instead promotes the transcytosis of certain ligands such as thyroglobulin and RBP.

Regulation of the cellular trafficking of this receptor has not been fully explored and constitutes the main objective of this thesis. We postulate that the megalin cytoplasmic domain contains motifs that regulate cellular trafficking of the receptor. Among the motifs present within this domain, are (a) a proline-rich region, ATPPPSP, that is an SH3 binding motif, and (b) a carboxyl terminal SEV motif that potentially binds PDZ domains, (c) four

putative clathrin-mediated endocytic signals (LL, NPXY, NxxY y YXX ϕ) and (d) several potential phosphorylation sites for PKC, PKA y CK-II. In this study, motifs within the megalin cytoplasmic domain were characterized in detail in terms of their function in endocytosis and the polarized localization of the receptor.

Regarding the polarized localization of megalin; this receptor was shown to be an excellent model because we found information for its apical localization in the cytoplasmic domain of megalin. This finding represents the first example of a protein with a single transmembrane domain that contains sorting information in this cellular domain.

In addition, two new properties of megalin have been revealed. The first one is the association of the receptor with lipid microdomains enriched in cholesterol and glycosphingolipids, termed lipid rafts, and the second is the interaction of the receptor with actin associated proteins. Both of these interactions were characterized and the results show that the SH3 and PDZ interacting motifs within the cytoplasmic tail of megalin were involved in the association with the actin cytoskeleton. Additionally, the association between megalin and lipid rafts is regulated by the integrity of the actin cytoskeleton and is not required for the apical localization of the receptor.

An important aim of this study was to define the endocytosis signal(s) present within the cytoplasmic tail of megalin. First, we showed that the internalization of the receptor is a clathrin-mediated process that is partially

regulated by the first NPxY motif present within the cytosolic tail. In addition, the data indicate that the SH3 binding motif regulates the initial internalization rate of the receptor and the PDZ binding motif is required for efficient ligand degradation.

Preliminary evidence from our laboratory has shown that the cytosolic domain of megalin is strongly phosphorylated *in vivo*. However, the nature of this phosphorylation and its potential function were unclear. An important discovery achieved in this thesis was the identification of the principal motif involved in the phosphorylation of the cytoplasmic tail of megalin which corresponds to a serine residue within the proline region PPPSP. The data also suggest that phosphorylation of the PPPSP motif could be mediated by Casein Kinase II (CK-II) and that it negatively regulates the internalization of megalin.

Analysis of the cytoplasmic motifs within the megalin cytosolic domain provided novel and relevant information concerning megalin's function and trafficking and has also contributed to the knowledge of broader aspects regarding receptor trafficking in polarized and non-polarized cells.

INDICE

I.	INTRODUCCION	7
	1. Megalina, Receptor Endocítico de la Familia del LDL-R.	7
	2. Fenotipo Epitelial Polarizado y Megalina	15
	3. Asociación de Proteínas a Microdominios Lipídicos	21
	4. Proceso de Endocitosis Mediado por Receptor y Megalina:	22
	5. Transcitosis y Megalina	24
	6. Hipótesis de Trabajo	28
	7. Objetivo General	28
	8. Objetivos Específicos	28
II.	MATERIALES Y METODOS	30
	1. Materiales	30
	1.1. Material Biológico	30
	1.1.1 Bacterias.....	30
	1.1.2 Plasmidios:	30
	1.1.3 Líneas Celulares:	32
	1.1.4 Anticuerpos.....	32
	1.2. Medios de Cultivo:	34
	1.3. Enzimas	34
	1.4. Oligonucleótidos	35
	1.4.1 Secuencias de oligonucleótidos	35
	1.5. Marcadores de Peso Molecular	39
	1.6. Reactivos.....	40
	2. Métodos	42
	2.1. Técnicas de Biología Molecular	42
	2.1.1 Clonamientos	42
	2.1.2 Eliminación de secuencias presentes en el dominio citosólico de megalina	43
	2.1.3 Mutagénesis sitio dirigida	44

2.1.4	Obtención de bacterias competentes	45
2.1.5	Transformación de bacterias.....	45
2.1.6	Obtención del DNA plasmidial	45
2.2.	Técnicas de Biología Celular	48
2.2.1	Cultivo de líneas celulares	48
2.2.2	Transfección de células	48
2.2.3	Western Blot	49
2.2.4	Determinación de la distribución polarizada de megalina y minireceptores.....	50
2.2.5	Yodinación de proteínas	52
2.2.6	Estudios de endocitosis.....	52
2.2.7	Inhibición de la endocitosis mediado por clatrina... ..	53
2.2.8	Estudios de fraccionamiento celular	54
2.2.9	Estudios de fosforilación <i>in vivo</i>	56
2.2.10	Tratamiento con drogas	57
2.2.11	Localización de proteínas por inmunofluorescencia	57
2.2.12	Análisis de la expresión de minireceptores por citometría de flujo	58
III.	RESULTADOS.....	59
1.	Determinantes Moleculares y Celulares que Participan en la Localización Apical de megalina:	59
1.1.	Análisis de la Asociación de Megalina a Microdominios de Colesterol/Glicoesfingolípidos (BALSAS).	59
1.2.	Análisis de la Interacción de Megalina con el Citoesqueleto y los Dominios Involucrados en esta Posible Interacción.....	72
1.3.	Determinar si Megalina Contiene Información de Destinación a la Superficie Apical en su Dominio Citoplasmático.. ..	78
2.	Estudio de la Fosforilación del Dominio Citosólico de Megalina:	101
2.1.	Identificación del Principal Motivo de Fosforilación en el Dominio Citoplasmático de Megalina.....	119
3.	Caracterizar la Ruta Endocítica de Megalina en Células no Polarizadas y su Regulación:.....	125

3.1.	Evaluación de la Participación de los Motivos de Endocitosis de Megalina en la Internalización y Tráfico Endocítico de este Receptor.	125
3.2.	Análisis del Papel de la Asociación de Megalina a Microdominios Lipídicos y al Citoesqueleto, así como el Papel de la Fosforilación del Dominio Citosólico en su Endocitosis.....	145
3.2.1	Interacción de megalina con el citoesqueleto.....	145
3.2.2	Asociación de megalina con microdominios lipídicos ...	148
3.2.3	Papel de la fosforilación del dominio citosólico de megalina en la endocitosis.....	153
IV.	DISCUSION	156
1.	Localización Apical de Megalina.....	156
2.	Regulación de la Endocitosis de Megalina.	161
3.	Interacción de Megalina con Proteínas del Citoesqueleto de Actina y su Regulación en la Endocitosis.	167
4.	Asociación de Megalina a Microdominios lipídicos.....	171
5.	Caracterización de la Fosforilación del Dominio Citoplasmático de Megalina.	175
6.	Identificación del Principal Motivo de Fosforilación en el Dominio Citoplasmático de Megalina y su Papel en la Endocitosis del Receptor. ..	178
V.	CONCLUSIONES	181
VI.	ANEXO.....	183
1.	Anexo 1: Mutantes generadas de los motivos del dominio citoplasmático de megalina.....	183
2.	Anexo 2 Mutantes truncadas del dominio citoplasmático de megalina.	184
3.	Anexo 3 Construcciones de GFP.	185
VII.	BIBLIOGRAFIA	186

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura de megalina.....	13
Figura 2. Representación esquemática del dominio citoplasmático de megalina.....	14
Figura 3. Esquema del minireceptor utilizado en el trabajo.....	26
Figura 4. Vector de expresión pcDNA3 usado para generar las construcciones del minireceptor de megalina y expresarlas en células animales.....	31
Figura 5. Distribución de megalina en gradientes de sacarosa.	61
Figura 6. Análisis de la asociación de megalina a balsas lipídicas durante su transporte a través de la ruta secretora..	64
Figura 7. Efecto de Latrunculina B sobre la asociación de megalina a balsas lipídicas.	67
Figura 8. Distribución de megalina fosforilada en balsas lipídicas.	69
Figura 9. Estudio de la asociación de minireceptores a balsas lipídicas....	71
Figura 10. Extracción de megalina con Tritón X-100 a 4° C.....	74
Figura 11. Extracción del minireceptor de megalina con Tritón X-100 a 4° C.....	77
Figura 12. Localización apical de megalina y del minireceptor con dominio citosólico de megalina.....	81
Figura 13. GFP no contiene información de destinación apical	83
Figura 14. Localización del reportador neutro GFP _{lrptm} HA en células MDCK	86
Figura 15. Localización apical de GFP _{lrptm} MegT	88
Figura 16. Distribución de construcciones de GFP en gradientes de sacarosa.	90
Figura 17. Localización de quimeras de GFP fusionadas a formas truncadas del dominio citoplasmático de megalina en células MDCK	94

Figura 32. Identificación del principal sitio de fosforilación en el dominio citosólico de megalina.....	123
Figura 33. Efecto de inhibidores de quinasas en la fosforilación de la mutante S170A.....	124
Figura 34. Efecto de la inhibición de endocitosis mediado por clatrina en la internalización de megalina.	128
Figura 35. Efecto de la inhibición de la endocitosis por clatrina en la internalización del minireceptor mLRP4lrptmMegT en células CHO.	130
Figura 36. Ensayos de endocitosis de minireceptores con motivos de endocitosis mutados.....	133
Figura 37. Estudio de la internalización del minireceptor con mutaciones en tres motivos de endocitosis (MegT 152/80/8).	135
Figura 38. Endocitosis del minireceptor con el motivo NxxY mutado.....	137
Figura 39. Análisis del papel del motivo rico en prolinas en la internalización de megalina.	139
Figura 40. Análisis de la expresión de minireceptores en la superficie celular mediante citometría de flujo.	142
Figura 41. Efecto de la delección del motivo de unión a dominios PDZ en la internalización y degradación de ligandos mediado por megalina	144
Figura 42. Endocitosis del minireceptor con el dominio citosólico de megalina (MegT) en presencia de un agente disociador de citoesqueleto de actina (Latrunculina B).....	147
Figura 43. Ensayos de endocitosis de minireceptores con el ectodominio del LRP, dominio citosólico de megalina y el transmembrana de megalina o transmembrana de LRP	149
Figura 44. Inmunoprecipitación de minireceptores que contienen el cuarto dominio de unión a ligandos del LRP, el dominio citoplasmático de megalina y el dominio de transmembrana del LRP o el dominio de transmembrana de megalina.....	151
Figura 45. Estudios de internalización de minireceptores que presentan mutaciones en motivos de endocitosis (Y80A) o mutaciones que generan deficiencias en la fosforilación (S170A) y Δ ProRich. ..	155

I. INTRODUCCIÓN

1. *Megalina, Receptor Endocítico de la Familia del LDL-R.*

Megalina es una glicoproteína de membrana de 600 kDa que pertenece a la familia de receptores de LDL. Esta familia de proteínas, que además incluye el receptor de LDL (LDL-R), el receptor relacionado con LDL-R (LRP), el receptor de VLDL y de ApoE, se expresan en la superficie celular desde donde unen y endocitan una gran variedad de ligandos tales como apolipoproteínas, proteasas, complejos de proteasas con sus inhibidores, etc. Por otro lado, los miembros de la familia LDL-R presentan características estructurales comunes, como la presencia de un gran dominio extracelular, un dominio de transmembrana y un dominio citoplasmático relativamente corto. La mayor similitud entre los receptores se encuentra a nivel del dominio extracelular, que contiene los dominios de unión a ligandos formados por motivo que contienen repeticiones del tipo complemento, ricos en residuos de cisteína [1]. En el caso de megalina, uno de los miembros más grandes de esta familia, su dominio extracelular contiene 36 repeticiones del tipo complemento, los cuales están agrupados en cuatro dominios de unión a ligandos (figura 1) [2]. Otra característica de estos receptores es que la interacción con sus ligandos puede ser antagonizada por una proteína llamada RAP (proteína asociada a receptor). Esta proteína de 39 kDa es capaz de unirse a todos los receptores de la familia LDL-R, sin

embargo no constituye un ligando extracelular sino que está presente en el retículo endoplásmico (RE) donde actúa como chaperona para permitir el plegamiento correcto de estas proteínas durante su síntesis [3]. En cuanto a los dominios citoplasmáticos de los miembros de la familia LDL-R, no existe una gran homología entre ellos, a excepción de la presencia de al menos un motivo del tipo NPxY el cual está relacionado con la incorporación de los receptores en foveolas cubiertas con clatrina. Sin embargo, este motivo no siempre constituye la señal de endocitosis para todos los miembros de la familia LDL-R y un ejemplo es el receptor LRP, cuya internalización se regula por otro tipo de señales [4].

Megalina fue originalmente identificada como el antígeno involucrado en la nefritis de Heymann [5] y recientemente se ha descrito que pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas generan autoanticuerpos que reaccionan contra megalina [6]. La expresión de este receptor está restringida a células del epitelio de absorción, como los presentes en el túbulo proximal del riñón, la tiroides, el intestino y el pulmón. [7]. En estos epitelios megalina se expresa específicamente en la cara apical y por ello este receptor también endocita ligandos presentes en la cara luminal de los tejidos epiteliales. A nivel del túbulo proximal, megalina une y endocita diferentes ligandos provenientes del filtrado glomerular como transcobalamina-vitamina B12 [8], albúmina [9] y complejos de vitamina D [10]. De esta forma, se le ha asignado a este receptor un papel importante en la recaptación de macromoléculas filtradas a través del glomérulo. Esta

función quedó de manifiesto en ratones *knock-out* para megalina, en que los animales que sobreviven presentan una gran pérdida de proteínas por la orina y deficiencias óseas debida a fallas en la homeostasis del calcio provocado por la pérdida de complejos de vitamina D [11]. Además, es importante destacar que la mayoría de estos ratones *knock-out* mueren a los minutos de nacimiento, con malformaciones importantes a nivel del sistema nervioso y deficiencias respiratorias [12]. Estos resultados indican que megalina es fundamental para el desarrollo normal del organismo y que la función de este receptor no es reemplazable por la de otro receptor de la familia LDL-R, a pesar de que algunos de ellos endocitan varios ligandos en común con megalina, como es el caso de LRP.

La función de megalina no se restringe sólo a la recaptación de macromoléculas a nivel renal, sino que también es importante en la absorción de proteínas en el intestino y transporte de moléculas a través de la barrera hematoencefálica [13]. En este sentido, es interesante destacar que en algunos tejidos, megalina también es capaz de realizar transcitosis de ligandos desde la superficie apical a la cara basolateral. Un ejemplo de ello es lo que ocurre en la glándula tiroidea, donde megalina está involucrada en la transcitosis de tiroglobulina y de esta manera regula la producción de hormonas tiroideas de este tejido [14]. Por otro lado, el fenotipo del ratón *knock-out* para megalina sugiere que este receptor juega un papel importante en la formación del sistema nervioso central durante el desarrollo. Se postula que los defectos generados por la ausencia de

megalina podrían ser el resultado de fallas en la captación de nutrientes importantes como colesterol, transportado en lipoproteínas con ApoE [15], o por alteraciones en vías de transducción de señales dependientes del receptor. La interacción de megalina con sonic hedgehog (shh), morfógeno que regula el desarrollo neuronal, refuerza la idea de que megalina constituye una pieza clave en los procesos de transducción de señales que ocurren durante el desarrollo neuronal [16].

Megalina también presenta una gran variedad de ligandos intracelulares que interactúan con los diferentes motivos del dominio citosólico [17]. El número de proteínas descritas ha ido aumentando y esto ha abierto nuevos frentes de estudio para este receptor. Por un lado, se han encontrado proteínas citosólicas relacionadas con procesos de transducción de señales vía quinasas (JIP-1, JIP-2) y proteínas G (SEMCAP-1) [18] y por otro lado, se han descubierto proteínas del tipo adaptadoras que interactúan con el dominio citosólico de megalina, como Dab2 [19] y ARH [20]. Estas proteínas contienen motivos del tipo PTB (dominio de unión a fosfotirosina), y se postula que tendrían un papel en el tráfico endocítico del receptor.

A pesar de todas las funciones fisiológicas descritas para megalina y su capacidad para interactuar con múltiples ligandos, tanto extracelulares como citosólicos, ciertos aspectos como los determinantes moleculares y celulares involucrados en su tráfico intracelular y la regulación de estos procesos no han sido totalmente dilucidados. En este sentido es interesante

recalcar que megalina presenta el dominio citoplasmático más grande de todos los miembros de la familia de receptores LDL-R. En su dominio citoplasmático, compuesto por 209 aminoácidos (figura 2), existen señales de internalización formadas por un motivo de di-leucinas, dos secuencias del tipo NPXY, que también están presentes en los otros receptores, un motivo del tipo NxxY y otro del tipo YXXØ [21, 22]. Este último ha sido descrito como una señal importante en la endocitosis de LRP que es un receptor de la misma familia que megalina [23].

Entre los otros motivos interesantes presentes en el dominio citosólico de megalina, y que no se encuentran en los otros receptores, se destacan una región rica en prolinas capaz de unir proteínas con dominios con homología a Src tipo 3 (SH3) y tipo 2 (SH2). También se encuentra una secuencia consenso para la unión a proteínas PDZ (**SEV**), que mediaría la interacción con proteínas citosólicas como GIPC [24] y PSD-95 [25], pero su papel en términos de la función del receptor aún no se conoce. Por otro lado, el dominio citosólico de megalina también presenta varios motivos de consenso de fosforilación por quinasas como la caseína quinasa II (CK-II), la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa C (PKC) [21] (figura 2). Trabajos de nuestro laboratorio han mostrado que el dominio citosólico de megalina se fosforila fuertemente, pero su papel en la función y el tráfico celular del receptor aún no se conoce.

La interacción de megalina con estas proteínas citosólicas sugiere, entonces, que este receptor podría participar en eventos de señalización intracelular. Otra posibilidad, que ha sido poco explorada, es que el tráfico celular del receptor, como la endocitosis o su localización apical, también podrían regularse a través de la interacción entre estas proteínas citosólicas.

En esta tesis se planteó como objetivo central analizar y caracterizar la función de los motivos citosólicos que presenta megalina en relación con su tráfico intracelular.

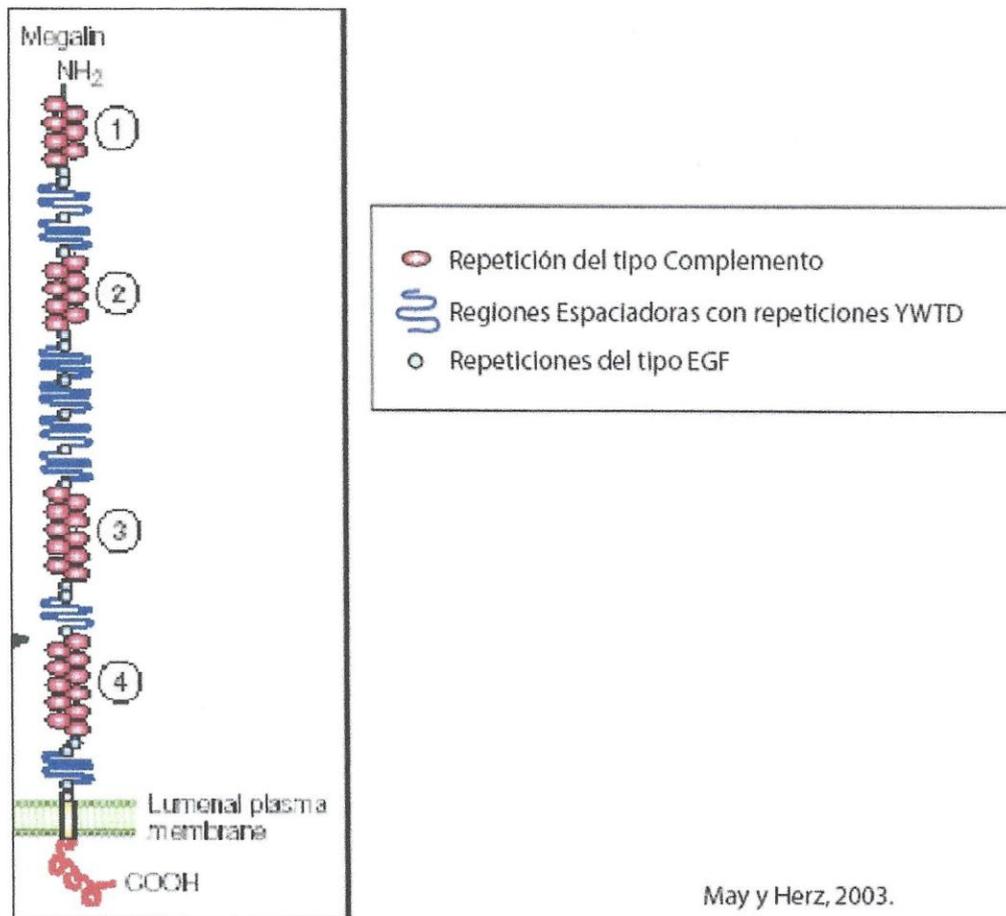


Figura 1. Esquema de la estructura de megalina. Este receptor, constituido por 4660 aminoácidos, presenta un gran dominio extracelular en el cual se destacan cuatro dominios de unión a ligandos. Éstos contienen motivos enriquecidos en residuos de cisteínas y están separados por repeticiones con homología al precursor de EGF y por repeticiones del tipo F/YWTD. Megalina contiene un dominio de transmembrana y un dominio intracelular formado por 209 aminoácidos.

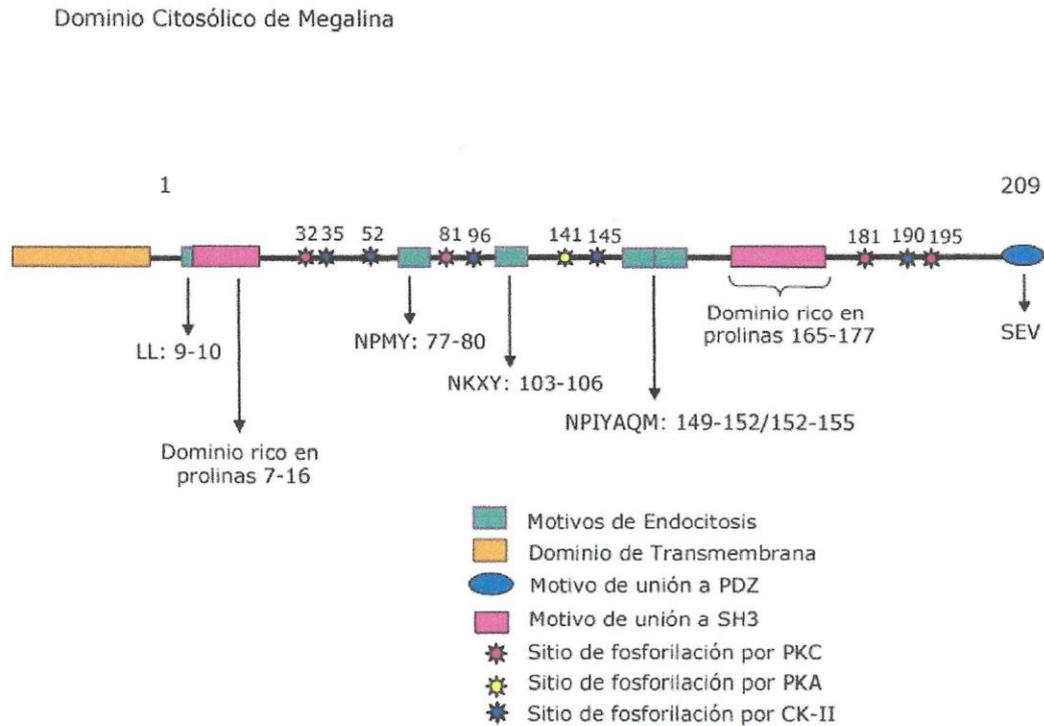


Figura 2. Representación esquemática del dominio citosólico de megalina. Este dominio está formado por 209 aminoácidos y contiene diversos motivos de endocitosis basados en tirosina y dileucina, sitios de consenso para fosforilación por proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA), caseína quinasa II (CK-II), regiones ricas en prolinas con homología a dominios de unión a SH3 y un motivo de interacción con dominios PDZ, presente en el extremo c-terminal de la región citoplasmática.

2. Fenotipo Epitelial Polarizado y Megalina

La capacidad de las células animales de generar y mantener una distribución polarizada de los componentes de su superficie celular es clave para su funcionalidad en arreglos multicelulares. Un ejemplo de ello son las células epiteliales polarizadas, las cuales forman barreras que separan compartimentos biológicos y regulan el transporte de iones y nutrientes entre estos compartimentos [26]. En la membrana plasmática de estas células se puede distinguir dos dominios funcional y bioquímicamente distintos: el dominio apical y basolateral. El dominio apical se encuentra en contacto con el lumen de los órganos y generalmente presenta especializaciones como microvellosidades que permiten una captación eficiente de componentes desde el medio extracelular. El dominio basolateral, en cambio, está en contacto con el tejido conectivo y con las células adyacentes. La función diferencial de ambos dominios se debe a que la composición proteica y lipídica de estos dos dominios es distinta [27]. La distribución asimétrica de proteínas y lípidos es el resultado de varios procesos que tienen lugar en células epiteliales: 1) Generación de complejos de unión, en particular uniones estrechas, que impiden la difusión de componentes proteicos y lipídicos [28]. 2) Mecanismos de segregación de proteínas en transportadores vesiculares distintos. Este proceso ocurre principalmente en el trans-Golgi (TGN) y también en endosomas [29]. 3) Mecanismos de retención diferencial de proteínas que podrían o no ser

transportadas polarizadamente en la ruta biosintética [30]. Este proyecto se enfocó hacia el estudio de los mecanismos de segregación y retención diferencial de proteínas que ocurren en células epiteliales polarizadas, utilizando a megalina como modelo de estudio.

Proceso de segregación de proteínas: Las proteínas de membrana y de secreción son sintetizadas en el retículo endoplásmico (ER) y luego transportadas a través del aparato de Golgi hasta el trans-Golgi (TGN). En el TGN, las proteínas son segregadas a vesículas distintas que se transportan hacia el dominio apical o basolateral de la célula [31]. La destinación de proteínas hacia el dominio basolateral está mediada por secuencias cortas de aminoácidos presentes en el dominio citoplasmático de estas proteínas. Muchas veces estas señales están basadas en residuos de tirosina y/o dileucinas, similares a los motivos involucrados en el la endocitosis de proteínas [32, 33, 34]. Debido a la similitud de las señales basolaterales con las señales de endocitosis se postula que proteínas adaptadoras, similares a las que participan en la endocitosis mediada por clatrina, podrían ser parte de la maquinaria involucrada en el proceso de segregación de proteínas hacia la membrana plasmática [35]. En este contexto, se ha sido descrito un nuevo tipo de proteína adaptadora AP1B, que contiene la subunidad $\mu 1b$, que interacciona *in vitro* con señales basadas en tirosinas [36]. La línea celular del epitelio del túbulo proximal renal, LLC-PK1, no posee esta proteína adaptadora y destina muchas proteínas con señales basadas en tirosinas al dominio apical en lugar del basolateral. Otros

estudios muestran que la segregación equivocada de receptores como LRP, el receptor de LDL y el de Transferrina (Tf), a la superficie apical en células LLC-PK1 puede ser corregida al expresar $\mu 1b$ en esta línea celular [36, 37].

Para la destinación de proteínas al dominio apical se han propuesto al menos tres tipos de señales diferentes: La primera consiste en la N y O-glicosilación del ectodominio de la proteína [38-40]. Sin embargo, hay casos que no apoyan esta proposición. Es el caso del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, cuya polaridad apical no cambia cuando se impide su glicosilación [41]. En segundo lugar, se han propuesto señales apicales de tipo peptídico presentes en el dominio de transmembrana y/o el citosólico de la proteína. El primero es el que media la destinación de las proteínas del virus influenza hemaglutinina (HA) al dominio apical [42] y el segundo ha sido encontrado en algunas proteínas politópicas [43-45]. Finalmente, el tercer tipo de señal descrito para la destinación de proteínas al dominio apical es la presencia de un tallo de glicosilfosfatidilinositol (GPI), a través del cual algunas proteínas se anclan a la membrana [46]. La maquinaria celular que interacciona con las señales apicales no está totalmente dilucidada. En este sentido, el mecanismo principal que se ha planteado es la incorporación de proteínas a través del tallo GPI a microdominios lipídicos enriquecidos en glicoesfingolípidos y colesterol. Estos microdominios están presentes en el TGN y reclutarían proteínas que van a ser segregadas al dominio apical. Algunas proteínas de transmembrana como la HA también pueden incorporarse a estos microdominios en el TGN y así ser

transportadas directamente a la superficie apical de células polarizadas [42]. Sin embargo, estudios recientes realizados en células MDCK muestran que algunas proteínas con tallo GPI son segregadas desde TGN junto con proteínas basolaterales y llegan primero a una zona lateral de la membrana plasmática para posteriormente ser endocitadas y transportadas a la superficie apical [47]. Estos estudios muestran que, a pesar de toda la información existente en este campo de estudio, el mecanismo mediante el cual se destinan las proteínas hasta los diferentes dominios celulares no está completamente claro. En este sentido es importante contar con nuevos modelos de estudio para aportar más información acerca de los motivos o señales de destinación y los distintos aspectos involucrados en su regulación. De esta forma, la familia de receptores de LDL, y en particular megalina, constituye un muy buen modelo para estudiar nuevos mecanismos de polaridad celular y los elementos involucrados en su regulación. Dentro de la familia de receptores de LDL-R, megalina presenta una mayor similitud en términos de su estructura y secuencia con el receptor LRP [2]. Sin embargo, la obtención de ratones *knock-out* para estas proteínas dejó en evidencia que estos receptores no cumplen papeles fisiológicos redundantes, lo cual puede deberse a la localización celular de estos receptores, ya que a diferencia de megalina que es apical, LRP reside en el dominio basolateral de la membrana plasmática [37]. Esta localización diferencial implica que ambos receptores están expuestos a diferentes ligandos y esto podría explicar en parte el por qué cumplen papeles

fisiológicos tan distintos. Es interesante destacar que precisamente en el dominio citosólico de estos receptores es donde se encuentra la mayor diferencia en sus secuencias y donde el receptor LRP contiene señales de segregación a dominio basolateral [37]. En cuanto a megalina, su dominio citosólico posee varios motivos interesantes que podrían determinar la localización celular del receptor. En esta región se destacan motivos basados en tirosina, sitios de fosforilación y motivos de interacción con dominios SH3 y PDZ (figura 2). En este trabajo planteamos que el dominio citosólico de megalina podría contener la señal de destinación apical, lo cual no se ha descrito para proteínas con un dominio de transmembrana.

Retención diferencial de Proteínas: Este es un proceso que, junto con el mecanismo de segregación, también contribuye a la distribución polarizada de proteínas en la membrana plasmática. En este caso, las proteínas son retenidas en forma selectiva en un dominio de la membrana plasmática mediante su interacción con proteínas del citoesqueleto y/o citosólicas. El citoesqueleto de actina se encuentra muy organizado debajo de la superficie apical de las células epiteliales, donde diversas proteínas como α -espectrina, ankirina [48] y proteínas de la familia de ERM (Ezrin-moesin-radixin) [49] se asocian para formar andamios multifuncionales que participan en el anclaje de proteínas de transmembrana y citosólicas. Muchas de estas proteínas presentan dominios denominados PDZ o SH3, que median la interacción entre proteínas. Existen varios ejemplos donde la asociación con el citoesqueleto juega un papel importante en la distribución

polarizada de proteínas. Este es el caso del canal de sodio sensible a amiloride, cuya asociación con α -espectrina a través del dominio SH3 le confiere localización apical [44]. Por otro lado, el intercambiador de Na^+/H^+ (isoforma 3) y la proteína CFTR (regulador de la conductancia de transmembrana de fibrosis quística) interactúan con el dominio PDZ de la proteína NHERF y esta interacción juega un papel importante en la distribución apical de estas proteínas [50, 51].

En el dominio citoplasmático de megalina existen algunos motivos que podrían participar en la interacción de este receptor con proteínas del citoesqueleto. Megalina presenta un motivo rico en prolinas **ATPPPSP** que presenta homología con el dominio de unión a SH3 presente en el canal de sodio sensible a amiloride, y otro motivo **SEV**, que constituye un potencial motivo de unión a dominios PDZ (figura 2). Estos motivos, podrían estar involucrados en interacciones con proteínas del citoesqueleto (α -espectrina, ankirina, NHERF) y de esta manera participar en la localización apical de megalina a través de un mecanismo de retención selectiva. Esta hipótesis se apoya en otros datos que indican que la isoforma 3 del intercambiador Na^+/H^+ , (NHE3) que interacciona con el citoesqueleto de actina, es capaz de interactuar de manera específica con megalina [52]. Esto sugiere que es posible que este receptor interactúe con el citoesqueleto de actina, lo que podría estar involucrado en la localización apical de este receptor y/o con otros aspectos de su tráfico intracelular, como la endocitosis. En esta de tesis se analizó la interacción de megalina con el citoesqueleto de actina y se

realizaron estudios para determinar la importancia del motivo rico en prolinas y el motivo SEV tanto en la interacción con el citoesqueleto como en el tráfico del receptor.

3. Asociación de Proteínas a Microdominios Lipídicos

Los balsas lipídicas son microdominios enriquecidos en colesterol y glicosfingolípidos que están presentes en las membranas celulares [53] y se caracterizan bioquímicamente por su baja densidad e insolubilidad en detergentes no iónicos a 4° C [54]. En estos microdominios lipídicos se encuentran asociadas proteínas con tallo GPI como la fosfatasa alcalina [55], proteínas con grupos acilos como tirosina quinasas de la familia Src [56] y algunas proteínas de transmembrana como la hemaglutinina [57]. Los microdominios lipídicos son más abundantes en la membrana plasmática, pero también se encuentran en organelos de la ruta biosintética, como el TGN, donde reclutarían algunas proteínas que van a ser segregadas la superficie apical de células polarizadas. En los microdominios lipídicos de la membrana plasmática se encuentran concentradas proteínas involucradas en eventos de transducción de señales como H-Ras, Integrinas, el receptor de EGF, entre otras [58]. También se asocian receptores que se endocitan a través de estos microdominios lipídicos, tales como los receptores para las toxinas del cólera y del ántrax [59] y el receptor 2 de interleuquinas [60-62]. En este caso, la internalización de los receptores es independiente de clatrina y es afectada por drogas que secuestran colesterol y que alteran la

estabilidad de estos microdominios lipídicos. Por otro lado, algunos receptores, como el de TGF β son endocitados mediante dos rutas: una mediada por clatrina, la cual está implicada en la señalización celular del receptor, y otra mediada por balsas lipídicas, que estimula la vía degradativa de éste [63]. Estos antecedentes muestran que la asociación de proteínas a balsas lipídicas puede modular diferentes aspectos del tráfico celular. Dado que una fracción de megalina se encuentra asociada a estos microdominios lipídicos, [37] en este trabajo se caracterizó esta asociación y se analizó como podría estar regulando el tráfico endocítico del receptor.

4. *Proceso de Endocitosis Mediado por Receptor y Megalina:*

Muchas ligandos o macromoléculas entran a la célula a través de un mecanismo de endocitosis mediado por clatrina. En este proceso, los ligandos son reconocidos por su receptor e internalizados previa aglomeración en foveolas cubiertas por clatrina [64]. En esta etapa ocurre el reconocimiento de señales de endocitosis que están presentes en el dominio citosólico de los receptores. Estas señales tipo NPxY, Yxx ϕ y LL son reconocidas por el complejo de proteínas adaptadoras, AP2, que media la interacción con clatrina, proteína que forma la cubierta de las vesículas endocíticas. Recientemente, se han descrito proteínas adaptadoras alternativas como Dab2 y ARH que interaccionan con motivos NPxY de la familia de receptores del LDL-R y que se postula podrían regular la endocitosis de estos receptores [65]. En este mismo punto, se ha mostrado

que el receptor de LDL se internaliza eficientemente en ausencia de componentes del complejo AP2, sugiriendo que otras proteínas adaptadoras como las antes mencionadas podrían reemplazar o suplir la función de AP2 [66].

Una vez internalizado el complejo receptor con un ligando, el pH ácido del endosoma induce la disociación del complejo y los ligandos generalmente son degradados en lisosomas y los receptores son reciclados hasta la superficie para cumplir con otra etapa de endocitosis [67]. Este es el caso de megalina que, como los otros receptores de esta familia, se endocita en forma constitutiva y luego recicla hasta la superficie celular. Megalina presenta 5 motivos de endocitosis putativos en su dominio citoplasmático (figura 2) y en este trabajo se estudió el papel de estos motivos en la internalización del receptor desde la superficie celular.

La fosforilación constituye un mecanismo frecuentemente usado para regular el tráfico de receptores [68-70]. Esto también se ha descrito para LRP, otro miembro de la familia de LDL-R, donde la fosforilación por PKA del dominio citosólico es importante para su endocitosis [71]. El dominio citoplasmático de megalina se fosforila fuertemente. Sin embargo, aún no se han descrito los aminoácidos de esta región del receptor que son fosforilados, ni tampoco la(s) quinasa(s) involucradas. Uno de los objetivos centrales de esta tesis fue determinar el o los sitios de fosforilación del

dominio citosólico de megalina y cual es su función en el tráfico intracelular del receptor, específicamente en la internalización.

5. *Transcitosis y Megalina*

La transcitosis consiste en el transporte de algunas proteínas mediante componentes vesiculares hasta la superficie celular opuesta. Este es un mecanismo usado por organismos multicelulares para transportar macromoléculas entre dos ambientes distintos sin alterar la composición de de estos ambientes [72]. La vía de transcitosis mejor estudiada corresponde a la del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR), el cual transporta IgA desde el dominio basolateral de células epiteliales hacia el dominio apical [73]. El tráfico intracelular del pIgR está bastante caracterizado y es regulado por señales presentes en el dominio citosólico del receptor donde, además, la fosforilación de un residuo de serina localizado en el dominio citoplasmático es requerida para una transcitosis eficiente del receptor desde el dominio basolateral al apical [74]. En relación a la regulación de la transcitosis de receptores, desde la membrana apical a la superficie basolateral, la información existente es más escasa. En este sentido, megalina representa un modelo muy atrayente para estudiar puesto que se ha descrito que algunos de los ligandos endocitados por el receptor como RBP (retinol binding protein) [75] y tiroglobulina [76] no son degradados sino que son transportados desde el lado apical al dominio basolateral mediante transcitosis. El mecanismo mediante el cual megalina media la

degradación de algunos ligandos y la transcitosis de otros aún no se conoce y podría estar regulado por señales presentes en el dominio citoplasmático de megalina, lo cual hace aún más interesante el estudio de estas señales.

Dado que el gran tamaño de megalina dificulta su manipulación a nivel del cDNA para hacer mutaciones o deleciones como también para hacer transfecciones, los estudios de los motivos involucrados en el tráfico de megalina se realizaron utilizando minireceptores formados por el cuarto dominio de unión a ligandos y dominio de transmembrana del LRP (otro miembro de familia LDL-R) y el dominio citosólico de megalina (figura 3). Estos minireceptores presentan un comportamiento similar a la proteína endógena en términos de la vida media y localización polarizada [37].

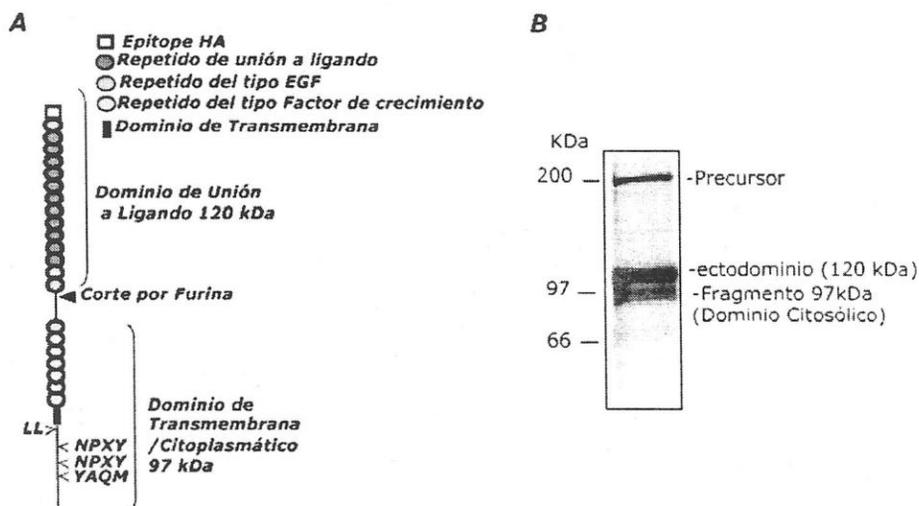


Figura 3. A) Esquema del minireceptor mLRP4lrptmMegT utilizado en el trabajo. Esta proteína presenta un epítoto HA en su extremo amino-terminal, el cuarto dominio de unión a ligandos del LRP, el cual contiene un sitio de corte por furina, el dominio de transmembrana del LRP y el dominio citoplasmático de megalina. B) Estudio de la expresión del minireceptor en células CHO por marcación metabólica e inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-HA. Se observan 2 formas de la proteína: un producto de mayor peso molecular (220 kDa), correspondiente a la forma no procesada y 2 productos de menor peso molecular generados por el corte con furina que ocurre en el Golgi. Estos 2 productos corresponden al ectodominio (120 kDa) y a una parte del ectodominio, el dominio de transmembrana y dominio citosólico (97 kDa).

El dominio citoplasmático de megalina presenta varias características interesantes. En primer lugar, es fuertemente fosforilado *in vivo* y presenta potenciales señales de endocitosis mediado por clatrina y motivos de interacción con proteínas, los cuales no están presentes en los otros miembros de la familia LDL-R. En segundo lugar, interacciona con diversas proteínas citosólicas que participan en procesos de transducción de señales y otras que constituyen componentes de la maquinaria endocítica o del citoesqueleto de actina. Sobre la base de estos antecedentes, se formuló la siguiente hipótesis:

6. Hipótesis de Trabajo

El dominio citosólico de megalina regula el tráfico intracelular de este receptor, su localización apical, su endocitosis, la interacción con proteínas reguladoras y procesos de señalización intracelular.

7. Objetivo General

Caracterización funcional de motivos citoplasmáticos de megalina en relación con su tráfico intracelular incluyendo endocitosis y destinación polarizada.

8. Objetivos Específicos

1. Estudiar los mecanismos moleculares y celulares que participan en la localización apical de megalina.

1.1 Analizar la asociación de megalina con microdominios lipídicos ricos en colesterol y glicoesfingolípidos.

1.2 Analizar si megalina interacciona con el citoesqueleto y los dominios del receptor involucrados en esta posible interacción. En particular se estudiará la participación de 2 secuencias ricas en prolina y el motivo SEV (motivo de unión a dominios PDZ) presentes en el extremo citosólico C-terminal de la proteína.

1.3 Determinar si el dominio citosólico de megalina contiene información de destinación a la superficie apical.

2. Estudiar la fosforilación de megalina, los sitios y posibles quinasas involucradas.

3. Caracterizar la ruta endocítica de megalina y su regulación.

3.1 Analizar la contribución de los potenciales motivos de endocitosis de megalina en la ruta endocítica del receptor.

3.2 Analizar el papel de la asociación de megalina a microdominios lipídicos y al citoesqueleto, así como el papel de la fosforilación del dominio citosólico en su endocitosis.

II. MATERIALES Y METODOS

1. **Materiales**

1.1. Material Biológico

1.1.1 Bacterias

Se usaron las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

DH5 α : sup E44 Δ lac U169f80(lacZ Δ M15)hds R17 rec A1 end A1 gyr A 96 thi-1 rel A1.

X1Blue: sup E44 hds R17 rec A1 end A1 gyr A 46 thi-1 rel lac-.

1.1.2 Plasmidios:

Se utilizaron los siguientes vectores de expresión eucarionte:

pcDNA3: Invitrogen Corp., San Diego, USA.

pEGFP-N1: Clontech laboratories, INC., Palo Alto, CA, USA

pmLRP4lrptmMegT: Fue obtenido a partir del plasmidio pmLRP4T100 generado previamente [77], en el cual se encuentra clonado el cuarto dominio de unión a ligandos del LRP, el dominio de transmembrana y dominio citosólico de LRP. La región citoplasmática de megalina obtenido por PCR desde una genoteca de riñón humano (BD Biosciences Clontech, Palo

Alto, CA, USA) fue clonado entre los sitios XhoI y XbaI de pLRP4T100 para reemplazar el dominio citosólico del LRP (figura 4).

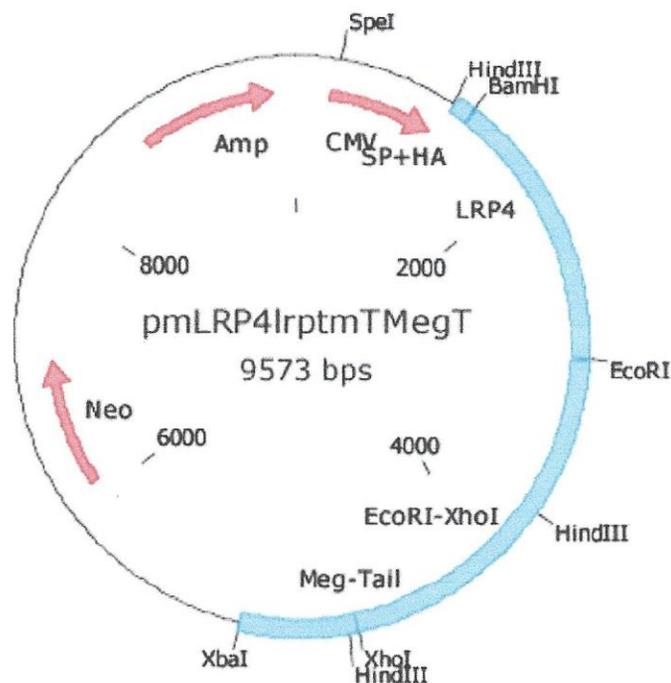


Figura 4. Vector de expresión pcDNA3 usado para generar las construcciones del minireceptor de megalina y expresarlas en células animales. Este vector contiene el promotor de citomegalovirus (CMV), seguido por un péptido señal (SP) y un epítipo HA. La construcción del minireceptor LRP4lrptmMegT se realizó clonando entre los sitios de restricción BamHI y XhoI, el cDNA que codifica para el dominio extracelular y dominio de membrana del LRP. El dominio citosólico de megalina fue clonado entre los sitios XhoI y XbaI. Las modificaciones del dominio citoplasmático de megalina, que incluyen deleciones y mutaciones sitio dirigidas, fueron generadas a partir de este cDNA del minireceptor clonado en pcDNA3.

1.1.3 Líneas Celulares:

A) Líneas no polarizadas:

BN: Línea celular derivada de saco vitelino de rata obsequiada por el Dr. Scott Argraves (Department of Cell Biology and Anatomy, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina, USA).

CHO^{lrp}: Línea celular de ovario de hámster que no expresa LRP y fue dada por el Dr. Guojun Bu (Department of Pediatrics and Cell Biology and Physiology, Washington University School of Medicine and St Louis Children's Hospital, St Louis Missouri, USA).

B) Líneas Polarizadas:

MDCK: tipo II (baja resistencia) es una línea celular epitelial derivada de riñón de perro y fue obsequiada por el Dr. Enrique Rodríguez Boulan (Dyson Vision Research Institute, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY, USA).

LLC-PK1: Línea celular epitelial derivada de riñón de cerdo, obtenida del Dr Carlos Vio (Centro de Investigación Médica de la Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile).

1.1.4 Anticuerpos

A) Anticuerpos primarios:

Anticuerpo anti HA: reconoce el epítoto HA presente en todas las quimeras generadas en el laboratorio. Se obtuvo de un sobrenadante de Hibridoma Babco (12CA5) y fue obsequiado por el Dr. Guojun Bu.

Anticuerpo anti Megalina: un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce el dominio citoplasmático de megalina y fue generado en el laboratorio en colaboración con el grupo de Dr. Guojun Bu.

Anticuerpo anti caveolina-1: policlonal de conejo obtenido de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA).

Anticuerpo anti actina: monoclonal de ratón obtenido de Sigma (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA).

Anticuerpo anti E-caderina: monoclonal de rata obtenido de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

B) Anticuerpos Secundarios:

Anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 obtenido de Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ, USA).

Anti-IgG de conejo conjugado con Cy3 obtenido de Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ, USA).

Anti-IgG de ratón y de conejo conjugado con peroxidasa de rábano obtenido de Chemicon International (Temecula, CA, USA).

Anti-IgG de rata conjugado con Alexa Fluor 488 y conjugado con FITC obtenidos de Chemicon International (Temecula, CA, USA).

1.2. Medios de Cultivo:

DMEM: Life Technologies, Inc (Rockville, MI, USA)

MEM: Life Technologies, Inc (Rockville, MI, USA)

F12 Ham: Life Technologies, Inc (Rockville, MI, USA)

Suero fetal: Life Technologies, Inc (Rockville, MI, USA)

Penicilina/streptomycin: Life Technologies, Inc (Rockville, MI, USA)

Geneticina (G418): Life Technologies, Inc (Rockville, MI, USA)

Aminoácidos no esenciales: Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

1.3. Enzimas

Enzimas de Restricción: Se obtuvieron de FermentasTM (Vilnius, Lithuania), de PromegaTM, (Madison, WI, USA) y Life TechnologiesTM, (Rockville, MI, USA).

RNAasa A y T4 DNA Ligasa: Se obtuvo de FermentasTM (Vilnius, Lithuania) y de Life TechnologiesTM, (Rockville, MI, USA), respectivamente.

Polimerasas: Taq DNA polimerasa, *Pfu* DNA polimerasa se obtuvieron de FermentasTM (Vilnius, Lithuania) y de PromegaTM (Madison, WI, USA), respectivamente.

1.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para los clonamientos y secuenciación de los productos de DNA generados se sintetizaron en:

BIOSOURCE International (Camarillo, CA; USA) a través de Biosonda S.A. Biotecnología Santiago, Chile y también a través de Gene Link (Hawthorne, NY, USA).

IDT: St Louis, MO USA.

1.4.1 Secuencias de oligonucleótidos

A) Amplificación de la proteína fluorescente verde (GFP):

5GFP: 5' GATCGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT 3'
BamHI

3GFP: 5' GATCCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCCT 3'
XhoI

B) Partidor con secuencia del dominio de transmembrana del LRP:

XhoI
3LRPTMNONSTOP: 5'GATCCTCGAGATACCAGAATACCACTCCGGCCACCA
GAACCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGAGGGATTAGGAT
GGAGGCTATATGCTTGTACAGCTCGTCCATGCC 3'

C) Partidores para amplificar el cDNA del dominio citosólico de la proteína hemaglutinina:

5 HATail: 5' GATCCTCGAGTGTTCTAATGGATCTTTG 3'
XhoI

3 HATail: 5' GATCTCTAGATCAGATGCATATTCTGCACTG 3'
XbaI

D) Amplificación del dominio citosólico de megalina:

5MegT: 5' GATCCTCGAGCACTATAGAAGGACCGGCTCCCTT 3'
XhoI

3MegT: 5' GATCTCTAGACTATACTTCAGAGTCTTCTTTAACA 3'
XbaI

E) Eliminación del motivo PDZ:

3PDZ: 5' GATCTCTAGACTAGTCTTCTTTAACAAGATTTGCGGTGTC 3'
XbaI

F) Eliminación del motivo rico en Prolinas (Distal)

ProInterno1: 5' AGGAGGCTTAGGCTTAGCCGCAGCAACACTTTCCTT 3'

ProInterno2: 5' AAGGAAAGTGTTGCTGGCTAAGCCTAAGCCTCCT 3'

G) Mutagénesis Sitio Dirigida: se destacan las bases que se modificaron para generar un cambio del aminoácido en cuestión por alanina.

TABLA 1. PARTIDORES PARA OBTENER MUTANTES DE ENDOCITOSIS:

Sitio mutado	Secuencia
L8A	5' AGGACCGGCTCC GC TTTTGCCTGCTCTGCCCAA 3' 5' TTGGGCAGAGCAGGCAAAG CGG GAGCCGGTCCT 3'
Y80A	5' GAAAACCCAATG GC CTCAGCCAGAGACAGTGCT 3' 5' AGCACTGTCTCTGGCTGAG GCC ATTGGGTTTTTC 3'
Y106A	5' GTGGATAATAAGAAT GC TGGAAGTCCCATA 3' 5' TATGGGACTTCCAG GC ATTCTTATTATCCAC 3'
N149A	5' ACCAACTTTGAAG GC TCCAATCTATGCACAGATGGAG 3' 5' CTCCATCTGTGCATAGATTGGAG GC TTCAAAGAAGGT 3'
Y152A	5' TTTGAAAATCCAATCGCTGCACAGATGGAGAACGAGCAA 3' 5' TTGCTCGTTCTCCATCTGTGCAGCGATTGGATTTTCAA 3'
M155A	5' CCAATCTATGCACAGGCGGAGAACGAGCAAAA 3' 5' CTTTTGCTCGTTCTCCGCCTGTGCATAGATTGG 3'

TABLA 2. PARTIDORES PARA OBTENER MUTANTES DE FOSFORILACIÓN:

Sitio mutado	Secuencia
T32A	5' GAAAATGGGAATGGGGTGG GC CTTCAGATCAGGGG 3' 5' CCCCTGATCTGAAGG CC ACCCCATTCCTTTTC 3'
S81A	5' GAAAACCCAATGTAC GC AGCCAGAGACAGT 3' 5' CACTGTCTCTGGCTG CG TACATTGGGTTTTTC 3'
S141A	5' CTCTTCAAACGAAA AG CTAAACAACTACCAAC 3' 5' GTTGGTAGTTTGTTTAG CT TTTTCGTTTGAAGAG 3'
S170A	5' GACACCACCTCC AG CACCTTCGCTCC 3' 5' GGAGCGAAGGTG CT GGAGGTGGTGTC 3'
S181A	5' CCCTGCTAAGCCTAAGCCGCCT GC GAGAAGAGACCCAACTC 3' 5' GAGTTGGGTCTCTTCTCG CA GGCGGCTTAGGCTTAGCAGGG 3'
S190A	5' GAGACCCAACTCCAACATAT G CTGCAACAGAAGACAC 3' 5' GTGTCTTCTGTTGCAG CA TATGTTGGAGTTGGGTCTC 3'
S195A	5' CCTATTCTGCAACAGAAGATG C ATTTAAAGACACCGCAAATC 3' 5' GATTTGCGGTGTCTTTAAAT GC ATCTTCTGTTGCAGAATAGG 3'
S190/195 ^a	5'CCA ACT CCAACATAT G CTGCAACAGAAGAC GC TTTTAAAGACAC CGC 3' 5'GCGGTGTCTTTAA AG CGTCTTCTGTTGCAG CA TATGTTGGAGT TGG 3'

H) Obtención de formas truncadas del dominio citosólico de megalina: en cada partidor se encuentra destacado el codón de término y subrayado el sitio de corte para la enzima de restricción XbaI.

TABLA 3. PARTIDORES PARA CONSTRUIR FORMAS TRUNCADAS DEL DOMINIO CITOSÓLICO DE MEGALINA:

Construcción	Secuencia
MegT30	5' GATCTCTAGACTA ACC CATTCCCATTTTCAGAGGGCTT 3'
MegT60	5' GATCTCTAGACTA CA TTCATTGCCATTGACCTGTCAAT 3'
MegT90	5' GATCTCTAGACTA AA CCACTTTGACAGCACTGTCTC 3'
MegT120	5' GATCTCTAGACTA AG TTTGTCTCTGGA ACT ATCTCAGA 3'
MegT150	5' GATCTCTAGACTA T GGATTTTCAAAGTTGGTAGTTTGT 3'
MegT180	5' GATCTCTAGACTA AGG AGGCTTAGGCTTAGCAGGGA 3'

1.5. Marcadores de Peso Molecular

Para geles de DNA se utilizaron como marcadores DNA ladder de 100pb, 50pb, 1kb DNA plus y fago λ digerido con Hind III, todos obtenidos de Life Technologies (Gaithersburg, USA).

Para geles de proteínas se usaron marcadores de PM preteñidos con rangos entre 26-200 kDa, obtenidos de Promega (Madison WI, USA) y de BioRad (Hercules CA, USA).

1.6. Reactivos

De Amersham, Life Sciences (Buckinghamshire, UK) se obtuvo estreptavidina sefarosa, las placas Hyperfilm y los reactivos de revelado para blotting ECL.

De Costar Corp. (Cambridge MA, USA) se obtuvo los filtros Transwell de policarbonato de 0.4 mm de tamaño de poro y 24 mm de diámetro y los filtros transparentes de 0.4 mm de tamaño de poro y 6.5 mm de diámetro.

De Difco Lab. (Detroit, Michigan, USA) se obtuvo agar-agar, triptona y extracto de levadura.

De Eastman Kodak Comp. (Rochester, USA) se obtuvo la película autorradiográfica X-Omat.

De Invitrogen™, se obtuvo Lipofectamina 2000.

De Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvo sacarosa y los solventes de grado analítico, acetona, etanol, metanol, alcohol isoamílico (IAA), isopropanol, ácido acético glacial, HCl, DMSO, glicerol, glicina, POP, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaCl, MgSO₄·7H₂O, Na₂CO₃, K₂HPO₄ y KH₂PO₄.

De NEN Life Science Products (Boston, USA) se obtuvo [³⁵S]-metionina/cisterna, [³²P]-Ortofosfato y [¹²⁵I]-yodo].

De Omega Bio Tek™ (Doraville, GA USA) se obtuvo el kit E.Z.N.A para purificar DNA.

De Pierce (Rockford, IL, USA) se obtuvo sulfo-NHS-biotina

De Serva (Heidelberg, Alemania) se obtuvo Lubrol.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) se obtuvo: Nistatina, metil- β -ciclodextrina, butirato de sodio, tunicamicina, seroalbúmina de bovino (BSA) grado RIA y libre de proteasas, proteína A-Sefarosa, ampicilina, kanamicina, antipain, leupeptin pepstatina, PMSF, Hepes, EGTA, EDTA, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$, KCl, $NaHCO_3$, BrEt, NH_4Cl , trizma base, SDS, DTT, TEMED, persulfato de amonio, Triton X-100, Tween 20, azul de Tripán, Tripsina, L-metionina, L-cisteína, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol (β -ME), glucosa, aminoácidos no esenciales, agarosa, acrilamida y bis-acrilamida grado biología molecular, Nistatina; Latrunculina B.

De Sudelab (Santiago, Chile), se obtuvo etanol, metanol y ácido acético para soluciones de fijación, tinción y lavado de geles.

El material de cultivo de células eucarióticas se obtuvo de Falcon (Millville, NJ, USA) y Orange Cientific (Braine-l'Alleud, Bélgica).

Para visualizar y fotografiar geles de DNA se utilizó el equipo gel Doc 2000 de BioRad.

2. Métodos

2.1. Técnicas de Biología Molecular

2.1.1 Clonamientos

Construcción de quimeras entre megalina y la proteína fluorescente verde:

a) GFPMegTMT: Se amplificó mediante PCR el cDNA de la proteína fluorescente verde (GFP) clonada en el vector pEGFP-N1 (Clontech™), usando partidores específicos para GFP con un sitio de corte para la enzima de restricción BamHI y para XhoI en el partidor 5' y 3' respectivamente. El producto de PCR se subclonó en el plasmidio mLRPMegTMT (contiene el cuarto dominio extracelular de LRP, el dominio de transmembrana y citosólico de megalina) cortado previamente con BamHI y XhoI para eliminar el ectodominio del minireceptor. Se obtuvo un producto final con el cDNA de GFP entre el epítotope HA del vector y la secuencia del dominio de transmembrana y citosólico de megalina.

b) GFP4lrptmMegT: Se generó un producto de PCR que contenía el cDNA para GFP fusionado a la secuencia para el dominio de transmembrana de LRP, usando un partidor 3' que contenía la secuencia completa del dominio de transmembrana de LRP. Este producto fue insertado en el plasmidio mLRP4lrptmMegT, cortado previamente con BamHI y XhoI, para

eliminar la secuencia que codificaba para el ectodominio y dominio de transmembrana del minireceptor.

Construcción del Reportador Neutro:

A partir del plasmidio que contenía el DNA de la proteína hemaglutinina (suministrado por Dr. Alfonso González) se amplificó mediante PCR, la secuencia de 39 pb correspondiente al dominio citosólico de la proteína hemaglutinina (HA). La secuencia del dominio citosólico de megalina del plasmidio GFPIrptmMegT, generado previamente en el laboratorio, fue reemplazada por la del dominio cDNA del dominio citosólico de HA, entre los sitios de restricción XhoI y XbaI.

2.1.2 Eliminación de secuencias presentes en el dominio citosólico de megalina

Eliminación del motivo rico en prolinas

Se eliminaron los aminoácidos 166-174: Se realizó la deleción mediante PCR utilizando partidores internos complementarios que excluyeran la región que se quería eliminar. El producto de PCR final se subclonó en el plasmidio mLRP4lrptmMegT (contiene el cuarto dominio extracelular de LRP, el dominio de transmembrana de LRP y el dominio citosólico de megalina), entre los sitios XhoI y XbaI, reemplazando el dominio citosólico original.

Eliminación del motivo de unión a dominios PDZ

Este motivo corresponde a los 3 últimos aminoácidos del dominio citoplasmático de megalina (**SEV**). Estos se eliminaron mediante PCR, donde se amplificó el cDNA para el dominio citoplasmático de megalina con partidores para el extremo 5' de esta secuencia y un partididor 3' donde se eliminaron los codones para los tres últimos aminoácidos. El producto de PCR final se subclonó en el plasmidio mLRP4lrptmMegT de la misma forma que la cola sin el motivo rico en prolinas.

Obtención de formas truncadas del dominio citosólico de megalina

Los cDNAs fueron amplificados por PCR utilizando partidores específicos para el extremo 5' la secuencia del dominio citosólico de megalina y diferentes partidores para el extremo 3', acortando este dominio en 90 pares de bases cada vez. Los productos de PCR fueron subclonados en el plasmidio mLRP4lrptmMegT, previamente cortado con XhoI y XbaI para eliminar la secuencia del dominio citoplasmático del minireceptor y reemplazarla por las secuencias de los dominios citosólicos truncados.

2.1.3 Mutagénesis sitio dirigida

Se diseñaron partidores que incluían mutaciones de las bases deseadas (ver tablas 1 y 2) y se utilizó el Kit "QuikChange™" de Stratagene (La Jolla, CA USA), siguiendo las indicaciones del proveedor.

2.1.4 Obtención de bacterias competentes

Estas fueron preparadas a partir de cepas de *E. coli* DH5 α mediante el método de CaCl₂. Las bacterias fueron crecidas en 40 ml de medio LB (Luria Broth: NaCl 1,0%, peptona al 1,0% y extracto de levadura al 0,5%) hasta alcanzar la fase logarítmica, detectada mediante la absorbancia a 600 nm. Las células se centrifugaron a 5500 rpm (rotor SS-34 Sorvall) por 5 min y el pellet obtenido fue resuspendido en 3 ml de una solución de CaCl₂ 75 mM durante 30 min. a 4° C. Las células fueron centrifugadas nuevamente a 2500 rpm por 5 min., resuspendidas en 2 ml de CaCl₂ 75 mM con glicerol al 15 %, alicuotadas y guardadas a -80° C para su uso posterior.

2.1.5 Transformación de bacterias

Las bacterias competentes fueron incubadas en hielo con 100 a 500 ng de DNA plasmidial por 30 min. La mezcla se sometió a un choque térmico por 2 min a 42° C y se resuspendió en 450 μ l de medio LB. Las bacterias se recuperaron con agitación suave a 37° C, se sembraron en placas de LB-agar al 1,5% en presencia de ampicilina 100 μ g/ml y se crecieron a 37° C por toda la noche.

2.1.6 Obtención del DNA plasmidial

Para la purificación de los diferentes plasmidios se utilizaron dos métodos:

Preparación en gran escala de DNA (Maxipreparation)

Se siguió el protocolo previamente descrito [78]. Las bacterias transformadas con el DNA plasmidial fueron crecidas en 250 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina durante 16 h con agitación constante. Luego, se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación a 5000 rpm (Sorval, Rotor GSA) por 15 min a 4° C y se resuspendieron en 10 ml de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, pH 8,0). Después de lisar las bacterias en 20 ml de solución II (NaOH 0,2 N, SDS al 1,0 %), se agregaron 15 ml de solución III (Acetato de Potasio 3 M, Ácido acético 0,7 M) y se incubó la mezcla en hielo por 5 min. El precipitado se centrifugó a 5000 rpm (Sorvall, Rotor GSA) por 10 min. y se recolectó el sobrenadante, desde donde se precipitaron los ácidos nucleicos con 0,6 volúmenes de isopropanol. Los ácidos nucleicos se separaron del sobrenadante mediante centrifugación a 5000 rpm (Sorvall, Rotor GSA) por 10 min. a 4° C y se resuspendieron en 3 ml de TE con LiCl 5 M para precipitar selectivamente el RNA. El RNA fue separado de la muestra mediante centrifugación, según ya descrito y se recolectó el sobrenadante y el DNA fue precipitado con 1 volumen de isopropanol, centrifugado a 7700 rpm (Sorvall, Rotor GSA) por 10 min a 4° C y resuspendido en 500 μ l de agua libre de nucleasas. La muestra con DNA fue tratada con RNAasa para eliminar restos de RNA y precipitada nuevamente con 500 μ l de una solución de PEG al 13 % con NaCl 1,6 M, centrifugada a 12.000 rpm y resuspendida en 400 μ l de TE. Las proteínas de la muestra fueron eliminadas mediante extracciones sucesivas

con fenol saturado con Tris pH 8,0 y una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (proporción 50:49:1). Finalmente la muestra de DNA fue resuspendida en 200 μ l de agua libre de nucleasas.

Minipreparación en pequeña escala de DNA (minipreparation)

Se utilizó el kit E.Z.N.A de Omega BioTek™ según las indicaciones del producto.

Cuantificación del DNA plasmidial

Se cuantificó mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm y usando la siguiente equivalencia: $\text{Concentración}_{\text{DNA}} = A_{260}/0.020$. La calidad del DNA se evaluó calculando la razón entre la absorbancia medida a 280 nm y la obtenida a 260 nm.

Análisis del DNA plasmidial

El análisis del DNA se realizó mediante digestión con enzimas de restricción, donde 250 ng de DNA plasmidial se incubaron con 0,5-1 U de cada enzima de restricción y en presencia del buffer correspondiente para cada enzima. Cada reacción fue incubada al menos 2 h a 37° C y los productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,0%.

2.2. Técnicas de Biología Celular

2.2.1 Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares BN, CHO, LLC-PK1 y MDCK se incubaron en 5 % CO₂ y 37° C. Las células BN (saco vitelino de rata) se cultivaron en medio MEM suplementado con aminoácidos esenciales, 10 % de suero fetal. Las células CHO se crecieron en medio F12-Ham con 10% de suero fetal. Las LLC-PK1 y MDCK se cultivaron en medio DMEM con 7.5 % suero fetal. Todos los medios fueron suplementados con penicilina/estreptomicina y con G418, sólo para las líneas celulares transfectadas establemente.

2.2.2 Transfección de células

Las distintas líneas celulares se transfectaron utilizando 30µg de DNA plasmidial (con los distintos cDNAs de megalina clonados en los minireceptores), mediante el método de fosfato de calcio descrito previamente [4] o con 1 a 2 µg de DNA con Lipofectamina plus o 2000 (GIBCO, BRL) como se describe en el protocolo del producto. Se seleccionaron transfectantes estables por su resistencia al antibiótico G418. La expresión de las proteínas de interés se siguió por Western blot, citometría de flujo y/o inmunoprecipitación de células marcadas metabólicamente con ³⁵S Metionina/Cisteína.

2.2.3 Western Blot

Las líneas celulares fueron lisadas en buffer de lisis: Buffer fosfato salino (NaCl 150 mM, Fosfato PBS) con Tritón X-100 1% e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Leupetin 50 μ M, Pepstatin 1 μ M y antipain 1 μ M) a 4° C por 1h. Las proteínas de los lisados celulares fueron sometidas a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y posteriormente transferidas a una membrana de "polyvinylidene difluoride (PVDF)". Las membranas fueron incubadas con un primer anticuerpo anti-HA para detectar las proteínas quiméricas que contienen el dominio citoplasmático de megalina o con un anticuerpo anti-dominio citosólico de megalina para detectar megalina endógena. Los anticuerpos fueron incubados en buffer PBS con 3% de leche y Tween-20 al 0.05% para el anticuerpo anti-HA o al 0.1% para el anticuerpo anti-megalina. Después de lavar 3 veces por 10 min., las membranas fueron incubadas con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano anti ratón o conejo dependiendo del primer anticuerpo usado. Las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas usando un sistema de quimioluminiscencia de ECL™ o con soluciones preparadas en el laboratorio: Ácido p-comárico 26.5 mM, luminol 160 mM en Tris 100 mM pH 8,0 y 5% de H₂O₂.

2.2.4 Determinación de la distribución polarizada de megalina y minireceptores

Biotinilación selectiva de proteínas

Las células epiteliales que expresan los diferentes construcciones se cultivaron a confluencia en filtros de policarbonato en cámaras Transwell, según la técnica descrita por Marmorstein y cols., 1998 [79]. La confluencia de las células fue seguida midiendo la resistencia transepitelial. Las células se biotinilaron de manera selectiva por el lado apical o basolateral, incubándolas con 0,5 mg/ml de biotina a 4° C. Luego, se lisaron las células con buffer de lisis (PBS, TX-100 1% con inhibidores de proteasas) y las proteínas biotiniladas se precipitaron usando streptavidina-agarosa. Las proteínas unidas a la resina se analizaron mediante inmunoblot. Se usó el anticuerpo anti-HA para detectar minireceptores o un anticuerpo anti-Megalina para detectar la proteína endógena. Como sistema de detección se utilizó un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa y el sistema ECL (Amersham).

Biotinilación posterior a pulso y caza "targeting":

Las líneas celulares utilizadas se crecieron en filtros en cámaras bilaterales (Transwell), según lo descrito anteriormente. Para realizar la marcación metabólica las células se incubaron 2 veces por 20 minutos en medio DMEM sin metionina y cisteína y luego se incubaron con 200 μ Ci de 35 S Metionina/Cisteína por 45 min. Las proteínas marcadas se acumularon

en el Golgi a 19° C durante 1h y 30 min en medio de caza (DMEM Hepes 20 mM y 10X Metionina y Cisteína), y luego se dejaron salir hacia la superficie celular incubando las células a 37° C por distintos tiempos. Después de cada tiempo las células se llevaron a 4° C y se biotinilaron las proteínas selectivamente en la superficie apical o basolateral, según la técnica ya descrita. Posteriormente se obtuvieron lisados celulares y el total de la proteína quimérica fue inmunoprecipitada con anti-HA y proteína-A sefarosa. Se guardó 1/5 de la proteína inmunoprecipitada y el resto fue dissociado del complejo inmune para volver a ser inmunoprecipitada con estreptavidina sefarosa. Finalmente, las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por SDS-PAGE y se revelaron mediante autoradiografía. Las proteínas presentes en la superficie se cuantificaron utilizando el programa "Quantity One" de BioRad.

Como control interno de la polaridad de las células y de la integridad de la monocapa, el medio de caza donde se incubaron las células fue recolectado desde el lado apical y basolateral. La proteína más abundante en el medio es la gp80, la cual es secretada por las células, predominantemente hacia el lado apical. Cantidades iguales de los sobrenadantes fueron analizadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y la proteína fue detectada mediante autoradiografía.

2.2.5 Yodinación de proteínas

50 μg de la proteína RAP fueron marcados con 1 mCi de ^{125}I mediante el método de "IODO-GEN".

2.2.6 Estudios de endocitosis

Medición de la velocidad inicial de internalización de megalina y de los minireceptores

Se utilizó el protocolo descrito por Li y cols., 2000 [23]. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Al día siguiente, las células se lavaron 2 veces con buffer de ligando (medio F12 con BSA 0,6%) y se incubaron con ^{125}I -RAP 5 nM a 4°C por 30 minutos (0,5 ml/pocillo). Posteriormente, el ligando no unido se eliminó mediante lavados sucesivos con buffer de ligando a 4°C y las células se llevaron a 37°C por diferentes tiempos para permitir la internalización del ligando. Después de cada tiempo, las placas se colocaron rápidamente en hielo y el buffer de ligando fue reemplazado con una solución ácida (ácido acético 0,2 M, pH 2,6, NaCl 0,1 M) para disociar el ligando unido. Se realizaron dos lavados ácidos por 20 min y la solución fue recolectada para medir las cuentas en un contador gamma (COBRATM, Packard). Posteriormente, las monocapas de células fueron lisadas con 0,75 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 0,2%, glicerol 10 %v/v) y los lisados fueron recolectados en tubos para ser contados. La suma del ligando internalizado más el ligando que permanecía en la superficie celular después de cada

tiempo corresponde al ligando total. Para cada tiempo se calculó la fracción de ligando internalizado como fracción del ligando total.

Estudios de degradación del ligando RAP

Células CHO fueron sembradas en placas de 12 pocillos (2×10^5 células/pocillo). Al día siguiente, las células fueron incubadas con buffer de ligando (medio F12 con BSA 0,6%) que contenía 5 nM de ^{125}I -RAP en presencia o ausencia de 500 nM de RAP sin marca. La incubación con el ligando fue realizada por 3 h a 37°C . Posteriormente el medio sobre la monocapa celular fue removido y las proteínas fueron inmunoprecipitadas con 10% de TCA. La degradación del radioligando fue determinada mediante la medición de fragmentos radioactivos solubles en 10% TCA. La eficiencia de degradación del ligando corresponde al valor del ligando degradado/ 2×10^5 células y fue calculado en relación al minireceptor con el dominio citosólico de megalina sin modificaciones.

2.2.7 Inhibición de la endocitosis mediado por clatrina

Disminución drástica de los niveles de potasio intracelular y choque hipotónico [80]

Las células se sometieron primero a un choque hipotónico mediante la incubación en medio DMEM/H₂O 1:1 durante 5 min. Posteriormente, las monocapas se lavaron 2 veces con Buffer A (Hepes 20 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1mM, pH 7,4) y se incubaron en esta misma solución

durante 30 min a 37° C. Después del pretratamiento las células se incubaron con el ligando con ^{125}I -RAP 5 nM a 4° y se siguió el protocolo de endocitosis.

Acidificación del citosol [81]

Las células se lavaron 2 veces con medio DMEM y luego se incubaron por 5 min en una solución DMEM/ácido acético 10 mM, pH 5,0. Finalmente, las células se incubaron con ligando y se siguió el protocolo de endocitosis ya descrito.

2.2.8 Estudios de fraccionamiento celular

Determinación de megalina en una fracción rica en citoesqueleto

Se utilizaron métodos de extracción diferencial de citoesqueleto para estudiar la asociación de megalina con esta fracción celular. Se utilizó el método descrito por Clarke y cols., 2000 [82]. Células LLC-PK1, que expresan las construcciones de megalina, se cultivaron hasta confluencia. Se lavaron con PBS a 4° C y se desprendieron mecánicamente en presencia de buffer A (Tris-HCL 20 mM, pH 7.5; sacarosa 0,25 M; EGTA 10 mM; EDTA 2 mM e inhibidores de proteasas) a 4° C. Posteriormente, las células se sonicaron. El lisado fue centrifugado a 100.000xg por 35 min. para obtener la fracción citosólica (sobrenadante) y un pellet. El pellet se resuspendió en 150 µl de buffer A + TX-100 0.05% a 4° C. Las muestras se incubaron en un balancín a 4° C y luego se centrifugaron a 100.000 xg durante 35 min para

obtener la fracción de membrana (sobrenadante) y un pellet. El pellet se resuspendió en 250 μ l de buffer de lisis (NaCl 150 mM; Tris-HCL 50 mM; EGTA 1 mM; EDTA 1mM; NP-40 1%; Desoxicolato de Sodio 0,1%; SDS 0,1% e inhibidores de proteasas) a 4° C. Se incubó en balancín a 4° C durante 1 h y luego se resuspendió en buffer de carga.

Gradientes de sacarosa

Células BN, que expresan megalina, o líneas celulares MDCK y CHO, que expresan las diferentes construcciones de megalina, se cultivaron en placas de 100 mm hasta confluencia. Posteriormente, las células se desprendieron mecánicamente en presencia de 1 ml de PBSc (buffer fosfato salino con CaCl₂ 0,1 mM y MgCl₂ 0,1 mM) y se solubilizaron en Tritón X-100 1%, CHAPS 20 mM Chaps o Lubrol 0.5%. Los lisados celulares se centrifugaron por 18 h a 100.000 xg (centrífuga Sorvall, Rotor SS-34) en una gradiente discontinua de sacarosa de 5-40% y se recolectaron 12 fracciones desde la parte superior del tubo hasta la parte inferior. Las muestras se resuspendieron en buffer Laemmli y fueron cargadas en geles SDS-PAGE 5% acrilamida para ver megalina endógena o al 6% para los minireceptores de megalina. Luego de transferir las proteínas a PVDF éstas fueron detectadas mediante Western Blot usando un anticuerpo anti-megalina o un anticuerpo anti-HA. La cantidad de proteína presente en las fracciones más livianas (15-25% sacarosa) fue considerada como la fracción enriquecida en balsas lipídicas.

Para inmunoprecipitar megalina de las diferentes fracciones de la gradiente de sacarosa, cada fracción se llevó a 20% sacarosa en presencia de buffer de inmunomix (SDS 1%, Tritón X-100 1%, Desoxicolato de Sodio 0,5%, BSA 0,5% en PBS). Las muestras se incubaron con 3 μ l de anticuerpo anti megalina y posteriormente con esferas de sefarosa-proteína A para precipitar los complejos inmunes, las cuales se analizaron por 5%-SDS-PAGE y autoradiografía.

2.2.9 Estudios de fosforilación *in vivo*

Se utilizó la técnica descrita previamente por Li y cols., 2001 [71]. Líneas celulares BN o LLC-PK1, que expresan megalina, o células CHO, transfectadas en forma estable, se sembraron el día anterior en placas de 6 pocillos. Luego, las células se marcaron en paralelo con ^{35}S -metionina/cisteína o ^{32}P -Ortofosfato. Para ello, primero las células se lavaron con medio libre de metionina/cisteína o con medio libre de fosfato y posteriormente se marcaron con 200 μCi de ^{35}S -metionina/cisteína durante 4 h o con 200 μCi ^{32}P -Ortofosfato, durante 2 h a 37° C. Después de lavar 3 veces con PBS, las células se lisaron en PBS, TX-100 1% en presencia de inhibidores de fosfatasas (glicerolfosfato 1 mM, ortovanadato 1 mM y NaF 5 mM) y de proteasas (PMSF 1 mM, Pepstatin 1 μM , Antipain 1 μM y Leupeptin 50 μM) a 4 ° C durante 1 h. Finalmente, los minireceptores se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-HA y megalina endógena se inmunoprecipitó con un anticuerpo que reconoce el dominio citosólico de la

proteína. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por SDS-PAGE y se revelaron mediante autoradiografía.

2.2.10 Tratamiento con drogas

Todas las drogas se prepararon concentradas 500 a 1000 veces la concentración final de uso en los solventes adecuados y fueron guardadas a -20° C. En general, las células se incubaron a 37° C en presencia de la droga o en el caso de los controles negativos, en presencia del solvente en el cual la droga fue disuelta. Latrunculina B y Nistatina (Sigma, St Louis, MO, USA) fueron utilizadas a una concentración final de $0,5 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. Los inhibidores de quinasas se agregaron durante la última hora de marcación con $[^{32}\text{P}]$ -Ortofosfato y $[^{35}\text{S}]$ -metionina y las concentraciones finales empleadas para cada uno se indica en el texto de las figuras correspondientes.

2.2.11 Localización de proteínas por inmunofluorescencia

Las líneas celulares se crecieron en cubreobjetos hasta alcanzar confluencia y se lavaron con PBSc (PBS MgCl_2 1 mM; CaCl_2 0,1 mM) antes de fijarlas con paraformaldehído al 2 %, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PBSc y en algunos casos se permeabilizaron mediante la incubación con TX-100 al 0,2% durante 10 min. a temperatura ambiente. Después, las muestras se bloquearon con PBS-gelatina al 0,2 %, se incubaron con el primer anticuerpo (anti-HA) durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron

suavemente con PBS. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo secundario (conjugado con un fluoróforo), se lavaron con PBS y agua destilada y se montaron con gelvatol en un portaobjetos. Las muestras se secaron y se observaron a través de un microscopio de fluorescencia confocal (Zeiss Axiovert 200M y LSM 5 Pascal laser scanning confocal).

2.2.12 Análisis de la expresión de minireceptores por citometría de flujo

Células CHO fueron resuspendidas, mediante una incubación previa con una solución de disociación no-enzimática. Para analizar la expresión de los receptores en la superficie celular, 2×10^5 células /muestra en PBS se incubaron sucesivamente con un anticuerpo anti-HA y un anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC por 1 h a 4° C. En paralelo, 2×10^5 células fueron permeabilizadas con PBS saponina 0,1% y e incubadas con los anticuerpos bajo las mismas condiciones ya descritas, para cuantificar la expresión total de los minireceptores en cada línea celular. La fluorescencia inespecífica fue medida en una muestra en ausencia de un anticuerpo primario. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCAN Becton Dickinson (Franklin Lakes NJ, USA).

III. RESULTADOS

1. Determinantes Moleculares y Celulares que Participan en la Localización Apical de megalina:

1.1. Análisis de la Asociación de Megalina a Microdominios de Colesterol/Glicosfingolípidos (BALSAS).

Megalina es un receptor de membrana que se localiza específicamente en la superficie apical de células epiteliales. Uno de los objetivos principales abordados en esta tesis tiene relación con la determinación de la/las señales que presenta este receptor para lograr su localización apical. Un mecanismo que podría contribuir a la destinación apical de megalina y que no descarta un papel del dominio citosólico, es su asociación con microdominios enriquecidos en colesterol y glicosfingolípidos, que se conglomerarían formando las denominadas balsas lipídicas. Se ha postulado que estos microdominios formarían parte de la maquinaria que lleva algunas proteínas de transmembrana y proteínas ancladas a la membrana por un tallo GPI, desde TGN hasta la superficie apical de células polarizadas [83]. Debido a que esta interacción podría regular el tráfico intracelular de megalina, se evaluó si el receptor se encontraba asociado a estos microdominios lipídicos. Desde el punto de vista operacional, estos microdominios se definen como fracciones de membrana que son insolubles en Tritón x-100 y que flotan en la mitad superior de gradientes de sacarosa del 5 al 30 % [84]. Estudios

previos han mostrado que el uso de diferentes detergentes para obtener los extractos celulares incide directamente sobre la composición lipídica y proteica de las balsas lipídicas que se aíslan [85]. Por lo tanto, como criterio de la asociación a microdominios lipídicos, se analizó la capacidad de megalina de flotar en gradientes de sacarosa en presencia de diferentes detergentes como, Tritón X-100, Chaps 20 mM o Lubrol 1.0% (figura 5).

Los estudios de fraccionamiento celular fueron realizados con células BN que expresan altas cantidades de megalina y los resultados muestran que en presencia de TX-100, una porción menor (15%) de la proteína está presente en las fracciones más livianas (fracciones 5-7) de la gradiente, donde se encuentran enriquecidas proteínas asociadas a balsas lipídicas (figura 5). Sin embargo, cuando se realizaron gradientes de sacarosa con extractos celulares obtenidos con Chaps o Lubrol la cantidad de megalina presente en las fracciones de balsas lipídicas fue de aproximadamente un 40% (figura 5). Estos datos muestran que, independiente del tipo de detergente utilizado para obtener los extractos celulares, siempre se detecta un porcentaje de megalina en las fracciones más livianas de la gradiente de sacarosa, por lo que se concluyó que el receptor posee la propiedad de asociarse a los microdominios lipídicos.

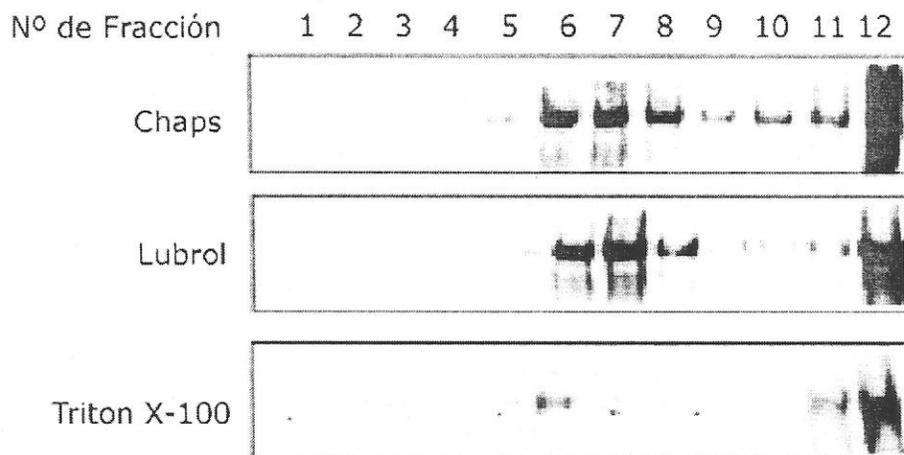


Figura 5. Distribución de megalina en gradientes de sacarosa. Células BN fueron cultivadas hasta confluencia en placas de 100 mm, raspadas en PBSc y solubilizadas en diferentes detergentes: Chaps 20 mM, Lubrol 0,5% o Tritón X-100 1%. Los lisados obtenidos fueron colocados en una gradiente discontinua de sacarosa de 5-40% y centrifugados hasta el equilibrio a 46.000 rpm por 18 h. Posteriormente, se recolectaron 12 fracciones de 0.4 ml desde la parte superior hasta el fondo del tubo y las proteínas de cada fracción fueron separadas por SDS-PAGE. Megalina fue detectada mediante Western blot usando un anticuerpo anti-megalina. La cantidad de megalina presente en las fracciones de menor densidad enriquecidos en balsas lipídicas (5-7) varió de acuerdo al detergente utilizado, observándose un mayor enriquecimiento cuando se utilizó el detergente Chaps.

Sobre la base de los resultados obtenidos se decidió caracterizar la asociación entre megalina y microdominios lipídicos. En primer lugar, se determinó en qué momento durante el paso de la proteína por la ruta secretora ocurría esta interacción. Para ello, se realizaron estudios de pulso y caza, marcando metabólicamente células BN con Metionina/Cisteína-³⁵S por 1 h y posteriormente incubando con medio sin marca (caza) durante 3 h a 37° C o 19 ° C. La incubación a 19° C permite acumular la proteína en el complejo de Golgi. Estudios previos muestran que la vida media de biosíntesis del receptor es de 8 horas y que en una hora la proteína no alcanzaría a llegar a la membrana plasmática y por lo tanto, posiblemente no ha salido del aparato de Golgi. En base a estos datos se presumió que durante la caza a 19° C la mayoría de la proteína se encontraba acumulada en el TGN ya que es poco probable que durante la hora de marcación metabólica a 37° C la proteína haya alcanzado a salir de este compartimiento y se encuentre en la superficie. Después de realizar el pulso y caza, las células se fraccionaron en una gradiente de sacarosa en Chaps y se analizó la distribución del receptor. Los resultados muestran que el 40 % de megalina asociada a balsas lipídicas a 19° C es muy similar al obtenido en estado estacionario (figura 6), lo que sugiere que megalina es incorporada en estos microdominios lipídicos tempranamente durante la ruta secretora. La asociación de megalina a balsas lipídicas en TGN podría constituir un mecanismo utilizado por el receptor para ser transportado a la superficie apical de células epiteliales. Sin embargo, si esto fuera así, no se

descartaría la existencia de otro tipo de señales apicales que podrían estar presentes en el dominio citosólico del receptor y que también fueron analizados en este trabajo.

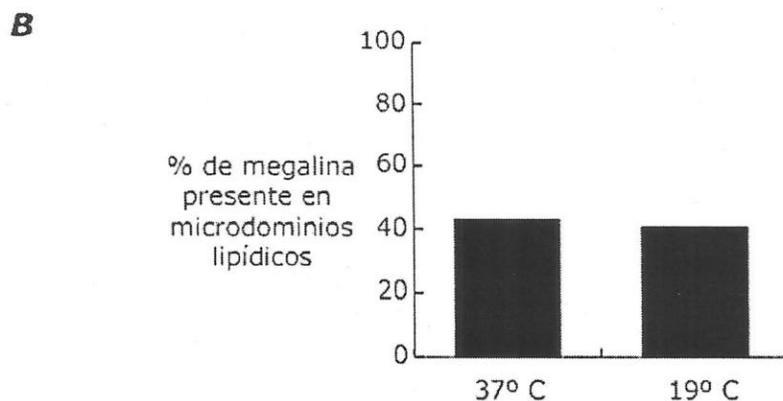
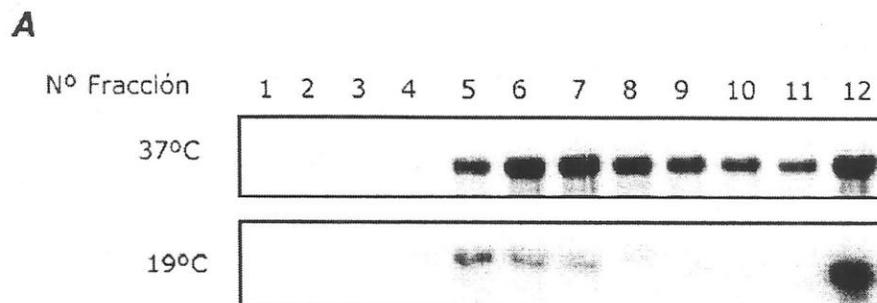


Figura 6. Análisis de la asociación de megalina a balsas lipídicas durante su transporte a través de la ruta secretora. Células BN que expresan megalina se cultivaron hasta confluencia y se marcaron metabólicamente durante 1 h con metionina/cisteína-³⁵S. Luego, las células se incubaron en medio de caza (DMEM Hepes 20 mM con 10X Metionina y Cisteína) durante 3 h a 37° C o 19° C. Posteriormente, las células se lisaron en Chaps 20 mM por 20 min a 4° C y se fraccionaron en una gradiente discontinua de sacarosa. Se recolectaron fracciones de 0.4 ml de la gradiente y megalina se inmunoprecipitó de cada fracción usando un anticuerpo contra el dominio citosólico de la proteína. Las muestras se analizaron por 5% acrilamida-SDS PAGE y autoradiografía (A). La cantidad de megalina en cada muestra se cuantificó y el porcentaje de megalina en las fracciones (5-7) de balsas lipídicas (correspondiente a 17-25% de sacarosa) está indicado en la figura (B). Una cantidad significativa de megalina se encuentra en las fracciones de balsas lipídicas aún cuando la proteína fue acumulada en el TGN a 19° C.

Dado que una fracción de megalina se encontró en balsas lipídicas, el segundo punto fue analizar cómo se regulaba esta asociación. Es importante destacar que sólo una pequeña fracción de megalina es capaz de flotar en gradientes de sacarosa/TX-100 y que la mayor parte se encuentra en el fondo de la gradiente. En estas fracciones más densas, megalina podría estar formando complejos con otras proteínas, posiblemente elementos del citoesqueleto de actina cortical. Para analizar si este tipo de interacciones podría estar regulando la asociación de megalina a balsas lipídicas, se realizaron estudios de flotación en gradientes de sacarosa en presencia de un agente disociador del citoesqueleto de actina, Latrunculina B. Cuando se preincubaron células BN con esta droga durante 1 hora la cantidad de megalina presente en las fracciones de microdominios lipídicos aumentó significativamente. En este caso, los extractos celulares fueron obtenidos con TX-100 y se observó que en presencia de Latrunculina B la cantidad de megalina presente en las fracciones de balsas lipídicas era de 20-25%, comparado con sólo un 10% en el control (figura 7). Esto sugiere que megalina podría estar interaccionando con proteínas del citoesqueleto de actina cortical, lo cual podría modular la asociación con los microdominios lipídicos. En este caso, se postula que la fracción de megalina que interacciona con proteínas asociadas a actina se encontraría en las fracciones más densas de la gradiente. La depolimerización de los filamentos de actina, a través de drogas que secuestran monómeros de actina como Latrunculina B [86], también podrían afectar la interacción de megalina con

proteínas del citoesqueleto. La interrupción de estas interacciones podría, también, facilitar la incorporación del receptor a balsas lipídicas. Esta es una característica interesante del receptor y podría jugar un papel central en su tráfico celular como por ejemplo, la endocitosis y/o también en la función del receptor en procesos de transducción de señales.

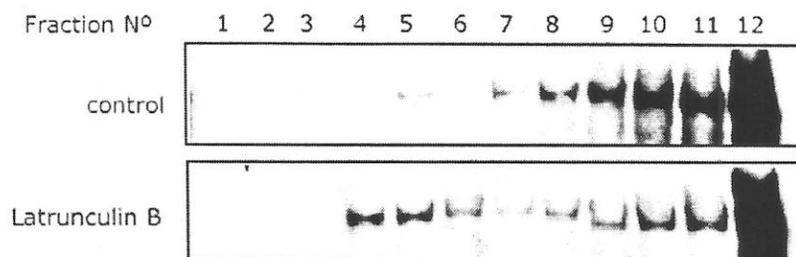
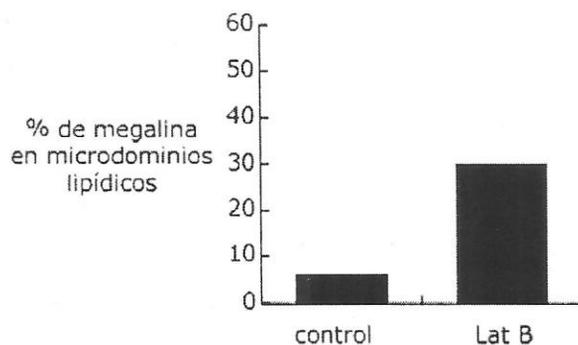
A**B**

Figura 7. Efecto de Latrunculina B sobre la asociación de megalina a balsas lipídicas. A) Células BN que expresan megalina se cultivaron hasta confluencia en placas de 100 mm y se trataron con 0.5 μ M de Latrunculina B o con DMSO (control) por 30 min a 37 $^{\circ}$ C. Posteriormente las células se lisaron en Tritón x-100 1% por 1 h a 4 $^{\circ}$ C y se fraccionaron en una gradiente discontinua de sacarosa. Se recolectaron 12 fracciones de 0.4 ml de la gradiente y las muestras se analizaron en 5% acrilamida-SDS PAGE y se revelaron mediante Western Blot usando un anticuerpo contra el dominio citosólico de megalina. B) Cuantificación del porcentaje de megalina presente en las fracciones de balsas lipídicas (4-6) con respecto al total de la proteína. Se observa que la cantidad de megalina presente en las fracciones de balsas lipídicas es mayor en células pretratadas con un agente disociador de citoesqueleto de actina (Latrunculina B) comparado con las células control.

Otra propiedad de megalina que se había determinado en el laboratorio, es que su dominio citoplasmático es fuertemente fosforilado. La relevancia funcional de esta modificación post-traducciona era, sin embargo, desconocida. Por tanto, uno de los objetivos centrales de este trabajo fue caracterizar la fosforilación del receptor y por ello se analizó la distribución de la forma fosforilada de megalina en un gradiente de sacarosa. Para ello, se usaron células BN, las cuales se marcaron metabólicamente con Metionina/Cisteína-³⁵S durante 4 horas o con [³²P]-Ortofosfato por 2 horas. Posteriormente, las células se fraccionaron en un gradiente de sacarosa/Chaps y se analizó la distribución de megalina marcada con ³⁵S, que representa la proteína total, y la distribución de la proteína fosforilada, correspondiente a la marca obtenida con ³²P. Se observa que una fracción importante (33%) del receptor fosforilado se encuentra en las fracciones de balsas lipídicas (figura 8). La distribución del receptor fosforilado en el gradiente de sacarosa es similar a la que se obtiene para la distribución de la proteína total. Además, se observan 2 bandas correspondientes a megalina fosforilada: una banda de mayor peso molecular, que se encuentra enriquecida en el fondo del gradiente, y una de menor peso molecular que está presente mayoritariamente en las fracciones de las balsas lipídicas. La banda de mayor peso molecular podría corresponder a una forma agregada de megalina o a complejos entre el receptor y otras proteínas. Este resultado sugiere que la fosforilación del receptor no está involucrada en la asociación con las balsas lipídicas.

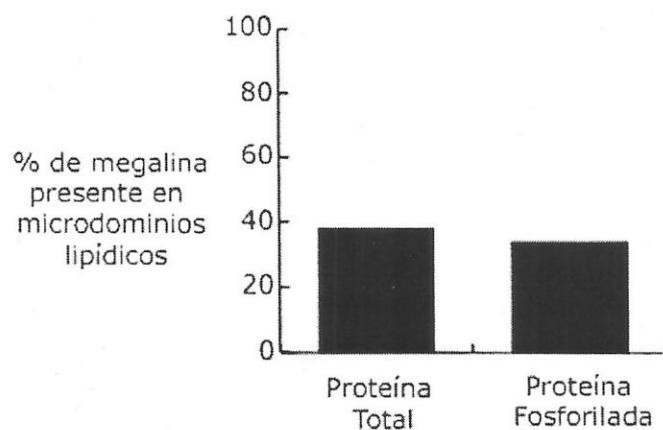
A**B**

Figura 8. Distribución de megalina fosforilada en balsas lipídicas. Células BN que expresan megalina se marcaron metabólicamente durante 4 h con metionina/cisteína- ^{35}S o 2 h con ^{32}P -ortofosfato. Posteriormente las células se lisaron en Chaps 20 mM por 30 min a 4°C y se fraccionaron en un gradiente discontinua de sacarosa. Se recolectaron fracciones de 0.4 ml de la gradiente y megalina se inmunoprecipitó de cada fracción usando un anticuerpo anti megalina. A) Las muestras se analizaron en 5% acrilamida-SDS PAGE y se revelaron mediante autoradiografía. B) La cantidad de megalina en cada muestra se cuantificó y se calculó el porcentaje de megalina en las fracciones (4-6). Una cantidad significativa del receptor fosforilado se encuentra en las fracciones de balsas lipídicas.

Por último, también se evaluó la capacidad de los minireceptores, que contenían parte de la secuencia de megalina, de asociarse a microdominios lipídicos. Para ello se contaba con el minireceptor que contiene el cuarto dominio de unión a ligandos del LRP, el dominio de transmembrana del LRP y el dominio citosólico de megalina (mLRP4lrptmMegT) (figura 3) y se construyó otro minireceptor que contenía el dominio de transmembrana de megalina en lugar del de LRP (mLRP4MegTMT). A partir de extractos de células CHO que expresaban los minireceptores se examinó la distribución de estas proteínas en gradientes de sacarosa y se comparó con la distribución de caveolina-1, que es una proteína que se encuentra mayoritariamente en fracciones de microdominios lipídicos. Los resultados muestran que un porcentaje del minireceptor con el dominio de transmembrana de megalina se encontraba presente en las fracciones de balsas lipídicas, mientras que el minireceptor con el dominio de transmembrana de LRP solo estaba presente en el fondo de la gradiente, en las fracciones más densas (figura 9). Estos datos indican que el dominio de transmembrana del LRP es diferente al de megalina y no presenta la propiedad de asociarse a los microdominios lipídicos.

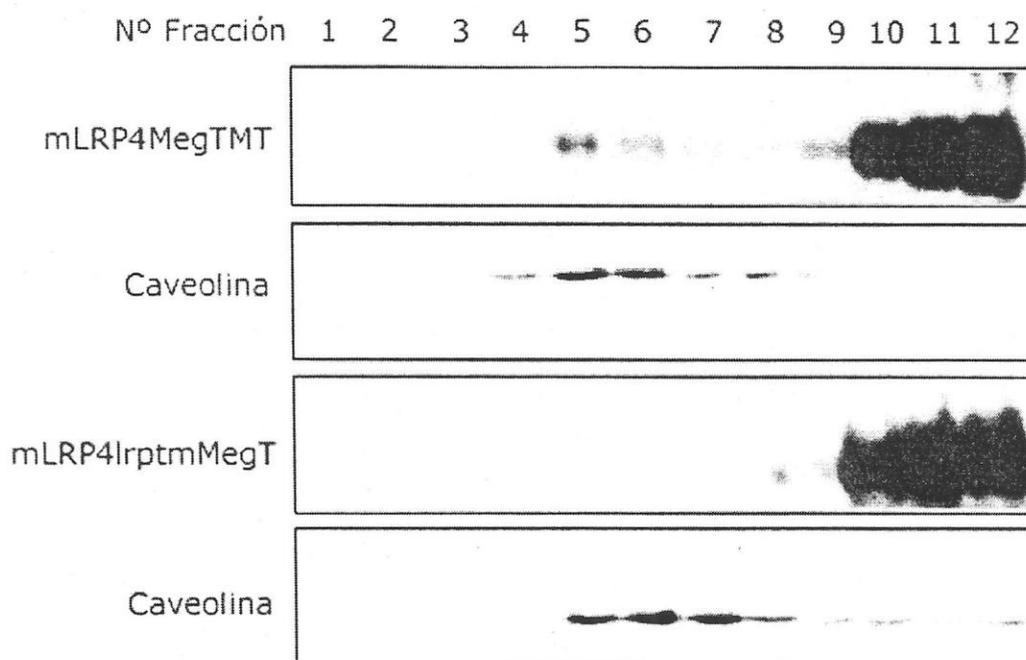


Figura 9. Estudio de la asociación de minireceptores a microdominios lipídicos. Células CHO que expresan el minireceptor formado por el cuatro dominio de unión a ligandos del LRP, el dominio de membrana y citoplasmático de megalina (mLRP4MegTMT) o con el minireceptor que contiene el dominio de membrana de LRP (mLRP4lrptmMegT) fueron cultivadas en placas de 100 mm y lisadas en 1 % TX-100. Los extractos celulares fueron fraccionados en una gradiente discontinua de sacarosa de 5-40%. Las 12 fracciones coleccionadas fueron analizadas por Western Blot usando un anticuerpo anti-HA para detectar el minireceptor o un anticuerpo contra caveolina como control positivo de una proteína asociada a balsas lipídicas. Se observa que en estas condiciones, solo el minireceptor con el dominio de membrana de megalina se asocia a microdominios lipídicos.

El conjunto de estos resultados muestra que megalina se asocia a microdominios lipídicos. Esta interacción probablemente ocurre tempranamente durante el paso del receptor por la ruta secretora y podría ser importante en su localización apical. Sin embargo, a partir de los datos obtenidos no se puede concluir que la localización apical de megalina depende directamente de la interacción con estos microdominios lipídicos. Por otro lado, es posible que esta asociación juegue un papel en otros aspectos del tráfico intracelular del receptor, como la endocitosis, transcitosis o en la señalización a nivel de la membrana plasmática.

1.2. Análisis de la Interacción de Megalina con el Citoesqueleto y los Dominios Involucrados en esta Posible Interacción.

Dado que la asociación de megalina a balsas lipídicas parece estar regulada por la integridad del citoesqueleto de actina se evaluó si el dominio citoplasmático de este receptor confiere la asociación de megalina a este elemento celular. Consideramos este punto muy importante puesto que esta asociación podría tener un papel en distintos aspectos del tráfico celular de megalina, ya sea en la localización polarizada como en el tráfico endocítico. Para analizar esta posible asociación se realizaron estudios de insolubilidad en Tritón X-100 a 4° C, ya que se ha descrito que proteínas asociadas al citoesqueleto presentan esta propiedad bioquímica [50]. Esto se estudió en un principio en líneas celulares de LLC-PK1 que expresan megalina, las

cuales se lisaron para obtener: 1) fracción celular total, 2) fracción citosólica, 3) fracción de membrana, y 4) una fracción insoluble en TX-100. Los resultados muestran que en células LLC-PK1, megalina se encuentra en una fracción insoluble en Tritón X-100 que podría ser de citoesqueleto, sugiriendo que existiría una interacción entre ambos (figura 10). Sin embargo, nuestros datos indican que megalina se encuentra asociada con microdominios lipídicos, lo cual también le confiere a la proteína la propiedad de ser insoluble en detergentes no iónicos a 4° C. Para determinar si la insolubilidad de megalina en TX-100 a 4° C se debía en parte a la interacción del receptor con el citoesqueleto, se repitieron los estudios de fraccionamiento en células LLC-PK1 que expresaban el minireceptor con dominio citosólico de megalina. Este minireceptor contiene el dominio de transmembrana del LRP y no se asocia con microdominios lipídicos (figura 9). Los resultados muestran que una parte importante de la proteína también se encuentra en la fracción insoluble en TX-100 a 4° C. El hecho de encontrar una parte del minireceptor que no se asocia a balsas lipídicas, en una fracción de proteínas insolubles en TX-100 sugiere que megalina podría asociarse con el citoesqueleto de actina. Además, comparado con lo observado para megalina endógena, la proporción entre la cantidad de receptor presente en la fracción TX-100 insoluble y la fracción de membrana es menor para el minireceptor, posiblemente por que no se asocia a microdominios lipídicos, lo cual contribuiría a la insolubilidad en TX-100 (figura 10).

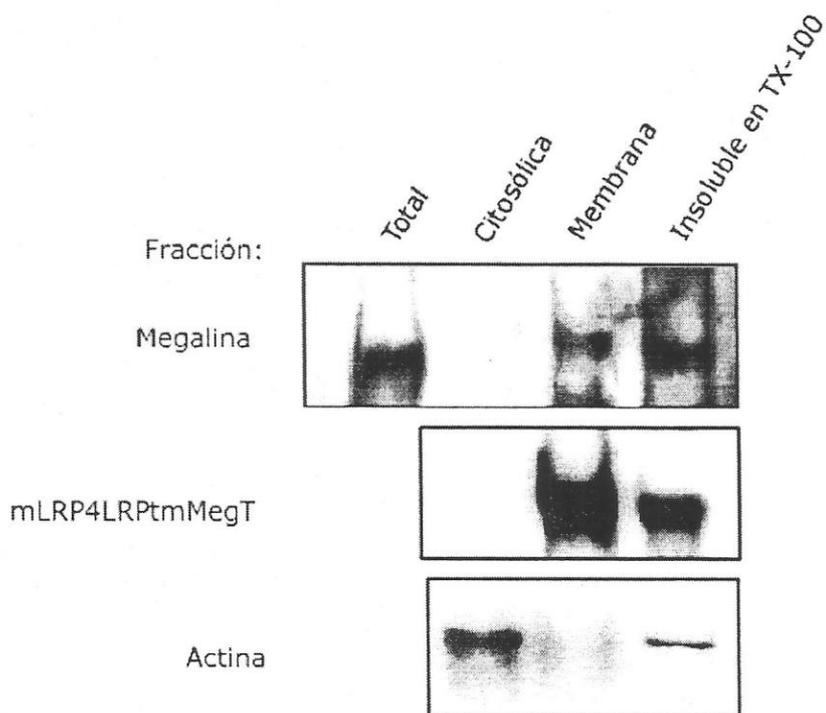


Figura 10. Extracción de megalina con Tritón X-100 a 4° C. Células LLC-PK1 sin transfectar y que expresan megalina o células LLC-PK1 transfectadas con el minireceptor de megalina fueron cultivadas en placas de 100 mm hasta confluencia. Las células se rasparon en presencia de buffer A (Tris 20 mM, pH 7.5; sacarosa 0.25M, EGTA 10 mM, EDTA 2 mM e inhibidores de proteasas) y se centrifugaron a 100.000 x g para sedimentar las membranas celulares, las cuales fueron posteriormente solubilizadas en TX-100 a 4° C. Las proteínas insolubles en estas condiciones se separaron mediante centrifugación a 100.000 x g y el pellet obtenido se resuspendió en NaCl 150 mM; Tris-HCL 50 mM; EGTA 1 mM; EDTA 1mM; NP-40 1%; Desoxicolato de Sodio 0,1%; SDS 0,1% e inhibidores de proteasas. Las diferentes fracciones celulares se analizaron mediante Western Blot. Megalina endógena fue detectada usando un anticuerpo que reconoce el dominio citosólico de la proteína y el minireceptor fue detectado usando un anticuerpo anti-HA. Se observa la presencia de megalina y el minireceptor en la fracción de membrana y también en la fracción insoluble en TX-100. La distribución de actina en estas fracciones fue utilizada como un control.

Los estudios de fraccionamiento se repitieron en células CHO y MDCK que expresaban el minireceptor que contiene el dominio citosólico de megalina y el dominio de transmembrana de LRP. Se encontró que en ambos tipos celulares una fracción de la proteína también es insoluble en TX-100 0.5% a 4° C, a diferencia del mismo minireceptor que contiene el dominio citosólico del LRP (figura 11). Este resultado sugiere que la interacción entre megalina y proteínas del citoesqueleto ocurre a través del dominio citosólico, puesto que el mismo minireceptor con dominio citosólico de LRP no se encuentra en esta fracción.

Para caracterizar mejor la asociación entre megalina y el citoesqueleto de actina se analizaron los motivos del dominio citoplasmático del receptor que podrían estar involucrados. En este dominio existen motivos de interacción con dominios SH3 y PDZ que están presentes en muchas proteínas del citoesqueleto cortical de actina, como NHERF [87], Ezrina [88], α -espectrina [89], etc. Primero, se evaluó el papel del motivo rico en prolinas distal que interacciona con dominios del tipo SH3. Mediante una estrategia basada en PCR se eliminó la secuencia que incluye los residuos 166-174, correspondiente al motivo rico en prolinas (distal) del dominio citoplasmático de megalina (Δ ProRich). Posteriormente, se realizaron estudios de fraccionamiento con dos tipos celulares, CHO y MDCK, que expresaban el minireceptor Δ ProRich, y se analizó la insolubilidad de esta variante del minireceptor en TX-100 a 4° C. Nuestros resultados muestran una disminución significativa del minireceptor Δ ProRich en la fracción de

proteínas insolubles en este detergente, comparado con el receptor sin la deleción (figura 11), sugiriendo que este motivo rico en prolinas jugaría un papel en la interacción de megalina con proteínas del citoesqueleto de actina. Dado que, en este caso, aún existía una fracción del receptor insoluble en TX-100, especulamos que la presencia de algún otro motivo citosólico, como el que media en la interacción con dominios PDZ, podría estar involucrado en una interacción con proteínas del citoesqueleto. Para analizar esta posibilidad, se eliminó del dominio citosólico el motivo SEV y se analizó la insolubilidad en TX-100 a 4° C. Los estudios fueron realizados en células CHO y muestran que este minireceptor Δ PDZ también presenta una disminución en su insolubilidad en TX a 4° C comparado con el minireceptor con el dominio citosólico completo (figura 11). Esto sugiere que tanto el motivo rico en prolinas, como el de interacción con proteínas PDZ, presentes en el dominio citoplasmático de megalina, serían importantes en la asociación con proteínas que forman parte del citoesqueleto de actina y podrían estar involucrados en la regulación del tráfico intracelular del receptor.

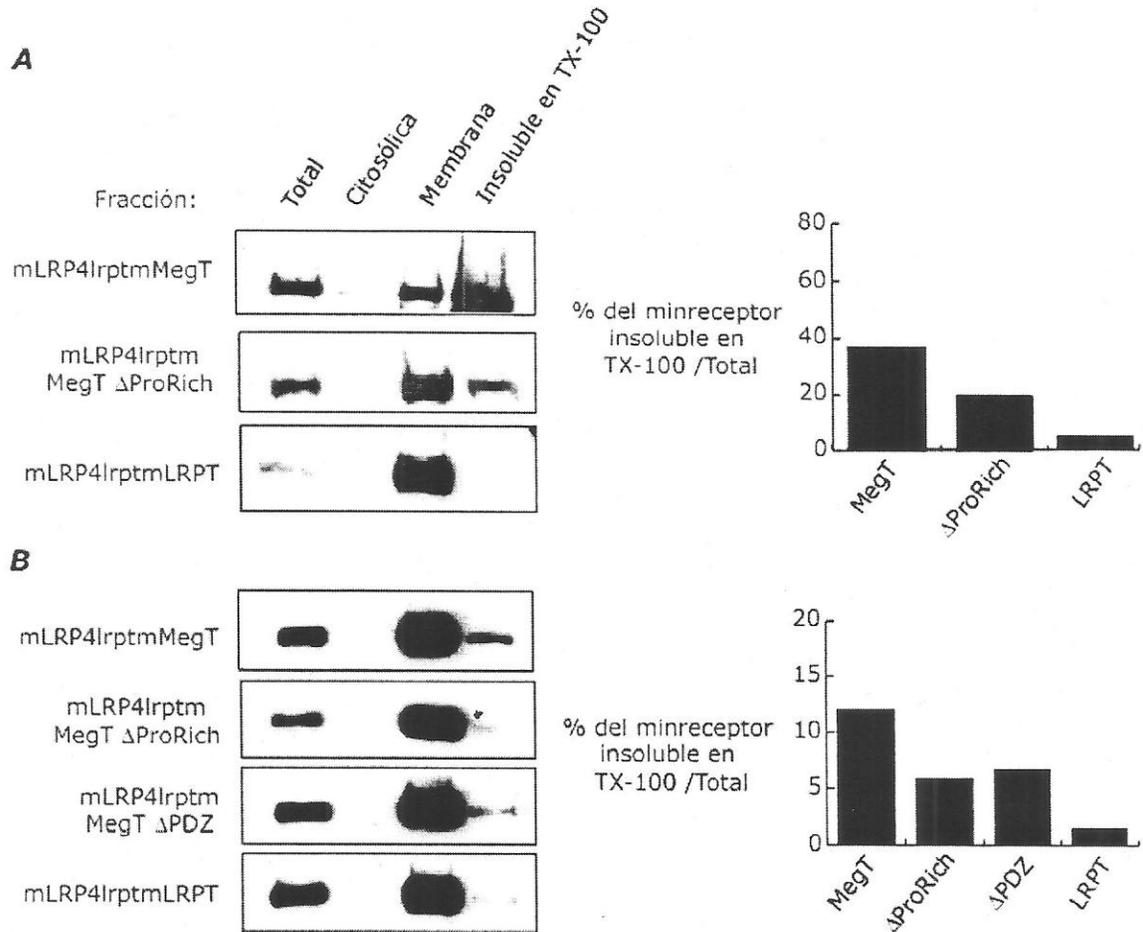


Figura 11. Extracción del minireceptor de megalina con Tritón X-100 a 4° C. Células A) MDCK o B) CHO transfectadas con el minireceptor con el dominio citosólico del LRP, con dominio citosólico de megalina o con la variante sin el dominio rico en prolinas o sin el motivo PDZ, fueron cultivadas en placas de 100 mm hasta confluencia. Las células se rasparon en presencia de buffer A (Tris 20 mM, pH 7.5; sacarosa 0.25M, EGTA 10 mM, EDTA 2 mM e inhibidores de proteasas) y se centrifugaron a 100.000 x g para obtener las distintas fracciones celulares según lo descrito anteriormente. Las fracciones celulares se separaron por SDS-PAGE y las proteínas fueron detectadas mediante Western Blot usando un anticuerpo anti-HA. Una fracción del minireceptor con el dominio citoplasmático de megalina está presente en la fracción insoluble en TX-100, a diferencia del receptor que contiene el dominio citoplasmático del LRP. La variante de megalina sin el motivo rico en prolinas o sin el motivo PDZ se enriquece mucho menos en esta fracción.

1.3. Determinar si Megalina Contiene Información de Destinación a la Superficie Apical en su Dominio Citoplasmático.

A nivel del ectodominio, megalina presenta una alta similitud con otro miembro de la familia LDL-R, llamado LRP. Sin embargo, este receptor, a diferencia de megalina, presenta una localización basolateral en células epiteliales [37]. Dado que megalina se diferencia del LRP particularmente en la región citosólica, se planteó que en este dominio podría existir información para la localización apical del receptor. En este contexto, nuestros datos sugieren que a través del dominio citoplasmático, megalina interactúa con el citoesqueleto. Este tipo de interacción podría ser importante para la localización apical del receptor mediante un mecanismo de retención selectiva en este dominio celular.

Además, es interesante destacar que en el dominio citoplasmático de megalina (figura 2), existen dos motivos basados en tirosina y uno de dileucinas que han sido descritos como señales basolaterales en otras proteínas [90, 91]. Este tipo de señales son dominantes sobre señales apicales como la glicosilación, lo cual sugiere que aún cuando megalina es glicosilada en el ectodominio, podría existir otro tipo de información, posiblemente en el dominio citoplasmático y/o de transmembrana, que permite lograr su destinación al dominio apical. Son pocas los ejemplos de secuencias proteicas citosólicas que funcionan como señales apicales. La

mayoría han sido descritas para proteínas politópicas y pueden ser secuencias sin motivos de consenso como la señal apical de la rodopsina [43] o motivos conocidos como los que interaccionan con dominios PDZ y han sido descritos para CFTR [51]. En este último caso, el motivo de interacción con dominios PDZ es importante para estabilizar CFTR en el dominio apical. El dominio citoplasmático de megalina contiene varios motivos de interacción con proteínas, entre ellos, un motivo de interacción con dominios PDZ, que podrían funcionar como señal apical. Dado que nuestros resultados sugieren que este motivo, como también el motivo rico en prolinas está mediando la interacción con citoesqueleto de actina, es posible que megalina se estabilice en la superficie apical de células epiteliales mediante un mecanismo similar al de CFTR. Antes de indagar en los motivos del dominio citosólico, el primer objetivo fue determinar si efectivamente existía información de destinación apical en el dominio citosólico de megalina.

Dado que megalina presenta un gran tamaño molecular, lo cual dificulta su manipulación a nivel molecular y de transfección celular, se utilizó un minireceptor (figura 3) formado por el cuarto dominio de unión a ligandos del LRP, el dominio de transmembrana de LRP y el dominio citosólico de megalina. Este minireceptor nos permitió estudiar y caracterizar los motivos del dominio citosólico de megalina involucrados en el tráfico celular del receptor. Datos previos del laboratorio mostraron que en líneas celulares epiteliales de riñón, LLC-PK1 y MDCK, el minireceptor con

dominio citosólico de megalina presentaba una localización apical, al igual que la proteína endógena (figura 12). Al cambiar el dominio citosólico de megalina por el de LRP, la proteína se localizó basolateralmente, lo cual sugiere que el dominio citoplasmático de megalina contiene información que permite la localización apical del minireceptor. Sin embargo, en este punto es importante destacar que el minireceptor sin dominio citosólico (solo el ectodominio/ transmembrana de LRP), también mostró una localización apical, posiblemente debido a la glicosilación del ectodominio. Esto significa que existe la posibilidad que en el minireceptor antes descrito la señal de destinación a la superficie apical esté dada sólo por la glicosilación de su ectodominio.

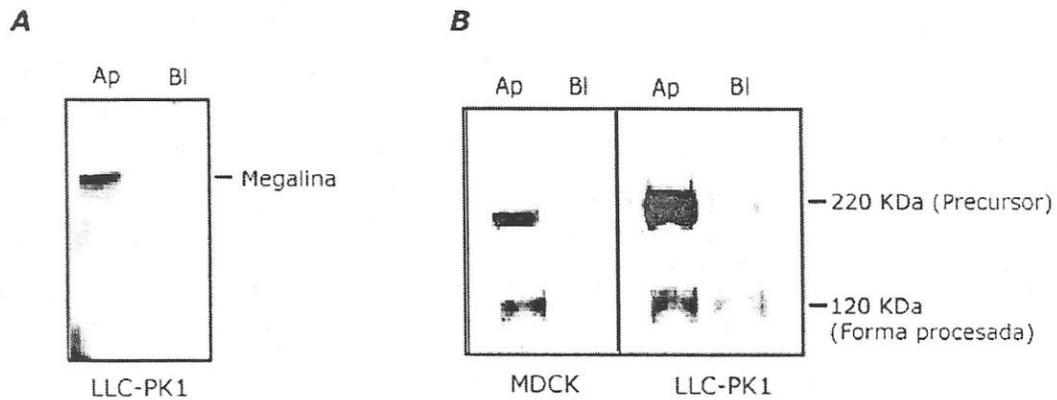


Figura 12. Localización apical de megalina y del minireceptor formado por el cuarto dominio de unión a ligandos y dominio de transmembrana del LRP y el dominio citosólico de megalina, en líneas celulares polarizadas LLC-PK1 y MDCK. Células LLC-PK1, que expresan megalina o células transfectadas con el minireceptor fueron cultivadas en filtros de cámaras bilaterales hasta confluencia y las proteínas de la superficie fueron selectivamente biotiniladas por el lado apical o basolateral a 4° C. Luego de obtener los lisados celulares, las proteínas biotiniladas fueron inmunoprecipitadas con esferas de agarosa-estreptavidina y analizadas mediante Western Blot usando un anticuerpo contra el dominio citosólico de megalina o un anticuerpo anti-HA para detectar megalina endógena o el minireceptor, respectivamente.

Para poner en evidencia si el dominio citosólico de megalina contiene información de destinación a la superficie apical, se construyó una proteína reportadora que no presentara información de destinación polarizada. Posteriormente, la proteína quimérica fue utilizada para demostrar que la presencia del dominio citosólico de megalina era suficiente para destinarla al dominio apical de células MDCK. La proteína reportadora que se generó fue construida con la proteína fluorescente verde (GFP) como ectodominio, ya que ésta no está glicosilada y su forma soluble (GFP sec) tampoco presenta polaridad (figura 13). Además, se utilizó el dominio de transmembrana de LRP y el dominio citoplasmático de hemaglutinina, HA (11 aminoácidos) que no presenta información de destinación polarizada (anexo 3).

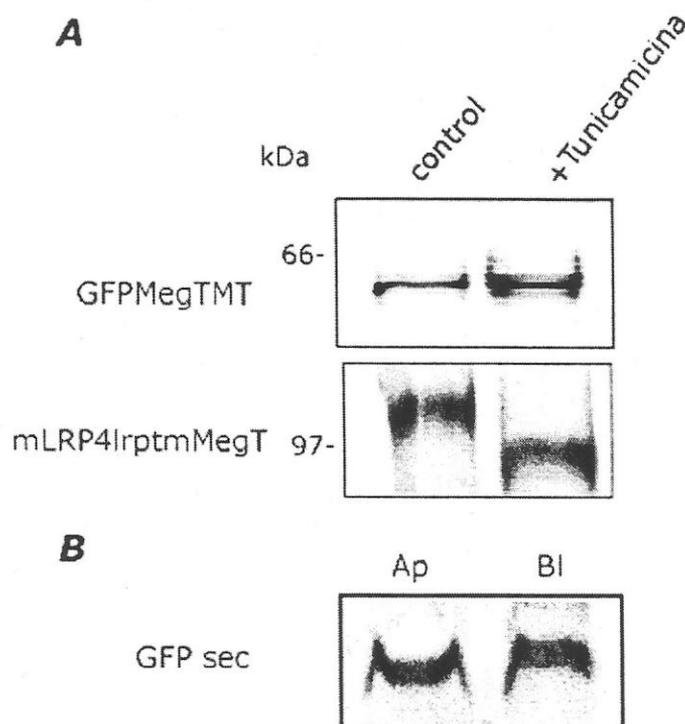


Figura 13. GFP no es glicosilado y se secreta en forma no polarizada. A) Células MDCK que expresan el minireceptor con ectodominio de GFP (GFMegTMT) o el minireceptor con ectodominio de LRP (mLRP4lrptmMegT) fueron cultivadas en placas de 6 pocillos y posteriormente marcadas metabólicamente con ^{35}S -metionina-cisteína en presencia o ausencia de $10\ \mu\text{g/ml}$ de tunicamicina por 4 h. Los minireceptores fueron inmunoprecipitados con anti-HA y esferas de agarosa-proteína A. El peso molecular de la proteína inmunoprecipitada fue analizada por SDS-PAGE y autoradiografía. B) Para determinar la polaridad de la forma secretable de GFP, células MDCK que expresan en forma estable GFPsec se cultivaron en cámaras bilaterales hasta formar una monocapa confluyente y se marcaron metabólicamente con ^{35}S -metionina-cisteína. Posteriormente, se recolectó el medio desde el lado apical y basolateral y GFP fue inmunoprecipitada desde el medio usando un anticuerpo anti-HA y esferas de agarosa-proteína A. La proteína inmunoprecipitada fue analizada por SDS-PAGE y autoradiografía. El peso molecular del minireceptor, que posee GFP como ectodominio, no es modificado por tunicamicina, indicando que esta quimera no es glicosilada. Además, se observa que GFP se secreta de manera no polarizada.

Luego de construir la proteína reportadora, su distribución celular fue analizada en la línea celular MDCK. Mediante microscopía confocal se encontró que esta proteína era eficientemente transportada a la superficie celular y presentaba una localización no polarizada (figura 14). Los estudios fueron realizados, primero, a través de inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti-HA en células confluentes y no permeabilizadas para determinar la localización de la quimera solamente en la superficie apical de las células, ya que en estas condiciones el anticuerpo no tiene acceso a la superficie basolateral. Se encontró un patrón vesicular típico de una marcación apical (figura 14A), mostrando que el reportador se encontraba en este dominio celular. Por otro lado, cuando en las mismas células se siguió la fluorescencia de la GFP para, determinar la localización de la proteína en toda la célula, resaltó una marcación de los bordes de las células en el plano basal. Esto sugiere que esta proteína también se encontraba en la superficie basolateral (figura 14A).

Los datos obtenidos por microscopía confocal fueron complementados con estudios de biotilación de proteínas de la superficie celular. Mediante esta técnica se detectó GFP/rptmHA (reportador) tanto en el lado apical como en el basolateral (figura 14B). En estas mismas células se determinó la localización de un marcador endógeno, e-caderina, el cual aparece correctamente distribuido en el lado basolateral. En conjunto, estos datos muestran que la proteína reportadora que se generó se distribuye de manera no polarizada en células MDCK. En este punto es importante resaltar

que se generó una proteína de membrana que no presentaba una localización polarizada, lo cual constituye una herramienta muy valiosa para poder estudiar posibles señales apicales presentes en dominios citosólicos de proteínas y que hasta ahora no se ha descrito en otros trabajos.

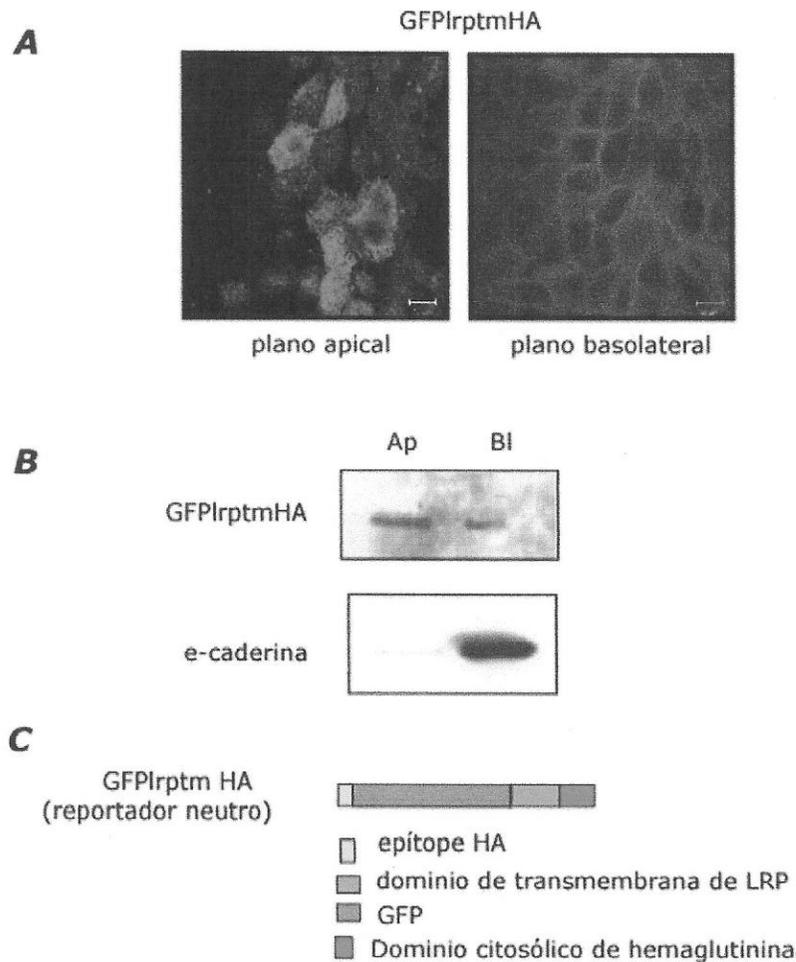


Figura 14. Localización en células MDCK, del reportador neutro GFPIrptmHA. A) Células MDCK que expresan la quimera fueron cultivadas en portaobjetos hasta confluencia y fijadas con paraformaldehído al 2%. Posteriormente, las células sin permeabilizar se incubaron sucesivamente con un anticuerpo anti-HA y un anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 y se analizaron por microscopía confocal. Se observa GFPIrptmHA en la superficie apical, detectado por anti-HA (rojo) y también en el lado basolateral, detectado por la fluorescencia de la GFP (verde) en los bordes de las células. La barra equivale a 10 μm . B) Células MDCK cultivadas en filtros de cámaras bilaterales hasta confluencia, fueron biotiniladas selectivamente en el lado apical o basolateral 4 $^{\circ}$ C. Desde los lisados celulares, las proteínas biotiniladas fueron inmunoprecipitadas con estreptavidina-agarosa y la quimera fue detectada por detección por Western Blot con un anticuerpo anti-HA. Se observa que la proteína en estudio fue biotinilada desde la superficie apical como basolateral, en cambio el control e-caderina se observa mayoritariamente en el lado basolateral. C) Representación esquemática de la construcción del reportador neutro.

Luego de caracterizar la proteína reportadora, se reemplazó el dominio citosólico (HA) por el de megalina (GFPIrptmMegT) y se analizó su distribución celular por las técnicas antes mencionadas. Los resultados muestran que la proteína reportadora con el dominio citosólico de megalina se localiza predominantemente en el lado apical de células MDCK. En la figura 15A se muestra la detección de GFPIrptmMegT mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti-HA en células MDCK, con y sin permeabilización previa. En ambos casos, se observa un patrón típico de una tinción apical y ninguna marcación correspondiente a un patrón basolateral. Este resultado fue corroborado con estudios de biotinylation selectiva de la superficie celular, donde también se encontró la quimera en el lado apical (figura 15B). Estos datos sugieren fuertemente que en el dominio citoplasmático de megalina existe información suficiente para su localización apical y constituye el primer ejemplo de una proteína del tipo I, cuya información de destinación a la superficie apical se encuentra en el dominio citoplasmático, ya que los pocos ejemplos que existen se refieren todos a proteínas politópicas, como las mencionadas anteriormente.

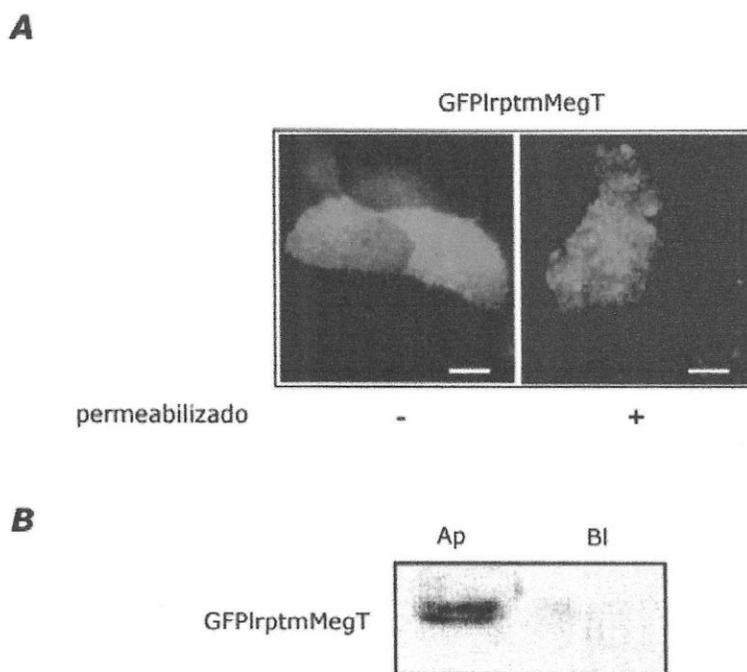


Figura 15. Localización apical de GFP/rptmMegT. A) Células MDCK que expresan establemente el reportador neutro fusionado al dominio citoplasmático de megalina fueron cultivadas en portaobjetos hasta confluencia y posteriormente fijadas con paraformaldehído al 2%. Luego, las células se incubaron sucesivamente con un anticuerpo anti-HA y un anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 para detectar la distribución de la quimera. Imágenes de microscopía confocal fueron tomadas y se observa una localización predominantemente apical tanto en células no permeabilizadas (-) como permeabilizadas (+) con Tritón X-100. La barra equivale a 5 μ m. B) Células MDCK fueron cultivadas en filtros de cámaras bilaterales hasta confluencia y posteriormente las proteínas de la superficie celular fueron biotiniladas selectivamente desde el lado apical y basolateral a 4 ° C. Luego, las proteínas biotiniladas fueron inmunoprecipitadas con esferas de proteína A-estreptavidina y separadas por SDS-PAGE. La proteína quimérica fue detectada mediante Western Blot usando un anticuerpo anti-HA, la cual se observó sólo en el lado apical.

Aun cuando los datos previos obtenidos en el trabajo muestran que el dominio de transmembrana del LRP no posee la propiedad de asociarse a microdominios lipídicos (figura 9), como control se evaluó si GFP_{lrptmMegT} se encontraba asociada a estos microdominios lipídicos para descartarlo como posible mecanismo de destinación al dominio apical de esta quimera. Estudios de flotación en gradientes de sacarosa muestran que tanto la proteína reportadora, como la quimera con el dominio citosólico de megalina (GFP_{lrptmMegT}) no estaban presentes en las fracciones más livianas de la gradiente (figura 16), por lo que se concluyó que no se asociaban a balsas lipídicas. Estos resultados muestran que la localización apical de GFP_{lrptmMegT} no depende de la asociación con microdominios lipídicos y probablemente se debe a la información presente en el dominio citosólico de megalina.

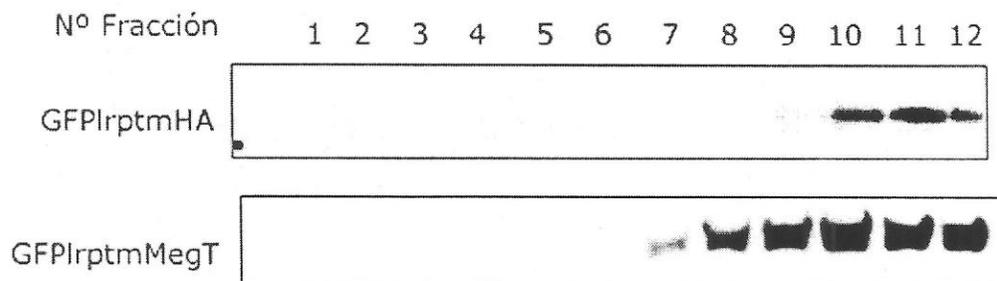


Figura 16. Distribución de construcciones de GFP en gradientes de sacarosa. Células MDCK que expresan establemente el reportador neutro o el reportador fusionado al dominio citoplasmático de megalina fueron cultivadas hasta confluencia en placas de 100 mm, raspadas en PBSc y solubilizadas en Tritón X-100 al 1%. Los lisados obtenidos fueron colocados en una gradiente discontinua de sacarosa de 5-40% y centrifugados hasta el equilibrio a 46.000 rpm por 18 h. Posteriormente, se recolectaron 12 fracciones y las proteínas de cada fracción fueron separadas por SDS-PAGE y fueron detectadas mediante Western blot usando un anticuerpo anti-HA. Estas dos proteínas quiméricas que contienen el dominio de transmembrana del LRP no se encuentran en las fracciones de balsas lipídicas.

El siguiente paso en este trabajo fue identificar la(s) señal(es) apicales que existen en el dominio citoplasmático de megalina. Como primera etapa, se acotó la región del dominio citosólico del receptor que contenía la información de destinación apical. Para ello, se generaron quimeras formadas por el ectodominio y el dominio de transmembrana del reportador, fusionados con el dominio citoplasmático de megalina truncado en diferentes partes (anexo 3). Específicamente, se generaron productos truncados correspondientes a los primeros 30 aminoácidos del dominio citosólico de megalina y se aumentó el número de aminoácidos en 30 para cada construcción. Las diferentes quimeras se expresaron en células MDCK para determinar su localización celular por microscopía confocal o biotinylation selectiva. Los resultados muestran que construcciones que contienen como ectodominio GFP, el dominio de transmembrana de LRP y un dominio citosólico formado por los primeros 150 ó 180 aminoácidos se localizaban de manera preferencial en la superficie apical, similar a lo que ocurre cuando está presente el dominio citoplasmático completo (figura 17). Sin embargo, la quimera que contiene sólo los primeros 120 aminoácidos del dominio citosólico de megalina presentaba una localización no polarizada, sugiriendo que existe información de destinación apical en la región comprendida entre los aminoácidos 120 y 150. Sobre la base de estos datos, se puede descartar un papel dominante del motivo rico en prolina (aminoácidos 164-177) en la localización apical, y del motivo de interacción

con dominios PDZ, que es importante para la localización apical de otras proteínas como CFTR [51].

Posteriormente, se realizaron estudios con el reportador fusionado a formas más cortas del dominio citosólico de megalina. La distribución de la proteína con los primeros 90 aminoácidos del dominio citosólico de megalina resultó ser predominantemente apical, en contraste con las quimeras que contenían solamente los primeros 30 ó 60 aminoácidos, las cuales tenían una localización claramente no polarizada (figura 18). Estos datos sugieren que entre los residuos 60 y 90 del dominio citosólico de megalina también existiría información de destinación apical. Interesantemente, entre los aminoácidos 60 y 120 de la región del dominio citosólico existen dos motivos basados en tirosina (NPxY y NxxY) (anexo 3) que han sido descritos como señales de destinación basolateral en otras proteínas como el receptor de LDL-R [92]. Para dilucidar el papel de los motivos que se encuentran en esta región, se mutaron los residuos de tirosina del primer motivo NPxY y del motivo NxxY en el dominio citosólico del receptor puesto en contexto de la proteína reportadora. La distribución de estas quimeras fue seguida por microscopía confocal. Los resultados muestran que la quimera con el primer motivo NPxY mutado (Y80A) presenta una distribución no polarizada, a diferencia de la quimera con el motivo NxxY mutado (Y106A), la cual se localiza apicalmente, al igual que la proteína con el dominio citosólico sin modificaciones (figura 19). Estos resultados sugieren que el primer motivo NPxY sería una señal apical y que el motivo NxxY no constituye una señal de

destinación. Además, cuando se mutaron los dos motivos basados en tirosina (Y80A/Y106A) se encontró que la proteína se localizaba apicalmente (figura 19), sugiriendo que en la ausencia de estos motivos existiría otra señal apical que posiblemente se encuentra en la parte final del dominio citosólico del receptor.

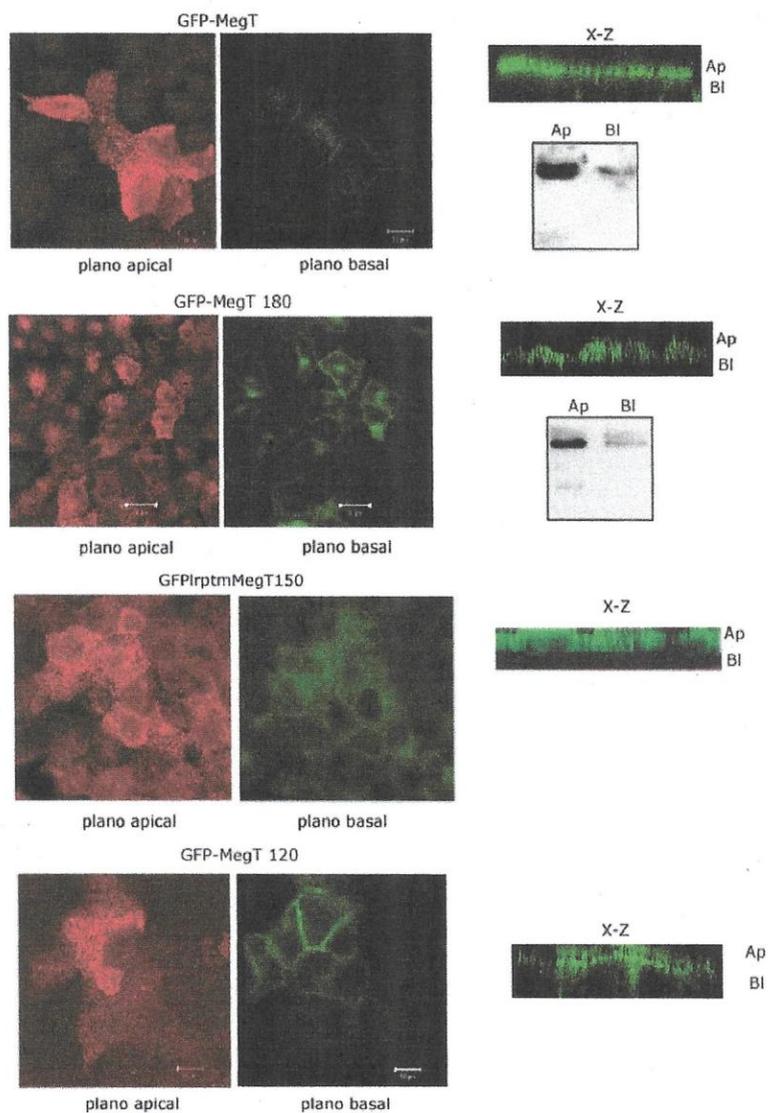


Figura 17. Localización de quimeras de GFP fusionadas a formas truncadas del dominio citoplasmático de megalina en células MDCK. Células que expresan las quimeras fueron cultivadas en portaobjetos hasta confluencia y fijadas con 2% paraformaldehído. Las proteínas fueron detectadas usando un anticuerpo anti-HA y un segundo anticuerpo anti-ratón cy3 (rojo) o analizada directamente por la fluorescencia del GFP (verde). La marca roja muestra la localización apical de la proteína y el verde muestra el lado basolateral. En algunos casos, se muestra la biotilación selectiva de las proteínas de la superficie. Los resultados muestran que las quimeras con los primeros 150 aminoácidos del dominio citosólico de megalina, presentan una localización predominantemente apical a diferencia de la quimera que contiene los 120 aminoácidos del dominio citosólico de megalina, la cual se distribuye en forma no polarizada. Las barras equivalen a 10 μm .

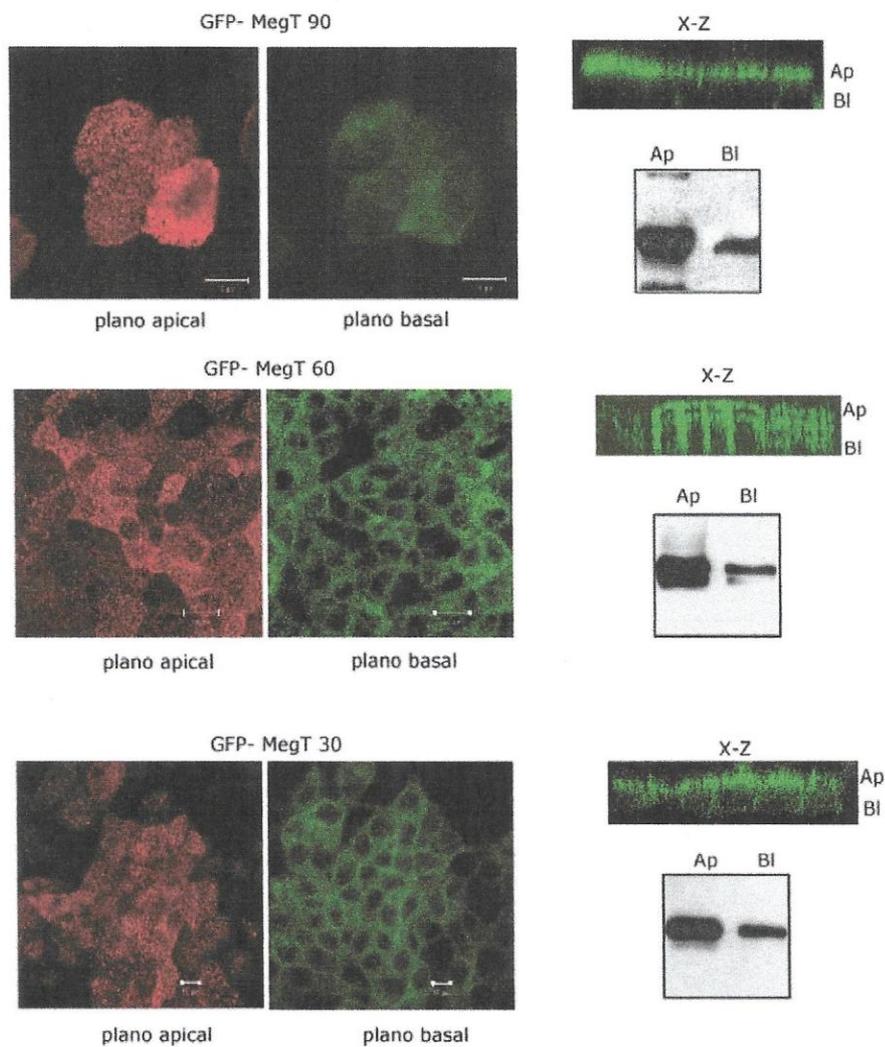


Figura 18. Localización de quimeras de GFP fusionadas a formas truncadas del dominio citoplasmático de megalina en células MDCK. Células que expresan las quimeras fueron cultivadas en portaobjetos hasta confluencia y fijadas con 2% paraformaldehído. Las proteínas fueron detectadas usando un anticuerpo anti-HA y un segundo anticuerpo anti-ratón cy3 (rojo) o analizada directamente por la fluorescencia del GFP (verde). La marca roja muestra la localización apical de la proteína y el verde muestra el lado basolateral. También se realizó la biotilación selectiva de células MDCK cultivadas en filtros de cámaras bilaterales hasta confluencia. Los resultados muestran que las quimeras con los primeros 90 aminoácidos del dominio citosólico de megalina, presentan una localización predominantemente apical a diferencia de la quimera que contiene los 30 ó 60 aminoácidos del dominio citosólico de megalina, la cual se distribuye en forma no polarizada. Las barras equivalen a 10 μ m.

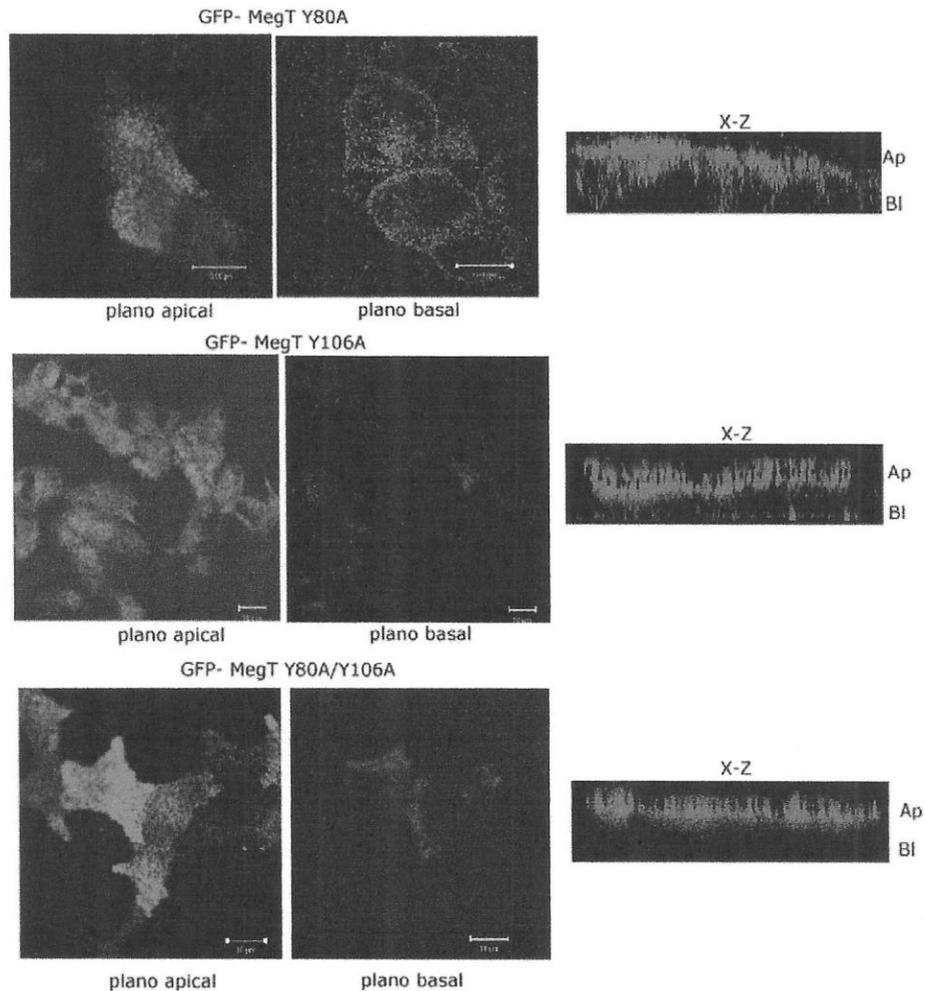


Figura 19. Localización polarizada en células MDCK de quimeras de GFP fusionadas a formas del dominio citoplasmático de megalina con mutaciones en los motivos de tirosina. Células que expresan las quimeras fueron cultivadas en portaobjetos hasta confluencia y fijadas con 2% paraformaldehído. Las proteínas fueron detectadas usando un anticuerpo anti-HA y un segundo anticuerpo anti-ratón cy3 (rojo) o analizada directamente por la fluorescencia del GFP (verde). La marca roja muestra la localización apical de la proteína y el verde muestra el lado basolateral. La mutante del motivo NPxY (Y80A) pierde su polaridad, en cambio mutación del motivo NxxY no afecta la distribución apical de la quimera. Las barras equivalen a 10 μm .

A partir de los datos obtenidos se puede concluir que en el dominio citoplasmático de megalina pueden coexistir diferentes señales. Por otro lado, los experimentos fueron realizados en estado estacionario, por lo que no se puede deducir si la información del dominio citosólico actúa como una señal de destinación directa o indirecta a la superficie apical. En este sentido, es posible que estos motivos basados en tirosina funcionen como señales apicales durante el proceso de segregación que ocurre en TGN, lo cual permitiría su destinación directa al dominio apical, o en endosomas, después de la internalización del receptor desde la membrana plasmática.

Para poder caracterizar mejor la(s) señal(es) apical(es) presentes en megalina, se planteó analizar la ruta secretora del receptor "targeting", es decir el estudio de la ruta que sigue el receptor desde su síntesis hasta la membrana plasmática. Debido a que no se contaba con una línea celular epitelial bien polarizada que expresara niveles elevados de megalina endógena, se realizaron los estudios de "targeting" en células MDCK transfectadas con el minireceptor formado por el cuarto dominio de unión a ligandos de LRP, el dominio de transmembrana de LRP y el dominio citosólico completo de megalina (figura 3). Mediante estudios de biotilación selectiva de proteínas de la superficie, se encontró que en estado estacionario el minireceptor se localiza en la superficie apical, al igual que la proteína endógena (figura 12). Posteriormente, se realizaron los estudios de targeting del receptor en células MDCK transfectadas con el minireceptor de megalina. Los resultados indican que inicialmente el

receptor se encuentra en ambos dominios de la superficie celular (apical y basolateral) y que a tiempos mayores (240 min) fue enriqueciéndose en la superficie apical (figura 20A y C). Las células estaban bien polarizadas ya que la proteína endógena gp80 fue secretada correctamente al lado apical (figura 20B). En relación con la localización polarizada de megalina, es importante destacar que a pesar de observarse un enriquecimiento del receptor en la superficie apical a tiempos mayores de caza (4 h), siempre se detectó una cantidad importante de la proteína en el dominio basolateral. Estos datos no muestran una coincidencia con los estudios de la polaridad del receptor en estado estacionario (figura 12) donde no se detectó la proteína en el lado basolateral. La diferencia entre estos resultados puede deberse a que el método de marcación metabólica resulta ser más sensible que el análisis de proteínas por Western Blot y es posible que en este último caso la técnica empleada no permitió detectar el receptor en el lado basolateral. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos se puede especular varias alternativas: 1) El receptor llegaría a ambos lados de la superficie celular y luego se estabiliza en la superficie apical por un mecanismo de de retención selectiva. 2) La proteína presente en la membrana basolateral sería endocitada y transportada al lado apical. Alternativamente, la detección del receptor en el lado basolateral durante todos los tiempos de caza podría reflejar un proceso de transcitosis de megalina desde el dominio apical al basolateral que es un fenómeno ya

descrito para el receptor. Sin embargo, esto es menos probable, ya que esto se evidenciaría también en estado estacionario.

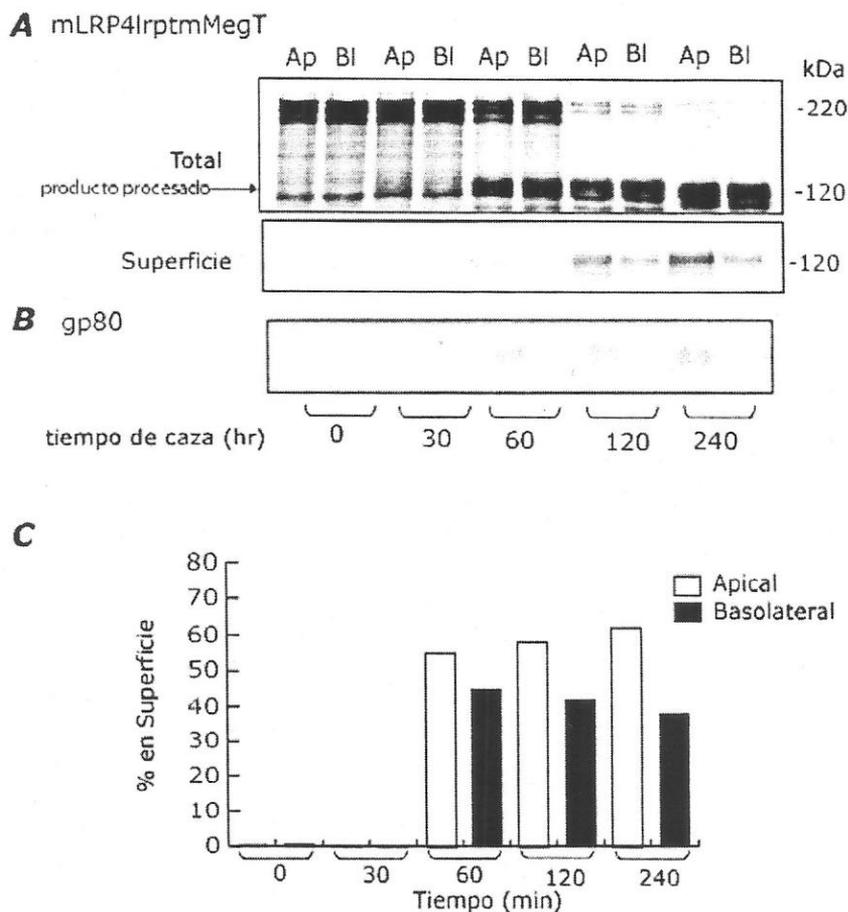


Figura 20. Análisis de la ruta secretora de megalina. Células MDCK que expresan el minireceptor mLRP4lrptmMegT se cultivaron sobre filtros en cámaras bilaterales hasta formar una monocapa confluyente y se marcaron metabólicamente con 200 μ Ci de metionina/cisteína- 35 S por 45 min. Las proteínas marcadas se acumularon en el Golgi a 19 $^{\circ}$ C durante 1h y 30 min y se cazaron a 37 $^{\circ}$ C por distintos tiempos. Luego, las células se llevaron a 4 $^{\circ}$ C y se biotinilaron las proteínas de la superficie apical (Ap) o basolateral (Bl). El total del minireceptor fue inmunoprecipitado con anti-HA proteína-A sefarosa y 1/5, de la muestra inmunoprecipitada fue analizada por SDS-PAGE (TOTAL). Las proteínas de la superficie se reprecipitaron desde 4/5 partes del inmunoprecipitado total con esferas de agarosa-estreptavidina y se analizaron por SDS-PAGE al 6%. A) Autoradiografía del minireceptor total y de la superficie celular para cada tiempo de caza. Se observa la aparición de los fragmentos procesados del minireceptor después de 1 h de caza. B) Detección de la proteína de secreción gp80 desde el medio donde se cultivaron y marcaron metabólicamente las células. Se observa que la proteína es sólo secretada al medio apical, lo cual muestra que las células estaban bien polarizadas. C) El minireceptor presente en la superficie se cuantificó utilizando el programa Quantity One de BioRad.

2. Estudio de la Fosforilación del Dominio Citosólico de Megalina:

Resultados obtenidos en el laboratorio, anterior al desarrollo de este trabajo, muestran que el dominio citoplasmático de megalina es fuertemente fosforilado *in vivo* (figura 21). Esta característica del dominio citosólico sugiere que la fosforilación es importante para la función del receptor y podría ser un elemento que regula el tráfico celular de megalina. En el dominio citosólico del receptor existen 4 sitios putativos de fosforilación por PKC, ocho por caseína quinasa II (CK-II) y uno por PKA (figura 2). Antes de explorar el papel de la fosforilación de megalina en el tráfico del receptor, primero fue necesario identificar el o los sitios donde se estaba fosforilando el dominio citosólico de megalina. Para ello, se utilizó el modelo del minireceptor (mLRP4lrptmMegT), el cual mostramos que también se fosforilaba fuertemente *in vivo* en células transfectadas (figura 21). En este caso es importante señalar que el minireceptor posee un sitio de procesamiento por furina en su ectodominio, por lo tanto, al ser transportado al Golgi es procesado por esta enzima generando 2 productos: uno de 120 kDa que contiene el ectodominio y otro de 97 kDa que posee el dominio citosólico del receptor. En estado estacionario, la fosforilación del fragmento de 97 kDa es mucho más significativa comparada con la de la forma no procesada. Esto sugiere que la fosforilación del dominio citosólico ocurriría principalmente después del paso del receptor por el Golgi.

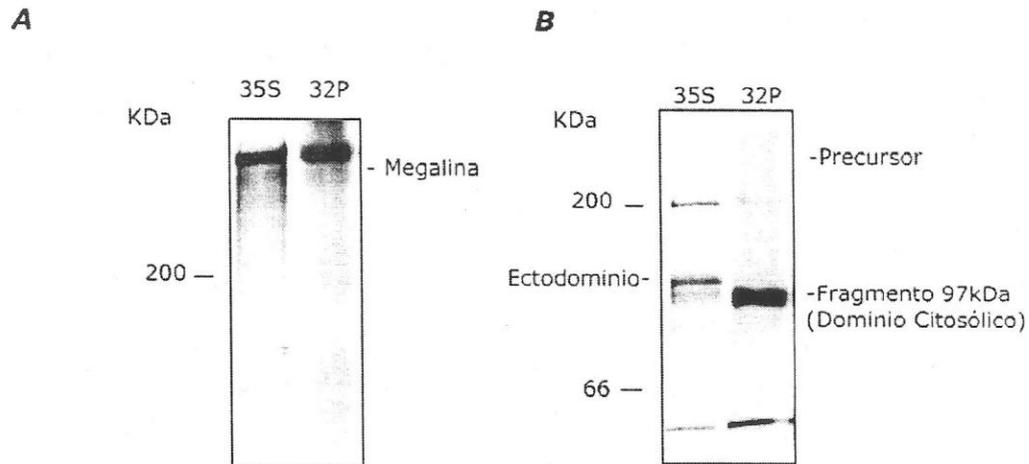


Figura 21. Fosforilación de megalina. A) Células BN que expresan megalina o B) Células CHO transfectadas con el minireceptor mLRP4lrptmMegT se marcaron metabólicamente con metionina/cisteína- ^{35}S por 4 horas o con ortofosfato- ^{32}P por 90 min. Luego, las células se lisaron y megalina endógena y el minireceptor fueron inmunoprecipitados usando un anticuerpo que reconoce el dominio citosólico del receptor y un anticuerpo anti-HA para las respectivas proteínas. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por SDS-PAGE y autoradiografía. Se observa que megalina y el minireceptor son fuertemente fosforilados in vivo. Además, en el minireceptor se destaca la fosforilación del fragmento de 97 kDa que contiene el dominio citosólico del receptor.

Para determinar si la fosforilación del dominio citosólico de megalina era dependiente de la unión de ligandos al ectodominio, se analizó la fosforilación de la quimera que contiene GFP como ectodominio, el dominio de transmembrana y dominio citosólico de megalina. En este caso, se encontró que el receptor se fosforilaba en forma importante (figura 22), sugiriendo que al menos una parte importante de la fosforilación del receptor ocurriría en forma constitutiva y de manera independiente de la unión de ligandos al ectodominio.

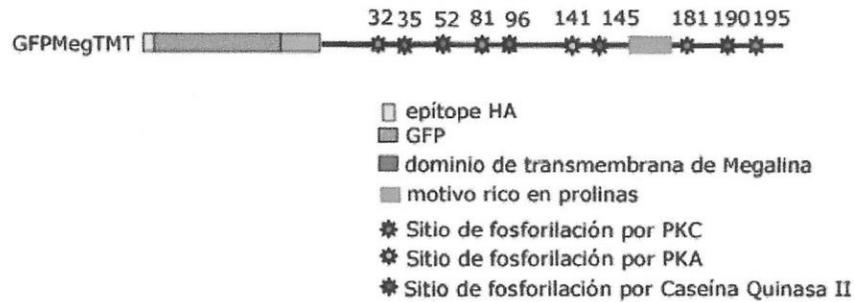
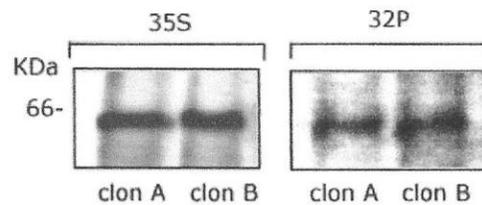
A**B**

Figura 22. Fosforilación del minireceptor GFPMegTMT en células MDCK A) Esquema del minireceptor B) Dos clones de células MDCK transfectadas establemente con la quimera se marcaron metabólicamente con metionina/cisteína-³⁵S por 4 horas o con ortofosfato-³²P por 90 min. Luego, las células se lisaron y GFPMegTMT fue inmunoprecipitada usando un anticuerpo anti-HA. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por SDS-PAGE y autoradiografía. Se observa que el minireceptor con ectodominio de GFP es fuertemente fosforilado *in vivo*, sugiriendo que la fosforilación del dominio citosólico de megalina puede ocurrir en ausencia de ligando en forma constitutiva.

Dado que resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio mostraron que *in vitro* el dominio citoplasmático de megalina se fosforilaba por PKC y PKA, se generaron mutaciones en los sitios de consenso para la fosforilación por estas quinasas (figura 5). Posteriormente, se realizaron estudios de fosforilación *in vivo* utilizando células CHO que expresaban establemente las diferentes construcciones y se comparó el nivel de la fosforilación del receptor mutado versus el sin mutar. Los resultados muestran que las mutantes de sitios de consenso para PKC o para PKA no presentan un menor nivel de fosforilación comparado con el receptor sin mutar (figuras 23, 24 y 25). Los datos sugieren que estos motivos no se fosforilan *in vivo* o que habría más de un sitio de fosforilación en el dominio citosólico del receptor, o que el método usado para medir cambios en el nivel de fosforilación de las mutantes únicas no era suficientemente sensible.

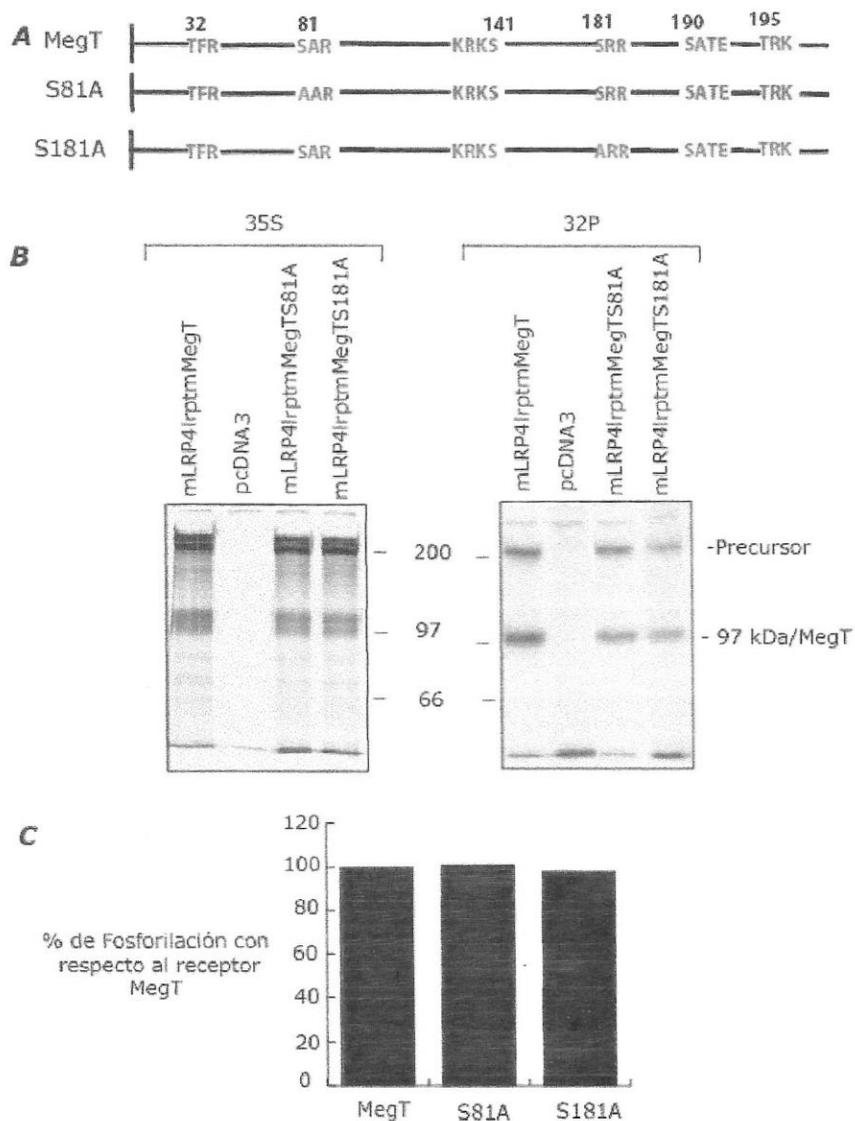


Figura 23. Análisis de la fosforilación de los minireceptores en células CHO transfectadas en forma estable. A) Esquema de las mutantes generadas. B) Las líneas celulares se marcaron con metionina/cisteína- ^{35}S por 4 horas o con ortofosfato- ^{32}P por 2 h. Los minireceptores fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA y analizados mediante SDS-PAGE 6%. C) Cuantificación de las bandas de proteína mediante densitometría con un phosphoimager. El porcentaje de fosforilación se calculó como la intensidad obtenida por la marca de ^{32}P dividida por la marca correspondiente a ^{35}S . A la razón obtenida para el receptor sin modificaciones (MegT) se le asignó un 100%.

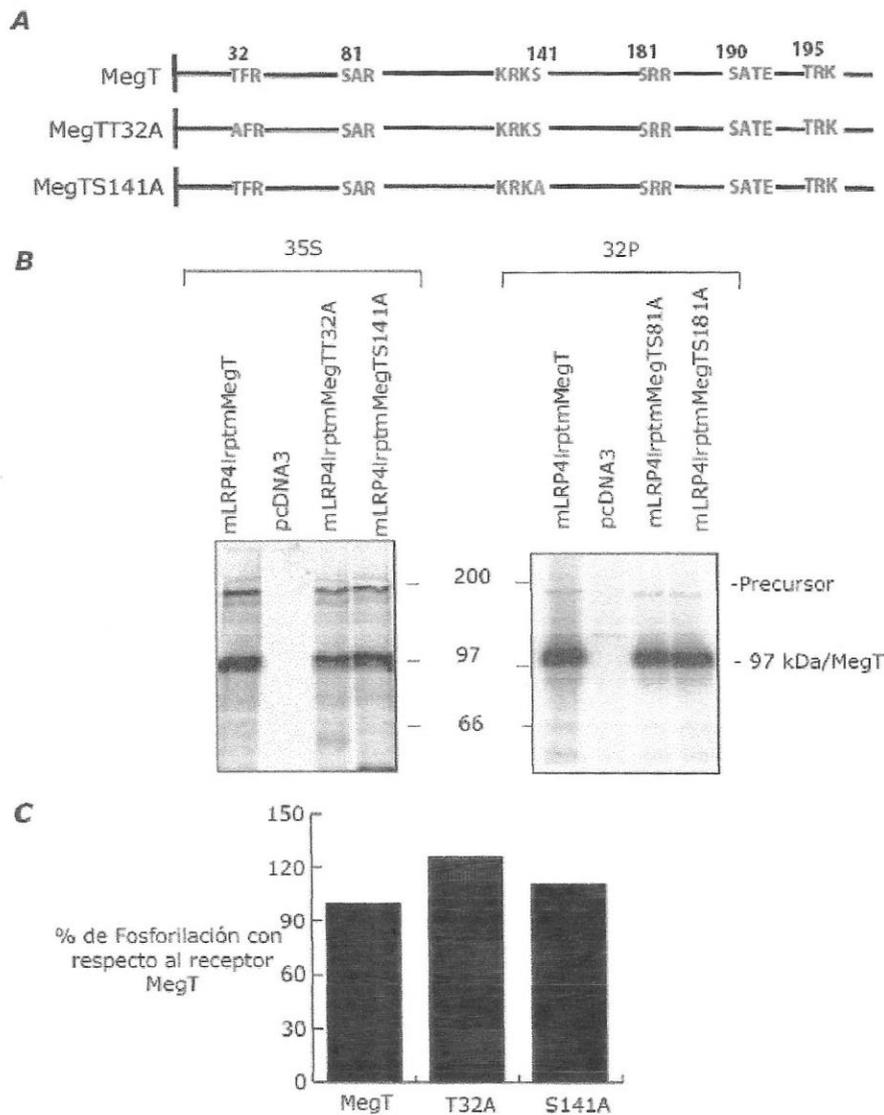


Figura 24. Análisis de la fosforilación de minireceptores en células CHO transfectadas en forma estable. A) Esquema de las mutaciones puntuales generadas. B) Las líneas celulares se marcaron con metionina/cisteína- ^{35}S por 4 horas o con ortofosfato- ^{32}P por 2 h. Los minireceptores fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA y analizados mediante SDS-PAGE 6%. C) Cuantificación de las bandas de proteína por densitometría con un phosphoimager. El porcentaje de fosforilación se calculó como la intensidad obtenida por la marca de ^{32}P dividida por la marca de ^{35}S . A la razón obtenida para el receptor sin modificaciones (MegT) se le asignó un 100%.

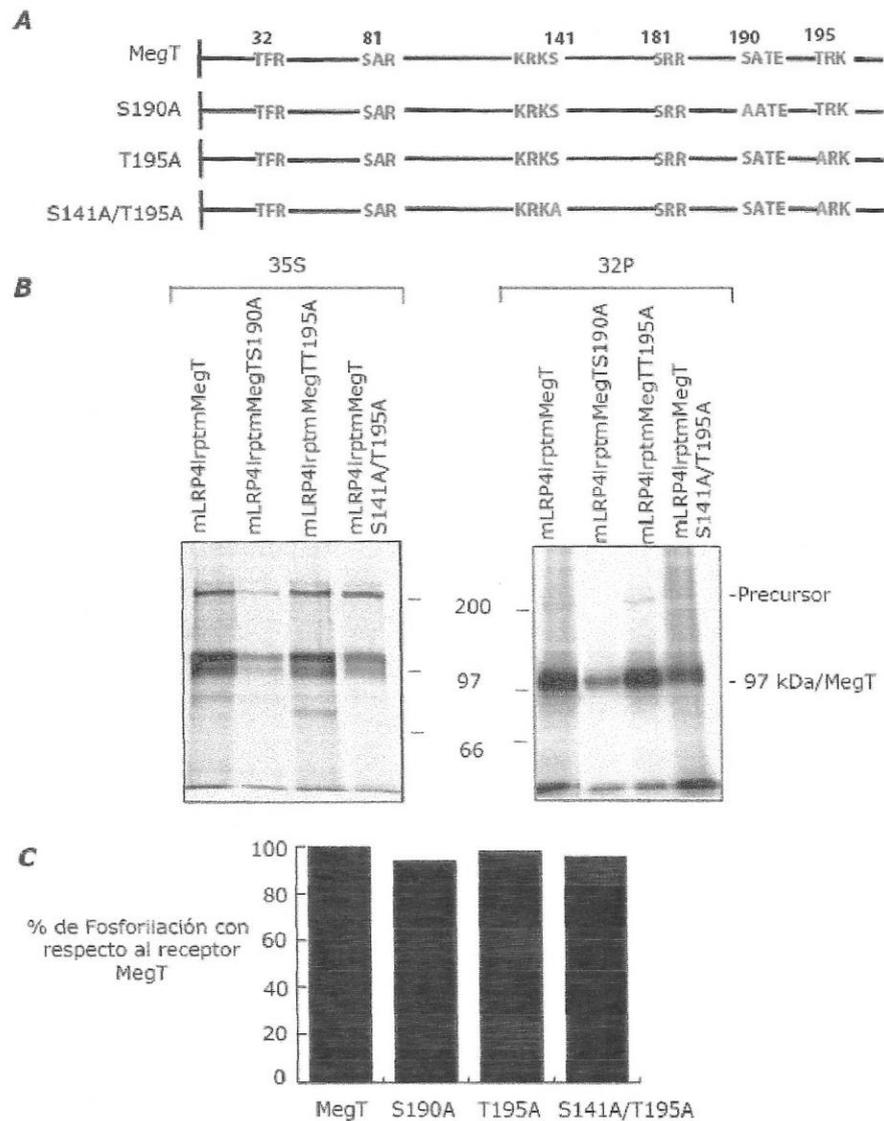


Figura 25. Análisis de la fosforilación de los minireceptores en células CHO transfectadas en forma estable. A) Esquema de las mutantes generadas. B) Las líneas celulares se marcaron con metionina/cisteína- ^{35}S por 4 horas o con ortofosfato- ^{32}P por 2 h. Los minireceptores fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA y analizados mediante SDS-PAGE 6%. C) Cuantificación de las bandas de proteína mediante densitometría con un phosphoimager. El porcentaje de fosforilación se calculó como la intensidad obtenida por la marca de ^{32}P dividida por la marca correspondiente a ^{35}S . A la razón obtenida para el receptor sin modificaciones (MegT) se le asignó un 100%.

Para determinar si el dominio citosólico de megalina se fosforilaba en más de uno de estos motivos de consenso, se generó una mutante con todos los sitios de consenso de fosforilación por PKA y PKC mutados al mismo tiempo (mutante completa). Cuando se analizó el nivel de fosforilación de esta mutante, sólo se encontró una leve disminución del 13% con respecto al minireceptor sin modificaciones en el dominio citosólico (figura 26). Estos datos sugieren que probablemente existen otros aminoácidos del dominio citosólico de megalina que se están fosforilando.

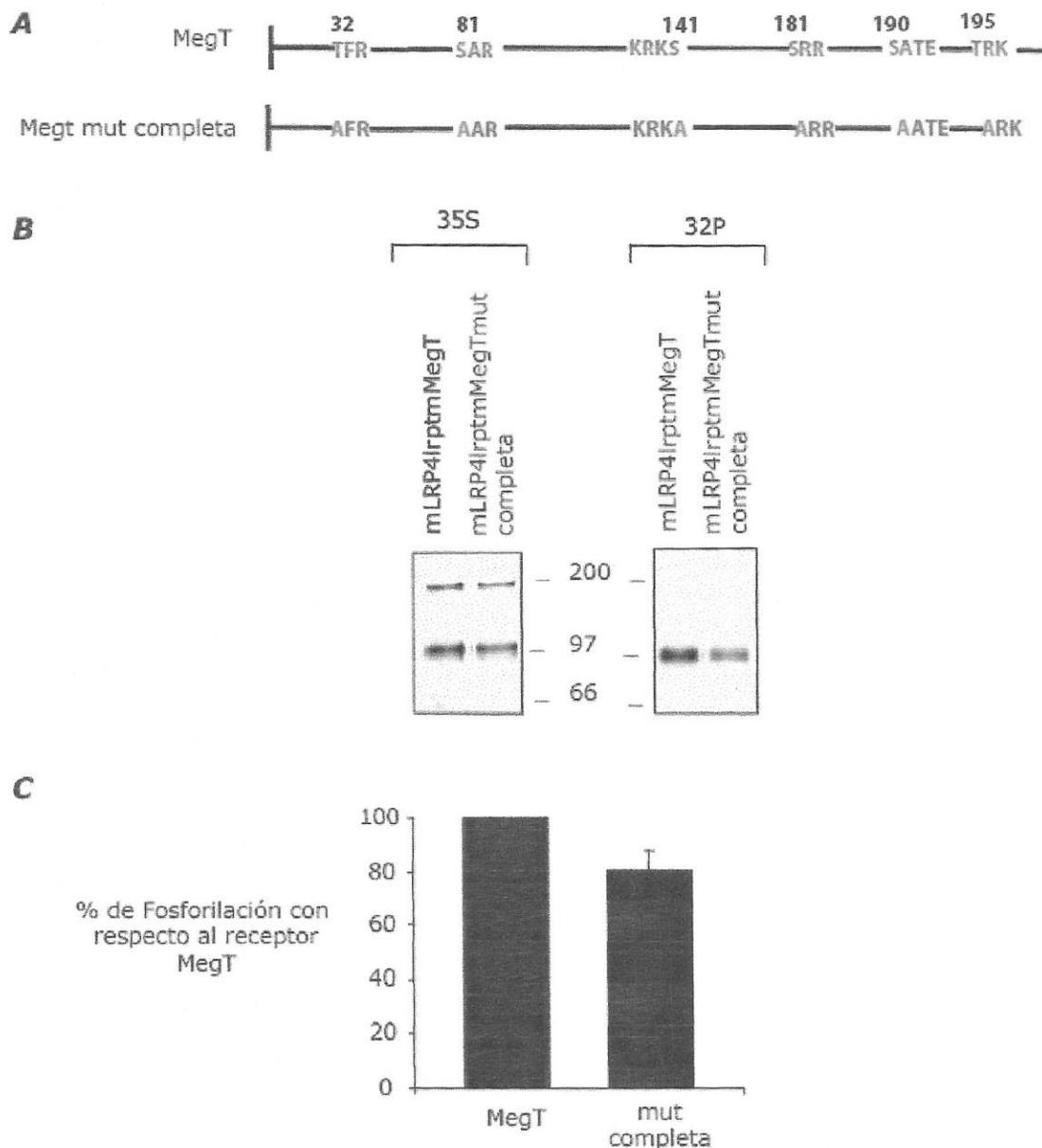


Figura 26. Análisis de la fosforilación del minireceptor con mutaciones en potenciales sitios de fosforilación por PKC y PKA (mut. completa). A) Esquema de las construcciones analizadas. B) Células CHO transfectadas en forma estable se marcaron con metionina/cisteína- ^{35}S por 4 horas o con ortofosfato- ^{32}P por 2 h y los minireceptores se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-HA. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante SDS-PAGE 6%. C) Las bandas de proteína fueron cuantificadas por densitometría y el porcentaje de fosforilación expresado como la intensidad obtenida por la marca de ^{32}P dividida por la marca obtenida por ^{35}S . A la razón obtenida para la cola sin modificaciones (MegT) se le asignó un 100%.

En un posterior intento de dilucidar el sitio de fosforilación, se decidió analizar el papel que podría tener la caseína quinasa II, ya que también existen sitios de consenso de fosforilación por esta quinasa que no han sido mutadas (figura 2). Como primera aproximación, se realizaron estudios de fosforilación *in vivo* en presencia de inhibidores de la CK-II (DRB y A3) tanto del minireceptor con el dominio citosólico sin mutaciones como del minireceptor que contiene todos los sitios de consenso de fosforilación por PKC y PKA mutados. Nuestros resultados sugieren que caseína quinasa II tendría un papel en la fosforilación de este receptor ya que en presencia de inhibidores para CK-II, la fosforilación del dominio citosólico del minireceptor, sin modificaciones, disminuyó en un 40% (figura 27).

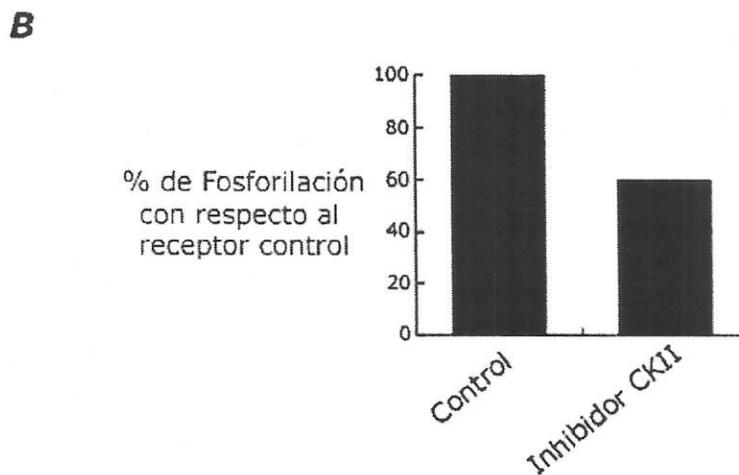
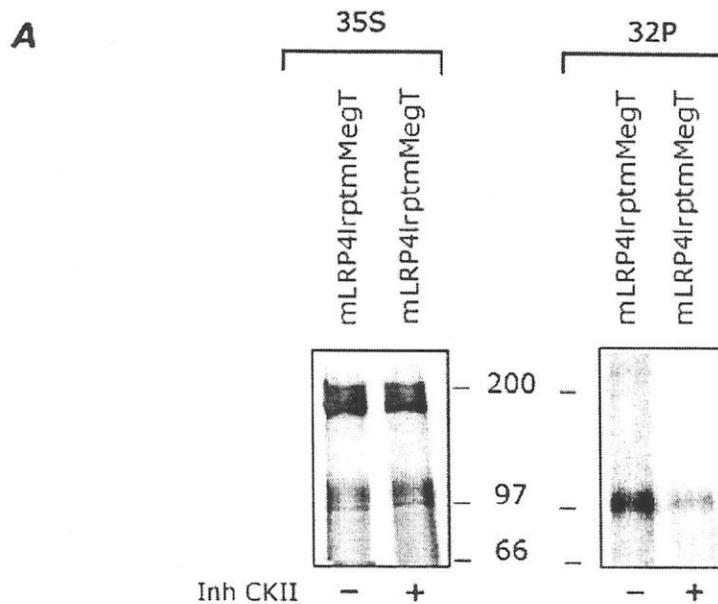


Figura 27. Efecto de inhibidores de la caseína quinasa II (CKII) en la fosforilación del minireceptor. A) Células CHO transfectadas en forma estable se marcaron con metionina/cisteína- ^{35}S o con ortofosfato- ^{32}P en presencia o ausencia de inhibidores para la CKII (DRB y A3 $100\ \mu\text{M}$). Los minireceptores se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-HA, se analizaron mediante SDS-PAGE al 6%, y se cuantificaron mediante densitometría con un phosphoimager. El porcentaje de fosforilación está expresado como la intensidad obtenida por la marca de ^{32}P dividida por la marca obtenida por ^{35}S . A la fosforilación del receptor sin drogas se le asignó un 100%. En presencia de inhibidores para CKII, la fosforilación del receptor disminuyó en un 40%

Además, cuando se analizó el efecto de inhibidores de CK-II en la fosforilación del minireceptor con todos los sitios PKC y PKA mutados, se observó una disminución aún más significativa (70%) en el nivel de la fosforilación. Por otro lado, la presencia de inhibidores de PKC no generó cambios muy significativos en la fosforilación de este mutante (figura 28). Estos resultados sugieren que la fosforilación de megalina es un proceso complejo que ocurriría en más de un sitio y que podría estar mediado por distintos tipos de quinasas.

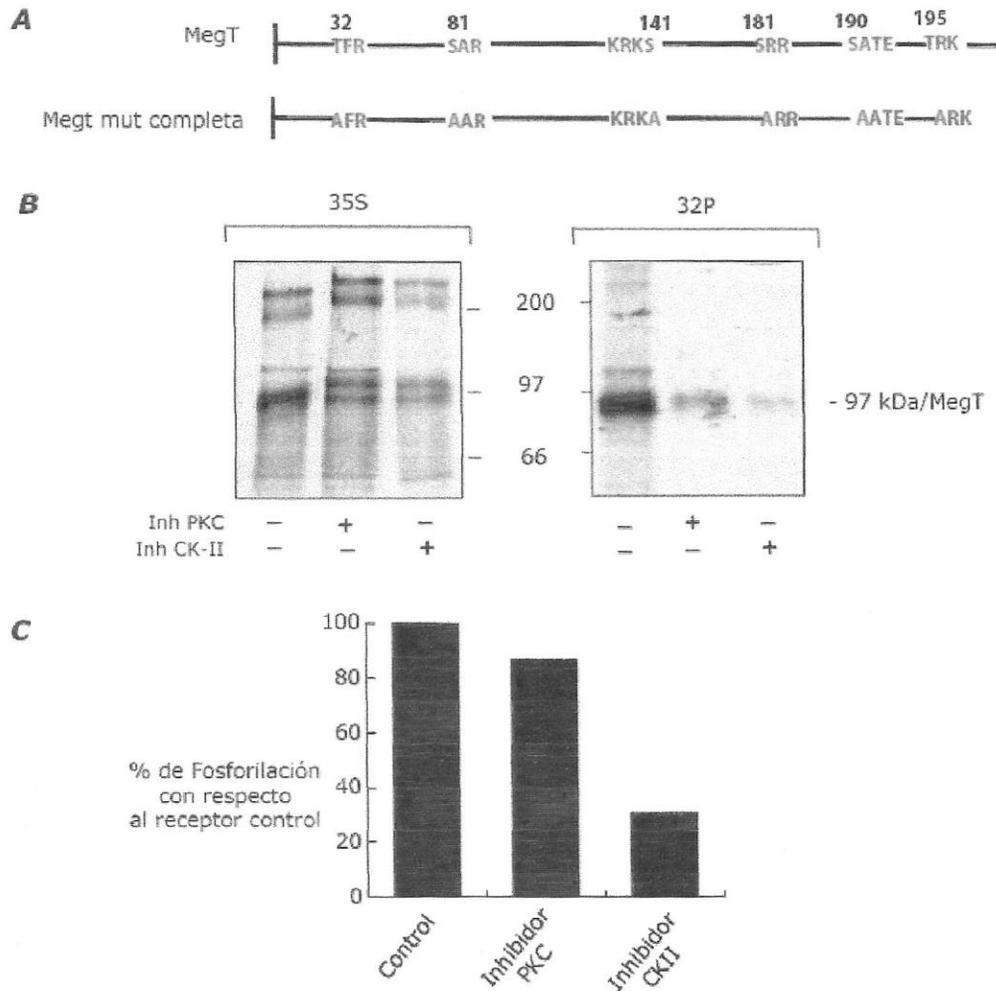


Figura 28. Efecto de inhibidores de quinasas en la fosforilación de la mutante con todos los sitios de consenso para PKC y PKA mutados (mut. completa). A) Esquema de la construcción mutada. B) Células CHO que expresan los minireceptores se marcaron con metionina/cisteína- ^{35}S o con ortofosfato- ^{32}P en presencia o ausencia de inhibidores para la PKC (péptido myr 10 μM y 6F 0.5 μM) o para la Caseína Quinasa II (CK-II) (DRB y A3 100 μM). Los minireceptores fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-HA y analizados mediante SDS-PAGE 6%. C) Las bandas de proteína fueron cuantificadas por densitometría y el porcentaje de fosforilación expresado como la intensidad obtenida por la marca de ^{32}P dividida por la marca obtenida por ^{35}S . A la razón obtenida para la condición sin inhibidores (control) se le asignó un 100%.

Dado que las mutantes puntuales no generaron cambios muy significativos en la fosforilación del receptor, se decidió analizar las formas truncadas del dominio citoplasmático de megalina y de esta manera acotar los sitios de fosforilación del receptor. Para ello, se construyeron minireceptores que contenían distintas porciones del dominio citosólico de megalina, partiendo de los primeros 30 aminoácidos del dominio citoplasmático y aumentando 30 aminoácidos más para cada construcción (anexo 2). Ensayos de fosforilación *in vivo* de estas construcciones muestran que, sorprendentemente, todas las formas truncadas de megalina se fosforilan (figura 29). Este resultado sugiere que existirían múltiples sitios de fosforilación localizados a lo largo del dominio intracelular del receptor, lo cual comprueba que éste sería un proceso muy complejo. Además, concuerda con los datos obtenidos anteriormente que mostraban sólo una leve disminución en el nivel de fosforilación de la mutante que contiene todos los sitios de consenso para PKC y PKA mutados. Por otro lado, sorprende que el minireceptor que contiene sólo los 30 primeros aminoácidos del dominio citosólico de megalina sea fosforilado *in vivo*. Estudios usando inhibidores para quinasas específicas sugieren que esta fosforilación es dependiente de PKC y/o CK-II, pero no de PKA (figura 30). Finalmente, es importante destacar que la fosforilación de estas formas truncadas del receptor no necesariamente refleja lo que ocurre *in vivo* con el receptor ya que la eliminación de regiones del dominio citoplasmático podría

exponer motivos de fosforilación que no serían funcionales en contexto del receptor completo.

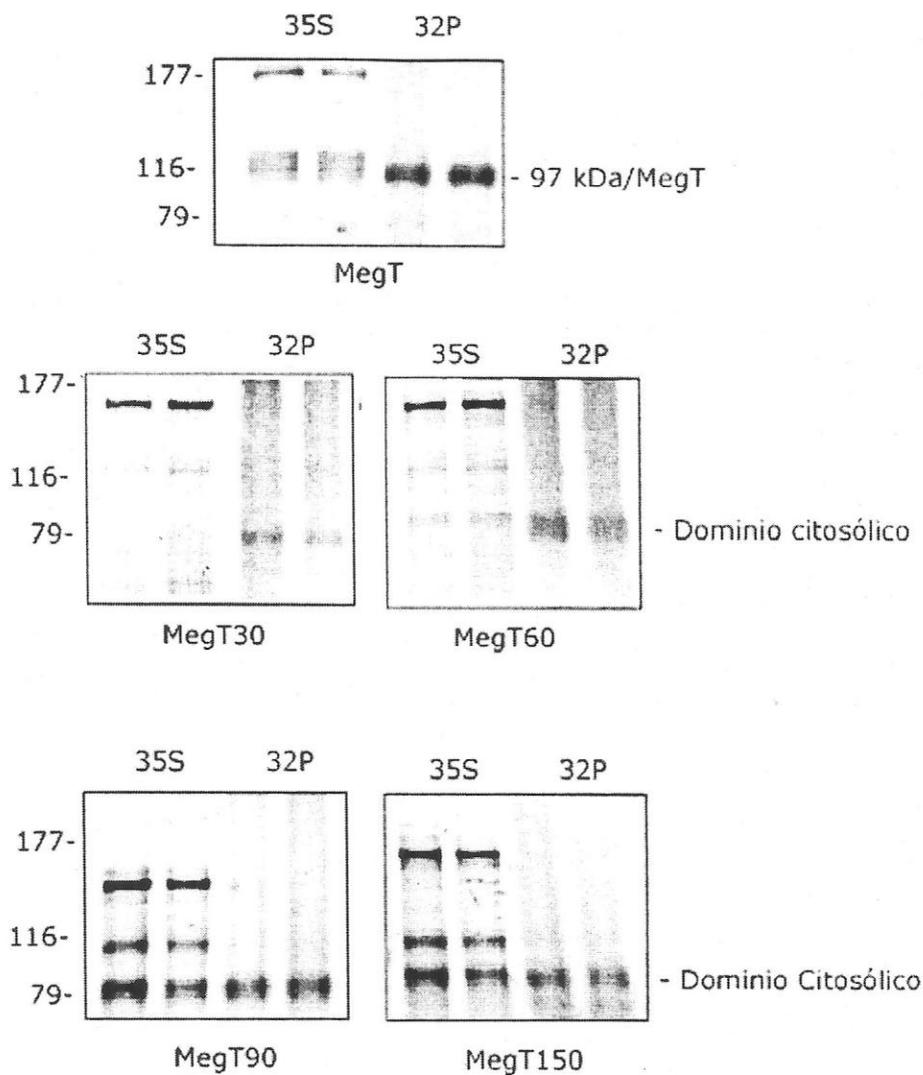


Figura 29. Análisis de la fosforilación de minireceptores con el dominio citosólico de megalina truncado. Células CHO transfectadas con los diferentes minireceptores truncados se marcaron con metionina/cisteína- ^{35}S por 4 horas o con ortofosfato- ^{32}P por 2 h. Los minireceptores fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA y proteína A y analizados mediante SDS-PAGE al 6%. En todas las construcciones analizadas se observa fosforilación del dominio citosólico de megalina, sugiriendo que el receptor se fosforila en varios sitios.

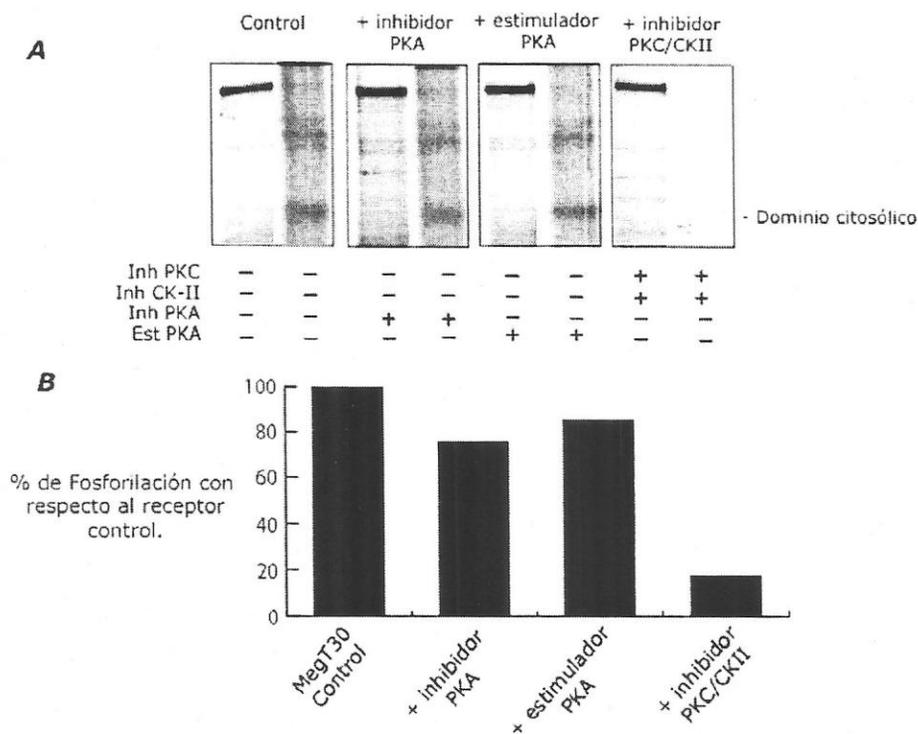


Figura 30. Efecto de inhibidores de quinasas en la fosforilación del minireceptor truncado MegT30. Líneas celulares CHO transfectadas con el minireceptor T30 se marcaron con metionina/cisteína- ^{35}S por 4 horas o con ortofosfato- ^{32}P por 2 h. en presencia o ausencia de inhibidores para la Caseína Quinasa II (CK-II) (DRB y A3 100uM) y proteína Quinasa C (PKC) (péptido myr 10 μM y GF 0.5 μM), inhibidores de la proteína Quinasa A (PKA) (H89 5 μM) o un estimulador de la PKA (Forskolin 50 μM). A) Los minireceptores fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA y analizados mediante SDS-PAGE 6%. B) Cuantificación de las bandas de proteína por densitometría. El porcentaje de fosforilación se calculó como la intensidad obtenida por la marca de ^{32}P dividida por la marca obtenida por ^{35}S . A la razón obtenida para el receptor sin drogas (control) se le asignó un 100%.

2.1. Identificación del Principal Motivo de Fosforilación en el Dominio Citoplasmático de Megalina.

Dentro del dominio citoplasmático de megalina también existen motivos de interacción con dominios SH3 y PDZ. Proteínas de andamiaje, que contienen este tipo de motivos, participan en eventos de transducción de señales de receptores a través del reclutamiento de moléculas señalizadoras, como proteínas quinasas [93]. Estos motivos podrían estar involucrados en la fosforilación de megalina, de manera indirecta, a través del reclutamiento de proteínas quinasas que fosforilan el dominio citosólico del receptor, como ocurre en otras proteínas de membrana. Es el caso de la subunidad α de la Na^+/K^+ ATPasa [94], el canal catiónico [95] y el receptor de NMDA [96]. Para evaluar el papel de estos motivos en la fosforilación de megalina, se realizaron estudios de fosforilación *in vivo* de variantes sin el motivo rico en prolina ($\Delta\text{ProRich}$) y el motivo de interacción con dominio PDZ (ΔPDZ) y se comparó su nivel de fosforilación con el del dominio citosólico completo de megalina. Nuestros datos muestran que la variante del minireceptor de megalina, a la cual se le eliminó una región rica en prolinas (aminoácidos 166-174) de la región citoplasmática, presentaba una disminución significativa en el nivel de fosforilación, mientras que en la mutante ΔPDZ no se observaron cambios (figura 31).

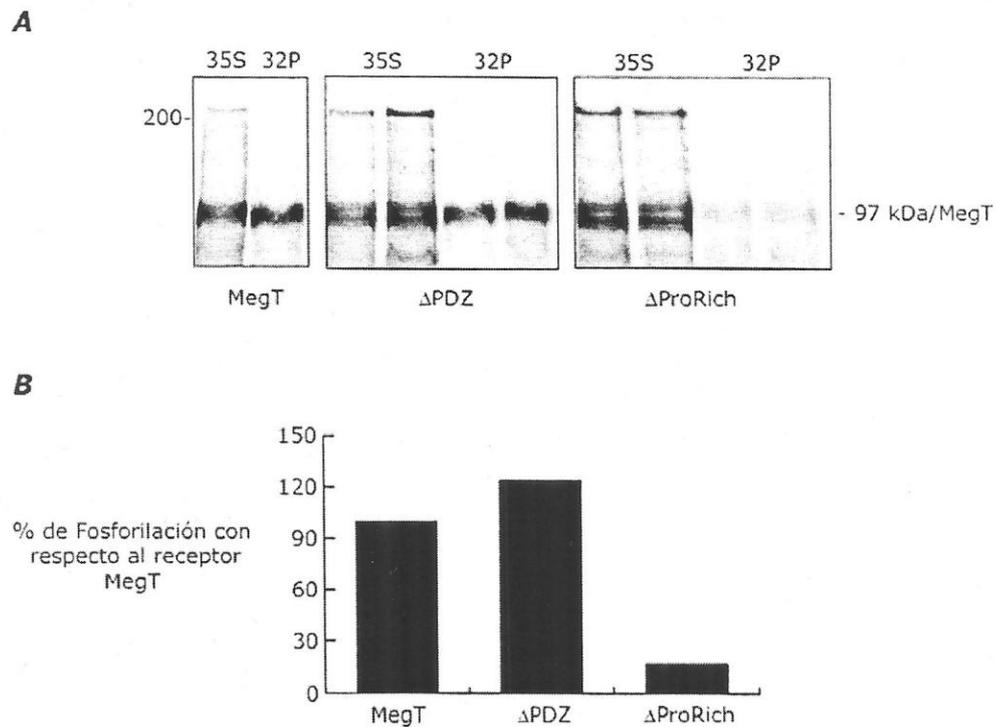


Figura 31. Fosforilación de la mutante sin el motivo rico en prolinas (Δ ProRich) o sin el motivo de unión a dominios PDZ (Δ PDZ). A) Células CHO que expresan establemente los minireceptores, con deleciones en diferentes motivos, se marcaron con metionina/cisteína- ^{35}S por 4 horas o con ortofosfato- ^{32}P por 2 h. Los minireceptores fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA y analizados mediante SDS-PAGE 6%. B) Cuantificación de las bandas de proteína por densitometría con un phosphoimager. Se observa que el receptor sin el motivo rico en prolinas presenta un nivel de fosforilación significativamente menor que el receptor completo.

Los datos obtenidos sugieren que el motivo rico en prolinas podría ser importante para la interacción de alguna quinasa con el dominio citoplasmático del receptor o que dentro del motivo eliminado podría existir un motivo de fosforilación. Al analizar la secuencia de la región rica en prolinas, se encontró un motivo del tipo **PPPSP** recientemente descrito como un motivo de fosforilación de los receptores LRP-5 y LRP-6 que también pertenecen a la familia LDL-R y que constituyen componentes esenciales de la vía señalización por Wnt [97]. Para determinar si en el dominio citosólico de megalina la serina perteneciente al motivo PPPSP también se fosforilaba, se realizó una mutagénesis sitio dirigida para cambiar la serina por alanina (S170A). Nuestros datos muestran claramente que la fosforilación *in vivo* de la mutante disminuyó drásticamente en un 90 % comparado con el receptor sin mutar (figura 32). Este es la primera vez que se muestra que una mutación puntual afecta en forma tan importante el nivel de fosforilación del dominio citoplasmático de megalina. La quinasa involucrada en la fosforilación de este motivo aún no se ha descrito. Para caracterizar la fosforilación remanente que presentaba la mutante S170A, se analizó el efecto de inhibidores de quinasas. Los resultados indican que la fosforilación remanente que se observa en la mutante S170A sería dependiente de PKC, ya que en presencia de inhibidores de esta quinasa, la fosforilación del receptor se eliminó casi completamente (figura 33). Por otro lado, los resultados sugieren que la fosforilación del motivo PPPSP sería dependiente de CK-II, ya que con inhibidores de esta quinasa se observa

una disminución significativa del receptor, similar a lo que se observa con la mutante S170A.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que el motivo PPPSP constituye el sitio principal de fosforilación de megalina y la obtención de esta mutante nos permitió evaluar en qué forma la fosforilación del receptor podría regular procesos de su tráfico celular, como por ejemplo la endocitosis (ver resultados de endocitosis 3.2).

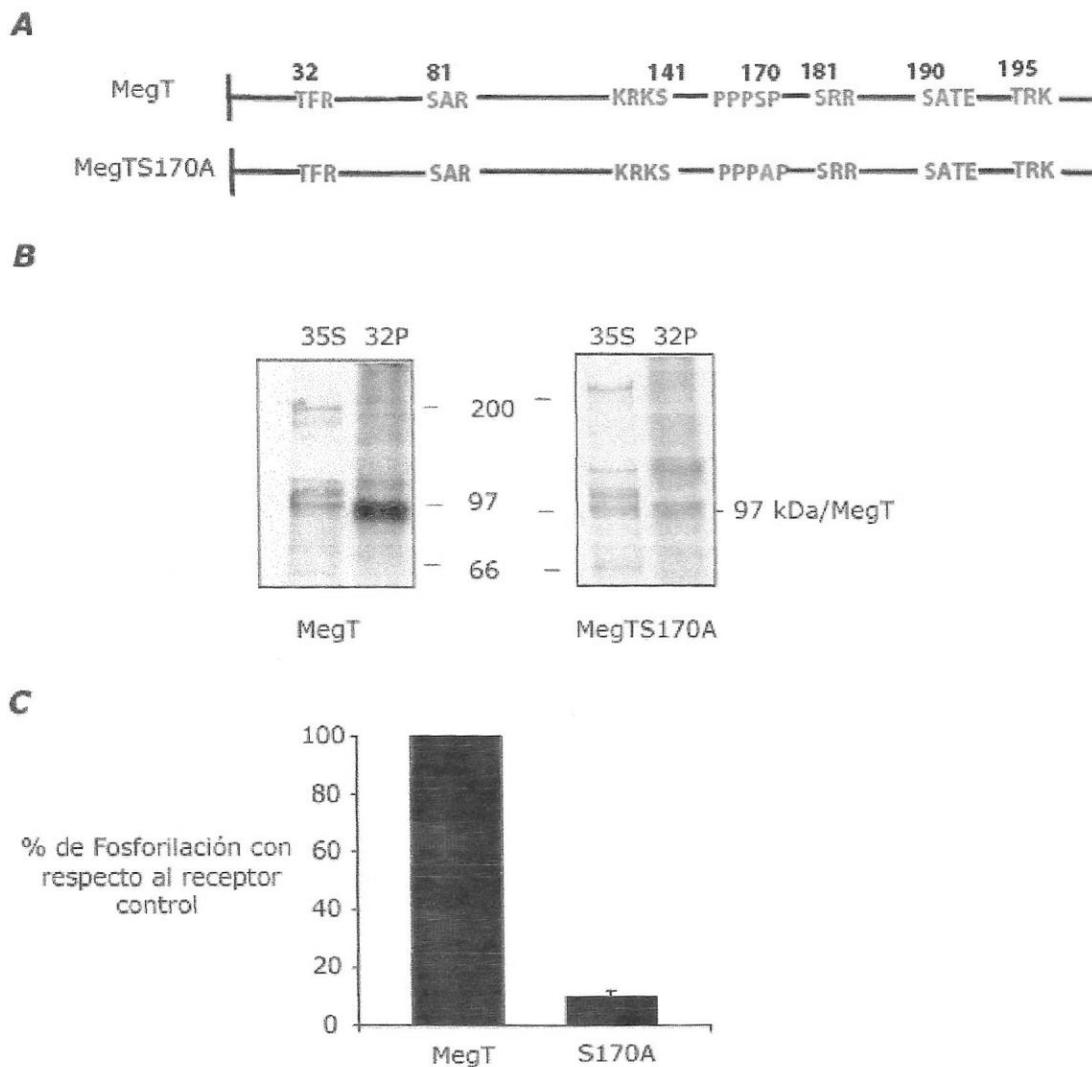


Figura 32. Estudio de Fosforilación de la mutante S170A. A) Esquema de las construcciones analizadas. B) Células CHO transfectadas en forma estable con el minireceptor de megalina con el dominio citosólico sin mutaciones (MegT) o con la mutación en la serina 170 (S170A) se marcaron con metionina/cisteína-³⁵S por 4 horas o con ortofosfato-³²P por 2 h. Los minireceptores fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA y analizados mediante SDS-PAGE 6%. C) Cuantificación de las bandas de proteína por densitometría con un phosphoimager. A la razón obtenida para el minireceptor sin mutaciones (MegT) se le asignó un 100%.

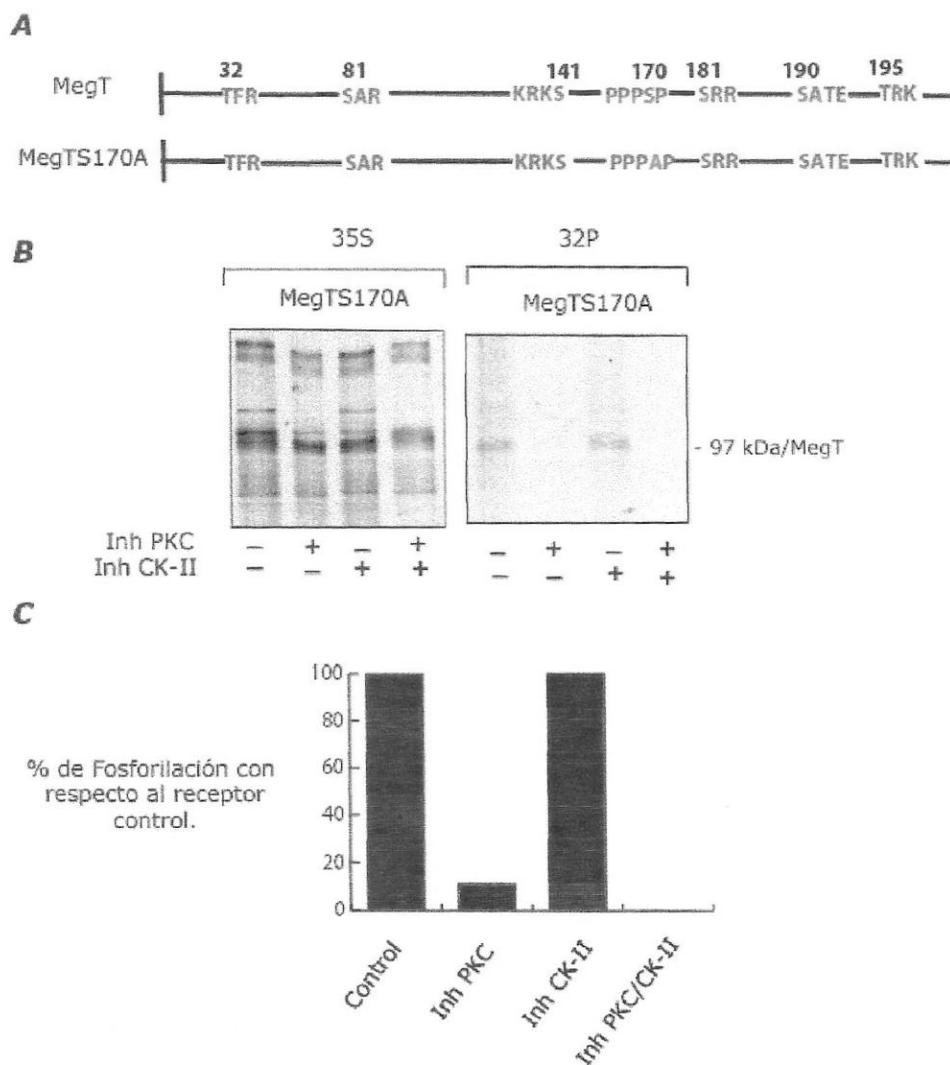


Figura 33. Efecto de inhibidores de quinasas en la fosforilación de la mutante S170A. A) Esquema de las construcciones analizadas. B) Células CHO transfectadas en forma estable con el minireceptor de megalina con el dominio citosólico que contiene la mutación en la serina 170 (S170A) se marcaron con metionina/cisteína- ^{35}S por 4 horas o con ortofosfato- ^{32}P por 2 h en presencia o ausencia de inhibidores para la proteína quinasa C (PKC) (péptido myr 10 μM y 6F 0.5 μM) o con inhibidores de la Caseína Quinasa II (CK-II) (DRB y A3 100 μM). Los minireceptores fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-HA y analizados mediante SDS-PAGE 6%. C) Cuantificación de las bandas de proteína por densitometría. A la razón obtenida para el minireceptor sin inhibidores se le asignó un 100%.

3. Caracterizar la Ruta Endocítica de Megalina en Células no Polarizadas y su Regulación:

3.1. Evaluación de la Participación de los Motivos de Endocitosis de Megalina en la Internalización y Tráfico Endocítico de este Receptor.

Una de las propiedades más destacadas de megalina es su alta capacidad endocítica, propiedad que se refleja en una rápida internalización del receptor desde la membrana plasmática y en la capacidad de endocitar ligandos diversos. Uno de los objetivos centrales de este trabajo fue estudiar los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la endocitosis del receptor y sus posibles mecanismos de regulación, como la fosforilación y asociación al citoesqueleto.

La internalización de receptores a través de vesículas cubiertas por clatrina es la más estudiada y caracterizada. En el dominio citosólico de megalina existen motivos basados en tirosina, como los motivos NPxY e Yxx ϕ , y del tipo dileucina que podrían mediar la internalización del receptor vía clatrina. Para caracterizar la endocitosis del receptor, se utilizaron dos modelos. El primero se basó en el estudio de megalina, para lo cual se utilizó la línea celular de saco vitelino de rata BN, que expresa altos niveles de esta proteína y en la que no se han detectado la expresión de otros receptores de la familia LDL-R, como LRP. En el segundo caso, se estudió la

endocitosis del minireceptor mLRP4lrptmMegT en células CHO^{LRP}. Sobre el plasmidio mLRP4lrptmMegT se realizaron las mutaciones en el dominio citoplasmático para estudiar el papel de los diferentes motivos en la endocitosis del receptor (anexo 1). La internalización de los receptores fue medida por la incorporación del ligando recombinante RAP marcado con ¹²⁵I en los distintos tipos celulares. La proteína RAP no es un ligando extracelular fisiológico para megalina, sino que reside en el retículo endoplásmico donde interacciona con los miembros de la familia LDL-R [98]. Sin embargo, RAP constituye una herramienta muy útil en este caso por que interacciona fuertemente con los ectodominios de megalina y del LRP, específicamente con el dominio cuatro de este último, que constituye el ectodominio del minireceptor.

En primer lugar, se quiso comprobar si la endocitosis de megalina era un proceso mediado por clatrina, para lo cual se analizó la internalización del receptor en condiciones donde esta vía se encontraba inhibida. Para bloquear la endocitosis mediada por clatrina se utilizó un método bioquímico basado en la disminución drástica del potasio intracelular o acidificación del citosol, que impide la formación de vesículas cubiertas por clatrina [81, 99]. Cuando se analizó la endocitosis de megalina en células BN se observó un bloqueo en la internalización cuando la formación de vesículas de clatrina se inhibía mediante acidificación del citosol (figura 34A). Esto sugiere que la internalización del receptor es principalmente mediada por clatrina. Dado que se encontró una fracción de megalina asociada a microdominios

lipídicos, se analizó si esta interacción también podría regular la internalización del receptor. Para ello se analizó el efecto de la droga Nistatina en la velocidad de internalización de megalina en células BN. Esta droga secuestra el colesterol de las células y se ha descrito que inhibe la endocitosis de receptores asociados a través microdominios lipídicos [100]. La velocidad de internalización de megalina no cambió en células pretratadas con esta droga, sugiriendo que la interacción con estos microdominios no regula este aspecto del tráfico celular del receptor (figura 34B).

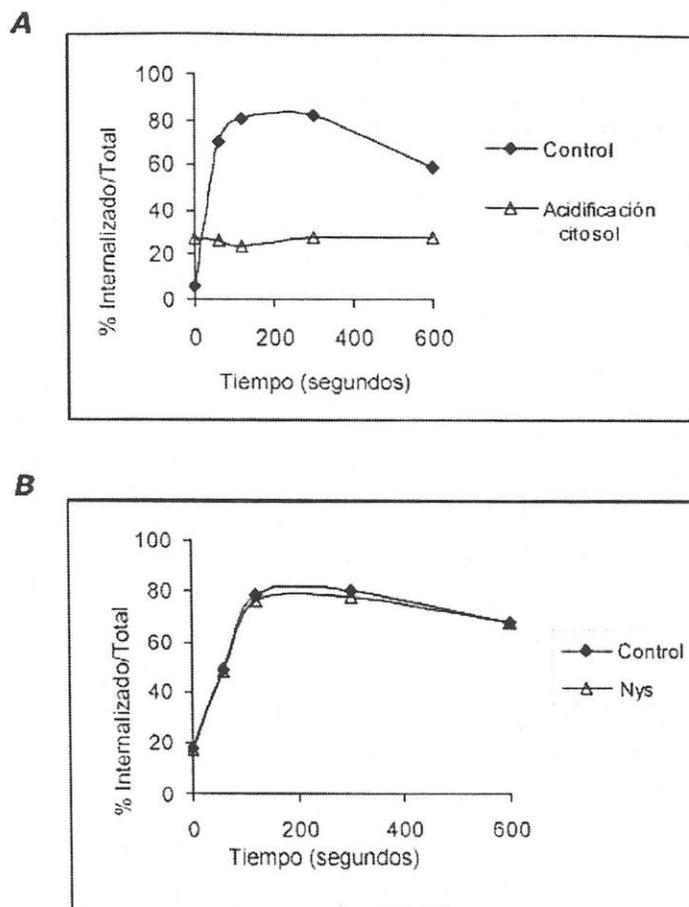


Figura 34. La endocitosis de megalina es un proceso dependiente de clatrina. Estudios de internalización del receptor se realizaron en células BN que expresan megalina. A) Análisis de la internalización de megalina cuando se bloquea la formación de clatrina mediante acidificación del citosol. B) Estudio de la dependencia entre la internalización de megalina y los microdominios lipídicos. La inhibición de la endocitosis por balsas lipídicas se realizó pretratando las células con Nistatina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 15 min a 37 $^{\circ}$ C. Posteriormente, tanto las células controles como las tratadas se incubaron con 5nM de ^{125}I IRAP (ligando) a 4 $^{\circ}$ C por 30 min según descrito en Materiales y Métodos. La cantidad de ligando internalizado como fracción del ligando total asociado en la superficie celular (la suma del ligando internalizado + ligando que permanece en la superficie celular), está graficado versus el tiempo.

Posteriormente, se realizaron estudios similares con el minireceptor mLRP4lrptmMegT en células CHO y en este caso se observó que la Disminución drástica de los niveles intracelulares de potasio bloqueó casi completamente la internalización del minireceptor (figura 35). Los resultados muestran que la internalización de megalina, como de un minireceptor que contiene el dominio citosólico del receptor, es un proceso mediado principalmente por clatrina.

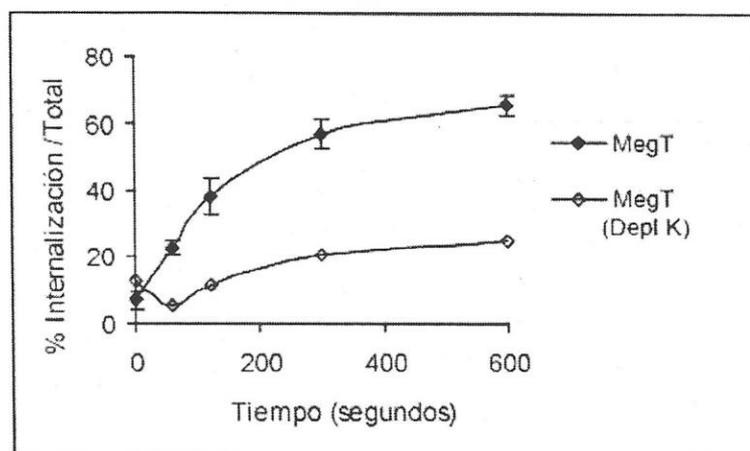


Figura 35. Estudios de internalización del minireceptor mLRP4lrptmMegT en células CHO. A) Efecto de la inhibición de la endocitosis por clatrina. Para inhibir esta vía, las células se depletaron de potasio (Depl K), incubándolas en medio hipotónico durante 5 min y posteriormente con medio libre de potasio. Posteriormente, tanto las células controles como las tratadas se incubaron con 5nM de 125 IRAP (ligando) a 4° C por 30 min. según descrito en Materiales y Métodos. La cantidad de ligando internalizado en el tiempo está graficado para cada condición. Se observa una inhibición casi completa de la internalización del receptor cuando se inhibe la vía de endocitosis por clatrina.

En el dominio citoplasmático de megalina existen 5 posibles motivos de endocitosis mediado por clatrina (figura 2). Una señal es del tipo LL y dos corresponden a motivos NPxY, siendo éste el tipo de señal descrito para la endocitosis del receptor de LDL. Adicionalmente, presenta un motivo no totalmente conservado que es del tipo NxxY y otro del tipo YXX ϕ que es un motivo importante para la endocitosis de LRP. Para analizar el papel de estos motivos en la internalización de megalina, se utilizó el modelo del minireceptor donde en el dominio citoplasmático se mutaron cada uno de los motivos de consenso para la endocitosis, cambiando aminoácidos claves por alanina (anexo 1). Posteriormente se realizaron ensayos de internalización de minireceptores en células CHO^{lrp-} usando ¹²⁵I -RAP como ligando. Se analizó primero el efecto de la mutación de la tirosina en posición 152, puesto que este residuo es compartido por el segundo motivo NPXY y el motivo YXX ϕ . Por otro lado, la proteína adaptadora Dab2 que se postula forma parte de la maquinaria endocítica, interacciona con el segundo motivo NPXY de megalina [101]. Inesperadamente, no se observó una disminución significativa en la velocidad inicial de internalización del receptor mutado en este residuo (figura 36B). Este dato fue complementado con estudios de internalización realizados con minireceptores que contenían el segundo motivo NPXY (mut N149A) o el motivo YXX ϕ (mut M155A) mutados en forma separada, los cuales tampoco mostraron una disminución importante de la velocidad de internalización (figura 36B). Estos resultados permiten concluir que la endocitosis de megalina es regulada por motivos diferentes al de LRP

y que la interacción con la proteína adaptadora Dab2 no es relevante para la etapa inicial de internalización del receptor desde la membrana plasmática. Los siguientes estudios mostraron que el motivo de dileucinas tampoco parece tener un papel importante en este proceso (figura 36B). Al mutar la tirosina 80 (Y80A), correspondiente al primer motivo NPxY, se encontró una disminución significativa en la velocidad inicial de internalización del receptor de aproximadamente un 30-40%, lo cual sugiere que el primer motivo NPxY presente en el dominio citoplasmático de megalina juega un papel importante en esta etapa (figura 36C). Por otra parte, estos resultados concuerdan con datos recientemente publicados donde se muestra que la proteína adaptadora ARH es importante para la endocitosis de megalina y que se uniría a este motivo del dominio citoplasmático [20].

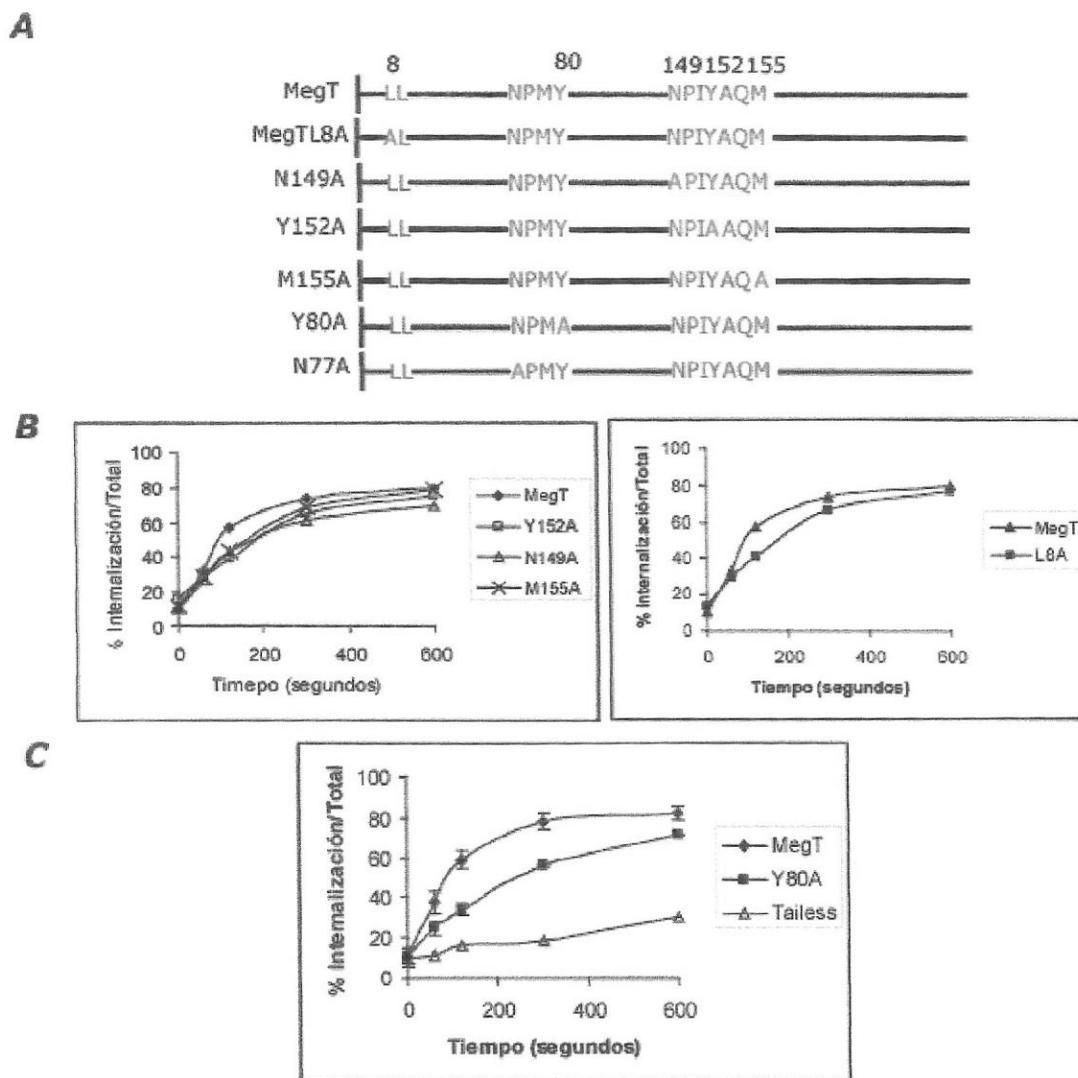


Figura 36. Ensayos de endocitosis de minireceptores con motivos de endocitosis mutados. A) Esquema de las mutaciones puntuales que se generaron. B) y C) Células CHO que expresan el minireceptor con el dominio citosólico de megalina sin mutaciones (MegT) o con las distintas mutaciones se incubaron con 5 nM ^{125}I -RAP a 4° C por 30 min y luego se llevaron a 37° C por distintos tiempos, según indica la figura. La cantidad de ligando internalizado fue calculado según lo descrito en las figuras anteriores. Se observa que la mutación del primer motivo tipo NPXY disminuye la velocidad de internalización del receptor en forma importante.

En relación con los resultados anteriores, es importante destacar que la endocitosis del minireceptor mutado (Y80A) no bajó al nivel del receptor sin dominio citosólico (Tailless), sugiriendo que los otros motivos del dominio citosólico podrían estar contribuyendo a la internalización del receptor en ausencia del primer motivo NPxY. Para analizar esta posibilidad, se generó un minireceptor con mutaciones en la tirosina 80 (Y80A), la leucina 8 (L8A) y la tirosina 152 (Y152A) y se analizó la velocidad de internalización de la mutante triple (Y152/80/8) en células CHO. Los resultados muestran que la internalización de la mutante (152/80/8) es comparable a la de la mutante única (Y80A) (Figura 37B) lo que confirma que el motivo de di-leucinas, el segundo motivo NPxY y el motivo Yxx ϕ , no juegan un papel importante en la internalización de megalina, aun cuando se encuentra mutado el primer motivo NPxY. Una posible explicación para este resultado, es que el receptor mutado (152/80/8) está siendo internalizado a través de una ruta alternativa que es independiente de clatrina. Para evaluar esta posibilidad se analizó la internalización de la mutante (152/80/8) en condiciones donde la vía de endocitosis por clatrina se encontraba inhibida. Los resultados muestran que la Disminución drástica del potasio intracelular, que inhibe la formación de clatrina en células CHO, bloqueó casi completamente la internalización de la mutante (152/80/8), al igual que lo que ocurre con el minireceptor original (figura 37C).

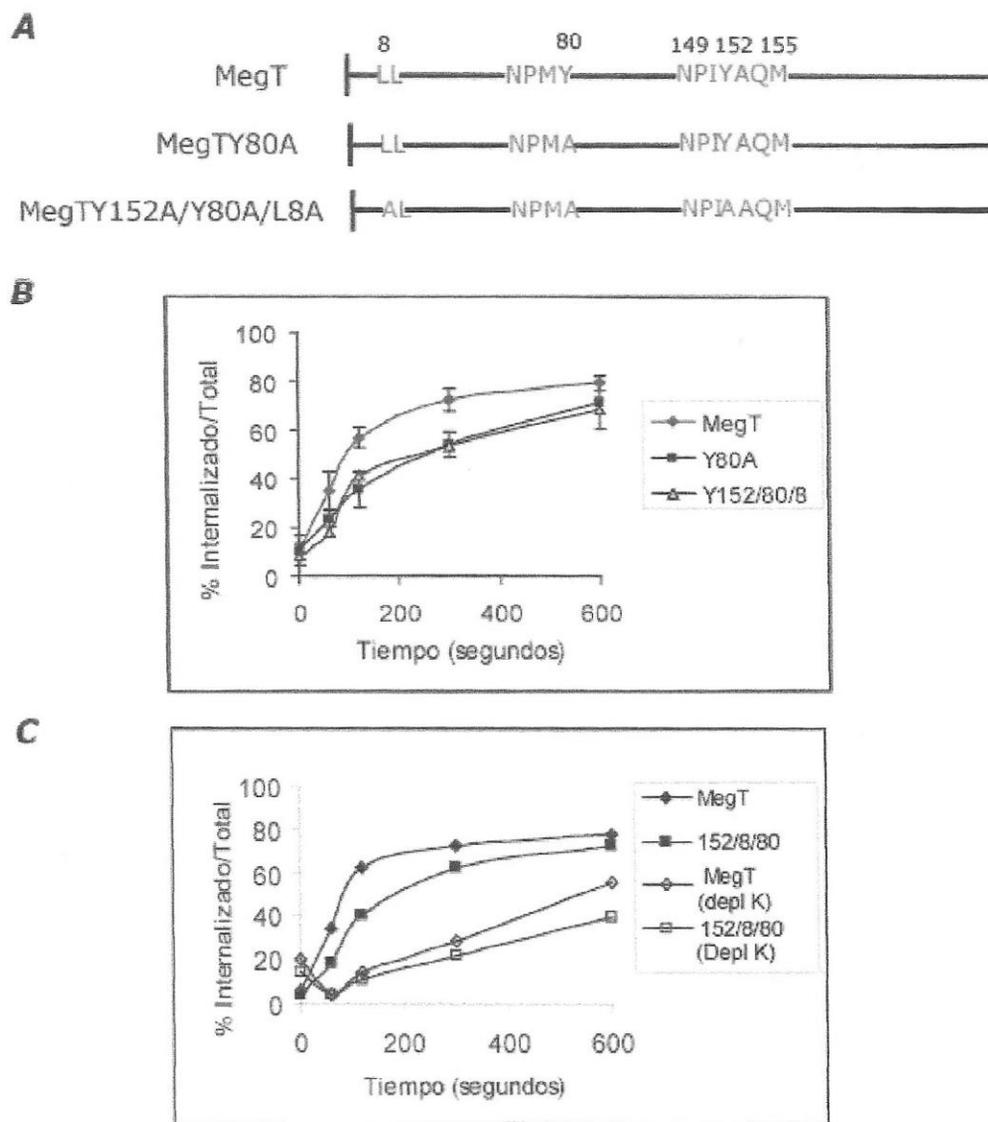


Figura 37. Estudio de la internalización del minireceptor con mutaciones en tres motivos de endocitosis (MegT 152/80/8). A) Esquema de los minireceptores usados. B) Gráfico de la velocidad de internalización del minireceptor (152/80/8) comparado con la mutante del primer motivo NPxY (Y80A). C) Efecto de la inhibición de clatrina, mediante la Disminución drástica del potasio intracelular, en la internalización del minireceptor sin modificaciones (MegT) y del minireceptor con las tres mutaciones. En general, células CHO sin tratar o tratadas con buffer sin potasio, se incubaron con ^{125}I -RAP según previamente descrito y se midió la incorporación del ligando a distintos tiempos. Se observa que la mutante triple (152/80/8) presenta una velocidad de internalización comparable a la de la mutante única (Y80A), que también es dependiente de clatrina.

Estos datos muestran que el minireceptor con todos los potenciales motivos clásicos de endocitosis por clatrina mutados, aún se sigue internalizando por esta vía y que probablemente exista otra señal dentro del dominio citosólico que está funcionando como señal de internalización mediante clatrina. Se evaluó la participación del tercer tipo de motivo del tipo NxxY, que contiene una lisina en lugar de una prolina (NKxY) y que podría funcionar como señal de endocitosis mediado por clatrina. Se mutó la tirosina en posición 106 por alanina y se midió la velocidad de internalización de la mutante en células CHO. Los resultados no indican cambios con respecto al minireceptor sin modificaciones, descartando que el motivo NxxY participe como señal de internalización del receptor (figura 38).

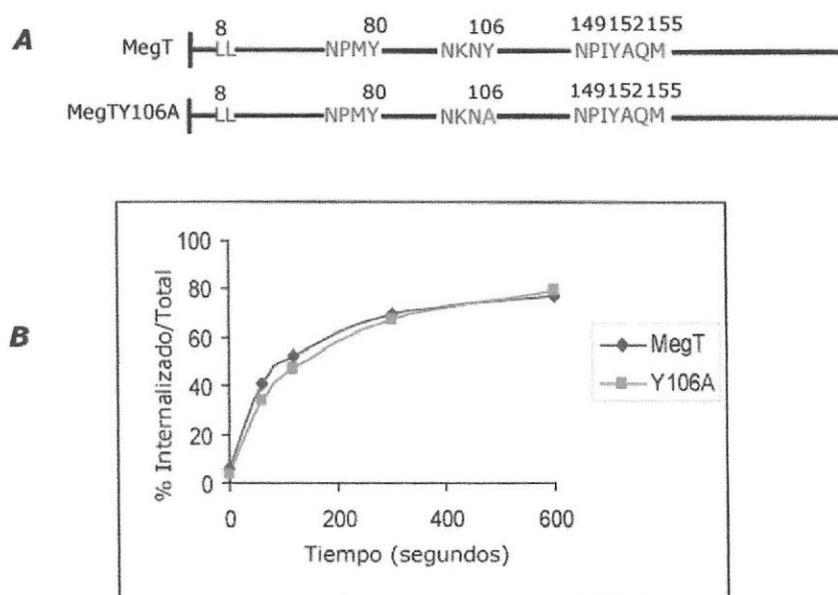


Figura 38. Endocitosis del minireceptor con el motivo NxxY mutado. A) Esquema del minireceptor mutado. B) Células CHO que expresan el minireceptor con el dominio citosólico de megalina sin mutaciones (MegT) o con la mutación del motivo NxxY (Y106A) se incubaron con 5 nM ^{125}I -RAP a 4 $^{\circ}$ C por 30 min y luego se llevaron a 37 $^{\circ}$ C por distintos tiempos, según indica la figura. El ligando internalizado como fracción del ligando total (ligando internalizado + ligando que permanece en la superficie celular) está, graficado versus el tiempo. Se observa que la mutación del motivo NxxY no afecta significativamente la velocidad de internalización del receptor.

Dado que al mutar los motivos clásicos de endocitosis vía clatrina no se logra abolir completamente la internalización del receptor, se decidió analizar el papel de los otros motivos presentes en el dominio citosólico de megalina. Se estudió específicamente el papel del dominio rico en prolinas y del motivo PDZ en la endocitosis de megalina ya que estos motivos también podrían mediar la interacción con proteínas de la maquinaria endocítica en la membrana plasmática. Sorpresivamente, cuando se eliminaron los 9 aminoácidos correspondientes al motivo rico en prolinas se encontró un incremento en la velocidad de internalización comparado con el mismo minireceptor con el dominio citosólico completo (figura 39). En el caso de la mutante Δ PDZ, a la cual se le eliminaron los últimos 3 aminoácidos del dominio citoplasmático no se observó un cambio significativo comparado con el receptor sin mutar. La interpretación de estos datos sugiere que la asociación de este receptor, posiblemente con proteínas del citoesqueleto de actina, a través del motivo rico en prolinas, como se discutió en la sección III 1.2, tendría un papel en la endocitosis del receptor.

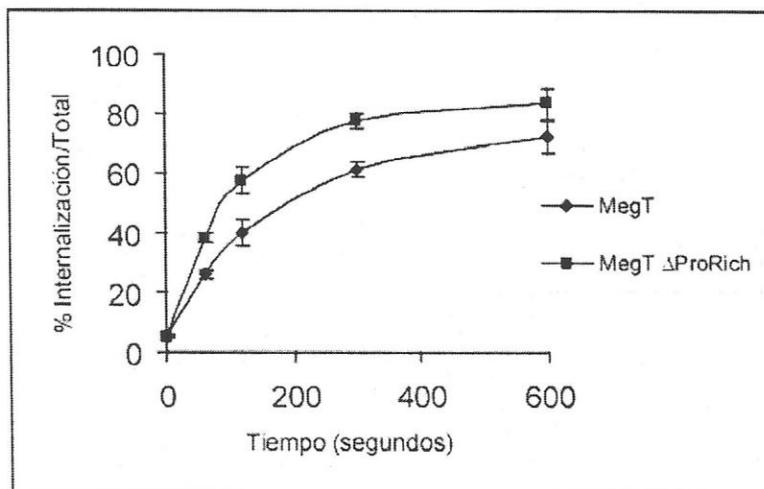


Figura 39. Análisis del papel del motivo rico en prolina en la internalización de megalina. Células CHO transfectadas en forma estable con el minireceptor con el dominio citosólico de megalina (MegT) o la variante sin el motivo rico en prolina (MegT Δ ProRich) se incubaron con 5 nM 125 I-RAP a 4°C por 30 min, y luego a 37°C según los tiempos indicados. La cantidad de ligando internalizado como fracción del ligando total asociado en la superficie celular (la suma del ligando internalizado + ligando que permanece en la superficie celular) está graficada versus el tiempo. La velocidad inicial de internalización del minireceptor sin el motivo rico en prolina es más rápida comparada con la del receptor sin deleciones.

En general nuestros resultados muestran que la endocitosis de megalina es un proceso muy complejo y que la internalización del receptor se regula, en parte, a través del primer motivo NPxY y posiblemente por otros motivos funcionales presentes en el dominio citosólico del receptor. Por otro lado, es posible que los motivos basados en tirosina, o de interacción con proteínas con dominios PDZ o SH3, participen en otras etapas del proceso endocítico del receptor como el reciclaje o degradación.

Para complementar los datos de endocitosis se analizó la expresión de los minireceptores en la superficie celular y en toda la célula, mediante citometría de flujo. Para ello células intactas, se incubaron con un anticuerpo anti-HA y un segundo anticuerpo conjugado con FITC para marcar los receptores presentes solamente en la superficie celular. En paralelo, se incubaron células permeabilizadas con los mismos anticuerpos para detectar la cantidad total del receptor presente en cada línea celular. En la figura 40 se muestra que existe un mayor porcentaje del minireceptor con el primer motivo NPxY mutado en la superficie celular en relación con lo observado para el minireceptor MegT sin mutaciones. Esto se correlaciona con los datos de internalización de ligando ^{125}I -RAP, los cuales muestran que esta mutante presenta una velocidad de internalización más lenta y sugiere que el receptor permanece más tiempo en la superficie celular. En el caso de los receptores sin el motivo rico en prolina, o el motivo de interacción con dominios PDZ, se observó que la proporción del receptor en la superficie celular era menor con respecto al receptor con el dominio citosólico intacto.

La variante Δ ProRich se caracteriza por presentar una mayor velocidad inicial de internalización y por lo tanto se encuentra en menor proporción en la superficie celular.

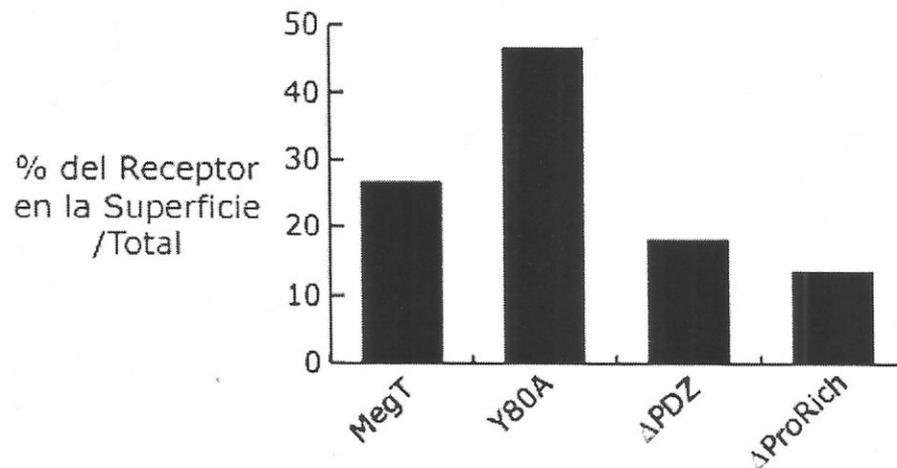


Figura 40. Análisis de la expresión de minireceptores en la superficie celular mediante citometría de flujo. Las células CHO en suspensión se marcaron con un anticuerpo anti-HA y un segundo anticuerpo anti-ratón, conjugado con FITC para detectar el receptor presente en la superficie celular. En paralelo, los mismos tipos celulares se permeabilizaron con PBS-saponina 0,1% y se procesaron de la misma manera para marcar el receptor total presente las células. El porcentaje del receptor en la superficie con respecto al total fue calculado mediante la razón entre la intensidad de fluorescencia obtenida para células sin permeabilizar dividido por el valor obtenido para células permeabilizadas (total).

Por otro lado, la velocidad de internalización de mutante Δ PDZ es similar al receptor sin modificaciones, por lo que se evaluó un posible defecto en otra etapa de la endocitosis del receptor. Para ello, se comparó la capacidad de degradación del ligando RAP de los minireceptores Δ PDZ y MegT. Los resultados muestran que la eficiencia de la degradación del ligando ^{125}I -RAP, en el caso de la mutante Δ PDZ, bajo significativamente en un 30% con respecto al receptor MegT (figura 41). Este resultado, en conjunto con los datos obtenidos por citometría de flujo que muestran una menor cantidad del minireceptor Δ PDZ en la superficie celular sugiere que podría existir un defecto a nivel del reciclaje del receptor desde el endosoma hacia la superficie celular. Por otro lado, estos resultados abren la posibilidad que los otros motivos basados en tirosina, que no son importantes en la internalización del receptor, pudieran funcionar también en etapas posteriores de la endocitosis, en conjunto con el motivo de unión a dominios PDZ.

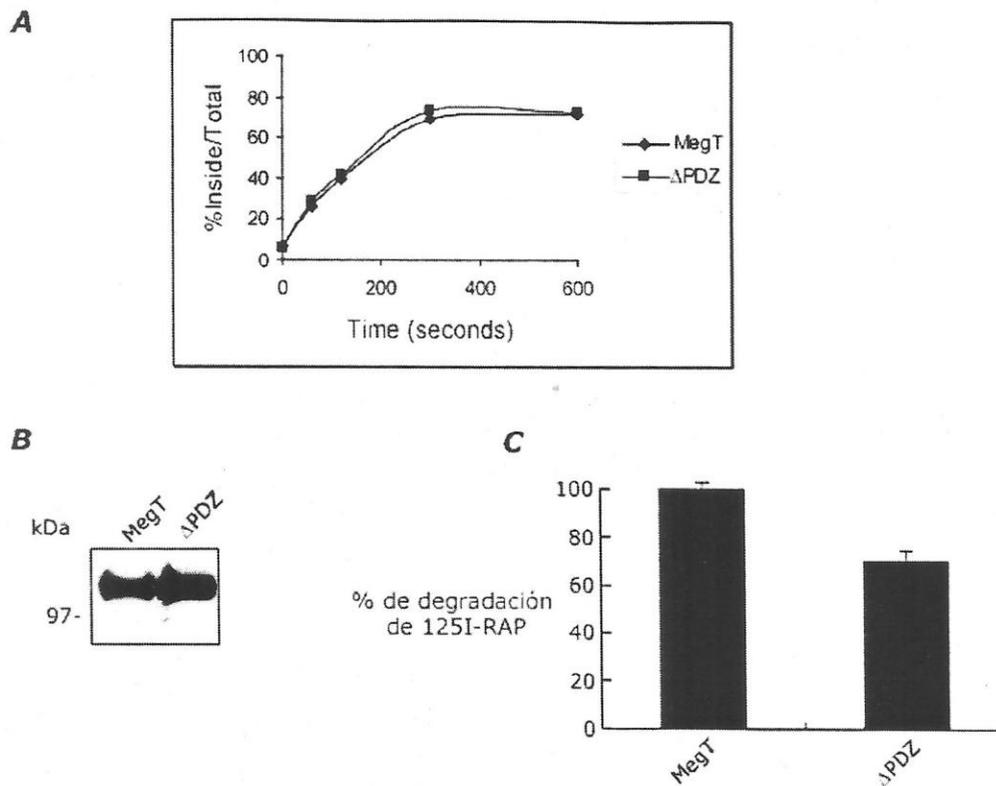


Figura 41. Efecto de la eliminación del motivo de unión a dominios PDZ en la endocitosis de megalina. A) Estudio de la velocidad de internalización del minireceptor mLRP4lrptmMegT sin modificaciones (MegT) o con el motivo PDZ eliminado del dominio citosólico (Δ PDZ). Células CHO transfectadas con estas construcciones se incubaron con 5 nM de 125 I-RAP durante 30 min a 4° C y luego se llevaron a 37° C por los tiempos indicados. Se muestra que la internalización de ambos receptores es similar. B) Análisis por Western Blot del nivel de expresión de los minireceptores en células CHO. Cantidades iguales de proteína (30 μ g) desde extractos celulares de células CHO que expresan los minireceptores fueron separados por SDS-PAGE y detectados con un anticuerpo anti-HA y un anticuerpo secundario conjugado con HP, mediante Western Blot. Se observa que el nivel de expresión del minireceptor de cada línea celular es muy similar. C) La mutante Δ PDZ presenta un menor eficiencia para degradar del ligando 125 I-RAP. Células CHO que expresan los minireceptores fueron incubadas con 125 I-RAP 5 nM por 3 h en presencia o ausencia de 500 nM de ligando no marcado. La eficiencia de degradación de ligando fue determinado según descrito en Materiales y Métodos. Los valores son el promedio de 6 determinaciones y al minireceptor con el dominio citosólico completo de megalina se le asignó un 100%.

3.2. *Analizar el papel de la asociación de megalina a microdominios lipídicos y al citoesqueleto, así como el papel de la fosforilación del dominio citosólico en su endocitosis.*

3.2.1 Interacción de megalina con el citoesqueleto

A partir del análisis de los motivos involucrados en la endocitosis de megalina se encontró que el dominio rico en prolinas juega un papel importante en este proceso. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que este motivo participa, además, en la interacción del receptor con proteínas del citoesqueleto. Sobre la base de estos antecedentes se decidió evaluar como la integridad del citoesqueleto de actina podría afectar la internalización del receptor, como se ha visto en la endocitosis apical de células epiteliales [102]. Para ello se realizaron experimentos de endocitosis en células pretratadas con drogas como Latrunculina B, que altera la integridad del citoesqueleto de actina. En este caso, las condiciones del tratamiento con la droga fueron las mismas que se han usado para generar una disociación del citoesqueleto de actina en estos tipos celulares [50]. Nuestros resultados muestran que la internalización del receptor no fue afectada bajo estas condiciones (figura 42). El experimento que se muestra fue realizado en células CHO, pero resultados similares se obtuvieron en células MDCK. A partir de los resultados obtenidos no se pudo demostrar una relación directa entre la internalización del receptor y la interacción con

el citoesqueleto de actina, pero es posible que la interacción entre ambos elementos sea importante en otras etapas del tráfico endocítico.

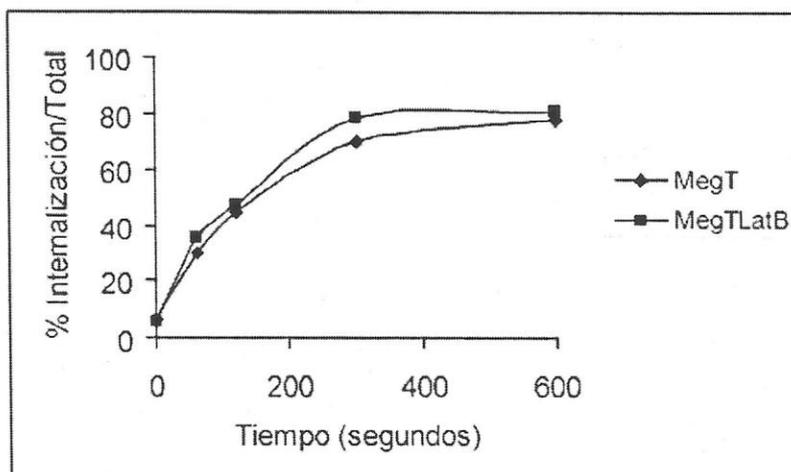


Figura 42. Endocitosis del minireceptor con el dominio citosólico de megalina (MegT) en presencia de un agente disociador de citoesqueleto de actina (Latrunculina B). Células CHO transfectadas en forma estable con el minireceptor se pretrataron por 30 min a 37° C con 0,5 μ M de Latrunculina B o DMSO (control). Posteriormente, para medir la endocitosis las células se incubaron con 5 nM 125 I-RAP a 4° C por 30 min, y luego a 37° C según los tiempos indicados. La cantidad de ligando internalizado como fracción del ligando total está, graficado versus el tiempo. La velocidad de internalización del minireceptor en presencia de Latrunculina B es similar a la condición control.

3.2.2 Asociación de megalina con microdominios lipídicos

La asociación de proteínas con microdominios lipídicos ha sido relacionada con la regulación de procesos endocíticos y dado que megalina se encuentra asociada con este tipo de microdominios se evaluó cómo esta propiedad podría influir en la Internalización del receptor. La internalización de megalina en células BN en presencia de drogas que secuestran el colesterol sugiere que no se requiere la integridad de estos microdominios para la internalización del receptor (figura 34B). Para complementar estos datos se comparó la velocidad de internalización de los minireceptores que contenían el dominio de transmembrana del LRP (mLRP4lrptmMegT) con los mismos minireceptores que contenían el dominio de transmembrana de megalina (mLRP4MegTMT). Los minireceptores usados en los ensayos de endocitosis contienen el dominio de transmembrana del LRP, el cual no se encuentra asociado con fracciones de microdominios lipídicos y es uno de las diferencias principales con el dominio de transmembrana de megalina, la cual le confiere al receptor la capacidad de asociarse a estos microdominios lipídicos. Células CHO^{lrp-} y MDCK, que expresaban establemente los minireceptores, fueron usadas en ensayos de internalización de I¹²⁵-RAP. Sorpresivamente, la velocidad de internalización del minireceptor con dominio de transmembrana de megalina bajó notoriamente comparado con el mismo minireceptor con transmembrana del LRP (figura 43). Esta disminución drástica en la endocitosis fue inesperada porque difiere mucho de la velocidad de internalización descrita para megalina.

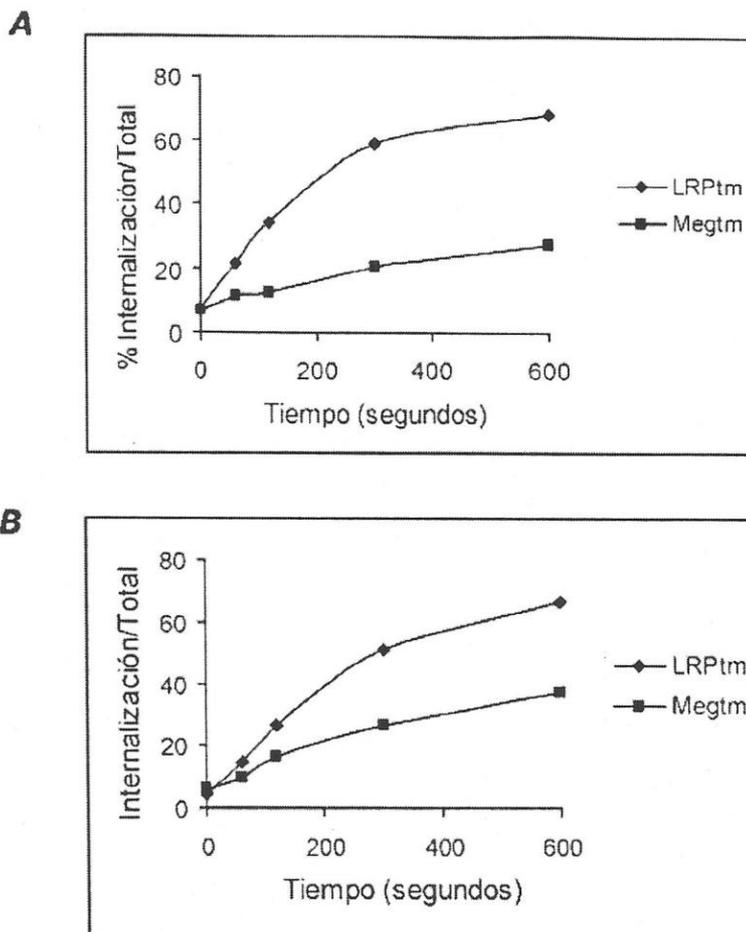


Figura 43. Ensayos de endocitosis de minireceptores con el ectodominio del LRP, dominio citosólico de megalina y el transmembrana de megalina (Megtm) o transmembrana de LRP (LRPtm). A) Células CHO y B) Células MDCK que expresan los minireceptores se incubaron con 5 nM ^{125}I -RAP a 4° C por 30 min y luego se llevaron a 37° C por distintos tiempos, según indica la figura. La cantidad de ligando internalizado como fracción del ligando total asociado con la superficie celular (la suma del ligando internalizado + ligando que permanece en la superficie celular) está graficado versus el tiempo. En ambos tipos celulares se observa que la velocidad de internalización del receptor con transmembrana de megalina es mucho más lento comparado con el receptor que contiene el dominio de transmembrana del LRP.

Para determinar si existía algún problema con la construcción del minireceptor con el dominio de transmembrana de megalina, se realizaron estudios de inmunoprecipitación para analizar el tamaño de la proteína por SDS-PAGE. Células CHO que expresaban esta construcción fueron marcadas metabólicamente con ^{35}S -metionina/cisteína y la proteína fue inmunoprecipitada usando un anticuerpo anti HA que reconoce el epítipo del amino-terminal o con un anticuerpo que reconoce el dominio citosólico de megalina. Al analizar por SDS-PAGE los productos inmunoprecipitados se observó que con el anticuerpo anti-HA sólo estaba presente la forma precursora y el producto de 120 kDa que contiene el ectodominio, pero no se detectó el producto de 97 kDa que contiene el dominio citosólico. Sin embargo, la inmunoprecipitación de los minireceptores con el anticuerpo, que reconoce el dominio citosólico de megalina, generó la forma precursora del minireceptor mLRP4MegTMT(figura 44). Esto sugiere que la proteína se sintetizaba completamente, pero, que una vez procesada por furina, su dominio citoplasmático era degradado.

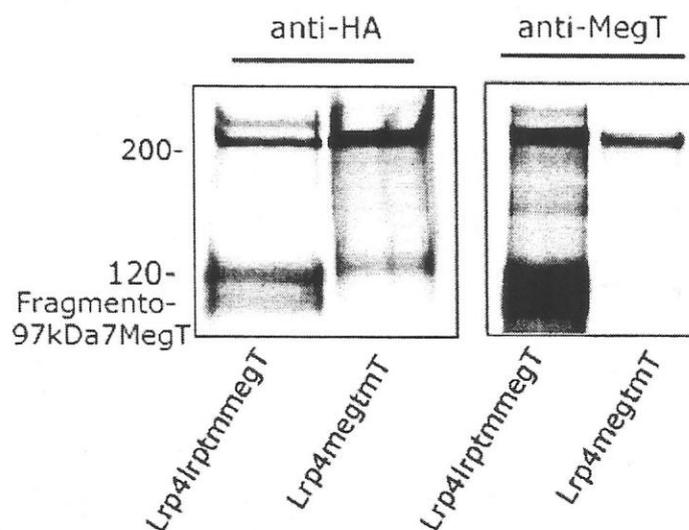


Figura 44. Inmunoprecipitación de minireceptores que contienen el cuarto dominio de unión a ligandos del LRP, el dominio citoplasmático de megalina y el dominio de transmembrana del LRP (mLRP4lrptmMegT) o el dominio de transmembrana de megalina (mLRP4MegtmT). Células CHO que expresan estas construcciones fueron marcadas metabólicamente con metionina/cisteína-35S por 4 horas. Después de lisar las células en TX-100 1%, se inmunoprecipitaron los minireceptores usando un anticuerpo que reconoce el epítipo HA presente en el amino-terminal de la proteína (anti-HA) o con un anticuerpo dirigido contra el dominio citoplasmático de megalina (anti-MegT). Los complejos inmunes fueron resueltos por SDS-PAGE y analizados mediante autoradiografía.

La ausencia del fragmento de 97 kDa que contiene el dominio citosólico del receptor explicaría porqué la velocidad de internalización del minireceptor con dominio de transmembrana de megalina es muy baja. El hecho que las células CHO^{LRP-}, que expresan esta quimera, presentan una alta capacidad de unión al ligando RAP sugiere que el receptor se encuentra en la superficie celular, pero que existiría una forma procesada que no contiene el dominio citoplasmático. Trabajos recientes muestran que megalina puede ser sustrato de la γ -secretasa y que este procesamiento es estimulado por PKC y requiere de la salida previa del ectodominio a través de metaloproteasas. [103]. El procesamiento por γ -secretasa ocurre en la región de transmembrana del receptor y genera la liberación de un fragmento citosólico, el cual es muy inestable. Dado que el minireceptor mLRP4MegTMT contiene un sitio de corte por furina en el dominio extracelular, se especuló que la proteína podría ser sustrato permanente de la γ -secretasa, lo cual generaría la degradación del dominio citosólico. Para analizar esta posibilidad, estudios de endocitosis con células CHO que expresan mLRP4MegTMT fueron realizados en presencia de inhibidores de la γ -secretasa para determinar si se lograba estabilizar el dominio citosólico y de esta manera observar un aumento en la internalización del receptor. Ensayos de internalización de ¹²⁵I-RAP en células tratadas con un inhibidor de la γ -secretasa (compuesto E) no mostraron diferencias comparados con las células control, sugiriendo que la actividad de esta enzima no afecta la estabilidad del dominio citosólico de mLRP4MegTMT. A partir de los

resultados obtenidos no se pudo determinar porqué el fragmento de 97 kDa de este minireceptor es particularmente inestable.

3.2.3 Papel de la fosforilación del dominio citosólico de megalina en la endocitosis

Los estudios de fosforilación de megalina muestran que la serina perteneciente al motivo PPPSP es el principal sitio de fosforilación de megalina. Para analizar como cambios en el nivel de la fosforilación del dominio citosólico afectan la endocitosis del receptor, se realizaron ensayos de internalización del minireceptor mutado (S170A) y se comparó con el receptor no modificado. En este caso, es interesante que al igual que lo que ocurre con la variante sin el motivo rico en prolinas, en el cual este residuo de serina 170 está ausente, la velocidad inicial de internalización es más rápida comparada con la del minireceptor nativo. En la figura 45B se encuentra graficado el porcentaje de ligando internalizado en el primer minuto por células CHO que expresan las variantes defectuosas en fosforilación. Se observa que estas mutantes son más eficientes en la internalización del ligando ^{125}I -RAP y sugiere que la fosforilación del dominio citoplasmático de megalina regularía negativamente la internalización del receptor, lo cual difiere de lo descrito para LRP, donde la fosforilación por PKA estimula la endocitosis del receptor.

Nuestros resultados indican que se requiere el primer motivo NPxY del dominio citosólico de megalina para una internalización rápida del receptor. En este contexto se analizó si la mutación en el motivo PPPSP podría estimular la internalización de la mutante de endocitosis. Los resultados indican que la internalización de la doble mutante (Y80A/S170A) es comparable con la mutante Y80A (figura 45B). Por lo tanto, la disminución de la fosforilación del dominio citosólico generado por la mutación de la serina 170 no puede compensar la falta del motivo de endocitosis NPxY. Esto sugiere que ambos motivos regularían la internalización del receptor a través de mecanismos independientes.

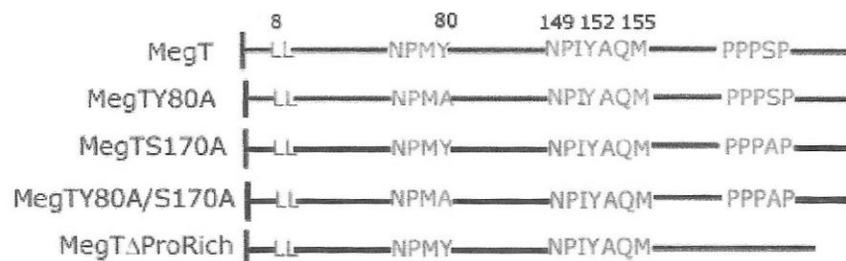
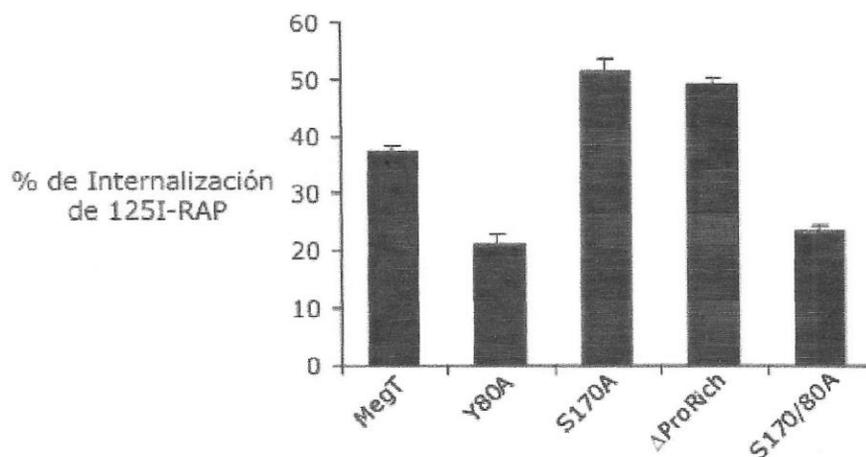
A**B**

Figura 45. Internalización de ¹²⁵I-RAP por células CHO transfectadas con minireceptores que presentan mutaciones en motivos de endocitosis (Y80A) o mutaciones que generan deficiencias en la fosforilación (S170A) y Δ ProRich. Las células se incubaron con ¹²⁵I-RAP durante 30 min a 4° C y se lavaron para remover el ligando no unido. Posteriormente, las células se incubaron a 37° C durante 1 min. La cantidad de ligando internalizado se calculó como fracción del ligando total (ligando internalizado + ligando unido). Se observa que las mutantes deficientes en fosforilación son más eficientes en la internalización del ligando comparado con el minireceptor sin modificaciones.

IV. DISCUSION

1. *Localización Apical de Megalina.*

En esta tesis se mostró evidencia de que el dominio citoplasmático de megalina contiene información para la localización apical del receptor. Este resultado es muy relevante dentro del campo de estudio de la polaridad celular, ya que se ha descrito que la segregación de la mayoría de las proteínas a la superficie apical depende de su incorporación a microdominios lipídicos enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos [104] y/o de la glicosilación del ectodominio [105, 106]. Además, las señales apicales del dominio citosólico, que ya han sido descritas, corresponden todas a proteínas de membrana politópicas como la rodopsina [43], CFTR [51] y el transportador del ácido γ -aminobutírico [107]. Por lo tanto, megalina se destaca como el primer ejemplo de una proteína tipo I que contiene información de localización apical en el dominio citosólico.

Es importante resaltar que las señales apicales en proteínas de membrana son difíciles de identificar ya que por un lado han mostrado ser de diversa naturaleza, y pueden encontrarse en distintos dominios de la proteína, y por otro lado generalmente son recesivas frente a señales basolaterales dominantes. En este sentido fue necesario contar con un modelo apropiado para demostrar que en el dominio citosólico de megalina existían señal(es) de destinación al dominio apical. Debido a que proteínas de membrana sin señales de destinación polarizada no han sido claramente

descritas hasta ahora, fue necesario generar nuestra propia proteína reportadora que no presentara información de destinación polarizada. La idea fue utilizar este modelo para demostrar que la presencia del dominio citosólico de megalina era suficiente para producir la localización apical del reportador. La proteína reportadora estaba formada por componentes que no presentaban información de destinación polarizada preferencial (figura 17). Este reportador contenía GFP como dominio extracelular, el dominio de transmembrana de LRP y el dominio citoplasmático de hemaglutinina (11 aminoácidos). La distribución de esta quimera resultó ser no polarizada en células MDCK, lo cual nos permitió usarla en el estudio de la información de destinación polarizada en el dominio citoplasmático de megalina. Consideramos este punto muy importante, ya que a partir del trabajo realizado en esta tesis se generó una herramienta muy valiosa que permite estudiar señales apicales y que hasta ahora no había sido descrita. Este reportador también podrá ser utilizado para estudiar señales apicales y basolaterales presentes en dominios citosólicos de otras proteínas.

Nuestros estudios mostraron que el dominio citoplasmático de megalina le confiere una localización apical al reportador. Esto constituyó la primera evidencia que mostraba que el dominio citoplasmático contiene información apical. En un trabajo realizado en paralelo con el nuestro, también se planteó la existencia de información de destinación polarizada en el dominio citosólico de megalina [108]. Sin embargo, en este caso no se utilizó una proteína sin polaridad como control, sino que se realizaron

estudios con un minireceptor que contenía el ectodominio y dominio de transmembrana de megalina sin dominio citosólico. Nuestros datos muestran que un minireceptor de composición similar, que contiene el cuarto dominio de unión a ligandos y el dominio de transmembrana de LRP sin dominio citosólico, se localiza de manera preferencial en el dominio apical. Esta localización apical probablemente se debe a la glicosilación del ectodominio que podría estar funcionando como una señal apical en la ausencia de una señal basolateral dominante. Probablemente lo mismo ocurre con el minireceptor estudiado por Takeda y cols., 2003 [108]. En nuestro caso, se mostró que la información del dominio citoplasmático de megalina era suficiente para localizar una proteína sin polaridad en la superficie apical.

El dominio citoplasmático de megalina contiene motivos que podrían tener un papel en la localización polarizada del receptor. Entre ellos, se destaca el motivo de interacción con dominios PDZ que ha sido implicado en la localización apical de proteínas como CFTR [51]. Es interesante destacar que otras señales presentes en este dominio, como las basadas en tirosinas y las dileucinas, se caracterizan por conferir una localización basolateral a otras proteínas [32]. El estudio de la polaridad de construcciones formadas por la proteína reportadora fusionada a diferentes formas truncadas del dominio citosólico de megalina (figura 17 y 18), permitió acotar la región que contenía la información de destinación al dominio apical. Nuestros resultados mostraron que la presencia de los primeros 150 aminoácidos del

dominio citosólico de megalina era suficiente para localizar la proteína reportadora en el dominio apical. Esta región del dominio citosólico excluye los motivos de interacción con dominios PDZ y SH3 (anexo 3), por lo que se pudo descartar la participación de estos motivos en la localización apical del receptor. A partir del estudio con la proteína reportadora fusionada a segmentos más cortos del dominio citosólico se pudo concluir que la(s) señal(es) apicales del receptor se encontrarían entre los residuos 60 a 90 y 120 a 150.

En esta región del dominio citosólico existen motivos basados en tirosina, los cuales se asocian con señales de segregación al dominio basolateral como ha sido descrito para el receptor del LDL [91] y LRP [37] y donde se han involucrado complejos adaptadores del tipo AP1B y AP-4 [35, 109]. En cambio, nuestros estudios sugieren que el primer motivo NPxY del dominio citosólico de megalina podría actuar como una señal apical en el receptor ya que al mutar este residuo la proteína se distribuye en forma no polarizada, cuando contiene el ectodominio del reportador neutro. Este sería el primer ejemplo de una proteína que contiene una señal apical basada en tirosina.

La localización de proteínas en la membrana plasmática después de su biosíntesis puede ser el resultado de eventos de segregación que ocurren en TGN o en endosomas, y/o por estabilización de la proteína en dominios de la membrana plasmática a través de un mecanismo de retención

selectiva. En relación con megalina es importante señalar que los estudios de la distribución polarizada del receptor fueron realizados en estado estacionario, lo cual no permite determinar en que compartimiento subcelular ocurre el reconocimiento de las señales del dominio citosólico.

Mediante estudios de "targeting" con el minireceptor que contiene el dominio citosólico de megalina (mLRP4lrptmMegT), se analizó la ruta que sigue el receptor desde su biosíntesis hasta llegar a la superficie celular. Nuestros resultados mostraron que a los 60 min se logra detectar el receptor en la superficie apical y basolateral, pero a tiempos mayores (4 horas) la proteína se enriquecía levemente en el dominio apical. Estos datos sugieren, por un lado, que el receptor es destinado primero a ambos dominios y que posteriormente es estabilizado en la superficie apical posiblemente a través de un mecanismo de retención selectiva. Sin embargo, los resultados del experimento de "targeting" son difíciles de interpretar, ya que en todos los tiempos de caza utilizados se detectó megalina en el dominio basolateral. Este resultado puede deberse a problemas técnicos, como lo mencionado anteriormente, o también podría dar cuenta de un proceso de transcitosis del receptor desde el dominio apical al basolateral.

En general, los datos muestran que el tráfico de megalina es un proceso difícil de estudiar pues podrían participar diversos mecanismos que permiten su localización en el dominio apical. Por un lado, no se descarta

que exista un proceso de segregación en TGN, en que el receptor podría ser transportado directamente a la superficie apical. Otra posibilidad es que el receptor sea destinado a ambos dominios de la membrana plasmática y luego sea endocitado desde el dominio basolateral y transportado a la membrana apical. En este punto es interesante señalar que el motivo NPxY del dominio citosólico constituye una señal para la internalización del receptor (ver resultados de endocitosis). Dado que al mutar este motivo el receptor también se detecta en ambos dominios de la superficie celular, es posible especular que después de su biosíntesis, el receptor llega primero al dominio basolateral y luego es endocitado para ser transportado hacia la superficie apical. Al estar mutado el motivo NPxY, el receptor se endocita más lentamente, por lo que se logra detectar en el dominio basolateral.

Finalmente, es importante considerar que, en conjunto con la información presente en el dominio citoplasmático, la N-glicosilación del ectodominio de megalina [110] y/o a la asociación del receptor con microdominios lipídicos también podrían participar en la localización apical de la proteína endógena. En este sentido, es posible que megalina pudiera tener varios mecanismos que aseguran su localización apical donde puede cumplir con sus funciones fisiológicas.

2. Regulación de la Endocitosis de Megalina.

La internalización de proteínas de membrana desde la superficie celular ocurre principalmente a través de endocitosis mediada por clatrina .

Este mecanismo de internalización ha sido el más caracterizado y es mediado por señales presentes en los dominios citosólicos de las proteínas, lo que permite su reclutamiento eficiente en foveolas cubiertas y su posterior incorporación a endosomas [67]. En general, estas señales consisten en secuencias cortas de aminoácidos y de acuerdo al aminoácido principal del motivo, se pueden distinguir dos clases: las basadas en tirosinas (tipo NPXY o Yxxφ) y las basadas en dileucinas. Megalina es un receptor localizado en el dominio apical de células epiteliales donde es capaz de endocitarse rápidamente y de manera constitutiva. Se ha descrito que este receptor realiza endocitosis mediado por clatrina, ya que a través de microscopía electrónica se ha podido visualizar este receptor en foveolas cubiertas y vesículas cubiertas por clatrina en células del túbulo proximal del riñón [24]. En esta tesis se utilizó un enfoque bioquímico para determinar si la endocitosis de megalina dependía exclusivamente de la vía de clatrina. Nuestros resultados indican que este es el caso, ya que la internalización de megalina en células BN se bloquea casi completamente bajo condiciones en que se inhibe la formación de clatrina y no es afectado por drogas, como la Nistatina, que alteran la integridad de los microdominios lipídicos (figura 34). El dominio citosólico de megalina contiene varios motivos potenciales de internalización vía clatrina, que incluyen, un motivo de dileucinas, dos motivos del tipo NPXY, un motivo del tipo NxxY y otro del tipo Yxxφ. Para estudiar los diferentes motivos involucrados en la internalización del receptor nuestra estrategia fue mutagenizar o eliminar los motivos del

dominio citosólico del receptor que podrían ser importantes en la endocitosis. Para ello, se utilizó un modelo de minireceptores formados por: el cuarto dominio de unión a ligandos y dominio de transmembrana del LRP y el dominio citoplasmático de megalina. Estudios realizados anteriormente con esta quimera mostraron que la velocidad de internalización del receptor varía dependiendo de los diferentes dominios citosólicos de la familia LDL-R, sugiriendo que la endocitosis estaba regulada por la información presente en el dominio citoplasmático [111]. La internalización del minireceptor con el dominio citoplasmático de megalina en células CHO, fue completamente dependiente de clatrina (figura 35). Al analizar las señales de endocitosis del receptor se encontró que la mutación de la tirosina 152, que forma parte de dos motivos de endocitosis (NPxY/Yxx ϕ), no afectó de manera significativa la internalización del receptor. Este resultado fue inesperado puesto que este residuo forma parte de un motivo Yxx ϕ que es importante en la endocitosis del LRP [23], lo cual muestra que aún cuando son similares estructuralmente, megalina no posee el mismo tipo de señal de internalización que LRP. Por otro lado, la tirosina 152 forma parte del segundo motivo FxNPxY, que funciona como sitio de unión para la proteína adaptadora Dab2 [19]. Se postula que Dab2 podría formar parte de la maquinaria endocítica ya que se asocia a componentes del complejo adaptador AP2, clatrina y fosfoinositoles. Regularía la endocitosis de miembros de la familia LDL-R al interactuar a través de su dominio PTB (Phosphotyrosine Binding Domain), con motivos FxNPxY presentes en todos

los miembros de la familia LDL-R [112]. Mutantes condicionales para Dab2 presentan un fenotipo similar al del *knock out* para megalina en términos de los defectos endocíticos observados en el túbulo proximal del riñón, que incluyen proteinuria y una disminución del número de foveolas y de vesículas cubiertas por clatrina [113]. Estos datos sugieren que Dab2 participaría en la endocitosis de megalina, sin embargo no se existe evidencia directa de fallas a nivel de la internalización del receptor y los defectos del ratón *knock out* podrían ser el resultado de defectos generales en la endocitosis mediado por clatrina. Por otro lado, sería posible que en células CHO, donde se realizaron los estudios de endocitosis, la función de Dab2, que se expresa en este tipo celular (datos del laboratorio), no sea importante o incluso podría ser reemplazado por otra molécula adaptadora que se expresa en esta línea celular.

Los siguientes estudios de los motivos del dominio citoplasmático de megalina mostraron que el primer motivo NPxY del receptor era importante para su internalización, ya que mutaciones de aminoácidos claves del motivo, como la tirosina 80 o la asparragina 77, generaban una disminución en la velocidad inicial de internalización de aproximadamente 40%. Este resultado se correlaciona con datos publicados recientemente donde se muestra que la proteína adaptadora ARH (Autosomal Recessive Familial Hypercholesterolemia) es capaz de unirse específicamente a este motivo del dominio citosólico y estimular la internalización de megalina [20]. ARH fue descubierta a raíz de la existencia de pacientes con mutaciones en este gen

que son incapaces de internalizar LDL en el hígado y por lo tanto, desarrollan hipercolesterolemia [114]. Sin embargo, la internalización de LDL en fibroblastos de estos pacientes era normal, lo cual deja en evidencia las diferencias que existen a nivel de la maquinaria endocítica entre los distintos tipos celulares. Posteriormente se demostró que la proteína ARH, al igual que Dab2, se unía a motivos del tipo FxNPxY y que también interaccionaba con clatrina y componentes del complejo AP2. A pesar de que ARH es capaz de modular la endocitosis de megalina, probablemente a través del primer motivo NPxY, es importante resaltar que la ausencia de este motivo no afecta completamente la internalización del receptor. Estos datos sugieren que existe más de un motivo de endocitosis funcional en megalina. Sorpresivamente, la mutación de todos los posibles motivos simultáneamente no bloquea la internalización del receptor, cuya velocidad de internalización fue comparable a la del receptor con sólo el primer motivo NPxY mutado. Estos resultados están en desacuerdo con datos publicados [108] que sugieren que el primer y tercer motivo NPxY del dominio citosólico de megalina son las señales de endocitosis para el receptor. Sin embargo, el trabajo realizado por Takeda y cols., 2003 [108], se basó en estudios de degradación de ligandos para medir la capacidad endocítica del receptor y no se realizaron ensayos que midieran directamente la velocidad de internalización. Por otro lado, en este trabajo se analizó la velocidad de internalización de minireceptores truncados y no mutaciones puntuales de cada motivo específico. El uso de este tipo de construcciones podría alterar

más de un motivo en el receptor y/o exponer otros motivos que no funcionan cuando el dominio citoplasmático está completo. En nuestro caso, las mutaciones puntuales de los 2 motivos NPxY generados en el dominio citosólico de megalina no fueron suficientes para bloquear la internalización del receptor. En este contexto, se plantea que existiría otra señal de internalización dentro del dominio citosólico de megalina que no es de consenso. Por otro lado, existe la posibilidad que los motivos basados en tirosina, que no participan en la internalización, podrían funcionar en otras etapas del tráfico endocítico como el reciclaje y la degradación.

La regulación de la internalización de megalina parece ser un proceso muy complejo que depende de varios motivos citoplasmáticos y proteínas citosólicas. El complejo AP2 ha sido descrito como el complejo adaptador principal para la endocitosis mediada por clatrina, sin embargo estudios recientes han mostrado que receptores como LDL-R pueden ser eficientemente internalizados en ausencia de este complejo [66]. Estos antecedentes sugieren que megalina contiene otro tipo de señales de endocitosis, aparte de los motivos clásicos basados en tirosinas y dileucinas, que podrían estar mediando la interacción del receptor con la maquinaria endocítica. La endocitosis de la variante sin el motivo rico en prolinas fue más rápida que la del receptor con el dominio citosólico completo. Este motivo rico en prolinas mediaría una interacción entre proteínas pertenecientes al citoesqueleto de actina, por lo que era posible que la actina participara como una barrera que impide la internalización rápida de

megalina. La eliminación de esta interacción podría facilitar la internalización del receptor a través del primer motivo NPxY.

3. Interacción de Megalina con Proteínas del Citoesqueleto de Actina y su Regulación en la Endocitosis.

La interacción de megalina con varias proteínas citosólicas como Dab2 [19], GIPC [24], PSD-95 [25] y proteínas de membrana como NHE3 [115] sugieren que este receptor podría interaccionar, al menos indirectamente, con el citoesqueleto de actina. En este trabajo se evaluó esta posible interacción utilizando un enfoque bioquímico basado en la insolubilidad en detergentes no iónicos a 4° C. Esta propiedad la poseen proteínas que forman complejos con el citoesqueleto y proteínas asociadas a microdominios lipídicos. Dado que megalina se asocia a estos microdominios lipídicos, se utilizaron los minireceptores que contienen el dominio de transmembrana del LRP, el cual no confiere la capacidad de asociarse a estos microdominios [37]. En los dos tipos celulares estudiados, MDCK y CHO, una fracción importante de los minireceptores que contienen el dominio citosólico de megalina se encuentran en la fracción insoluble en TX-100 a 4° C, a diferencia del mismo minireceptor en el que el dominio citosólico del LRP está presente (figura 11). El motivo rico en prolinas y/o el motivo de interacción con dominios PDZ, son importantes en esta interacción con proteínas del citoesqueleto de actina.

En sistemas como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* existe una relación directa entre el citoesqueleto de actina y procesos endocíticos. Sin embargo, en células animales el papel del citoesqueleto de actina en la endocitosis de proteínas es más variable [116]. Por un lado, se postula que habría una relación funcional entre ambos, puesto que debajo de la membrana plasmática existe un citoesqueleto de actina cortical y muchos componentes de la maquinaria endocítica son capaces de interactuar directa o indirectamente con estos componentes [117]. Por otro lado, los datos de la literatura indican que la endocitosis no siempre es afectada por cambios en el citoesqueleto de actina y puede depender de los siguientes factores, como del tipo de receptor, el tipo celular y las condiciones de cultivo [118]. En nuestro caso, la disociación del citoesqueleto de actina en células CHO o MDCK no generó un efecto importante sobre la internalización del receptor. Sin embargo, es importante señalar que los experimentos fueron realizados con células CHO y MDCK, las cuales al ser cultivadas en placas no generan un fenotipo polarizado. Este es un factor importante a considerar puesto que estudios previos con células MDCK polarizadas sugieren que la integridad del citoesqueleto de actina juega un papel clave en la endocitosis apical [102].

Independiente de los resultados anteriores, los cuales pueden deberse a las condiciones experimentales empleadas, existen otros datos que sugieren que megalina, a través de su dominio citosólico, podría interactuar, al menos indirectamente, con el citoesqueleto de actina. Esta

interacción podría ocurrir a través de varias proteínas. Una de ellas es Dab2, la cual interacciona con el segundo motivo NPxY del dominio citosólico de megalina y también con miosina VI, una proteína motora del citoesqueleto de actina [119]. Esta proteína es una miosina no convencional, ya que se mueve hacia el extremo negativo de filamentos de actina. En el caso de células epiteliales desde de microvellosidades de la membrana plasmática hacia el interior de la célula y se sugiere que podría estar involucrada, junto con Dab2 en el secuestro de receptores en la base de las microvellosidades, donde ocurre la formación de foveolas cubiertas [119]. Por otro lado, también se ha planteado que miosina VI participaría en la etapa posterior de formación de vesículas cubiertas por clatrina o en el transporte de vesículas endocíticas hacia el endosoma temprano. Algunas isoformas de miosina VI se han encontrado específicamente en compartimentos de la superficie apical de células epiteliales, sin embargo se ha visto que las distintas isoformas de miosina VI se localizan en vesículas endocíticas sin cubierta de clatrina [120]. Adicionalmente, trabajos recientes muestran que miosina VI es necesaria para la internalización de proteínas apicales como CFTR [121], pero para el caso de megalina, aún no se ha encontrado una función específica en el tráfico endocítico. La asociación de megalina con miosina VI también podría ocurrir a través de una proteína llamada GIPC, la cual se localiza en vesículas endocíticas. Esta proteína interacciona con miosina VI y con el motivo PDZ del dominio citosólico de megalina y podría servir de puente entre ambos [122]. La interacción indirecta de megalina con esta

proteína motora a través de distintas proteínas sugiere que podría cumplir un papel en el tráfico celular de este receptor, pero aún no existen datos que demuestran esto. Estudios donde se sobreexpresó una forma dominante negativa de miosina VI, se observó una disminución en la captación de transferrina. Es interesante destacar que el defecto no se observó en la velocidad de captación inicial de transferrina, sino en una etapa posterior de transporte de vesículas hacia el endosoma temprano [123]. En este trabajo se postuló que la miosina VI funciona en el transporte de vesículas endocíticas a través del citoesqueleto de actina hacia el endosoma temprano.

Para el caso de megalina, la eliminación del motivo PDZ que podría mediar una interacción con miosina VI, no afectó la internalización del receptor desde la membrana plasmática, sin embargo, la cuantificación de minireceptores en la superficie celular, mediante citometría de flujo, mostró que la variante Δ PDZ está más concentrada al interior de la célula en relación con el receptor nativo. Esta mutante presentó un defecto en etapas posteriores de la endocitosis, al igual que en el caso del receptor de transferrina, y resultó ser un 30% menos eficiente en la capacidad de degradación de ligandos comparado con el receptor nativo. Estos resultados sugieren que la interacción a través del motivo PDZ de megalina con proteínas como GIPC, que a su vez interacciona con miosina VI, podría ser requerido en la etapa de transporte de vesículas que contienen el receptor, hacia el endosoma temprano. La eliminación de las interacciones entre

megalina y estas proteínas citosólicas genera un retardo en las etapas posteriores de la endocitosis, lo cual afecta la capacidad del receptor para mediar la degradación eficiente los ligandos. Por otro lado, es posible que el motivo de interacción con dominios PDZ regule específicamente el reciclaje del receptor como ha sido descrito para CFTR [124].

4. Asociación de Megalina a Microdominios lipídicos.

Megalina, como un minireceptor que contiene el dominio de transmembrana de megalina, es capaz de asociarse a balsas lipídicas. Estos son microdominios lipídicos presentes en las membranas celulares y están enriquecidos en colesterol y glicosfingolípidos [104]. Los datos muestran que el enriquecimiento de megalina en las fracciones de balsas lipídicas, varía de acuerdo al tipo de detergente utilizado para obtener los extractos celulares. La fracción de megalina presente en balsas lipídicas fue menor cuando se utilizó TX-100 para generar los extractos y mayor cuando se usó Chaps o Lubrol. Esta diferencia en el enriquecimiento puede deberse a la capacidad de cada detergente de extraer distintos tipos de rafts. Estudios anteriores han mostrado que la extracción de células con diferentes detergentes influye sobre la composición del los rafts que se aíslan, lo cual sugiere que en las células existe una población heterogénea de microdominios lipídicos que varían en cuanto a su composición proteica y lipídica [84]. Nuestros datos muestran que siempre existe un porcentaje de megalina presente en las fracciones de balsas lipídicas independientemente

del tipo de detergente usado, lo cual permite concluir que efectivamente existe una asociación del receptor con microdominios lipídicos. Megalina se asociaría con microdominios lipídicos tempranamente en la ruta secretora (figura 6) y esto sugiere que esta asociación podría tener un papel en la destinación de la proteína desde TGN hacia el dominio apical, como ha sido descrito para otras proteínas [125]. Sin embargo nuestros datos indican que la asociación de megalina a balsas lipídicas no es un requisito para la destinación apical del receptor y que la información presente en el dominio citosólico es suficiente para su localización apical. Por otro lado, existe la posibilidad que la asociación de megalina a microdominios lipídicos podría regular otros aspectos del tráfico del receptor. Se ha mostrado que proteínas que se endocitan a través de microdominios lipídicos llegan a un compartimiento intracelular que es diferente al del endosoma temprano. Este compartimiento presenta características distintas de la de los compartimentos endocíticos clásicos. Por un lado, no presenta el marcador endosomal EEA-1 y, además, posee un pH más neutro y no ácido como el del endosoma temprano [126]. La incorporación de megalina a este tipo de compartimientos podría tener una relevancia fisiológica ya que a diferencia del pH ácido del endosoma temprano, que favorece la disociación del ligando de su receptor, el pH neutro evitaría la disociación ligando-receptor y permitiría a este complejo ser transportado a otros compartimentos intracelulares o al lado opuesto de la membrana mediante transcitosis. La internalización de megalina a través de balsas lipídicas podría constituir un

mecanismo fisiológico utilizado por el receptor para realizar transcitosis de algunos ligandos como la tiroglobulina [76] o la proteína de unión a retinol (RBP) [75]. La internalización de megalina en células BN no es afectada por drogas que secuestran el colesterol y desintegran los microdominios lipídicos, sugiriendo que el receptor no es internalizado a través de estos microdominios lipídicos. Como no se ha analizado este efecto en tipos celulares polarizados, donde ocurre la transcitosis del receptor, esto no puede descartarse. Por otra parte, es posible que exista una vía de internalización mediado por microdominios lipídicos que se manifiesta por la unión de ligandos específicos al ectodominio de megalina.

Por otra parte, nuestros datos sugieren que cambios en la estabilidad o estructura del citoesqueleto de actina afectarían la distribución de megalina en balsas lipídicas, y también ha sido descrito para otras proteínas como la de adhesión molecular CD44 [127]. En conjunto con los experimentos de insolubilidad en TX-100, este resultados sugiere que existiría una asociación de megalina con citoesqueleto de actina, la cual modula su incorporación a microdominios lipídicos, probablemente por que retiene el receptor en complejos de alta densidad.

Nuestros resultados también muestran que la asociación de megalina a balsas lipídicas depende del dominio de transmembrana del receptor ya que minireceptores con el dominio de transmembrana de megalina son capaces de flotar en gradientes de sacarosa a diferencia del mismo

minireceptor que posee el dominio de transmembrana del LRP. Dado que la asociación a microdominios lipídicos ha sido descrita como un elemento que regula el tráfico de proteínas, se indagó si la asociación de megalina a microdominios lipídicos podría ser importante para la internalización del receptor. Para ello, se comparó la velocidad inicial de internalización del minireceptor que contenía el dominio de transmembrana de megalina y que se asocia con balsas lipídicas, con el minireceptor que contiene el dominio de transmembrana de LRP y que no presenta esta propiedad. Sorpresivamente, se encontró una diferencia sustancial en la velocidad de internalización de ambos receptores, a pesar de que los dos receptores contenían el mismo ectodominio y dominio citoplasmático. La velocidad de internalización del minireceptor con transmembrana de megalina era muy baja y muy similar al receptor sin dominio citoplasmático. Estudios de inmunoprecipitación con un anticuerpo dirigido contra el epítotope HA, muestra que el único producto del procesamiento por furina es el ectodominio de 120 kDa, es decir que no existe el fragmento de 97 kDa que incluye el dominio citosólico del receptor (figura 45). Sin embargo, cuando se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo que reconoce el dominio citosólico de megalina, se observó el minireceptor, en su forma no procesada (producto de 220 kDa), pero tampoco se detectó el fragmento de 97 kDa. Estos datos sugieren que las células expresan la construcción completa del minireceptor con el dominio de transmembrana de megalina, pero que el fragmento de 97 kDa parece

ser muy inestable y no hemos podido dilucidar por qué el dominio citosólico del minireceptor presenta esta propiedad.

5. Caracterización de la Fosforilación del Dominio Citoplasmático de Megalina.

La fosforilación de proteínas ha sido implicada en la regulación de diversos aspectos del tráfico intracelular de proteínas, como la endocitosis y transcitosis. Se ha descrito que la fosforilación de LRP por PKA es importante para estimular la internalización del receptor [71]. Asimismo, la fosforilación del receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR) en un residuo de serina localizado en el dominio citoplasmático es requerida para una transcitosis eficiente del receptor desde el dominio basolateral al apical. En este caso, al inhibir la fosforilación del receptor, reemplazando la serina por alanina, se observa una disminución de la transcitosis del receptor y se favorece el reciclaje. Por otro lado, la presencia de un aminoácido cargado negativamente en esta posición genera una transcitosis rápida del receptor [128]. En el caso de megalina nuestros datos indican que el dominio citoplasmático es fuertemente fosforilada *in vivo*, pero se desconocía cuál podría ser su función. El hecho que el dominio citoplasmático de megalina es tan fuertemente fosforilado, sugiere que es importante para la función del receptor y podría estar involucrado en diversos procesos tanto de su tráfico celular como aspectos de señalización intracelular.

Estudios previos del laboratorio, usando inhibidores de quinasas, sugerían que la fosforilación de megalina ocurría en serina o treonina. En el dominio citosólico del receptor existen 4 potenciales sitios de fosforilación por PKC, uno por PKA y ocho por caseína quinasa II, de los cuales tres se sobreponen con sitios de fosforilación por PKC (figura 2). Uno de los objetivos principales de esta tesis fue determinar donde se estaba fosforilando megalina y posteriormente analizar el papel en la regulación del tráfico intracelular. Para lograr este objetivo, primero se intentó dilucidar cual de los motivos presentes en el dominio citosólico de megalina se estaba fosforilando. Para ello, se utilizó el minireceptor formado por el cuarto ectodominio y dominio de transmembrana del LRP y el dominio citosólico de megalina (mLRP4lrptmMegT), sobre el cual se realizaron las distintas mutaciones. Primero, se demostró que el minireceptor también se fosforilaba fuertemente *in vivo*, al igual que la proteína endógena. El análisis del minireceptor muestra que la fosforilación de la forma no procesada (220 kDa) es mucho menor comparado con el producto de 97 kDa que contiene el dominio citoplasmático de megalina y que se genera a partir del corte enzimático del receptor por furina a nivel del complejo de Golgi. Esta observación sugiere que la fosforilación del receptor ocurriría principalmente después de su paso por TGN. Por otro lado, se encontró que el minireceptor que contiene GFP como ectodominio, el dominio de transmembrana del LRP fusionado al dominio citosólico de megalina presentaba un nivel de fosforilación similar al que ocurría en la proteína endógena. Este dato

sugiere que la fosforilación del dominio citosólico de megalina podría ser constitutiva e independiente de la unión de ligandos al ectodominio, aún que no se descarta que pueda haber cambios en el nivel de fosforilación inducido por ligandos específicos para el receptor.

Al caracterizar la fosforilación del dominio citoplasmático de megalina se encontró que éste era un proceso complejo que probablemente ocurre en más de un sitio e involucra diferentes quinasas. Por un lado, el estudio de mutantes únicas para cada potencial sitio de fosforilación por PKC y PKA no mostró disminuciones en el nivel de fosforilación del receptor. Además, cuando se mutaron todos los sitios de fosforilación por PKC y el sitio de fosforilación por PKA en una misma construcción, no se observó ninguna disminución significativa de la fosforilación comparado con el receptor sin mutar. Estos datos sugieren que la fosforilación más importante de megalina ocurriría en motivos diferentes a los de consenso por PKA y PKC. En este contexto se exploró el papel de la caseína quinasa II, ya que en el dominio citoplasmático del receptor existen sitios de consenso para esta quinasa. Estudios usando inhibidores de quinasas sugieren que la caseína quinasa II en conjunto con la PKC podría participar en la fosforilación del receptor. Para localizar los sitios de fosforilación del dominio citosólico, se analizó la fosforilación *in vivo* de minireceptores con dominio citosólico de megalina truncados. Dado que todas las formas truncadas se fosforilan, incluyendo el minireceptor con sólo los primeros 30 aminoácidos, sugiere que el receptor se fosforila en múltiples sitios que se ubican en diferentes sitios a lo largo de

dominio intracelular del receptor. Es importante señalar que estos estudios no necesariamente reflejan el comportamiento del receptor *in vivo* ya que en las formas truncadas se pueden exponer sitios de fosforilación que normalmente no se fosforilan en contexto del dominio citosólico completo. Sin embargo, se puede concluir que en la fosforilación del dominio citosólico de megalina participaría más de un tipo de quinasa y que, en particular, la CK-II pareciera tener un papel importante. En este sentido, es importante señalar que el tráfico celular de diversas proteínas como la aquoporina4 [129], furina [130] y de la proteína viral gE del virus varicella-zoster [131], es regulada a través de la fosforilación por CK-II.

6. Identificación del Principal Motivo de Fosforilación en el Dominio Citoplasmático de Megalina y su Papel en la Endocitosis del Receptor.

Estudios de otros miembros de la familia LDL-R, que incluyen LRP-5 y LRP-6, muestran que en el dominio citosólico de estos receptores existe un motivo del tipo PPPSP donde se fosforila un residuo de Serina [97]. Nuestros datos muestran que una variante del minireceptor de megalina, a la cual se eliminó una región rica en prolina (aminoácidos 166-174) de la región citoplasmática, presentaba una disminución significativa en el nivel de fosforilación. Estos datos sugerían que este motivo era importante para la

interacción de alguna quinasa con el dominio citoplasmático del receptor o que dentro del motivo eliminado existía un motivo de fosforilación. Interesantemente, esta región eliminada contiene un motivo PPPSP, por lo que se especuló que la serina presente dentro de este motivo rico en prolinas podría ser fosforilada. Efectivamente, cuando se mutó esta serina por alanina se encontró una disminución casi completa de la fosforilación del receptor, por lo que se pudo concluir que el motivo PPPSP es un motivo principal de fosforilación de megalina. Esto, es la primera vez que se describe un motivo de fosforilación en el dominio citosólico del receptor y resulta ser muy interesante desde varios puntos de vista. Primero por que receptores, como LRP5 y 6, que se fosforilan en este motivo, están involucrados en la vía de señalización por Wnt [97], lo cual abre un campo de estudio novedoso para megalina, ya que también podría estar participando en esta vía. Por otro lado, nos permitió evaluar directamente el papel de la fosforilación en aspectos del tráfico del receptor, como la endocitosis, lo cual no había sido abordado en otros trabajos.

Nuestros resultados muestran que la fosforilación del dominio citoplasmático de megalina cumple una función más bien inhibitoria, ya que la mutante S170A con el sitio principal de fosforilación mutado, presentaba una velocidad inicial de internalización mayor comparado con el receptor sin mutación y con un nivel de fosforilación normal. Esto difiere de lo que se ha descrito para otros receptores como el receptor β -1 adrenérgico [69] y LRP [71], cuya internalización es estimulada por la fosforilación por PKA. Sin

embargo, estudio recientes muestran que el dominio citoplasmático de LRP también es fosforilado por PKC α y en este caso juega un papel negativo sobre la internalización del receptor y por otro lado favorece la interacción con moléculas señalizadoras como Shc [132]. En el caso de megalina, sería interesante estudiar si la fosforilación este motivo también regula el reclutamiento de proteínas citosólicas involucradas en procesos de transducción de señales ya descritas para el receptor [17]. Adicionalmente, es posible que la fosforilación del receptor pudiera estar involucrado en la modulación de otros aspectos del tráfico celular del receptor como la transcitosis.

En relación con la quinasa involucrada en la fosforilación del motivo PPPSP, aún no existen datos en este aspecto. Nuestros resultados sugieren que la fosforilación del motivo PPPSP podría ser dependiente de la caseína quinasa-II, ya que la disminución en el nivel de fosforilación del dominio citosólico generado por inhibidores de CK-II era comparable con el efecto generado por la mutación del la serina perteneciente al motivo PPPSP. Por otro lado, los datos muestran que la fosforilación residual que se observa en esta mutante era dependiente de PKC y no de CK-II.

V. CONCLUSIONES

1. Mediante estudios de fraccionamiento en gradientes de sacarosa se determinó que megalina se asocia con microdominios lipídicos.
2. La incorporación de megalina a balsas lipídicas depende del dominio de transmembrana y ocurre tempranamente en su paso por la ruta secretora (TGN). Esto sugiere que el dominio de transmembrana podría participar en la segregación apical del receptor en conjunto con la información presente en el dominio citosólico del receptor.
3. La interacción de megalina con microdominios lipídicos está regulada por la integridad del citoesqueleto de actina.
4. Una fracción de megalina y un minireceptor con el dominio citosólico de megalina son insolubles en Tritón X-100 a 4° C, sugiriendo que, a través del dominio citosólico, existiría una interacción con proteínas del citoesqueleto.
5. Los motivos de interacción con dominios SH3 y PDZ del dominio citosólico de megalina regularían la interacción con citoesqueleto.
6. Se generó una proteína reportadora que no presenta información de destinación polarizada conocida y constituye una herramienta valiosa para estudiar la información de destinación presente en el dominio citoplasmático de proteínas.

7. El dominio citoplasmático de contiene información suficiente para su localización apical. Esto constituye el primer ejemplo de una proteína de membrana del tipo I que contiene información de destinación apical en su dominio citosólico.

8. La información de destinación al dominio apical de megalina podría encontrarse entre los aminoácidos 60 y 90; y entre los aminoácidos 120 y 150 del dominio citosólico del receptor.

9. El primer motivo NPxY podría funcionar como señal apical del receptor.

10. La endocitosis de megalina es un proceso mediado por clatrina y un motivo del tipo NPxY constituye una importante señal para su internalización.

11. El motivo de interacción con dominios PDZ no participa en la internalización del receptor, pero si es importante para la degradación eficiente de ligandos.

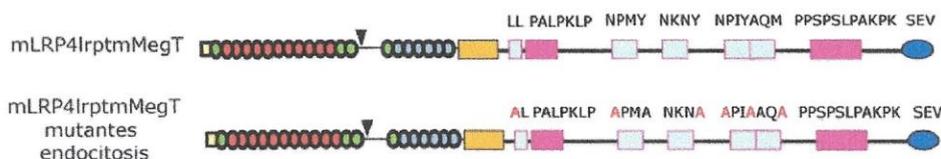
10. Un motivo del tipo PPPSP constituye el sitio principal de fosforilación del dominio citoplasmático de megalina.

11. La fosforilación del motivo PPPSP regula negativamente la internalización del receptor.

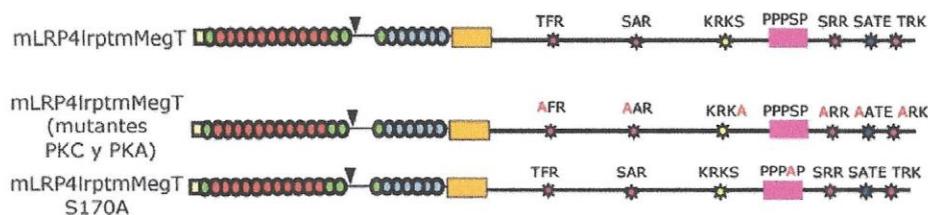
VI. ANEXO

1. Anexo 1: Mutantes generadas de los motivos del dominio citoplasmático de megalina.

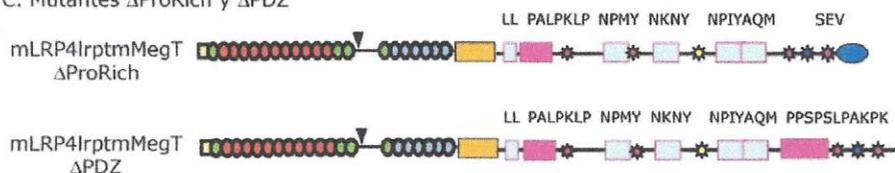
A. Mutantes en Motivos de Consenso de Endocitosis



B. Mutantes en Motivos de Consenso de Fosforilación



C. Mutantes Δ ProRich y Δ PDZ

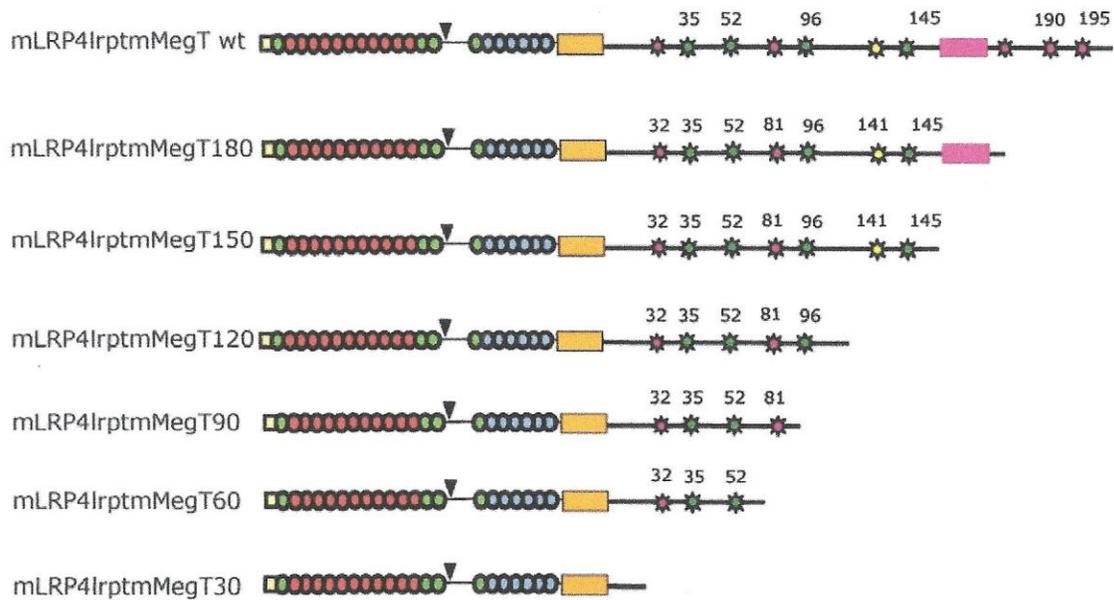


D. Minireceptor con transmembrana de megalina



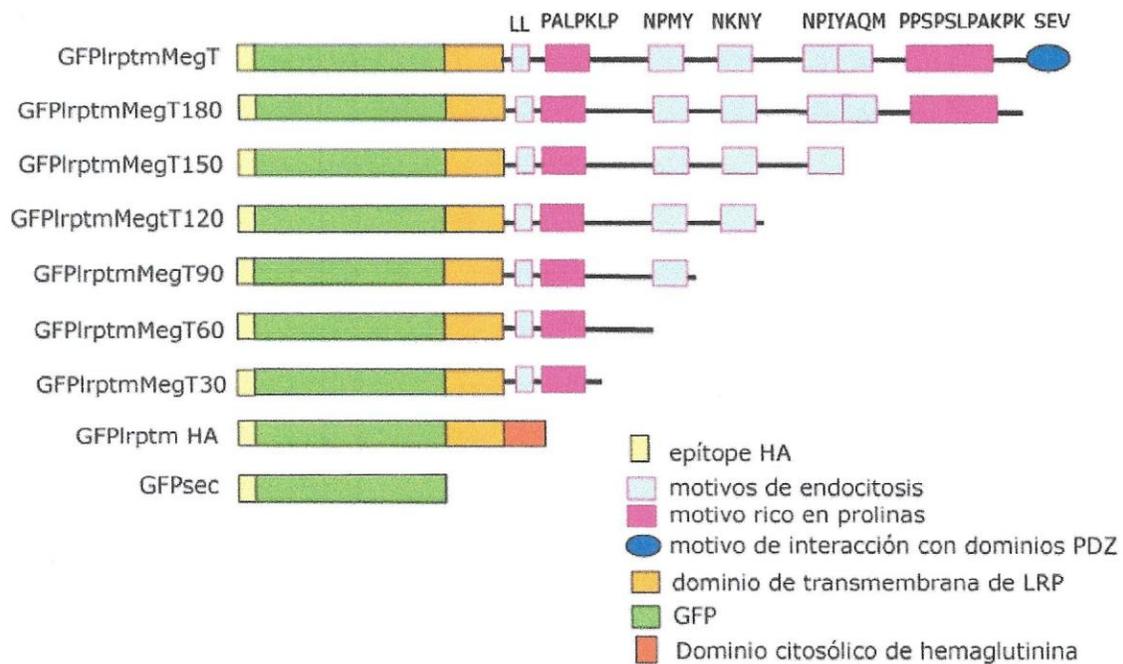
A) Motivos de endocitosis del receptor y las mutaciones puntuales que se generaron. El aminoácido clave de cada motivo fue mutado por alanina. En B) se destacan los potenciales sitios de fosforilación por PKA y PKC presentes en el dominio citosólico del receptor y las mutaciones creadas en estos posibles residuos fosforilables. En C) se muestran las mutantes de megalina cuyos dominios de interacción con motivos SH3 o PDZ fueron eliminados. D. Esquema del minireceptor que posee el dominio de transmembrana de megalina en lugar del de LRP.

2. Anexo 2 Mutantes truncadas del dominio citoplasmático de megalina.



Esquema del minireceptor con el dominio citoplasmático de megalina y las formas truncadas que se generaron. Se destacan los potenciales sitios de fosforilación por PKC, PKA y Caseína Quinasa II y el motivo rico en prolinas.

3. Anexo 3 Construcciones de GFP.



Construcciones de GFP-megalina utilizadas para analizar la información de destinación apical presente en el dominio citosólico de megalina. Se destacan los motivos basados en dileucinas y tirosinas, los motivos ricos en prolina y de interacción con dominios PDZ.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Krieger, M. and J. Herz, *Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)*. Annual Review of Biochemistry, 1994. **63**: p. 601-37.
2. Hussain, M.M., D.K. Strickland, and A. Bakillah, *The mammalian low-density lipoprotein receptor family*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 141-72.
3. Bu, G. and M.P. Marzolo, *Role of rap in the biogenesis of lipoprotein receptors*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(4): p. 148-55.
4. Li, Y., M. Marzolo, P. van Kerkhof, G.J. Strous, and G. Bu, *The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(22): p. 17187-17194.
5. Kerjaschiki, D. and M.G. Farquhar, *The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1982. **79**: p. 5557-5561.
6. Seido, O., Toshihiro Matsui^{1,2}, Kusuki Nishioka¹ and Tomohiro Kato¹, *Autoantibodies to low-density-lipoprotein-receptor-related protein 2 (LRP2) in systemic autoimmune diseases*. Arthritis Research & Therapy, 2003. **5**(3): p. R174-R180.
7. Lundgren, S., T. Carling, G. Hjalmar, C. Juhlin, J. Rastad, U. Pihlgren, L. Rask, G. Akerstrom, and P. Hellman, *Tissue distribution of human gp330/megalin, a putative Ca(2+)-sensing protein*. J Histochem Cytochem, 1997. **45**(3): p. 383-92.
8. Moestrup, S.K., H. Birn, P.B. Fischer, C.M. Petersen, P.J. Verroust, R.B. Sim, E.I. Christensen, and E. Nexø, *Megalin-Mediated Endocytosis Of Transcobalamin-Vitamin-B-12 Complexes Suggests a Role Of the Receptor In Vitamin-B-12 Homeostasis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**(16): p. 8612-8617.
9. Cui, S., P.J. Verroust, S.K. Moestrup, and E.I. Christensen, *Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule*. Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 2): p. F900-7.
10. Christensen, E.I., J.O. Moskaug, H. Vorum, C. Jacobsen, T.E. Gundersen, A. Nykjaer, R. Blomhoff, T.E. Willnow, and S.K. Moestrup, *Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(4): p. 685-95.

11. Nykjaer, A., D. Dragun, D. Walther, H. Vorum, C. Jacobsen, J. Herz, F. Melsen, E.I. Christensen, and T.E. Willnow, *An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3*. *Cell*, 1999. **96**(4): p. 507-15.
12. Willnow, T.E., J. Hilpert, S.A. Armstrong, A. Rohlmann, R.E. Hammer, D.K. Burns, and J. Herz, *Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(16): p. 8460-4.
13. Moestrup, S.K. and P.J. Verroust, *Megalin-and cubilin- mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids and hormones in polarized epithelia*. *Annu. Rev. Nutr.*, 2001. **21**: p. 407-428.
14. Marino, M., L. Chiovato, N. Mitsiades, F. Latrofa, D. Andrews, S. Tseleni-Balafouta, A.B. Collins, A. Pinchera, and R.T. McCluskey, *Circulating thyroglobulin transcytosed by thyroid cells in complexed with secretory components of its endocytic receptor megalin*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(9): p. 3458-67.
15. May, P. and J. Herz, *LDL receptor-related proteins in neurodevelopment*. *Traffic*, 2003. **4**(5): p. 291-301.
16. McCarthy, R., J. Barth, M. Chintalapudi, C. Knaak, and W. Argraves, *Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor*. *J. Biol. Chem.*, 2002. **277**: p. 25660-25667.
17. May, P., H.H. Bock, and J. Herz, *Integration of endocytosis and signal transduction by lipoprotein receptors*. *Sci STKE*, 2003. **2003**(176): p. E12.
18. Gotthardt, M., M. Trommsdorff, M.F. Nevitt, J. Shelton, J.A. Richardson, W. Stockinger, J. Nimpf, and J. Herz, *Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(33): p. 25616-24.
19. Oleinikov, A.V., J. Zhao, and S.P. Makker, *Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytic receptor gp600/megalin*. *Biochem J*, 2000. **347**(Pt 3): p. 613-621.
20. Nagai M, M.T., Takeda T, Farquhar MG., *The adaptor protein ARH escorts megalin to and through endosomes*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**((12)): p. 4984-96.
21. Hjalm, G., E. Murray, G. Crumley, W. Harazim, S. Lundgren, I. Onyango, B. Ek, M. Larsson, C. Juhlin, P. Hellman, H. Davis, G. Akerstrom, L. Rask, and B. Morse, *Cloning and sequencing of human gp330, a Ca(2+)-binding*

- receptor with potential intracellular signaling properties. *Eur J Biochem*, 1996. **239**(1): p. 132-7.
22. Saito, A., S. Pietromonaco, A.K. Loo, and M.G. Farquhar, *Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(21): p. 9725-9.
 23. Li, Y., M.P. Marzolo, P. Kerkhof, G.J. Strous, and G. Bu, *The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal For LDL receptor-related protein (LRP)*. *J Biol Chem*, 2000. **275**: p. 17187-17194.
 24. Lou, X., T. McQuistan, R. Orlando, and M. Farquhar, *GAIP, GIPC and Gai3 are concentrated in endocytic compartments of proximal tubule cells: putative role in regulating megalin's function*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**: p. 918-927.
 25. Larsson M, H.G., Sakwe AM, Engstrom A, Hoglund AS, Larsson E, Robinson RC, Sundberg C, Rask L., *Selective interaction of megalin with postsynaptic density-95 (PSD-95)-like membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins*. *Biochem J*, 2003. **373**((Pt 2)): p. 381-91.
 26. Yeaman, C., K.K. Grindstaff, and W.J. Nelson, *New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(1): p. 73-98.
 27. Dotti, C.G., J. Kartenbeck, and K. Simons, *Polarized distribution of the viral glycoproteins of vesicular stomatitis, fowl plague and Semliki Forest viruses in hippocampal neurons in culture: a light and electron microscopy study*. *Brain Res*, 1993. **610**(1): p. 141-7.
 28. van Meer, G. and K. Simons, *Lipid polarity and sorting in epithelial cells*. *J Cell Biochem*, 1988. **36**(1): p. 51-8.
 29. Matter, K. and I. Mellman, *Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells*. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. **6**: p. 545-554.
 30. Fanning, A.S. and J.M. Anderson, *Protein modules as organizers of membrane structure*. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. **11**(4): p. 432-9.
 31. Rodriguez-Boulan, E. and C. Zurzolo, *Polarity signals in epithelial cells*. *J Cell Sci Suppl*, 1993. **17**: p. 9-12.

32. Matter, K., E.M. Yamamoto, and I. Mellman, *Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells*. J Cell Biol, 1994. **126**(4): p. 991-1004.
33. Mostov, K.E. and M.H. Cardone, *Regulation of protein traffic in polarized epithelial cells*. Bioessays, 1995. **17**(2): p. 129-38.
34. Rodriguez-Boulan, E. and S.K. Powell, *Polarity of epithelial and neuronal cells*. Ann Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 395-427.
35. Simmen, T., S. Höning, A. Icking, R. Tikkanen, and W. Hunziker, *AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells*. NATURE CELL BIOLOGY, 2002. **4**: p. 154-158.
36. Folsch, H., H. Ohno, J.S. Bonifacino, and I. Mellman, *A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells*. Cell, 1999. **99**(2): p. 189-98.
37. Marzolo, M.P., M.I. Yuseff, C. Retamal, M. Donoso, F. Ezquer, P. Farfan, Y. Li, and G. Bu, *Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains*. Traffic, 2003. **4**(4): p. 273-88.
38. Alfalah, M., R. Jacob, and H.Y. Naim, *Intestinal Dipeptidyl Peptidase IV Is Efficiently Sorted to the Apical Membrane through the Concerted Action of N- and O-Glycans as Well as Association with Lipid Microdomains*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10683-90.
39. Rodriguez-Boulan, E. and A. Gonzalez, *Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props?* Trends Cell Biol, 1999. **9**(8): p. 291-4.
40. Vogel, L.K., M. Spiess, H. Sjostrom, and O. Noren, *Evidence for an apical sorting signal on the ectodomain of human aminopeptidase N*. J Biol Chem, 1992. **267**(4): p. 2794-7.
41. Marzolo, M.P., P. Bull, and A. Gonzalez, *Apical sorting of hepatitis B surface antigen (HBsAg) is independent of N-glycosylation and glycosylphosphatidylinositol-anchored protein segregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1834-9.
42. Lin, S., H.Y. Naim, C. Rodriguez, and M.G. Roth, *Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of then transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells*. J. Cell Biol., 1998. **142**(1): p. 51-57.

43. Chuang, J.Z. and C.H. Sung, *The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells*. J Cell Biol, 1998. **142**(5): p. 1245-56.
44. Rotin, D., D. Bar-Sagi, O.B. H, J. Merilainen, V.P. Lehto, C.M. Canessa, B.C. Rossier, and G.P. Downey, *An SH3 binding region in the epithelial Na⁺ channel (α rENaC) mediates its localization at the apical membrane*. Embo J, 1994. **13**(19): p. 4440-50.
45. Sun, A.Q., M. Ananthanarayanan, C.J. Soroka, S. Thevananther, B.L. Shneider, and F.J. Suchy, *Sorting of rat liver and ileal sodium-dependent bile acid transporters in polarized epithelial cells*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 1): p. G1045-55.
46. Lisanti, M.P. and E. Rodriguez-Boulan, *Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells*. Trends Biochem Sci, 1990. **15**(3): p. 113-8.
47. Roman Polishchuk, A.D.P.a.J.L.-S., *3, Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway*. NATURE CELL BIOLOGY, 2004. **6**(4): p. 297-307.
48. De Matteis, M., Morrow JS., *Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway*. J Cell Sci, 2000. **113**((Pt 13)): p. 2331-43.
49. Fanning, A. and J. Anderson, *Protein Modules as organizers of membrane structure*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**: p. 432-439.
50. Kurashima, K., D.S. S, K. Szaszi, R. Ramjeesingh, J. Orlowski, and S. Grinstein, *The apical Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 29843-9.
51. Moyer, B.D., M. Duhaime, C. Shaw, J. Denton, D. Reynolds, K.H. Karlson, J. Pfeiffer, S. Wang, J.E. Mickle, M. Milewski, G.R. Cutting, W.B. Guggino, M. Li, and B.A. Stanton, *The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27069-74.
52. Biemesderfer, D., T. Nagy, B. DeGray, and P.S. Aronson, *Specific association of megalin and the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in the proximal tubule [In Process Citation]*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17518-24.
53. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**: p. 569-572.

54. Nusrat, A., C.A. Parkos, P. Verkade, C.S. Foley, T.W. Liang, W. Innis-Whitehouse, K. Eastburn, and J. Madara, *Tight junctions are membrane microdomains*. J Cell Sci, 2000. **113**: p. 1771-1781.
55. Brown, D., *GPI-anchored proteins and detergent-resistant membrane domains*. Braz J Med Biol Res, 1994. **27**(2): p. 309-15.
56. Sargiacomo, M., M. Sudol, Z. Tang, and M.P. Lisanti, *Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells*. J Cell Biol, 1993. **122**(4): p. 789-807.
57. Lin, S., H.Y. Naim, A.C. Rodriguez, and M.G. Roth, *Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells*. J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 51-7.
58. Simons, K.T., D., *Lipid Rafts and Signal Transduction*. Nat Reviews, 2000. **1**: p. 31-39.
59. Torgersen, M.L., G. Skretting, B. van Deurs, and K. Sandvig, *Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms*. J Cell Sci, 2001. **114**: p. 3737-3747.
60. Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, L. GC., A. Benmerah, and A. Dautry-Varsat, *Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway*. Mol Cell, 2001. **7**: p. 661-671.
61. Helms, J.B. and C. Zurzolo, *Lipids as Targeting Signals: Lipid Rafts and Intracellular Trafficking*. Traffic, 2004. **5**(4): p. 247-254.
62. Subtil, A.S., A. Hémar, and A. Dautry-Varsat, *Rapid Endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited*. J Cell Sci, 1994. **107**: p. 3461-3468.
63. Di Guglielmo, G.M., C. Le Roy, A.F. Goodfellow, and J.F. Wrana, *Distinct endocytosis pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover*. Nat Cell Biol, 2003. **5**: p. 410-421.
64. Mousavi, S., L. Malerod, T. Berg, and R. Kjekken, *Clathrin-dependent endocytosis*. Biochem. J., 2004. **377**: p. 1-16.
65. Traub, L.M., *Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection*. J. Cell Biol., 2003. **163**(2): p. 203-208.

66. Motley A, B.N., Seaman MN, Robinson MS., *Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells*. J Cell Biol., 2003. **162**(5): p. 909-18.
67. Bonifacino, J.S.T., L.M., *Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes*. Annu. Rev. Biochem., 2003. **72**: p. 395-447.
68. Katsura, T., C.E. Gustafson, D.A. Ausiello, and D. Brown, *Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells*. Am J Physiol, 1997. **272**(6 Pt 2): p. F817-22.
69. Rapacciuolo, A., S. Suvarna, L. Barki-Harrington, L.M. Luttrell, M. Cong, R.J. Lefkowitz, and H.A. Rockman, *Protein Kinase A and G Protein-coupled Receptor Kinase Phosphorylation Mediates B-1 Adrenergic Receptor Endocytosis through Different Pathways*. J. Biol. Chem., 2003. **278**(37): p. 35403-35411.
70. Salazar, G. and A. Gonzalez, *Novel Mechanism for Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Endocytosis Revealed by Protein Kinase A Inhibition*. Mol Biol Cell, 2002. **13**: p. 1677-1693.
71. Li, Y., P. van Kerkhof, M.P. Marzolo, G.J. Strous, and G. Bu, *Identification of a major cyclic AMP-dependent protein kinase A phosphorylation site within the cytoplasmic tail of the low-density lipoprotein receptor-related protein: implication for receptor-mediated endocytosis*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1185-95.
72. Tuma, P. and A.L. Hubbard, *Transcytosis: crossing cellular Barriers*. Physiol Rev, 2003. **83**: p. 871-932.
73. Mostov, K., *Protein traffic in polarized epithelial cells: the polymeric immunoglobulin receptor as a model system*. J Cell Sci Suppl, 1993. **17**: p. 21-6.
74. Mostov, K.E., M. Verges, and Y. Altschuler, *Membrane traffic in polarized epithelial cells*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(4): p. 483-90.
75. Marino, M., D. Andrews, D. Brown, and R.T. McCluskey, *Transcytosis of Retinol-Binding Protein across Renal Proximal Tubule Cells after Megalin (gp 330)-Mediated Endocytosis*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(4): p. 637-48.
76. Marino, M., G. Zheng, L. Chiovato, A. Pinchera, D. Brown, D. Andrews, and R.T. McCluskey, *Role of megalin (gp330) in transcytosis of thyroglobulin by thyroid cells. A novel function in the control of thyroid hormone release*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 7125-37.

77. Obermoeller, L.M., Z. Chen, A.L. Schwartz, and G. Bu, *Ca²⁺ and receptor-associated protein are independently required for proper folding and disulfide bond formation of the low density lipoprotein receptor-related protein*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(35): p. 22374-81.
78. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 1989, CSH, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
79. Marmorstein, A.D., C. Zurzolo, A. Le Bivic, and E. Rodriguez-Boulan, *Cell Surface Biotinilation Techniques and Determination of protein polarity*, in *Cell Biology: A laboratory handbook*, J.E. Celis, Editor. 1998, Academic Press: San Diego. p. 341-350.
80. Hansen, S.H., K. Sandvig, and B. van Deurs, *Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification*. *J Cell Biol*, 1993. **121**(1): p. 61-72.
81. Heuser, J., *Effects of cytoplasmic acidification on clathrin lattice morphology*. *J Cell Biol.*, 1989. **108**((2)): p. 401-11.
82. Clarke, H., Soler, A and Mullin, J., *Protein kinase C activation leads to dephosphoylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets*. *J Cell Sci*, 2000. **113**: p. 3187-3196.
83. Lisanti, M.P. and E. Rodriguez-Boulan, *Polarized sorting of GPI-linked proteins in epithelia and membrane microdomains*. *Cell Biol Int Rep*, 1991. **15**(11): p. 1023-49.
84. Pike, L.J., *Lipid Rafts: heterogeneity on the high seas*. *Biochem J*, 2004. **378**: p. 281-292.
85. Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A. and Simos, K., *Resistance of cell membranes to different detergents*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003. **100**: p. 5795-5800.
86. Tetsuro Wakatsuki, Bill Schwab, N.C. Thompson, and a.E.L. Elson, *Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells*. *J. Cell Sci*, 2000. **114**: p. 1025-1036.
87. Shenolikar, S. and E.J. Weinman, *NHERF: targeting and trafficking membrane proteins*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **280**(3): p. F389-95.
88. Bretscher, A., *Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family*. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. **11**(1): p. 109-16.

89. Beck, K.A. and W.J. Nelson, *The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine*. Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 1): p. C1263-70.
90. Bello, V., J.W. Goding, V. Greengrass, A. Sali, V. Dubljevic, C. Lenoir, G. Trugnan, and M. Maurice, *Characterization of a di-leucine-based signal in the cytoplasmic tail of the nucleotide-pyrophosphatase NPP1 that mediates basolateral targeting but not endocytosis*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(10): p. 3004-15.
91. Matter, K., W. Hunziker, and I. Mellman, *Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants*. Cell, 1992. **71**(5): p. 741-53.
92. Matter, K., J.A. Whitney, E.M. Yamamoto, and I. Mellman, *Common signals control low density lipoprotein receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells*. Cell, 1993. **74**(6): p. 1053-64.
93. Pawson, T. and J. Scott, *Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins*. Science, 1997. **278**: p. 2075-2080.
94. Yudowski, G., R. Efendiev, C. Pedemonte, A. Katz, P. Berggren, and A. Bertorello, *Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na⁺, K⁺-ATPase alpha subunit and regulates its trafficking*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6556-61.
95. Magoski, N., G. Wilson, and L. Kaczmarek, *Protein Kinase Modulation of a Neuronal Cation Channel Requires Protein-Protein Interactions Mediated by an Src homology 3 Domain*. Journal of Neuroscience, 2002. **22**(1): p. 1-9.
96. Yu, X.-i., R. Askalan, G.J. Keil II, and M.W. Salter, *NMDA Channel Regulation by Channel-Associated Protein Tyrosine Kinase Src*. Science, 1997. **275**: p. 674-678.
97. Tamai K, Z.X., Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X. I., *A mechanism for Wnt coreceptor activation*. Mol Cell, 2004. **13**((1)): p. 149-56.
98. Bu, G., *Receptor-associated protein: a specialized chaperone and antagonist for members of the LDL receptor gene family*. Curr Opin Lipidol, 1998. **9**: p. 149-155.
99. Larkin JM, D.W., Anderson RG., *Potassium-dependent assembly of coated pits: new coated pits form as planar clathrin lattices*. J Cell Biol., 1986. **103**((6 Pt 2)): p. 2619-27.

100. Ros-Baró. A., L.-I., C., Peiró, S., Bellido, D., Palacín, M., Zorzano, A., Camps, M., *Lipid Rafts are Required for GLUT4 internalization in adipose cells.* Proc Natl Acad Sci USA, 2001. **98**(21): p. 12050-12055.
101. Gallagher H, O.A., Fenske C, Newman DJ., *The adaptor disabled-2 binds to the third Psi xNPxY sequence on the cytoplasmic tail of megalin.* Biochimie., 2004. **86**((3)): p. 179-82.
102. Gottlieb, T.A., I.E. Ivanov, M. Adesnik, and D.D. Sabatini, *Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells.* J Cell Biol, 1993. **120**: p. 695-710.
103. Zou Z, C.B., Nguyen T, Mentone S, Thomson B, Biemesderfer D.J Biol Chem. . Epub 2004 Jun 04. Related Articles, Links, *Linking receptor-mediated endocytosis and cell signaling: evidence for regulated intramembrane proteolysis of megalin in proximal tubule.* J. Biol. Chem., 2004. **279**((33)): p. 34302-10.
104. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes.* Nature, 1997. **387**: p. 569-572.
105. Yeaman, C., A.H. Le Gall, A.N. Baldwin, L. Monlauzeur, A. Le Bivic, and E. Rodriguez-Boulan, *The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells.* J Cell Biol, 1997. **139**(4): p. 929-40.
106. Scheiffele, P., J. Peranen, and K. Simons, *N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells.* Nature, 1995. **378**(6552): p. 96-8.
107. Muth, T.R., J. Ahn, and M.J. Caplan, *Identification of sorting determinants in the C-terminal cytoplasmic tails of the gamma-aminobutyric acid transporters GAT-2 and GAT-3.* J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25616-27.
108. Takeda, T., H. Yamazaki, and M.G. Farquhar, *Identification of an Apical Sorting Determinant in the Cytoplasmic Tail of Megalin.* Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **8**: p. 8.
109. Gan, Y., T.E. McGraw, and E. Rodriguez-Booulan, *The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane.* NATURE CELL BIOLOGY, 2002: p. 1-5.
110. Morelle, W., S.M. Haslam, M. Ziak, J. Roth, H.R. Morris, and A. Dell, *Characterization of the N-linked oligosaccharides of megalin (gp330) from rat kidney.* Glycobiology, 2000. **10**(3): p. 295-304.

111. Li, Y., W. Lu, M.P. Marzolo, and G. Bu, *Differential Functions of Members of the Low Density Lipoprotein Receptor Family Suggested by Their Distinct Endocytosis Rates*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18000-18006.
112. Mishra SK, K.P., Hawryluk MJ, Agostinelli NR, Watkins SC, Traub, *Disabled-2 exhibits the properties of a cargo-selective endocytic clathrin adaptor*. EMBO J., 2002. **21**((18)): p. 4915-26.
113. Morris, S.M., Tallquist, M.D., Rock, C.O. and Cooper J.A., *Dual roles for the Dab2 adaptor protein in embryonic development and kidney transport*. EMBO J, 2002. **21**: p. 1555-1564.
114. García, C.K.e.a., *Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein*. Science, 2001. **292**: p. 1394-1398.
115. Biemesderfer, D., T. Nagy, B. DeGray, and P.S. Aronson, *Specific association of megalin and the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in the proximal tubule*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17518-24.
116. Apodaca, G., *Endocytic traffic in polarized epithelial cells: Role of the Actin and Microtubule cytoskeleton*. Traffic, 2001. **2**: p. 149-159.
117. Schafer, D., *Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**((1)): p. 76-81.
118. Fujimoto, M.L., Roth, R., Heuser, J. and Schmid, S., *Actin Assembly Plays a Variable, but not Obligatory Role in Receptor-Mediated Endocytosis in Mammalian Cells*. Traffic, 2000. **1**: p. 161-171.
119. Morris, S., Arden SD, Roberts RC, Kendrick-Jones J, Cooper JA, Luzio JP, Buss F. Traffic., *Myosin VI binds to and localises with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton*. Traffic, 2002. **3**((5)): p. 331-41.
120. Dance, L.A., Miller, M., Seragaki, S., Aryal, P., White, B., Aschenbrenner, L. Hasson, T., *Regulation of Myosin-VI Targeting to Endocytic Compartments*. Traffic, 2004. **5**: p. 798-813.
121. Agnieszka Swiatecka-Urban, C.B., Bonita Coutermarsh, Katherine H. Karlson, Roxanna Barnaby*, Laura Aschenbrenner, George M. Langford, Tama Hasson, and Bruce A. Stanton, *Myosin VI Regulates Endocytosis of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*. J. Biol. Chem., 2004.

122. Hasson, T., *Myosin VI: two distinct roles in endocytosis*. J.Cell Sci., 2003. **116**((Pt 17)): p. 3453-61.
123. Aschenbrenner, L., Lee, T. and Hansson, T., *Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries*. Mol Biol Cell, 2003. **14**: p. 2728-2743.
124. Swiatecka-Urban, A., M. Duhaim, B. Coutermarsh, K. Karlson, J. Collawn, M. Milewski, G. Cutting, W. Guggino, G. Langford, and B. Stanton, *PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 40099-105.
125. Arreaza, G. and D.A. Brown, *Sorting and intracellular trafficking of a glycosylphosphatidylinositol- anchored protein and two hybrid transmembrane proteins with the same ectodomain in Madin-Darby canine kidney epithelial cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(40): p. 23641-7.
126. Parton, R.G. and A.A. Richards, *Lipid Rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms*. Traffic, 2003. **4**: p. 724-738.
127. Olfierenko S, P.K., Harder T, Gerke V, Schwarzler C, Schwarz H, Beug H, Gunthert U, Huber LA., *Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton*. J Cell Biol., 1999. **146**((4)): p. 843-54.
128. Casanova, J.E., P.P. Breitfeld, S.A. Ross, and K.E. Mostov, *Phosphorylation of the polymeric immunoglobulin receptor required for its efficient transcytosis*. Science, 1990. **248**(4956): p. 742-5.
129. Madrid R, Le Maout S, Barrault MB, Janvier K, Benichou S, and M. J., *Polarized trafficking and surface expression of the AQP4 water channel are coordinated by serial and regulated interactions with different clathrin-adaptor complexes*. EMBO J, 2001. **20**((24)): p. 7008-21.
130. Teuchert M, Berghofer S, Klenk HD, and G. W., *Functional importance of the cytoplasmic tail sorting signals and interaction with the AP-2 adaptor medium chain subunit. Recycling of furin from the plasma membrane*. J. Biol. Chem., 1999. **274**((51)): p. 36781-9.
131. Kenyon TK, Cohen JI, and G. C., *Phosphorylation by the varicella-zoster virus ORF47 protein serine kinase determines whether endocytosed viral gE traffics to the trans-Golgi network or recycles to the cell membrane*. J Virol, 2002. **76**((21)): p. 10980-93.

132. Ranganathan, S., C. Liu, M. Migliorini, C. Von Arnim, I. Peltan, I. Mikhailenko, B. Hyman, and D. Strickland, *Serine and threonine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein by protein kinase Calpha regulates endocytosis and association with adaptor molecules.* J Biol Chem., 2004. **279**((39)): p. 40536-44.