

UCH-FC
Biotecnología
D687
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias

**DETERMINANTES MOLECULARES Y CELULARES DEL
TRÁFICO INTRACELULAR DE LRP EN CÉLULAS
POLARIZADAS**

Memoria de Título
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

MARIBEL VANESSA DONOSO RIVERA

Noviembre, 2005
Santiago - Chile

Director de Tesis: Dra. María Paz Marzolo Canales
Laboratorio de Histología, Departamento de Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile.



“DETERMINANTES MOLECULARES Y CELULARES DEL TRÁFICO INTRACELULAR DE LRP EN CÉLULAS POLARIZADAS”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MARIBEL VANESSA DONOSO RIVERA

Dra. María Paz Marzolo Canales
Directora de Memoria de Título

Firma manuscrita en azul de la Dra. María Paz Marzolo Canales, sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Presidente Comisión

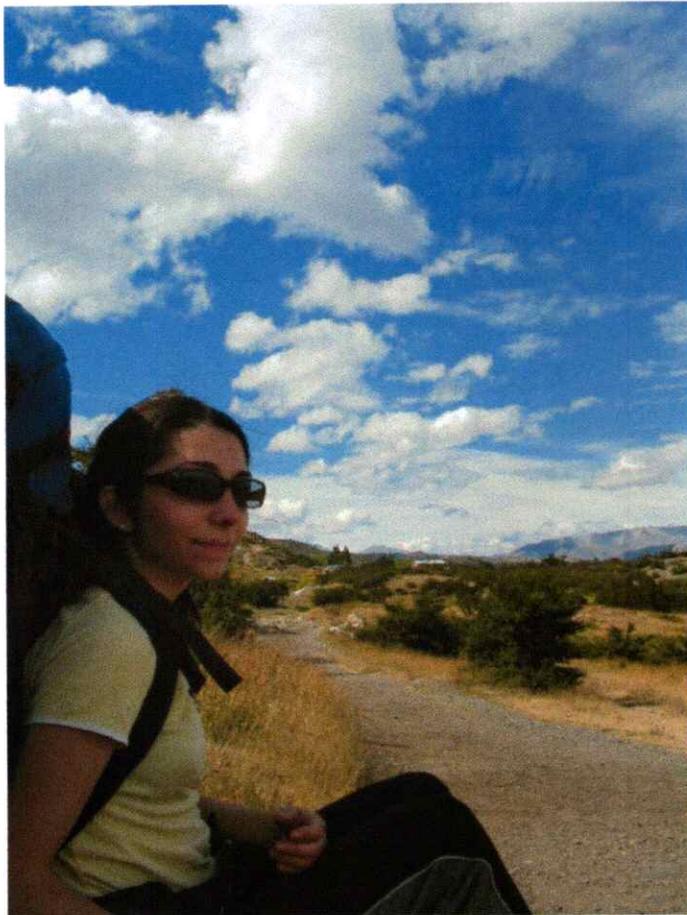
Firma manuscrita en azul del Dr. Marco Tulio Nuñez González, sobre una línea horizontal.

Dr. Christian González-Billault

Firma manuscrita en azul del Dr. Christian González-Billault, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Noviembre de 2005

Con todo mi cariño
a mis padres, María Isabel y Carlos,
a mis hermanos Cristian, Kito
y Andrea. A mi familia...



Ha llegado el momento, concluye una gran etapa...

La historia comienza desde que estaba en el colegio, sin saber bien qué estudiar, sólo que debía ser una carrera científica. Ingresé a Ingeniería en Biotecnología Molecular, nombre que sonaba un poco complicado y que en más de una ocasión fue difícil de memorizar por familiares y amigos. Estando en pregrado tuve la oportunidad de conocer grandes amigos y de disfrutar la Facultad de Ciencias y el Campus, con sus jardines, espacios amplios, con su gente tan diversa.

Hoy, no puedo dejar de expresar que me siento feliz y completamente orgullosa de haber estudiado en la grande y gloriosa Universidad de Chile, y a través de este trabajo de tesis haberme involucrado fuertemente en el mundo científico, mediante mis estudios en Biología Celular. Concluye así una etapa, sin embargo sé que comienza todo un nuevo camino para emprender.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer enormemente a mi tutora de tesis Dra. María Paz Marzolo, quien me enseñó en mis inicios a trabajar en el laboratorio. Gracias por la entrega de una formación científica rigurosa, por el espíritu crítico, por las ideas y por la confianza depositada en mi. Gracias por toda la guía y motivación transmitida durante todo el desarrollo de mi tesis.

Quiero agradecer también a todos mis compañeros de laboratorio con quienes he compartido y que siempre formaron parte de un grato ambiente de trabajo, a Pamela, Loreto, Claudio, Isabel, Benjamín, Ricardo, Natalia, Bárbara y Rodrigo, quienes siempre estuvieron dispuestos a brindarme su ayuda cuando la necesitaba.

A Alex, gracias por el incondicional apoyo, comprensión, ayuda, motivación. Gracias por el cariño, por ser un gran amigo y un gran compañero.

Finalmente, quiero agradecer especialmente a mi querida y gran familia, a mis padres quienes creyeron en mi desde hace mucho tiempo y depositaron toda su confianza en esta etapa de mi vida, gracias por todo su esfuerzo. A mis tíos, Tabo y Laura, quienes me apoyaron y estuvieron conmigo durante mi etapa universitaria. A mis hermanos, a mis abuelitos, a Ana y a Jaqui por toda la ayuda, el ánimo y el apoyo que me brindaron.

FINANCIAMIENTO

El desarrollo de esta memoria de título fue financiado por los siguientes proyectos:

- Proyecto Fondecyt 1020746
- Proyecto Fondap 13980001
- MIFAB
- FIRCA # TW06456

ÍNDICE

| | Página |
|---------------------------------|--------|
| DEDICATORIA..... | ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| FINANCIAMIENTO..... | iv |
| ÍNDICE..... | v |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | ix |
| ABREVIATURAS..... | xi |
| RESUMEN..... | xiii |
| ABSTRACT..... | xv |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. El problema de estudio..... | 1 |
| 2. Hipótesis..... | 19 |
| 3. Objetivos generales..... | 19 |
| 4. Objetivos específicos..... | 19 |
| 5. Estrategia experimental..... | 20 |
| MATERIALES..... | 23 |
| 1. Material biológico..... | 23 |
| 1.1 Bacterias..... | 23 |
| 1.2 Plasmidios..... | 23 |
| 1.3 Células eucarióticas..... | 24 |
| 1.4 Anticuerpos..... | 24 |

| | |
|---|----|
| 2. Reactivos..... | 25 |
| MÉTODOS..... | 27 |
| 1. Técnicas de biología molecular..... | 27 |
| 1.1 Cultivo y crecimiento de bacterias..... | 27 |
| 1.2 Preparación de bacterias competentes..... | 27 |
| 1.3 Transformación..... | 28 |
| 1.4 Obtención de plasmidios..... | 28 |
| 1.5 Mutagénesis sitio dirigida..... | 30 |
| 1.6 Electroforesis de DNA en geles de agarosa..... | 31 |
| 2. Técnicas de biología celular..... | 31 |
| 2.1 Cultivo de líneas celulares..... | 31 |
| 2.1.1 Mantenimiento de líneas celulares MDCK, FRT y cultivo primario de neuronas de hipocampo..... | 31 |
| 2.1.2 Congelamiento de células..... | 32 |
| 2.2 Transfección celular..... | 32 |
| 2.2.1 Transfección estable de células MDCK..... | 32 |
| 2.2.2 Transfección transiente de células MDCK..... | 33 |
| 2.2.3 Transfección estable de células FRT..... | 34 |
| 2.2.4 Transfección de neuronas de hipocampo..... | 34 |
| 2.3 <i>Western Blot</i> | 35 |
| 2.3.1 Preparación del extracto proteico..... | 35 |
| 2.3.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS..... | 35 |
| 2.3.3 Transferencia a membrana..... | 36 |
| 2.3.4 Incubación con anticuerpos..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 2.3.5 <i>Stripping</i> de membranas..... | 37 |
| 2.4 Inmunoprecipitación de células marcadas metabólicamente..... | 37 |
| 2.5 Biotinilación..... | 38 |
| 2.6 Inmunofluorescencia..... | 40 |
| 2.6.1 Inmunofluorescencia de células MDCK y FRT..... | 40 |
| 2.6.2 Inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo..... | 40 |
| 2.7 Microinyección..... | 41 |
| 2.8 Co-inmunoprecipitación..... | 42 |
| 3. Microscopía..... | 43 |
| 3.1 Microscopía de epifluorescencia..... | 43 |
| 3.2 Microscopía confocal..... | 44 |
| RESULTADOS..... | 45 |
| 1. Estudio de la distribución intracelular de los distintos minireceptores de LRP en células polarizadas..... | 45 |
| 1.1 Distribución intracelular de los minireceptores en células MDCK..... | 45 |
| 1.2 Distribución intracelular de los minireceptores en células FRT..... | 55 |
| 1.3 Distribución intracelular de los minireceptores en Neuronas de Hipocampo..... | 60 |
| 1.4 Estudio de la participación del primer motivo NPxY en la destinación del LRP..... | 69 |
| 2. Estudio de la maquinaria intracelular en la segregación y destinación del LRP..... | 72 |
| 2.1 Posible papel de SNX17..... | 72 |
| 2.2 Posible papel de μ -1B..... | 78 |
| 2.2 Papel de PKD..... | 81 |

| | |
|-------------------|-----|
| DISCUSIÓN..... | 86 |
| CONCLUSIONES..... | 100 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 102 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Señales representativas de segregación basolateral y proteínas en las que se encuentran contenidas..... | 8 |
| Tabla 2. Partidores utilizados en mutagénesis sitio dirigida para la generación de mLRP4 DD38,39AA..... | 30 |
| Tabla 3. Resumen de la localización del minireceptor para las distintas mutaciones puntuales en los motivos aminoacídicos presentes en la cola citosólica del LRP..... | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Principales vías de tráfico intracelular en células epiteliales polarizadas..... | 6 |
| Figura 2. Familia del receptor de LDL..... | 12 |
| Figura 3. Estructura y sitios de unión de ligandos de LRP..... | 16 |
| Figura 4. Potenciales motivos aminoacídicos involucrados en segregación basolateral y mutaciones puntuales de los constructos para el minireceptor de LRP..... | 21 |
| Figura 5. Localización del minireceptor wt en células MDCK..... | 46 |
| Figura 6. Localización de los minireceptores N26A y Y29A en células MDCK..... | 48 |
| Figura 7. Localización de los minireceptores DD38,39AA y LL43,44AA en células MDCK..... | 50 |
| Figura 8. Localización de los minireceptores Y63A, N60A y L66A en células MDCK...52 | |
| Figura 9. Localización de los minireceptores S76A, LL86,87AA y Y63A,LL86,87AA en células MDCK..... | 54 |
| Figura 10. IF de células FRT transfectadas establemente con los minireceptores de LRP wt y con las mutaciones N26A y Y29A..... | 57 |
| Figura 11. Colocalización de los minireceptores wt y N26A con el marcador de endosoma temprano EEA1 en células FRT y MDCK..... | 59 |
| Figura 12. IF de neuronas de hipocampo transfectadas con los minireceptores de LRP wt y con la mutación N26A..... | 61 |
| Figura 13. Distribución intracelular y superficial de los minireceptores de LRP wt y con la mutación N26A en neuronas de hipocampo..... | 63 |
| Figura 14. Expresión del minireceptor Y29A en neuronas de hipocampo..... | 65 |
| Figura 15. Expresión de los minireceptores Y63A y LL86,87AA en neuronas de hipocampo..... | 67 |
| Figura 16. Microinyección de los minireceptores wt, N26A y Y29A en células MDCK.. | 70 |
| Figura 17. Expresión de SNX17 endógena en células polarizadas..... | 73 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. El motivo NPxY proximal de LRP es requerido para la interacción con SNX17..... | 75 |
| Figura 19. Colocalización del minireceptor N26A y myc-SNX17..... | 77 |
| Figura 20. Coinmunoprecipitación de μ -1B-HA y γ -adaptina junto con el minireceptor wt..... | 79 |
| Figura 21. Transfección transiente de PKD 1 dominante negativo en células MDCK expresando el minireceptor wt..... | 82 |
| Figura 22. Transfección del minireceptor wt junto con PKD 1 dominante negativo en neuronas de hipocampo..... | 84 |
| Figura 23. Secuencia aminoacídica de los dominios citoplasmáticos del receptor de LDL y LRP..... | 89 |
| Figura 24. Modelo de reconocimiento de señales aminoacídicas en el tráfico de LRP..... | 97 |

ABREVIATURAS

- ApoE : apolipoproteína E
- BSA : albúmina de suero bovino
- Ci : Curie
- Dab1 : *Disabled-1*
- DN : dominante negativo
- DMEM : medio Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO : dimetilsulfóxido
- DNA : ácido desoxirribonucleico
- EDTA : ácido etilen-diamino-tetra-acético
- EGF : factor de crecimiento epidermal
- FRT : línea celular epitelial proveniente de tiroides de ratas Fisher
- G418 : geneticina
- GST : glutation-S-transferasa
- HA : hemaglutinina del virus influenza
- Hepes : ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico
- h : hora
- IF : inmunofluorescencia
- kDa : kilo Dalton
- LB : medio de cultivo Luria Bertani
- LDL : lipoproteína de baja densidad
- LRP : proteína relacionada al receptor de LDL

MDCK : línea celular epitelial proveniente de riñón distal de perro

min : minutos

NPxY : asparragina - prolina - cualquier aminoácido - tirosina

PBS : tampón fosfato salino

PCR : reacción de polimerasa de DNA en cadena

PEG : polietilenglicol

PKD : Proteína Quinasa D

PMSF : fenil-metil-sulfonil-fluoruro

PVDF : difluoruro de polivinilideno

RAP : proteína asociada a receptor

rpm : revoluciones por minuto

SA : estreptoavidina

SDS : dodecilsulfato de sodio

seg : segundo

SFB : suero fetal bovino

SNX : *Sorting Nexin*

TAE : tris acetato EDTA

TGN : red trans Golgi

Tris : tris(hidroximetil)aminometano

VLDL : lipoproteína de muy baja densidad

WB : *western blot*

wt : tipo silvestre

Yxx ϕ : tirosina - cualquier aminoácido - cualquier aminoácido - aminoácido hidrofóbico voluminoso

RESUMEN

Las células epiteliales y neuronas se caracterizan por poseer la membrana plasmática dividida en dos dominios distintos: apical y basolateral, y somatodendrítico y axonal, respectivamente. Esta característica les permite desarrollar funciones de transporte, secreción vectorial y transmisión de señales que son críticas para la sobrevivencia del organismo. En estas células polarizadas la destinación de proteínas de membrana plasmática hacia los distintos dominios ocurre posterior a la síntesis en retículo endoplásmico, en la red trans del Aparato de Golgi o después de la internalización desde la superficie celular en endosomas de segregación y/o de reciclaje. La segregación de proteínas en transportadores vesiculares o tubulares sería mediada por señales de destinación que se encontrarían, al menos para proteínas basolaterales, dentro de la estructura proteica, en el dominio citoplasmático.

En el presente estudio se utilizó al LRP, una proteína miembro de la familia de receptores del tipo del receptor de lipoproteínas de baja densidad o LDL-R, como un modelo de estudio de determinantes moleculares de la regionalización de proteínas en células polarizadas. LRP se localiza polarizadamente en células epiteliales y en neuronas. Sobre la base de estos antecedentes hemos estudiado las señales de destinación y de endocitosis presentes en el dominio citosólico del receptor, analizando el papel de algunos motivos aminoacídicos, basados en tirosina y dileucinas. Se determinó la importancia que tienen cada uno de estos motivos, por sí solos o dentro del contexto aminoacídico en el que se encuentran, en la destinación final a la membrana que tiene la proteína en células epiteliales (FRT y MDCK) y en neuronas de

hipocampo. Los estudios se realizaron mediante la transfección de un minireceptor ya generado, el cual imita la función y tráfico de LRP. Además del minireceptor nativo, se utilizó una batería de minireceptores con distintas mutaciones puntuales en la mayor parte de los aminoácidos presentes en el dominio citoplasmático que conforman los posibles motivos implicados en la destinación y/o segregación basolateral de la proteína. Los resultados indican que la tirosina 29, presente en el primer motivo NPxY, es clave para la localización de LRP, tanto basolateral como somatodendrítica en las células estudiadas. Sorprendentemente la mutación del motivo NPxY como APxY resultó en un fenotipo de distribución diferente al de NPxA, sugiriendo que la tirosina podría ser parte de otra señal de destinación distinta a NPxY. Otros motivos aminoacídicos como la tirosina 63, dentro del contexto de un motivo Yxx ϕ , y el motivo dileucina distal también tienen una contribución en la información de destinación final de LRP. Por tanto, la información contenida dentro de la proteína estaría siendo decodificada de manera similar por la maquinaria intracelular de los tipos celulares estudiados.

Se estudió además la participación de proteínas tales como el complejo adaptador AP-1B y su subunidad μ -1B, de *Sorting Nexin 17* que interactúa con LRP, y de la Proteína Quinasa D, que tendría una función en la destinación basolateral de proteínas de membrana en células MDCK. Los resultados muestran la participación de estas proteínas intracelulares y contribuyen al conocimiento de la maquinaria intracelular que participa en el reconocimiento de las señales de destinación de LRP, tanto en células epiteliales como en neuronas de hipocampo.

ABSTRACT

Epithelial cells and neurons have their plasma membrane divided in two different domains: apical and basolateral, and somatodendritic and axonal, respectively. This characteristic allow them to develop functions of transport, vectorial secretion and signal transmission that are relevant for the appropriate organism's functioning. In polarized cells, the sorting of membrane proteins to the different domains of the plasma membrane occurs, after the synthesis in the endoplasmic reticulum, in the trans Golgi network and/or after the internalization from the cell surface, in sorting and/or recycling endosomes. The segregation step would be mediated by sorting signals normally present, at least for basolateral proteins, within the protein structure, in the cytoplasmic domain.

In the present study we used LRP (Low density lipoprotein-receptor Related Protein), a member of the LDL-R family, as a protein model. LRP is located in polarized manner in epithelial cells and neurons. With these antecedents we have studied the sorting and endocytosis signals present in the cytosolic domain of the receptor, analysing the role of some aminoacidic motifs, based on tyrosine and dileucine. In this work we determined the relevance of each of these motifs, in the final plasma membrane distribution of LRP in epithelial cells (FRT and MDCK) and hippocampal neurons. The studies were performed by transfection of a minireceptor, already generated, which mimics the LRP's function and traffic. In addition to the wild-type minireceptor, we used a battery of several LRP's point mutants in key aminoacids from the putatives sorting motifs present in the cytoplasmic domain of LRP. Our results

indicate that tyrosine 29, that is part of the first NPxY motif, is absolutely required for the LRP's basolateral, as well as its somatodendritic distribution. Surprisingly the mutation of the NPxY motif as APxY had a different distribution compared to NPxA, suggesting that the tyrosine could be part of other sorting signal, distinct to NPxY. Other aminoacidic motifs as tyrosine 63, within the context of a Yxx ϕ motif, and the distal dileucine motif also has a contribution in LRP's final destination. Therefore, the information contained within the cytoplasmic domain of the protein would be being decoded in a similar way by the intracellular machinery of both epithelial and neuronal cells.

In addition to the study of molecular determinants we studied the participation of intracellular proteins such as the adaptor complex AP-1B and its subunit μ -1B, Sorting Nexin 17 which interacts with LRP, and the Protein Kinase D, recently described with a function in the sorting of basolateral membrane proteins in MDCK cells. The results demonstrate a participation of these intracellular proteins in LRP trafficking and contribute to elucidate the nature of intracellular machinery participating in the recognition of LRP's sorting signals, both in epithelial cells as in hippocampal neurons.

INTRODUCCIÓN

1. El problema de estudio

1.1 Células con membrana plasmática polarizada

La asimetría espacial o polaridad celular es una propiedad fundamental para la estructura y función de la mayor parte de las células eucarióticas. Un aspecto básico de esta polaridad es que la membrana plasmática celular está dividida en dominios discretos con diferentes composiciones de lípidos y proteínas y, consecuentemente, con funciones distintas. Las proteínas de membrana y secretorias son transportadas en vesículas de membrana las que se fusionan con regiones específicas de la membrana plasmática, definiendo y manteniendo las identidades y funciones únicas de estos dominios de la superficie celular (Mostov, 2000; Nelson y Yeaman, 2001). Durante el desarrollo, las vías de tráfico polarizado son modificadas para ser acomodadas a las necesidades específicas, tanto al tipo celular individual como a la organización global de las células en tejidos y órganos (Mostov y cols., 2003).

Algunos tipos celulares que presentan el establecimiento de subdominios en su membrana plasmática son levaduras, fibroblastos, células epiteliales y neuronas. Estudios en estos tipos celulares dan cuenta de los mecanismos altamente conservados entre los distintos organismos, que son utilizados para generar y mantener la polaridad celular. Por ejemplo, la yemación que ocurre en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la división celular asimétrica durante la embriogénesis en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, la formación de lamelipodios en

fibroblastos, la generación y mantención de las membranas en el axón y dendritas en neuronas, y de los dominios apical y basolateral en células epiteliales polarizadas.

Células epiteliales y neuronas tienen un origen embrionario común por lo que comparten varios de los mecanismos que les permiten generar y mantener una regionalización de funciones en la membrana plasmática. Basado en la segregación de glicoproteínas virales, se propuso hace más de una década que neuronas utilizan la misma maquinaria de segregación de proteínas que las células epiteliales (Dotti y Simons, 1990). Muchas proteínas que son localizadas dendriticamente en neuronas son concentradas en la superficie basolateral de células MDCK, y proteínas que son axonales son apicales, siendo en algunos casos los mismos motivos que median la segregación en ambos tipos celulares, sin embargo existen excepciones para este modelo apical/axonal y basolateral/dendrítico. Esto sugiere entonces que los mecanismos de segregación de proteínas en ambos tipos celulares tienen algunos componentes comunes.

En el área de la biología celular, el establecimiento de dominios subcelulares con componentes moleculares y propiedades funcionales distintas es un problema fundamental. La polaridad celular ha sido particularmente estudiada en células epiteliales, sin embargo quedan muchas interrogantes por resolver en el área del tráfico polarizado de proteínas, como detalles importantes de la maquinaria que está involucrada en la segregación en el TGN y en endosomas, incluyendo las funciones de balsas lipídicas, señales de segregación, proteínas adaptadoras y de citoesqueleto. En neuronas menos conocido aún es el establecimiento de la polaridad neuronal, la mantención de los dominios axonal y somatodendrítico, y cómo proteínas de membrana son segregadas hacia estos dominios distintos.

1.2 Células epiteliales y neuronas de hipocampo

La polaridad celular ha sido particularmente estudiada en neuronas y en células epiteliales, siendo estas últimas uno de los mejores sistemas modelo. Las células epiteliales forman monocapas que se alinean en superficies y cavidades, presentando su membrana plasmática dividida en superficies apical y basolateral, separadas por uniones estrechas, las cuales se enfrentan al lumen del órgano y a las células que subyacen y tejido conectivo, respectivamente. La superficie basolateral contiene receptores para la adhesión a otras células y el establecimiento de la membrana, y para la captación de nutrientes desde la circulación, mientras que la superficie apical contiene transportadores para el intercambio de pequeñas moléculas con el ambiente externo (Gumbiner, 1990) y en general define la función o especialización del epitelio.

Las neurona es una célula con una alta complejidad morfológica y especialización de su membrana, la que se encuentra dividida en un axón y en un dominio somatodendrítico. Con su largo axón extendido y elaborado árbol dendrítico, las neuronas establecen el circuito que detecta, almacena y transmite información que es esencial para la función de todos los organismos complejos, notándose la importancia biológica que subyace en la morfología celular. La polaridad neuronal es establecida tempranamente en el desarrollo a medida que las células se diferencian y extienden sus procesos, sin embargo existen muchas preguntas que aún quedan por dilucidar acerca de la formación y de la mantención de la compartimentalización de la membrana en este tipo celular.

Se han definido mecanismos de polarización celular comunes mediante el estudio de ambos tipos celulares, los que incluyen barreras en la membrana para la difusión de proteínas (Kobayashi y cols., 1992; Winckler y cols., 1999; Nakada y cols.,

2003), estabilización de complejos proteicos en la membrana por proteínas de andamiaje (Harris y Lim, 2001), y una destinación selectiva de proteínas a lo largo de la vía secretoria y endosomal (Jacob y Naim, 2001; Keller y cols., 2001; Kreitzer y cols., 2003).

1.3 Vías de tráfico intracelular y generación de fenotipo polarizado. Señales de destinación. Participación de proteínas adaptadoras

La distribución polarizada de componentes apical y basolateral es el resultado de tres procesos (Mostov y cols., 2000; Nelson y Yeaman, 2001) que pueden coexistir en las células epiteliales: (i) proteínas recién sintetizadas en el Retículo Endoplásmico son transportadas a través del Aparato de Golgi hacia la red trans Golgi (TGN), desde donde son segregadas dentro de vesículas que luego se fusionan con la superficie apical o basolateral (Jacob y Naim, 2001; Kreitzer y cols., 2003), mientras que otras proteínas son transportadas desde el TGN hacia endosomas, y desde allí hacia la superficie celular (Orzech y cols., 2000); (ii) retención selectiva de algunas proteínas en la superficie celular, a menudo mediante una interacción de su extremo carboxilo terminal con proteínas conteniendo dominios PDZ (Harris y Lim, 2001), y (iii) aquellos componentes que no son retenidos en la superficie son endocitados y liberados en endosomas tempranos, desde donde pueden reciclar a la superficie celular, dirigirse hacia los endosomas tardíos o ser transportados a través de la célula y liberados en la superficie opuesta, lo cual se conoce como transcitosis (Mostov y cols., 2000; Nelson y Yeaman, 2001). La importancia relativa de las vías de segregación biosintética como del reciclaje selectivo de la endocitosis y transcitosis para el transporte de proteínas varía de acuerdo al tipo celular (Mostov y cols., 2003). Por ejemplo, en células

epiteliales MDCK el flujo a través de la vía endocítica es aproximadamente diez veces mayor que a través de la vía biosintética, indicando que el reciclaje selectivo de la endocitosis y transcitosis es esencial para la polaridad de las células en un estado estacionario (Bomse y cols., 1989). Las vías descritas anteriormente se muestran en la **Figura 1.**

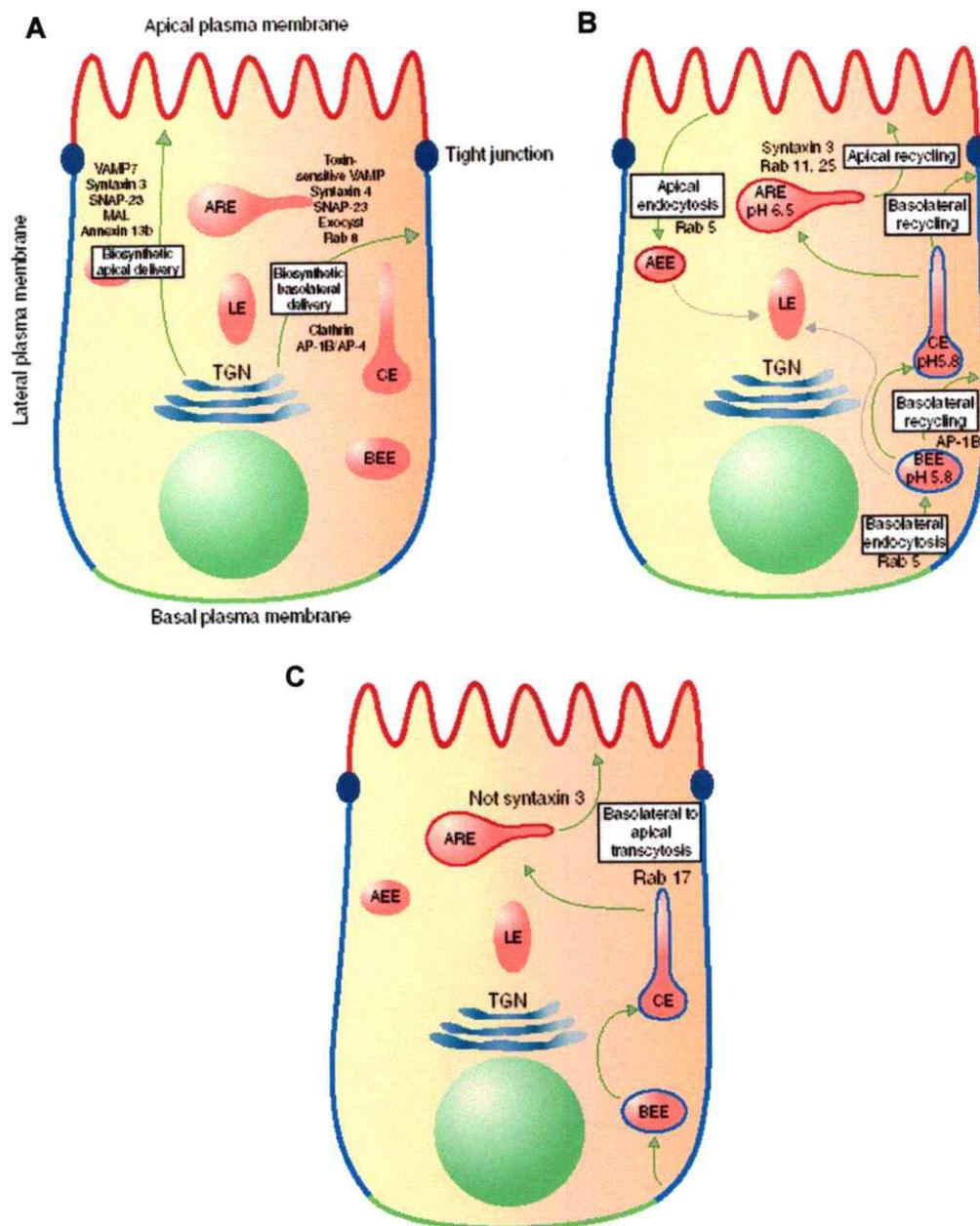


Figura 1. Principales vías de tráfico intracelular en células epiteliales polarizadas.

A. Se muestra la vía biosintética hacia la superficie apical y basolateral. Se indican los componentes específicos conocidos de la maquinaria de tráfico para cada vía, así como los pHs de los compartimentos en la vía de transcitosis. AEE, endosoma temprano apical; ARE, endosoma de reciclaje apical; BEE, endosoma temprano basolateral; CE, endosoma común; LE, endosoma tardío (Mostov y cols., 2000). B. Vías de reciclaje en la superficie apical y basolateral. Se muestran en gris las vías degradativas hacia los LE. C. Vía de transcitosis desde la superficie basolateral hacia la apical. (Figura 1: Mostov K., Su T., and ter Beest M. 2003. Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat. Cell Biol.* 5:287-293).

Dentro de las señales de segregación apical se han identificado tallos glicofosfatidilinositol (Lisanti y cols., 1988; Brown y cols., 1989), asociación a microdominios lipídicos ricos en colesterol y glicoesfingolípidos (Weimbs y cols., 1997), glicanos en el ectodominio (Scheiffele y cols., 1995; Yeaman y cols., 1997) y secuencias aminoacídicas de ectodominio o transmembrana (Alonzo y cols., 1997). Sin embargo, recientemente, en trabajos publicados por nuestro laboratorio se encontró que la localización de Megalina, una proteína apical, contiene la información de destinación en su dominio citosólico, siendo el primer caso descrito para una proteína con un sólo dominio transmembrana (Marzolo y cols., 2003).

En la destinación de proteínas de membrana plasmática hacia la superficie basolateral participan secuencias aminoacídicas cortas presentes en sus dominios citoplasmáticos (Matter y Mellman, 1994; Mostov y Cardone, 1995), muchas de las cuales están basadas en un residuo de tirosina clave, ya sea del tipo NPxY o Yxx ϕ (Matter y cols., 1992; Thomas, 1993) y en motivos de dileucinas (Hunziker y Fumey, 1994; Odorizzi y Trowbridge, 1997). También se ha encontrado que participan en la localización basolateral grupos de aminoácidos cargados negativamente, los que pueden funcionar en conjunto con un motivo basado en tirosina cercano (Matter y cols., 1994), y sitios de fosforilación (He y cols., 2002). Algunas secuencias y proteínas que las contienen se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Señales representativas de segregación basolateral y proteínas en las que se encuentran contenidas^a.

| Dominios de segregación basolateral ^b | Proteína |
|--|---|
| NPVYQKTTEDEHI | Receptor de LDL, señal proximal |
| QDGYSYPSRQMVSLIEDDVA | Receptor de LDL, señal distal dominante |
| RELVEPLTPSGEA | Receptor de EGF |
| KRTLRRLLQERE | Receptor de EGF |
| KTEAENTITYSLLK | Receptor Fc IgG |
| RMQAQPPGYRHVADGEDHA | Fosfatasa ácida lisosomal |
| RKRSHAGYQTI | Glicoproteína lisosomal 120 |
| RARHRRNVDRVSIQSYRT | Receptor de plg |
| SYTRFSLARQVDGDNQSHVEMKLA | Receptor de transferrina |
| RVGIHLCKIKHTKKRQIYTDIEMNRLGK | Proteína VSV G |
| QTKGSYMEVE | Aquaporina 4 |
| DNRSQVETEDLILKPGVVHVI | Aquaporina 4 |

^aAdaptación Tabla 1, He C., Hobert M., Friend L., Carlin C. 2002 The EGF-R juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core. *J. Biol. Chem.* 277(41):38284-38293.

^bLos residuos críticos de cada dominio se muestran en negrita.

Dichas señales pueden ser encontradas de manera única dentro del dominio en el que se insertan, o bien coexistir junto con otra señal dentro del mismo dominio, con la cual pueden funcionar en conjunto, como los aminoácidos de carga negativa cercanos a cada tirosina dentro del receptor de LDL (Matter y cols., 1994); de manera independiente, como el motivo dileucina y la señal basada en tirosina en el dominio citosólico de aquaporina 4 (Madrid y cols., 2001), o bien solapar con la señal de endocitosis de la proteína, como ocurre en el receptor Fc IgG (Matter y cols., 1994).

Diversos experimentos han demostrado que deleciones del dominio citosólico de proteínas basolaterales resultan en una destinación de la proteína hacia la superficie apical, sugiriendo que la destinación apical ocurriría por defecto o a través del reconocimiento de una señal críptica (Mostov y cols., 1986). Más aún, estas señales de segregación basolateral en el dominio citoplasmático pueden ser transplantadas a moléculas reporteras heterólogas y dirigirlas nuevamente hacia la superficie basolateral (Casanova y cols., 1991). Por ejemplo, el receptor de LDL contiene dos señales de segregación basolateral, en el cual la inactivación de una de estas señales puede causar una destinación errónea hacia la superficie apical y resultar en una hipercolesterolemia (Matter y cols., 1992; Koivisto y cols., 2001), lo cual manifiesta la importancia biológica de la correcta localización celular de tales proteínas.

Se ha descrito que las señales basolaterales son reconocidas por proteínas adaptadoras asociadas a cubierta de clatrina, donde se incluye AP-1B, la cual contiene una subunidad alternativa específica de epitelio, μ -1B (Folsch y cols., 1999). La expresión de AP-1B es suficiente para conferir una correcta segregación basolateral en células que carecen de este complejo adaptador. Se ha propuesto que AP-1B funciona a nivel de TGN o en segregación endosomal (Folsch y cols., 2001; Gan y cols., 2002). Otra proteína adaptadora también involucrada en la segregación basolateral es AP-4 (Simmen y cols., 2002).

Por otro lado, recientemente se ha descrito una nueva familia de proteínas llamadas *Sorting Nexins* (SNXs) las que están involucradas en la regulación del tráfico intracelular de proteínas (Worby y Dixon, 2002). Se ha establecido que en células eucarióticas estas proteínas están localizadas en endosomas (Gullapalli y cols., 2004), su sobre-expresión o inhibición puede modular el tráfico de receptor en la superficie celular (Kurten y cols., 1996; Barr y cols., 2000; Xu y cols., 2001; Wang y cols., 2002),

pueden unir un variado número de receptores, y dada la presencia de un dominio phox que las caracteriza, el cual se une a fosfatidil inositol fosfato (Ponting, 1996), sugiere un papel en la destinación de estas proteínas hacia dominios específicos de membrana enriquecidos en fosfolípidos. Dentro de la familia de SNXs, se ha encontrado que SNX17 se une a la mayoría de los miembros de la familia del receptor de LDL, entre ellos a LRP (Stockinger y cols., 2002). Datos no publicados del laboratorio del Dr. Guojun Bu muestran que SNX17 interactúa con el motivo NPxY proximal de LRP y que a través de estudios funcionales SNX17 podría estar involucrada en modular la disponibilidad de LRP en la superficie celular, sugiriendo que SNX17 podría ser un importante componente de la maquinaria de segregación para el tráfico intracelular y/o reciclaje de LRP.

Diversos estudios recientes han descrito la participación de otras moléculas que regulan el tráfico basolateral, tales como GTPasas pequeñas del tipo Rab8 (Ang, 2003), Rab11 (Lock, 2005), Cdc42 (Kroschewski, 1999; Cohen, 2001), Ra1A (Shipitsin, 2004) y el complejo del exocisto (Yeaman, 2001). Además, recientemente se ha demostrado la participación de la Proteína Quinasa D (PKD) en el transporte basolateral de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSVG) desde TGN hacia la membrana plasmática basolateral (Yeaman, 2004) en células epiteliales.

1.4 Familia del receptor de LDL

La familia génica del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) está constituida por un grupo de glicoproteínas de membrana con un alto grado de identidad (70%-100%) en su secuencia entre un amplio rango de especies, las cuales funcionan

como receptores para diversos ligandos extracelulares (Hussain y cols., 1999; Li y cols., 2001). Los miembros de esta familia son el receptor de LDL, Proteína relacionada al Receptor de LDL (LRP), Megalina, Receptor de VLDL, LR11, Receptor 2 de ApoE, y LR8B (Schneider y Nimpf, 1993; Schneider y cols., 1997), los cuales se muestran en la **Figura 2**.

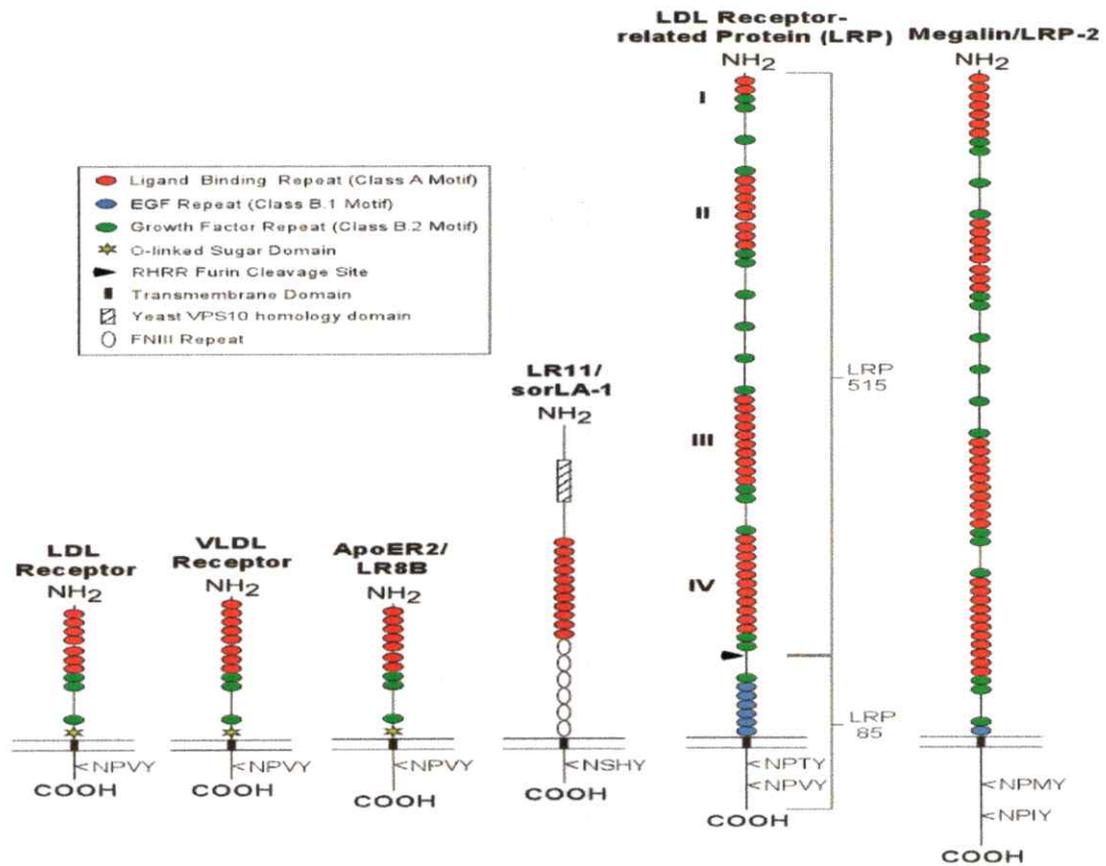


Figura 2. Familia del receptor de LDL.

Los miembros de la familia del receptor de LDL son glicoproteínas que se localizan en la membrana plasmática. Poseen dominios de unión a ligando constituidos por repeticiones de unión a ligando. Todos ellos poseen al menos un motivo NPxY en el dominio citoplasmático. (Figura 1: Bu G. and Marzolo MP. 2000. Role of receptor-associated protein (RAP) in the biogenesis of lipoprotein receptors. *Trends Cardiovasc. Med.* **10** (4):148-155).

Los receptores de esta familia son proteínas de membrana tipo I, los cuales atraviesan la membrana una sola vez y que exponen el extremo carboxilo terminal al interior de la célula. Estas proteínas se caracterizan por poseer un dominio extracelular, el cual contiene módulos formados por los repetidos de unión tipo A, con cerca de 40 residuos cada uno conteniendo 6 cisteínas apareadas las que dan lugar a tres puentes disulfuro. Estos módulos constituyen los sitios de afinidad por el ligando y se encuentran repetidos en serie, conocidos como "repeticiones de unión a ligando", los que a su vez se organizan en grupos formando lo que se conoce como "dominios de unión a ligando" (Hussain y cols., 1999; Li y cols., 2001). Contiene además repetidos tipo B, que también contienen 6 cisteínas apareadas y, que junto con módulos de cerca de 50 residuos que poseen el tetrapéptido consenso Tyr-Trp-Thr-Asp constituyen el dominio de homología con el precursor del factor de crecimiento epidermal (EGF). Este dominio también se localiza repetidamente a lo largo del dominio extracelular, los cuales se conocen con el nombre de "repeticiones EGF" (Hussain y cols., 1999; Li y cols., 2001). La región extracelular posee además una extensión corta rica en serinas y treoninas, conteniendo azúcares O-glicosilados. Las proteínas de la familia además poseen un dominio transmembrana relativamente corto, formado por aproximadamente 20 aminoácidos y un dominio citoplasmático que contiene una o más señales para la internalización del receptor vía vesículas cubiertas por clatrina.

Los receptores de la familia se endocitan y reciclan en forma constitutiva, es decir, independientemente del ligando (Hussain y cols., 1999). Los ligandos que se unen a los receptores de la familia participan en procesos tales como el metabolismo lipoproteico, la regulación de la función de proteasas, desarrollo embrionario, y en la patogénesis de algunas enfermedades (Bu y Marzolo, 2000), siendo ApoE y RAP

ligandos comunes para todos los miembros de la familia. Sin embargo, recientemente se han encontrado nuevas funciones para estos receptores en señalización intracelular (Trommsdorff, 1999; Willnow y cols., 1999).

1.5 Proteína relacionada al receptor de LDL (LRP)

La proteína relacionada al receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP) es uno de los miembros más grandes de la familia, el cual se expresa principalmente en la superficie sinusoidal de hepatocitos y en cerebro, en la superficie somatodendrítica. La importancia biológica de LRP queda de manifiesto con experimentos de gen *knock out* en ratones que revelan un absoluto requerimiento de LRP durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Herz, 1992).

LRP une una variedad de ligandos en su región extracelular, entre ellos ApoE, activador de plasminógeno tisular, α 2-macroglobulina, lipasa hepática, lactoferrina, RAP, la proteína precursora del amiloide (APP), encontrándose relacionado con diversos papeles biológicos, como el metabolismo y transporte de lipoproteínas, la homeostasis de proteinasas e inhibidores de proteinasas, migración celular, coagulación sanguínea, entrada de virus y toxinas a la célula, activación de enzimas lisosomales, transducción de señales y neurotransmisión (Herz y Strickland, 2001).

Dentro del dominio extracelular de LRP, las repeticiones de unión a ligando se encuentran en grupos de 2 y 11 repetidos individuales, a los cuales se unen la mayor parte de sus ligandos (Neels y cols., 1999). Luego se encuentran los dominios homólogos al precursor de EGF constituidos por dos repetidos EGF, seis repetidos YWTD organizados en una estructura tipo hélice (Springer, 1998) y otros seis repetidos EGF preceden al único segmento transmembrana. El dominio citosólico contiene dos

motivos NPxY, un motivo Yxx ϕ y dos motivos de dileucinas los cuales sirven como sitios de anclaje para la maquinaria de endocitosis y para proteínas adaptadoras citoplasmáticas y de andamiaje involucradas en eventos de señalización (Trommsdorf y cols., 1998). Estas regiones se muestran en detalle en la **Figura 3**.

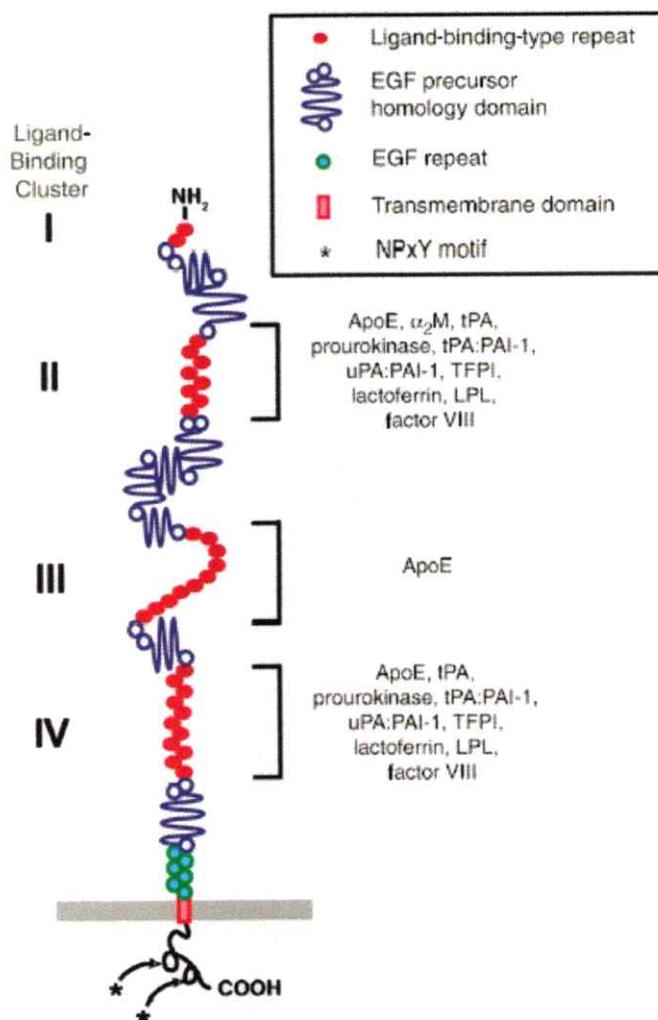


Figura 3. Estructura y sitios de unión de ligandos de LRP.

Se muestra la conformación de la estructura de LRP. Se indican los ligandos extracelulares de LRP y los distintos sitios a los que se unen. Motivos NPXY en la cola citosólica se indican con asteriscos (Fig. 1: Herz and Strickland. 2001. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Invest.* **108**:779-784).

LRP es sintetizado como un precursor de cadena única de 600 kDa, el cual es sometido a un procesamiento proteolítico posterior a la traducción dentro del compartimento trans Golgi por la endopeptidasa furina. Este procesamiento da origen a una forma madura de LRP, como un heterodímero asociado no covalentemente, consistiendo de una cadena extracelular de 515 kDa y una cadena transmembrana de 85 kDa. Esta subunidad menor contiene un único dominio transmembrana y un dominio citoplasmático compuesto de 100 aminoácidos, entre los cuales se encuentran varios motivos aminoacídicos, descritos anteriormente como putativos determinantes de segregación y/o destinación para LRP, los cuales serán objeto de estudio en esta tesis.

Existen además un número creciente de proteínas adaptadoras y de andamiaje que se unen al dominio citosólico de LRP, tales como Dab-1, FE65, SEMCAP-1, JIP1, JIP2, PSD-95 y dentro de las funciones a las que se encuentran asociadas estas proteínas son la activación de la familia Src quinasas, migración neuronal, remodelamiento de actina y acoplamiento a receptores NMDA (Herz y Strickland, 2001).

El motivo NPxY se ha involucrado en la interacción con proteínas citoplasmáticas conteniendo un dominio de unión a fosfotirosina, entre las que se encuentran Dab1, que se une específicamente al segundo motivo NPxY (Trommsdorf y cols., 1998), FE65 que permite la interacción de LRP con APP (Bressler y cols., 1996; Zambrano y cols., 1997) y con miembros de la familia Ena/VASP de proteínas de unión a actina (Ernekova y cols., 1997). Se conoce poco de las proteínas que están involucradas en la regulación de la endocitosis y tráfico intracelular de LRP, ámbito que también se estudió en esta tesis.

Dada la importancia fisiológica del LRP y su expresión predominante en células con fenotipo polarizado, se decidió estudiar a nivel molecular y celular los

determinantes de su distribución polarizada: basolateral en epitelios y somatodendrítica en neuronas. Dado que la información que especifica la segregación de proteínas estaría codificada dentro de la estructura individual de cada proteína de membrana plasmática y que además estas señales deben ser correctamente reconocidas e interpretadas por la maquinaria celular para que ocurra una apropiada destinación de la proteína, creemos que el LRP constituye un excelente modelo de estudio para indagar en estos aspectos.

Estudios recientes de nuestro laboratorio muestran que el complejo adaptador AP-1B participa en la localización polarizada del receptor, sugiriendo (dada la función propuesta para el complejo) que al menos señales basolaterales basadas en tirosina podrían ser relevantes en la localización de LRP.

2. Hipótesis

LRP contiene, en su dominio citoplasmático, elementos moleculares que participan en su tráfico intracelular en células polarizadas y que se asocian con elementos celulares que determinan la distribución polarizada, basolateral o somatodendrítica, del receptor en la superficie celular.

3. Objetivos generales

- Determinar los motivos aminoacídicos presentes en el dominio citoplasmático de LRP que cumplen un papel en la destinación polarizada de esta proteína en células MDCK, FRT y neuronas de hipocampo.
- Estudiar los determinantes celulares que participan en la destinación polarizada de LRP en células epiteliales polarizadas y neuronas de hipocampo.

4. Objetivos específicos

- Caracterización de la localización celular, en el estado estacionario, de un minireceptor de LRP que tiene como ectodominio el cuarto dominio extracelular del LRP, y los dominios de transmembrana y citoplasmático completo con mutaciones puntuales en los distintos motivos consenso posiblemente implicados en la destinación basolateral.

- Análisis del mecanismo de destinación a la superficie o *targeting* de aquellos minireceptores con mutaciones puntuales que afectan la localización celular final de la proteína.
- Estudio de la maquinaria intracelular, (AP-1B, PKD, SNX17) que estaría participando en los distintos mecanismos de segregación y destinación de LRP en el modelo celular propuesto.

5. Estrategia experimental

Se contaba con una serie de plasmidios que codifican para el minireceptor de LRP antes descrito, su forma nativa y con mutaciones de aminoácidos claves por alanina. Además de los que ya se tenían se obtuvo uno adicional en el cual se mutaron los dos aminoácidos aspárticos (posiciones 38 y 39 desde el primer aminoácido posterior al término del transmembrana) que se encuentran cercanos al primer motivo NPxY, para evaluar si tienen alguna contribución en la información basolateral presente en el dominio citoplasmático del receptor. Las construcciones utilizadas en este trabajo se muestran en la **Figura 4**.

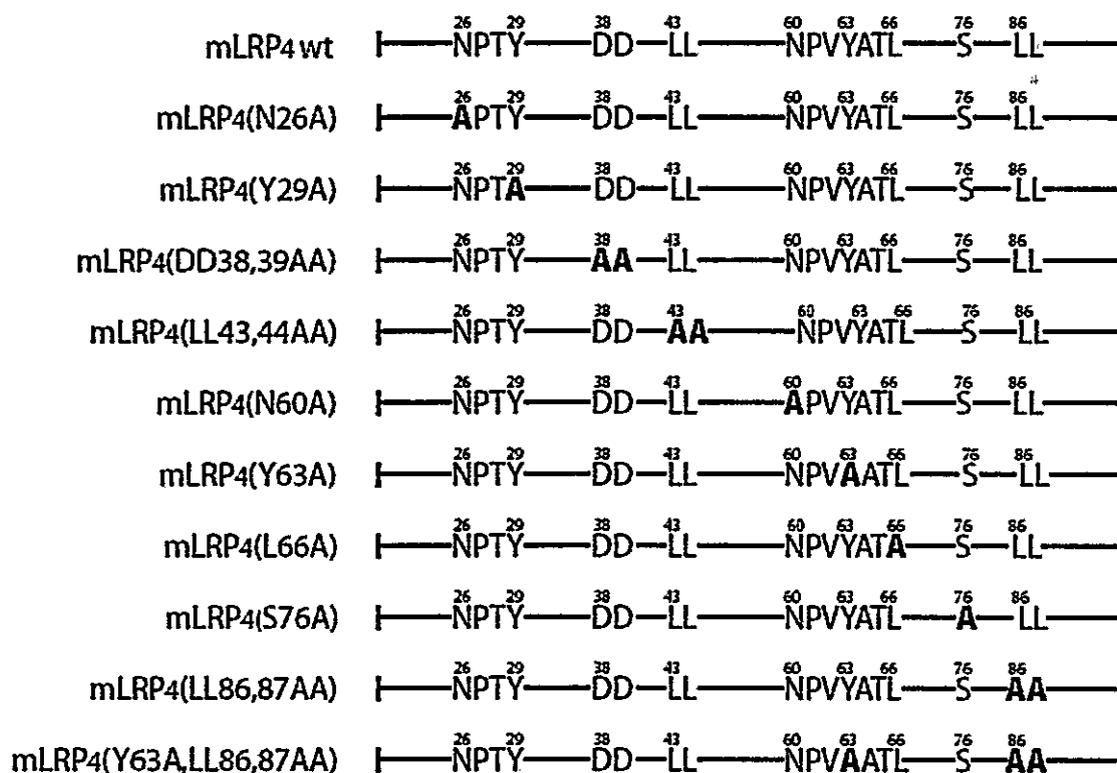


Figura 4. Potenciales motivos aminoacídicos involucrados en segregación basolateral y mutaciones puntuales de los constructos para el minireceptor de LRP.

Representación esquemática de potenciales señales de segregación basolateral dentro del dominio citosólico del LRP. Se muestran en negrita las sustituciones aminoacídicas realizadas en cada uno de los motivos estudiados, que dan origen a los distintos constructos.

Todos estos plasmidios fueron transfectados ya sea estable o transientemente en células epiteliales MDCK, FRT y transientemente en neuronas de hipocampo en cultivo primario. Las líneas estables generadas fueron chequeadas mediante inmunoprecipitación de células marcadas metabólicamente. Se evaluó la distribución del receptor en la superficie celular mediante técnicas que finalmente detectan al epítoto HA presente en el extremo aminoterminal de los receptores.

La participación de proteínas celulares en el tráfico del LRP se realizó por experimentos de pérdida o cambio de la distribución mediante el uso de dominantes negativos de PKD y SNX17, como así mismo por la falta de AP-1B y experimentos de coinmunoprecipitación con el receptor.

MATERIALES

1. Material biológico

1.1. Bacterias

Para la transformación de las distintas construcciones plasmidiales del minireceptor de LRP que ya se poseían, y de los minireceptores generados en el laboratorio con la mutación en los dos aminoácidos aspárticos, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α .

1.2 Plasmidios

Los plasmidios para el minireceptor de LRP presentan sólo el cuarto dominio de unión a ligando del dominio extracelular, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático de LRP. El minireceptor nativo (mLRP4) y con las mutaciones N26A, Y29A, DD38,39AA, LL43,44AA, N60A, Y63A, L66A, S76A, LL86,87AA y la doble mutante Y63A,LL86,87AA en su dominio citoplasmático fueron proporcionados por el Dr. Bu (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, EE.UU.), al igual que el plasmidio correspondiente a myc-SNX17. El plasmidio mLRP4 DD38,39AA se generó en el laboratorio mediante mutagénesis sitio dirigida.

El plasmidio con el cDNA para la expresión de GFP-EPS15 DN (EΔ95/295) fue proporcionado por el Dr. Alexander Benmerah (Institut Cochin U567 INSERM/UMR8104 CNRS, Paris, France). El plasmidio para la expresión de GST-PKD 1 DN fue proporcionado por el Dr. Vivek Malhotra (Cell and Developmental Biology, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093-0347, EE.UU.). El plasmidio μ -1B-HA fue proporcionado por Dr. Enrique Rodríguez-Boulan (Cornell University, New York, NY, EE.UU.).

1.3 Células eucarióticas

Las células MDCK se obtuvieron del Dr. Enrique Rodríguez-Boulan. Células FRT fueron obtenidas del Dr. Alfonso González (Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile). El cultivo primario de neuronas de hipocampo fue gentilmente enseñado por el Dr. Alfredo Cáceres (Instituto Mercedes y Martín Ferreyra, Córdoba, Argentina). Otros cultivos de neuronas se obtuvieron del Laboratorio de la Dra. Alejandra Álvarez (Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile).

1.4 Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: policlonal anti-LRP humano (Marzolo y cols., 2003), monoclonal anti-HA, el cual se obtuvo del hibridoma 12A5 de ratón, (Obermoeller y cols., 1998), otro monoclonal obtenido de Babco, un policlonal anti-HA (Upstate, Lake Placid, NY, EE.UU.) y otro policlonal anti-HA Y-11 (Santa Cruz Biotechnology). Policlonal anti-Megalina humana generado en el laboratorio contra el

dominio citosólico de Megalina, monoclonal anti-uvomorulina/E-cadherina y anti- γ -adaptina monoclonal (Sigma Chemical, St Louis MO, EE.UU.), monoclonal anti-ZO-1 (Zymed), monoclonal anti-myc (9E10) (Roche Diagnostics), monoclonal anti-MAP2 (clon AP14, Cáceres et al., 1992). Como anticuerpos secundarios se utilizaron: anti-IgG de ratón conjugado con Cy-3 (Chemicon, Temecula, CA, EE.UU.), anti-rata conjugado con Alexa 488 y un anti-conejo conjugado con Alexa 594 (Molecular Probes) y los anticuerpos anti-ratón-HRP (oveja), anti-conejo-HRP y anti-rata-HRP (cabra) (Chemicon, Temecula, CA, EE.UU.).

2. Reactivos

Los siguientes reactivos de cultivo celular se adquirieron de GIBCO (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, EE.UU.): DMEM, DMEM sin calcio, F-12 modificado por Coon, suplemento N-2, suplemento B-27, DMEM sin metionina y cisteína, L-glutamina, penicilina, estreptomina, G418, tripsina-EDTA, y Lipofectamina Plus. La lipofectamina 2000 fue obtenida de Invitrogen (CARLSBAD, California, EE.UU.) y el suero fetal bovino fue obtenido de Hyclone (South Logan, UT, EE.UU.).

Los inhibidores de proteasas (leupeptina, aprotinina, pepstatina A, antipaina), acrilamida, bisacrilamida, glicerol, Tween-20, persulfato de amonio, temed, gelatina, saponina, paraformaldehído, metionina, L-cisteína, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, EDTA, Hepes, sacarosa y BSA fueron adquiridos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EE.UU.).

De Winkler (Santiago, Chile) se obtuvo el Tris, SDS, β -mercaptoetanol y NaCl.

De Merck se obtuvo etanol, isopropanol, ácido acético glacial, metanol, cloroformo, citrato de sodio, CaCl_2 y MgCl_2 .

Biotina Sulfo-NHS-LC, esferas de agarosa unidas a estreptoavidina y esferas de agarosa unidas a proteína A fueron obtenidas de Pierce (Rockford, IL, EE.UU.). Estándar de peso molecular preteñido para proteínas, Tritón x-100 y bromuro de etidio provienen de Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.). Membrana de transferencia Immobilon-P fue obtenida de Millipore (Billerica, MA, EE.UU.). El sistema ECL fue obtenido de Amersham Biosciences UK Limited (Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). El cloruro de amonio fue de Fisher Scientific (New Jersey, EE.UU.) y metionina-cisteína [S^{35}] fue adquirida en NEN Life Science Products.

MÉTODOS

1. Técnicas de biología molecular

1.1 Cultivo y crecimiento de bacterias

Las bacterias fueron cultivadas en medio LB (bactotripton 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g en 1 litro de agua, pH 7,4) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y crecidas hasta saturación en agitador con regulación de temperatura a 37°C con agitación de 170 rpm.

1.2 Preparación de bacterias competentes

Se creció una colonia de bacterias DH5α en 40 ml de medio LB durante 45 min de modo de alcanzar una densidad óptica de 600 nm. Las bacterias fueron centrifugadas a 3.000 rpm por 9 min, se resuspendieron en 4 ml de CaCl₂ 75 mM suavemente, pues células se encuentran muy frágiles, y luego se completó con 20 ml de CaCl₂ 75 mM. Se incubó en hielo por 30 min y se centrifugó a 2.500 rpm por 5 min a 4°C. Se resuspendieron en 4 ml de CaCl₂ 75 mM en hielo y se dejó a 4°C durante toda la noche. Finalmente, las bacterias competentes generadas fueron alicuotadas en tubos eppendorf de 0,5 ml y congeladas rápidamente a -80°C en glicerol al 15%v/v (207 µl de bacterias y 43 µl glicerol 87%).

1.3 Transformación

Se mezclaron 50 μ l de bacterias competentes con 1 μ l de DNA plasmidial y se dejó en hielo durante 30 min. Luego se hizo una incubación a 42°C durante 45 seg y posteriormente se dejó en hielo por 2 min. Luego se agregaron 450 μ l de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) precalentado a 37°C y se dejó agitando a 37°C durante 1 h. Finalmente se sembró la mezcla en placas LB-ampicilina y se dejó toda la noche en estufa a 37°C.

1.4 Obtención de plasmidios

Los plasmidios utilizados fueron obtenidos mediante tres metodologías distintas, según lo requerido para su posterior uso. Estas metodologías fueron:

Minipreparación: Consiste en la purificación de DNA plasmidial a través de una columna de intercambio aniónico, para la obtención de sobre 50 μ g de DNA. Se utilizó el kit E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep II de Omega Bio-tek, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Midipreparación: Consiste en la purificación de DNA plasmidial a través de una columna de intercambio aniónico, para la obtención de sobre 100 μ g de DNA. Se utilizó el kit QIAGEN®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Maxipreparaciones: Consistieron en la obtención de DNA plasmidial para la obtención de sobre 1 mg de DNA, mediante el siguiente protocolo: las bacterias conteniendo el

plasmidio de interés fueron crecidas en 250 ml de medio LB-ampicilina a 37°C con agitación. Las bacterias se centrifugaron a 5.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El precipitado celular se resuspendió en una solución I (glucosa 50 mM, Tris-Cl pH 8 25 mM, EDTA pH 8,0 10 mM) y se lisó con 20 ml de solución II (43 ml de agua desionizada, 2 ml de NaOH, 5 ml de SDS 10%), se mezcló suavemente y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregaron 15 ml de solución III (acetato de potasio 60 ml, ácido acético glacial 11,5 ml, agua 28,5 ml), se mezcló suavemente y se dejó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 5.000 rpm a 4°C durante 10 min. Luego se agregó al sobrenadante 0,6 volúmenes de isopropanol y se volvió a centrifugar de igual manera anterior. El precipitado de ácidos nucleicos se resuspendió en 3 ml de TE pH 8,0 y 3 ml de LiCl 5 M y se centrifugó a 5.200 rpm a 4°C durante 5 min. Al sobrenadante se añadió un volumen equivalente de isopropanol y posteriormente se centrifugó a 7.700 rpm a 4°C durante 10 min. El precipitado de DNA fue resuspendido en 500 μ l de TE pH 8,0 y se agregó 1,5 μ l de RNAsa one. Se incubó durante 1,5 h a 37°C. Posteriormente se agregaron 500 μ l de PEG 13% NaCl 1,6 M y se dejó en hielo durante 1 h. Luego se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C durante 10 min. El precipitado fue resuspendido en 400 μ l de TE pH 8,0 y se agregó 400 μ l de fenol saturado con Tris pH 8,0, se agitó en vórtex y se centrifugó durante 2 min a máxima velocidad. Luego se agregó nuevamente 200 μ l de TE pH 8,0 y se volvió a centrifugar. Se juntaron ambas fases superiores y se agregó 400 μ l de una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se agitó en vórtex y se centrifugó 1 min a máxima velocidad. Luego se agregó al sobrenadante 800 μ l de éter saturado con agua, se agitó vigorosamente y se aspiró la fase superior. Se repitió 3 veces. Se agregaron 100 μ l de acetato de amonio 10 M y 1.000 μ l de etanol absoluto (90%) para precipitar el DNA

plasmidial. Se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C durante 10 min, se lavó el precipitado con 400 µl de etanol al 70% y finalmente se resuspendió en 200 µl de agua libre de nucleasas.

1.5 Mutagénesis sitio dirigida

Para la construcción del plasmidio mLRP4 DD38,39AA se utilizó como molde el plasmidio de mLRP4 nativo. La amplificación se realizó mediante un kit de mutagénesis sitio dirigida QuikChange® de Stratagene, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los partidores diseñados que llevan la mutación deseada se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Partidores utilizados en mutagénesis sitio dirigida para la generación de mLRP4 DD38,39AA.

| Partidor | Secuencia | Posición |
|--------------|---|-----------------------|
| LRP DD/AA #1 | 5' GGC GGA GAG CCT GCT GCT GTG GGA GGC CTA C 3' | +13.898 al +13.928 |
| LRP DD/AA #2 | 5' GTA GGC CTC CCA CAG CAG CAG GCT CTC CGC C 3' | +13.928 al +13.898 |

Finalmente, las muestras de DNA obtenido se enviaron a secuenciar para la comprobación de las mutaciones realizadas.

1.6 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Una vez determinada la concentración de cada muestra de DNA mediante la medición de la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro, se determinó su calidad mediante su observación en un gel de agarosa al 0,8% disuelto en TAE (1 litro de TAE 50X: 242 g Tris, 57,1 ml ácido acético glacial, 37,2 g Na₂EDTA·2H₂O) con 1 µl de bromuro de etidio. Se cargaron en cada carril 500 ng de DNA plasmidial, ya sea obtenidos desde una purificación de DNA mediante columna, midipreparación o maxipreparación. Las muestras se corrieron a 100 V durante 1 h usando como solución tampón TAE . Posteriormente el gel fue visualizado en un transiluminador.

2. Técnicas de biología celular

2.1 Cultivo de líneas celulares

2.1.1 Mantenimiento de líneas celulares MDCK, FRT y cultivo primario de neuronas de hipocampo

La línea celular epitelial MDCK se cultivó en DMEM con 7,5 % de suero fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina y plasmocin 1:10000. Las células FRT se cultivaron en medio F-12 modificado por Coon, con 5% de SFB, penicilina/estreptomicina y plasmocin 1:10.000. El medio para mantenimiento de células MDCK y FRT transfectadas se suplementó con G418 0,4 mg/ml. Para mantener y

sembrar las células para los distintos experimentos, éstas eran soltadas y disgregadas con tripsina , previo 3 lavados con PBS . Para el caso del cultivo primario de neuronas hipocampales, éstas eran mantenidas en DMEM con suplemento N-2 , suplemento B-27 , glutamina 2 mM y ovoalbúmina 0,1%. Todas las células se crecieron en estufa de cultivo a 37°C con una atmósfera al 5% de CO₂

2.1.2 Congelamiento de células

Una vez que células MDCK y FRT alcanzaban una confluencia de aproximadamente 80%, se soltaban con tripsina y eran centrifugadas a 1000 rpm durante 10 min, conteniendo 10 ml de medio Hanks con 5% de suero de caballo. El precipitado de células era resuspendido, suavemente, en un medio de congelación (SFB 50%, medio de crecimiento 40% y DMSO 10%) y congelando inmediatamente los criotubos a -80°C en un periodo de una semana como mínimo y luego eran traspasados a N₂ líquido.

2.2 Transfección celular

2.2.1 Transfección estable de células MDCK

Se sembraron 200.000 células en placa de 6 pocillos el día anterior a la transfección, en medio DMEM sin calcio y suero fetal bajo en calcio 5%. Las células fueron transfectadas con una mezcla de 2 µg de DNA, 12 µl de Lipofectamina 2000 en 1 ml de medio DMEM sin calcio y se incubaron con la mezcla de transfección durante 4-6 h en el incubador a 37°C. Posteriormente, se lavó una vez con PBS para retirar el

remanente del complejo de DNA y se dejó con medio wt por 36 h aproximadamente. Luego, las células crecidas fueron disgregadas de manera homogénea y se pasó un cuarto del resuspendido celular a una placa de 100 mm con medio de selección. Éste consistía de medio wt suplementado con 0,8 mg/mL del antibiótico G418. Las células se crecieron alrededor de 12–14 días en el medio de selección, tiempo al cual fue posible distinguir colonias formadas a partir de una única célula transfectada, portadora de la resistencia al antibiótico. Para cada DNA transfectado se aislaron 24 colonias crecidas individualmente en placa de 24 pocillos por duplicado. Una placa fue utilizada para realizar los lisados totales para el WB, a fin de obtener los clones positivos para el epítotope HA, y la otra era mantenida como respaldo de los clones. Aquellos clones positivos fueron amplificados en botellas de 25 cm² para su posterior congelación.

2.2.2 Transfección transiente de células MDCK

Se sembraron células MDCK establemente transfectadas con los minireceptores wt y N26A para la transfección transiente de PKD 1 DN y SNX17 respectivamente. Se crecieron 400.000 células sobre cubreobjetos en placa de 6 pocillos. La transfección con SNX17 se realizó al día siguiente de la siembra, mientras que la transfección con PKD 1 DN se realizó al cuarto día ya que se requería una mayor confluencia de las células. El día previo a la transfección se crecieron las células en DMEM sin calcio suplementado con piruvato 1 mM, glutamina 2 mM y suero fetal bajo en calcio 5%. En ambas transfecciones se utilizó 5 µg de DNA con 40 µl de Lipofectamina 2000 para cada uno. Se incubó por 6 h con el complejo de DNA, luego se lavó una vez con PBS y se dejó con medio wt hasta el día siguiente. Las células se inducen con butirato de sodio 2 mM por 16 h y se proceden a realizar las IF.

2.2.3 Transfección estable de células FRT

Se sembraron 200.000 células en placa de 6 pocillos el día anterior a la transfección, en medio F-12 modificado por Coon y suero fetal bajo en calcio 5%. Las células se transfectaron utilizando 2 μ g de DNA, 12 μ l de Lipofectamina Plus y 8 μ l de reactivo Plus sobre 1 ml de medio DMEM sin calcio. Las células se incubaron con la mezcla de transfección durante 8 h en el incubador a 37°C. Después de retirar el complejo del DNA, se lavó con PBS y se dejó con medio wt. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento que para la transfección estable de células MDCK mencionado anteriormente.

2.2.4 Transfección de neuronas de hipocampo

Las células del cultivo primario de neuronas de hipocampo se cultivaron en medio de mantención normal, sobre cubreobjetos en placa de 35 mm. La transfección se realizó al quinto día posterior a la siembra, con una mezcla de 2 μ g de DNA y 12 μ l de Lipofectamina 2000 sobre 1,5 ml de medio de crecimiento normal sin antibióticos como volumen final. Se incubó por 4-5 h a 37°C y luego se retiró el complejo de DNA. Se dejó con medio de crecimiento normal por 16-18 h. Luego se procedió a realizar la IF.

2.3 Western Blot

2.3.1 Preparación del extracto proteico

Las células crecidas en medio de crecimiento normal fueron lavadas sobre hielo con PBS frío 3 veces y fueron lisadas con una solución tampón de lisis (PBS , Tritón x-100 1%, PMSF 1 mM, inhibidores de proteasas: aprotinina 1 μ M, antipaina 1 μ M, leupeptina 1 μ M, pepstatina 1 μ M) durante 1 h a 4°C. Luego el lisado se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C durante 10 min para la precipitación de los núcleos celulares. Posteriormente al sobrenadante se agregó una solución tampón de carga (glicerol, Tris, SDS, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol) y se hirvió por 5 min. Las muestras eran cargadas inmediatamente o bien eran almacenadas a -20°C.

2.3.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

Las muestras obtenidas fueron cargadas en gel de poliacrilamida-SDS. Para la detección de LRP endógeno y de los minireceptores de LRP se utilizaron geles al 6%, para la detección de SNX17 endógena se usaron geles al 10%, mientras que para la detección de μ -1B y γ -adaptina se utilizó un gel en gradiente 5%-15%. Las muestras eran cargadas junto con un estándar de peso molecular. Para la electroforesis del gel se utilizó una solución tampón Tris 250 mM, glicina 2 M, SDS 10% y fue realizada a 100 mV.

2.3.3 Transferencia a membrana

Las proteínas del gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de PVDF, previamente activada en metanol Merck, en un sistema de transferencia Bio-Rad®. Las proteínas de bajo peso molecular se transfirieron a 1 A durante 2 h, mientras que proteínas de alto peso molecular fueron transferidas a 350 mA durante toda la noche. La transferencia fue realizada a 4°C y se utilizó como solución tampón Tris 250 mM, glicina 2 M y metanol 20%.

2.3.4 Incubación con anticuerpos

Una vez terminada la transferencia, se dejaba secar la membrana a temperatura ambiente y luego era activada en metanol antes de ser incubada con los anticuerpos. Éstos fueron incubados en PBS , leche 3% o 5% y Tween-20 0,05% o 0,1%. Los anticuerpos primarios fueron incubados durante toda la noche en balancín a 4°C y los secundarios a temperatura ambiente por 2 h. Para la detección de los minireceptores se utilizó anti-HA monoclonal con una dilución 1:100 y anticuerpo anti-ratón-HRP 1:5.000. Para la detección de LRP y SNX17 endógeno se utilizó anti-LRP policlonal 1:1000 y anti-SNX17 policlonal 1:3.000, respectivamente y como secundario se utilizó anti-conejo-HRP 1:10.000. Para la detección de μ -1B-HA y γ -adaptina se usaron los anticuerpos anti-HA monoclonal (Babco) 1:500 y anti- γ -adaptina monoclonal 1:150. Después de cada incubación con los anticuerpos la membrana era lavada con PBS-Tween-20 0,05% o 0,1% por 3 veces durante 5 min en agitación. Finalmente, la membrana fue revelada con el sistema ECL (*Electro Chemo Luminiscence*).

2.3.5 Stripping de membranas

Una vez que la membrana había sido incubada con un anticuerpo determinado y revelada en placa, ésta podía ser nuevamente incubada con otro anticuerpo. Para ello se realizaba un *stripping* de la membrana, en el cual se lavaba la membrana utilizada en el revelado con PBS-Tween-20 0,1% durante 20 min por 2 veces en balancín, luego un lavado con PBS de 10 min y posteriormente una incubación con citrato de sodio 0,1 M pH 3,0 durante 1 h en agitación fuerte a temperatura ambiente. Luego la membrana era lavada nuevamente con PBS por 10 min y finalmente incubada en solución de bloqueo para nuevamente ser incubada con un anticuerpo.

2.4 Inmunoprecipitación de células marcadas metabólicamente

Las células fueron sembradas a una densidad de 250.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos, de modo que el día de la marcación estuviesen entre 60 y 80 % confluentes. Al día siguiente se inició el ensayo, primero se realizó una depleción, donde las células fueron lavadas una vez con PBSc (PBS , CaCl₂ 1,3 mM, MgCl₂ 1 mM) y una vez con medio de depleción tibio (DMEM sin metionina-cisteína). Luego se incubaron dos veces por 20 min en el mismo medio a 37°C y posteriormente se realizó la marcación: se preparó el medio de marca DMEM sin metionina-cisteína con 200 µCi/ml de ³⁵S-met-cis . A cada pocillo se agregó 700 µl equivalentes a 140 µCi/pocillo y se incubó a 37°C en incubadora por 4 h. Después de la marcación, las células se lavaron dos veces con PBSc frío y luego se realizó la lisis celular incubando con 700 µl/pocillo de solución tampón de lisis (PBS, Tritón x-100 1%) fría con inhibidores de proteasas en balancín por 1 h a 4°C. Luego el lisado fue centrifugado a 4°C por 5 min a

14.000 rpm. Al sobrenadante se agregó 500 μ l de solución HA mix (PBS, CaCl_2 0,5 mM, MgCl_2 1 mM, SDS 10%, Tritón x-100 1%, BSA 0,25%) y 60 μ l de proteína A-agarosa, se incubó por 2 h a 4°C en balancín y se centrifugó 5 min a 14.000 rpm. Luego se agregó al sobrenadante 30 μ l de anticuerpo monoclonal HA y se incubó en balancín toda la noche a 4°C para permitir la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Luego se agregó a cada tubo 60 μ l de resina proteína A-agarosa y se incubó en balancín a 4°C por 2 h. Posteriormente se realizaron los lavados de la resina con 1 ml de HA mix dos veces y con PBSc 2 veces. Finalmente se agregaron 30 μ l de solución tampón de carga, se agitó en vórtex y se hirvió 5 min. Luego se centrifugó 3 min a 14.000 rpm y se procedió a cargar en gel de poliacrilamida al 6%.

Una vez que finalizó la corrida del gel, éste fue fijado 30 min con agitación suave en solución de fijación (isopropanol 50%, ácido tricloroacético 10%) y fue puesto a secar en secador Bio-Rad® sobre papel Wathman durante 2 h a 80°C. Una vez secos, los geles fueron expuestos en placas sensibles a la radiación a -80°C hasta el momento del revelado.

2.5 Biotinilación

Se sembraron 200.000 células sobre filtros de policarbonato de 24 mm de diámetro, a los cuales se les fue midiendo día a día la resistencia transepitelial con un par de electrodos de marca EVOM Epithelial Voltohmmeter (World Precision Instruments, EE.UU.). Células MDCK fueron procesadas cuando alcanzaron una resistencia de 250-300 Ohm/cm^2 , mientras que células FRT fueron procesadas cuando alcanzaron una resistencia de 1500-2000 Ohm/cm^2 . Todo el ensayo fue realizado a

4°C, las células fueron lavadas con PBSc 3 veces de 5 min cada una en balancín y luego fueron incubadas con Sulfo-NHS-LC-Biotina 0,5 mg/ml en la misma solución de lavado, por 30 min 2 veces en balancín, utilizando una nueva dilución de biotina la segunda vez. Luego los filtros fueron lavados con NH₄Cl 50 mM en PBSc por 20 min 2 veces, en balancín y finalmente con PBS durante 10 min. Luego, los filtros fueron cortados y dispuestos en tubos eppendorf para ser lisados con 1 ml de solución tampón de lisis SA (Tris pH 8,0 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA pH 8,0 5 mM, BSA 0,2%, Tritón x-100 1%, inhibidores de proteasas) durante 1 h en balancín, con agitación en vórtex ocasionalmente. Luego el lisado fue traspasado a otro tubo y se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. Al sobrenadante se agregaron 40 µl de SDS 10% y 60 µl de resina estreptoavidina y los tubos se dejaron en balancín toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizó el lavado de la resina que tiene unida las proteínas de la superficie celular que lograron unir biotina. Éste consistió en consecutivos lavados de 1 ml, centrifugando cada vez, con solución HA mix, solución Tp II (Tris pH 8,0 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA pH 8,0 5 mM, BSA 0,2%, SDS 0,1%) solución Tp III (Tris pH 8,0 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA pH 8,0 5 mM, BSA 0,2%) y solución Tp IV (Tris pH 8,0 50 mM). Finalmente se agregaron 30 µl de solución tampón de carga, se hirvió por 5 min, se centrifugó a 1.000 rpm y se procedió a cargar en gel de poliacrilamida al 6%.

2.6 Inmunofluorescencia

2.6.1 Inmunofluorescencia de células MDCK y FRT

Se sembraron 100.000 células MDCK y FRT sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos por 3–4 días y 24 h antes del experimento se indujo la expresión del receptor con butirato de sodio 2 mM. Para lavar las células se utilizó PBS CaCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM. Las células se fijaron con paraformaldehído 2% para células MDCK y 4% para células FRT, durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células se permeabilizaron con Tritón x-100 0,2% durante 10 min a temperatura ambiente y se bloquearon con PBS-gelatina 0,2% durante 1 h. Se incubó con anticuerpo primario, diluido en solución de bloqueo, en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Luego las células fueron lavadas 3 veces en PBS-gelatina 0,2% e incubados con anticuerpo secundario 30 min a 37°C. Nuevamente se realizaron los lavados y finalmente los cubreobjetos con las células se montaron sobre el portaobjeto con una interfase de gelvatol (20 g de polivinilalcohol, 40 ml de glicerina, DABCO 0,1 g/ml, azida 0,1%, 80 ml PBS pH 7,4) y secados a 65 °C durante 20 min en cámara seca.

2.6.2 Inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo

Neuronas de Hipocampo fueron sembradas sobre cubreobjetos en placas de 35 mm por 4–7 días en medio N-2. Todas las soluciones se utilizaron a 37°C. Para lavar las células se utilizó PBS filtrado, con lavados de 5 min por 3 veces. Las células se fijaron con paraformaldehído 4%-sacarosa 4% durante 20 min a temperatura ambiente

y luego se lavaron 4 veces con PBS. Para observar el minireceptor en el interior de la célula, éstas se permeabilizaron con PBS-Tritón x-100 0,2% durante 5 min a temperatura ambiente. Luego, se lavaron con PBS 5 min por 3 veces y se bloquearon con PBS-BSA 5% durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubó con anticuerpo primario diluido en PBS-BSA 1%, en cámara húmeda durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego los cubreobjetos fueron lavados en PBS durante 5 min por 3 veces e incubados con anticuerpo secundario diluido en PBS-BSA 1%, durante 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS y finalmente los cubreobjetos con las células se montaron sobre una gota de gelvatol con las células hacia abajo. Se dejó secar a temperatura ambiente en oscuridad. Para visualizar el minireceptor en la superficie celular, las células fueron incubadas con el primer anticuerpo primario seguido por el secundario conjugado con un fluoróforo antes de la permeabilización. Luego, para observar las proteínas intracelulares, las células fueron incubadas con Tritón x-100 y posteriormente fueron incubadas con el segundo anticuerpo primario seguido por el secundario conjugado con otro fluoróforo.

2.9 Microinyección

Células MDCK se sembraron en cubreobjetos en placa de 24 pocillos y se les dejó crecer durante 4 días hasta alcanzar confluencia. Las microinyecciones fueron realizadas en los núcleos celulares utilizando capilares de vidrio y un microinyector Eppendorf Transjector 5246 montado sobre un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100. Las células fueron microinyectadas en medio DMEM Hepes 20 mM, SFB 10%. La concentración de DNA microinyectada en los núcleos celulares consistió en 50 ng/ μ l

de los minireceptores de LRP, 100 ng/ μ l de RAP, y 30 ng/ μ l de PKD isoforma 1 DN, diluidos en solución tampón de microinyección (Hepes 10 mM, HKCl 140 mM, pH 7,4). La mezcla fue centrifugada a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C. Luego de realizada la microinyección, se incubaron las células a 37°C durante 1 h en el mismo medio de microinyección, para permitir la síntesis del DNA. Luego se le adicionó al medio cicloheximida 100 μ g/ml para la detención de la síntesis, y se llevaron las células a 20°C durante 2,5 h para permitir la acumulación de las proteínas en TGN. Finalmente, las células fueron incubadas nuevamente a 37°C por 3 h para permitir la salida del total de proteínas acumuladas. Luego se procedió a realizar la IF: las células fueron lavadas con PBS CaCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM frío y fijadas con paraformaldehído 4% por 30 min. Luego, las células sin permeabilizar, fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo anti-HA por 30 min y luego fueron lavadas dos veces por 5 min con PBS. Posteriormente, las células fueron nuevamente fijadas en paraformaldehído 4% por 15 min y permeabilizadas con Tx-100 por 10 min. Luego fueron incubadas con anticuerpo policlonal de pollo anti-HA por 30 min. La localización apical de los minireceptores fue detectada con los anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados con Alexa 488 o con Alexa 555 (ambos hechos en cabra). La localización intracelular y/o basolateral de los minireceptores fue detectada con anticuerpo anti-pollo-Alexa 594 (hecho en cabra).

2.10 Co-inmunoprecipitación

Células MDCK fueron sembradas en una placa de 100 mm hasta confluencia, y se indujo con butirato de sodio 2 mM el día anterior al experimento.

Las células fueron retiradas de la placa con un raspador de goma en PBS y se centrifugaron a 1.000 rpm por 8 min. El precipitado celular fue resuspendido en 800 μ l de una solución tampón de lisis (Tris 20 mM, NP-40 0,5%, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Na_2VO_4 1 mM, NaF 1 mM, inhibidores de proteasas, ácido okadaico 250 ng/ml, pH 7,4). Las células fueron pasadas por jeringa y lisadas durante 20 min en hielo. Luego, se centrifugó el lisado a 9.700 rpm durante 3 min para eliminar los núcleos. A 400 μ l del sobrenadante se le agregó anticuerpo anti-LRP RRR policlonal 10 μ g y a los otros 400 μ l se agregó como anticuerpo no relacionado 10 μ g de un anticuerpo policlonal que reconoce la cola de Megalina. Se incubó por 2 h a 4°C en balancín.

A continuación se agregaron 40 μ l de proteína A-agarosa y se dejó incubando durante 1,5 h. Se centrifugó a 14.000 rpm por 1 min. Finalmente, se lavaron las muestras con 800 μ l de solución tampón de lisis 3 veces a casi sequedad, se resuspendió el precipitado en 25 μ l de solución tampón de carga, se hirvieron 5 min, se centrifugaron a 1.000 rpm y se procedió a cargar en un gel de poliacrilamida hecho en gradiente entre el 5% y 15% para analizar las muestras por WB.

3. Microscopía

3.1 Microscopía de epifluorescencia

Las muestras constituidas por células MDCK y FRT crecidas en los cubreobjetos fueron observadas en un microscopio invertido de epifluorescencia Zeiss Axiophot, con un objetivo de inmersión 63X y fotografiadas con una cámara Axiocam (14 bits; 1300x1030 pixeles) exposición entre 500 y 2.000 milisegundos, evitando una

saturación de la señal. Las imágenes de fluorescencia digital fueron transferidas al computador utilizando el programa Axiovision 5.0.

3.2 Microscopía confocal

Las muestras constituidas por células MDCK fueron observadas y analizadas con un microscopio invertido (Carl Zeiss Axiovert 35M) equipado con epifluorescencia y fotografiadas usando un objetivo 63X (Carl Zeiss) usando el programa Axiovision (versión 3.0.6). Las muestras constituidas por neuronas de hipocampo crecidas en cubreobjetos fueron observadas y analizadas usando un microscopio confocal (Carl Zeiss Axiovert 200M LSM 5) utilizando un objetivo 63X y en algunos casos el objetivo 100X. Secciones del plano X-Y de 0,5 μm de espesor fueron colectadas secuencialmente, con una resolución de 1024 \times 1024. Se utilizó el programa LSM 5 Pascal.

RESULTADOS

1. Estudio de la distribución intracelular de los distintos minireceptores en células polarizadas

1.1 Distribución intracelular de los minireceptores en células MDCK

La distribución subcelular en el estado estacionario de los distintos minireceptores en células MDCK fue analizada mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IF) y biotilación selectiva. Se chequeó que las células biotiladas estuvieran correctamente polarizadas mediante la distribución basolateral de un marcador basolateral endógeno, E-cadherina (datos no mostrados) y se realizó la cuantificación de la localización obtenida para cada minireceptor.

El minireceptor wt (mLRP4) fue encontrado exclusivamente en el dominio basolateral. Por IF se pudo observar tinción positiva de la membrana basolateral en células permeabilizadas, la cual se distingue por un patrón típico de tinción de los bordes de la célula. Por biotilación este minireceptor se localizó exclusivamente en el dominio basolateral, con un 92% localizado en esta superficie. Estos resultados se muestran en la **Figura 5**.

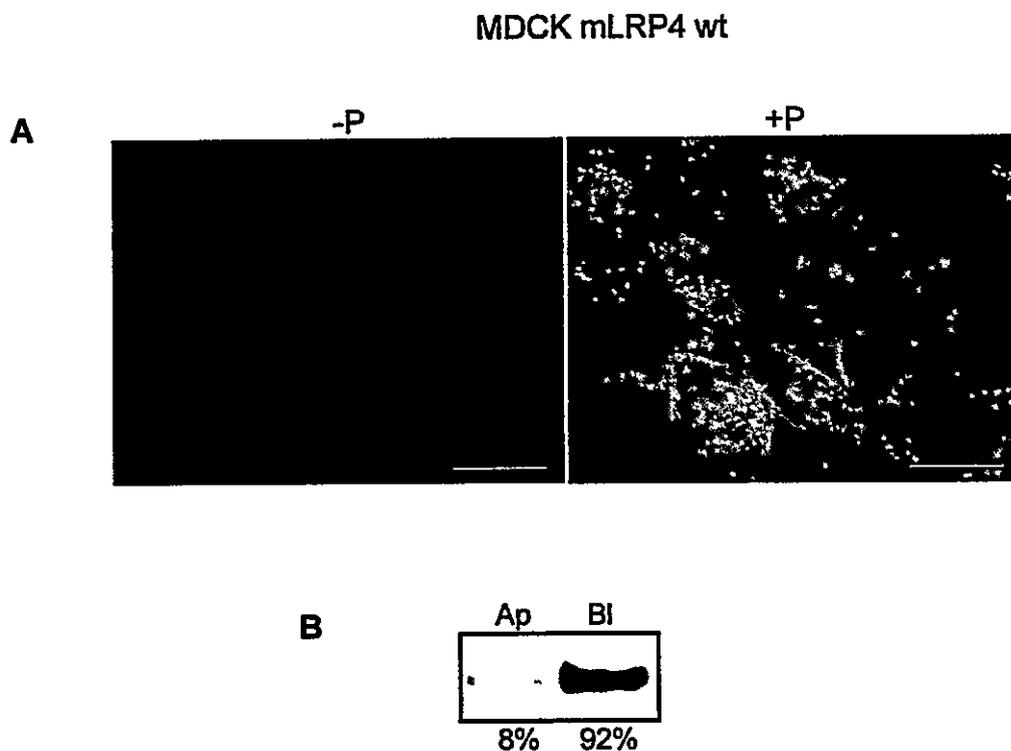


Figura 5. Localización del minireceptor wt en células MDCK.

A. IF de células MDCK transfectadas establemente con el minireceptor wt, donde no se observa presencia del receptor en la superficie apical en células sin permeabilizar (-P), mientras que en células permeabilizadas (+P) se observa el minireceptor en la membrana basolateral, dado por un patrón típico de tinción de bordes de la célula. En todas las IF, para ver el minireceptor, se utilizó como anticuerpo primario anti-HA policlonal 1:500 y como secundario anti-conejo Alexa 594 1:1.000. B. Biotinilación de estas mismas células muestra que el minireceptor wt, a nivel de superficie, está localizado casi exclusivamente en el dominio basolateral (92%). Las muestras biotiniladas fueron incubadas con anticuerpo monoclonal anti-HA 1:200 toda la noche a 4°C, y como anticuerpo secundario anti-ratón HRP 1:5.000 por 2h a temperatura ambiente. Barras= 10 μ m.

La localización de este minireceptor wt resultó ser entonces similar a la del receptor LRP endógeno en estas células (Marzolo y cols., 2003).

Existen en el dominio citosólico del LRP varios putativos sitios de destinación basolateral (ver figura 4), entre los cuales destacan dos motivos basados en tirosina del tipo NPXY, un motivo Yxx ϕ , en el que la tirosina es compartida con el segundo motivo NPXY, dos motivos de LL y algunos aminoácidos cargados negativamente cercanos a las tirosinas, del tipo DD, que se han visto involucrados en la destinación basolateral del receptor de LDL (Matter y cols., 1994). Es por ello que se decidió analizar la contribución de cada uno de estos motivos en la distribución del receptor, transfectando los plasmidios correspondientes generados por mutagénesis sitio dirigida.

El minireceptor N26A, con mutación en el primer motivo NPXY, presentó una distribución más bien intracelular, donde por IF en células sin permeabilizar no se observó marca positiva y mientras que en células permeabilizadas no se observaron bordes celulares sino que una fuerte tinción vesicular tipo endosomal. Estos resultados fueron confirmados mediante biotinilación, donde no se observó el minireceptor en la superficie celular en el estado estacionario (promedio de 3 experimentos, no mostrados) (Figura 6A). Sorprendentemente, al analizar la localización del minireceptor Y29A, donde también se destruye el motivo NPXY, mediante IF se observó que se distribuye de manera importante en la superficie apical de células sin permeabilizar, mientras que en células permeabilizadas no se observó su localización en la membrana basolateral. Mediante biotinilación su localización fue en el polo apical. Esta mutación única entonces revirtió la polaridad de LRP, implicando que este motivo sería clave en la localización basolateral (Figura 6B).

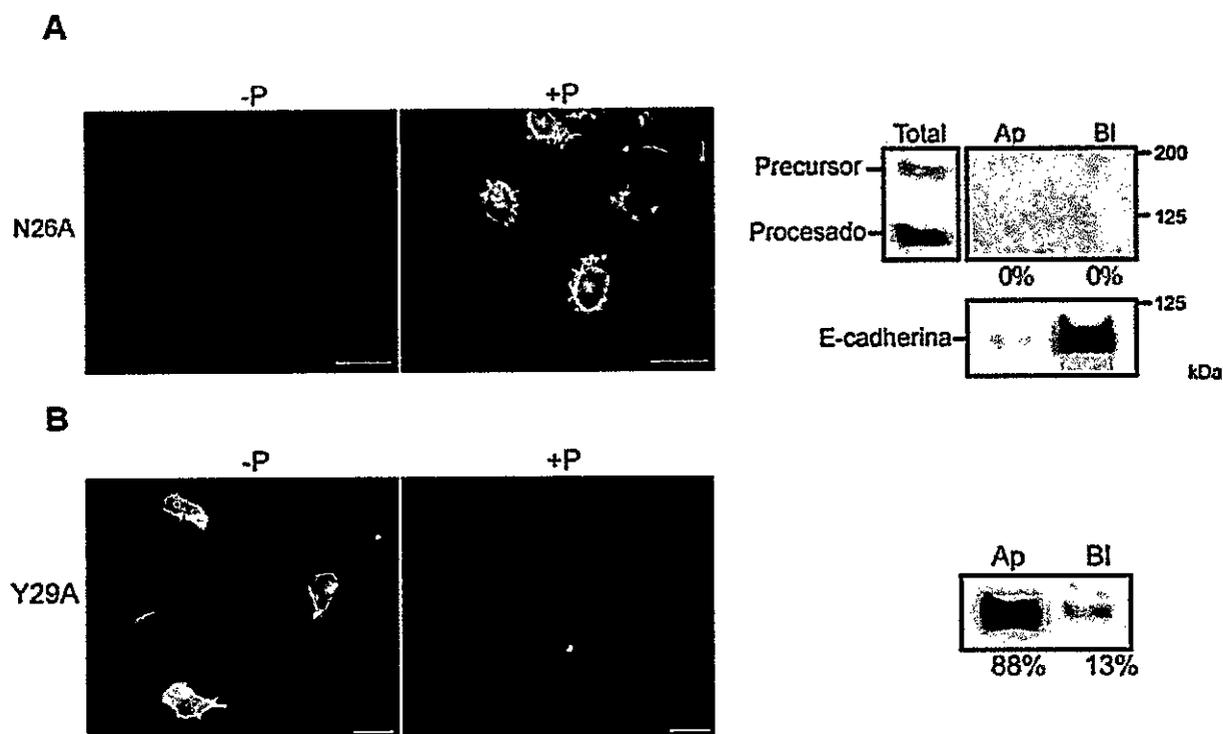


Figura 6. Localización de los minireceptores N26A y Y29A en células MDCK.

IF y biotilación de células MDCK transfectadas establemente con los minireceptores indicados. A. Se observa que el minireceptor N26A no está presente en la superficie apical de células sin permeabilizar (-P), ni en los bordes de la célula en una condición con permeabilización (+P), sino que se localiza principalmente en estructuras intracelulares. Estos datos fueron confirmados mediante una biotilación de estas mismas células, donde no se observa la presencia del receptor ni en la superficie apical ni basolateral. Se muestra la expresión del clon utilizado (Total), la presencia de las células y la correcta polarización de la muestra utilizada mediante la proteína basolateral endógena E-cadherina. B. Localización principalmente apical del minireceptor Y29A, donde mediante IF se observa una importante marca en células sin permeabilizar (-P) y una ausencia de tinción de bordes celulares (+P), lo cual fue confirmado por biotilación, encontrándose un 88% del total del receptor de superficie en el dominio apical. Barras= 10 μ m.

El minireceptor DD38,39AA presentó una distribución principalmente basolateral mediante biotilación, con un 80% del receptor que se encuentra localizado a nivel de la membrana plasmática en la superficie basolateral versus un 20% del receptor en la superficie apical. Mediante IF fue posible distinguir una marca pequeña de receptor en la superficie apical en células sin permeabilizar (**Figura 7A**), mientras que en células permeabilizadas se lograron ver bordes. Sólo se muestra la localización del minireceptor en células sin permeabilizar, pues es esta condición la que da cuenta de un cambio en el fenotipo en comparación con el minireceptor wt (lo mismo para las siguientes figuras 8 y 9). Por lo tanto, esto sugiere que estos dos residuos aspárticos podrían contribuir a la localización del receptor, posiblemente dada por la tirosina en posición 29 del primer NPxY. El minireceptor LL43,44AA presentó una distribución basolateral igual que el minireceptor wt, tanto por IF, donde no se observa la presencia del receptor en la superficie apical, como por biotilación (**Figura 7B**). Por lo tanto, este motivo de dileucinas proximal no tiene relevancia en la destinación final del LRP.

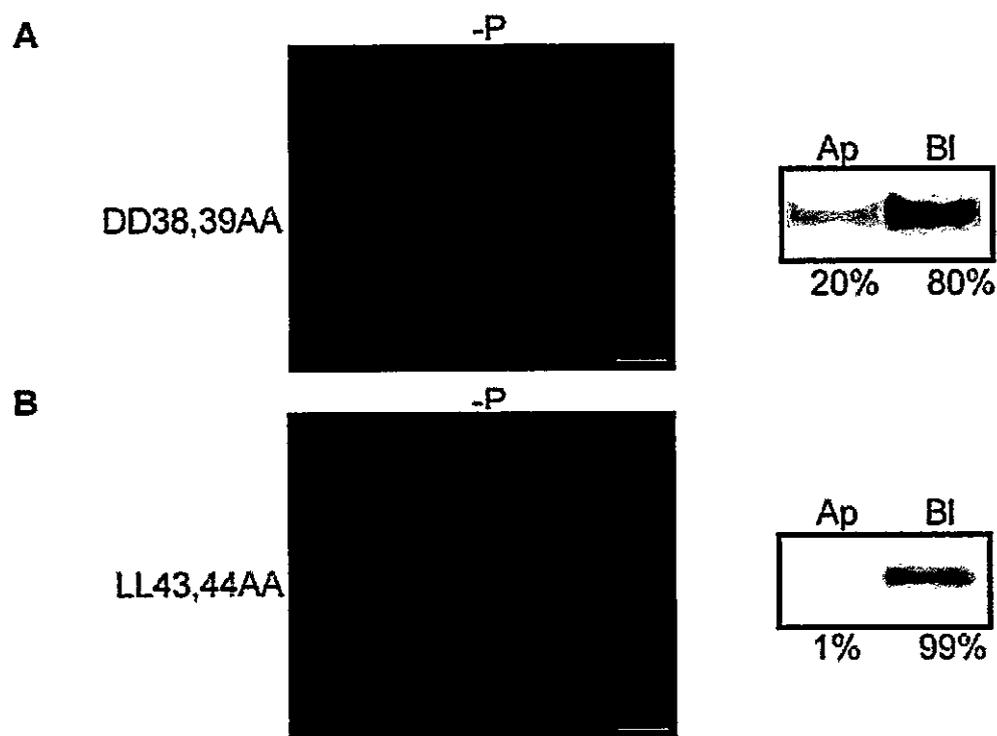


Figura 7. Localización de los minireceptores DD38,39AA y LL43,44AA en células MDCK.

IF y biotinilación de células MDCK transfectadas establemente con los minireceptores indicados. A. Se observa que el mLRP4 DD38,39AA se localiza principalmente en la membrana basolateral (80%) aunque también se observa una presencia menor en la superficie apical (20%) por biotinilación, como en células sin permeabilizar mediante IF. B. En cambio, el mLRP4 LL43,44AA tiene una localización basolateral al igual que el minireceptor wt. Barras= 10 μ m.

Luego se analizó la localización de los minireceptores con mutaciones en el segundo motivo NPxY, que se encuentran en la mitad distal del dominio citoplasmático del LRP. Primero se analizó la distribución del minireceptor con la mutación correspondiente a la tirosina, dada la importancia que este aminoácido confiere para la endocitosis de este minireceptor (Bu y cols., 2000). El minireceptor Y63A presentó una localización no polarizada, encontrándose tanto en la superficie apical y basolateral mediante IF y biotilación (**Figura 8A**). Dado que esta tirosina está contenida en un motivo consenso NPxY que se solapa con el motivo YATL, se decidió analizar la localización de los minireceptores con las mutaciones en N60A y L66A de forma de dilucidar en cuál de estos dos motivos podría estar participando. La distribución de mLRP4 N60A fue principalmente basolateral mediante IF y biotilación, no así el minireceptor mLRP4 L66A, que presentó una distribución más bien no polarizada, encontrando una importante tinción apical y basolateral por IF y biotilación (**Figura 8B**). Este resultado muestra que el segundo motivo NPxY no participa en la localización basolateral del LRP, sino que sería el mismo motivo de endocitosis, YATL el que tendría un papel en esta distribución.

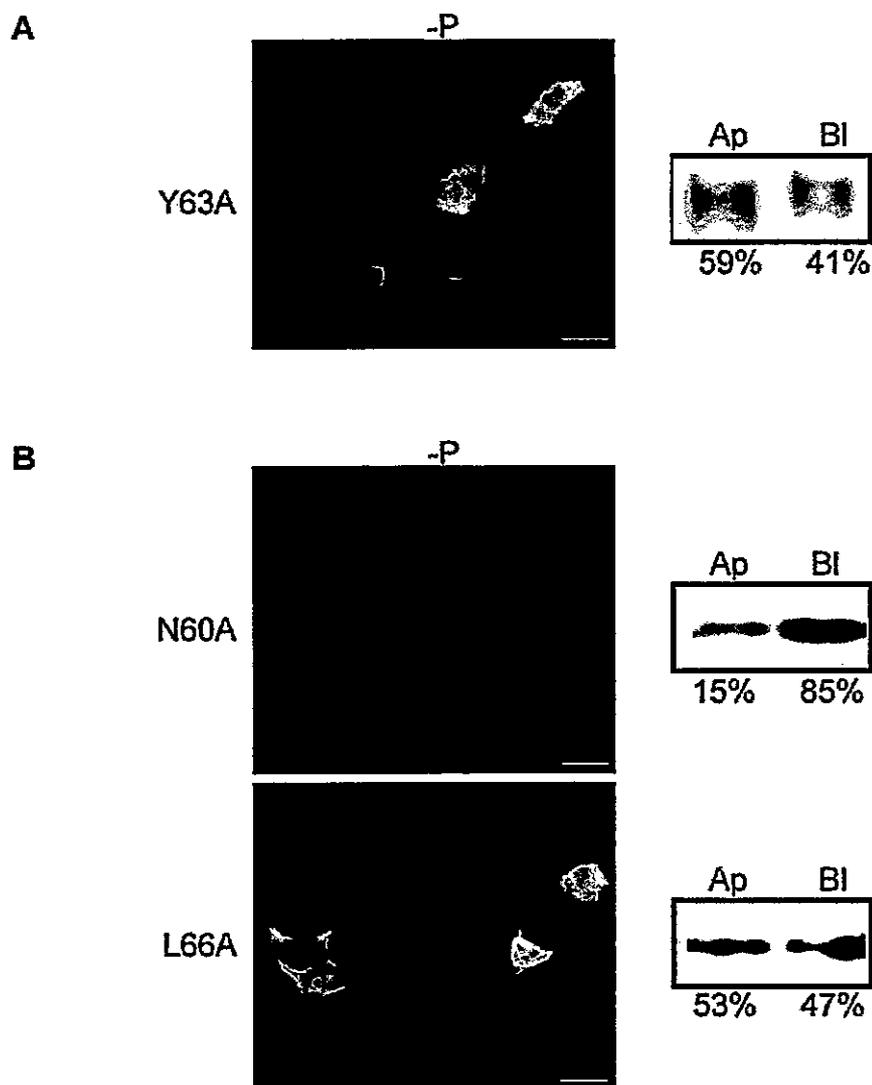


Figura 8. Localización de los minireceptores Y63A, N60A y L66A en células MDCK.

IF y biotinylación de células MDCK transfectadas establemente con los minireceptores indicados. A. Se observa que el mLRP4 Y63A se encuentra localizado tanto en la superficie apical como basolateral, mediante IF y biotinylación. B. Este residuo de tirosina estaría inserto dentro del motivo $Yxx\phi$ (YATL) y no dentro del motivo NPxY (NPVY), puesto que al encontrarse mutado el residuo L66 se observa el mismo fenotipo que para Y63A, no así al mutar el residuo N60, donde no se observa una localización apical, sino más bien basolateral. Barras= 10 μ m.

Luego se decidió analizar la contribución en la información de destinación basolateral del principal sitio de fosforilación del receptor (Li y cols., 2000), siendo éste el aminoácido serina 76. El minireceptor mLRP4 S76A resultó estar localizado de manera restringida en el dominio basolateral, lo cual se observó claramente mediante IF y biotilación (**Figura 9**). Finalmente, se analizó el motivo dileucinas ubicado en la posición 86-87 en la cola citoplasmática del receptor. El mLRP4 LL86,87AA resultó estar distribuido de manera no polarizada en la membrana celular, siendo encontrado de manera importante en la superficie apical y basolateral, lo cual pudo ser confirmado tanto por IF como por biotilación (**Figura 9**). Esto estaría sugiriendo que este motivo aminoacídico tendría una contribución en la localización del receptor. Para estudiar si este fenotipo en el cambio de distribución del LRP podría volverse más drástico, se utilizó el minireceptor Y63A,LL86,87AA, el que posee una doble mutación en los motivos NPXY y dileucina distales. El mLRP4 Y63A,LL86,87AA resultó ser también distribuido de manera no polarizada (**Figura 9**), al igual que los minireceptores con ambas mutaciones realizadas de manera independiente. Esto indica que ambos motivos, el NPXY y dileucina distales, actúan de manera independiente en la destinación del LRP, puesto que al mutar ambos motivos por separado y de manera conjunta se obtuvo indistintamente el mismo cambio en la distribución del receptor. Lo anterior sugiere que ambos motivos aminoacídicos podrían estar formando parte de un único motivo que los integra a ambos en conjunto o la existencia de un mecanismo más complejo en el reconocimiento de señales de destinación.

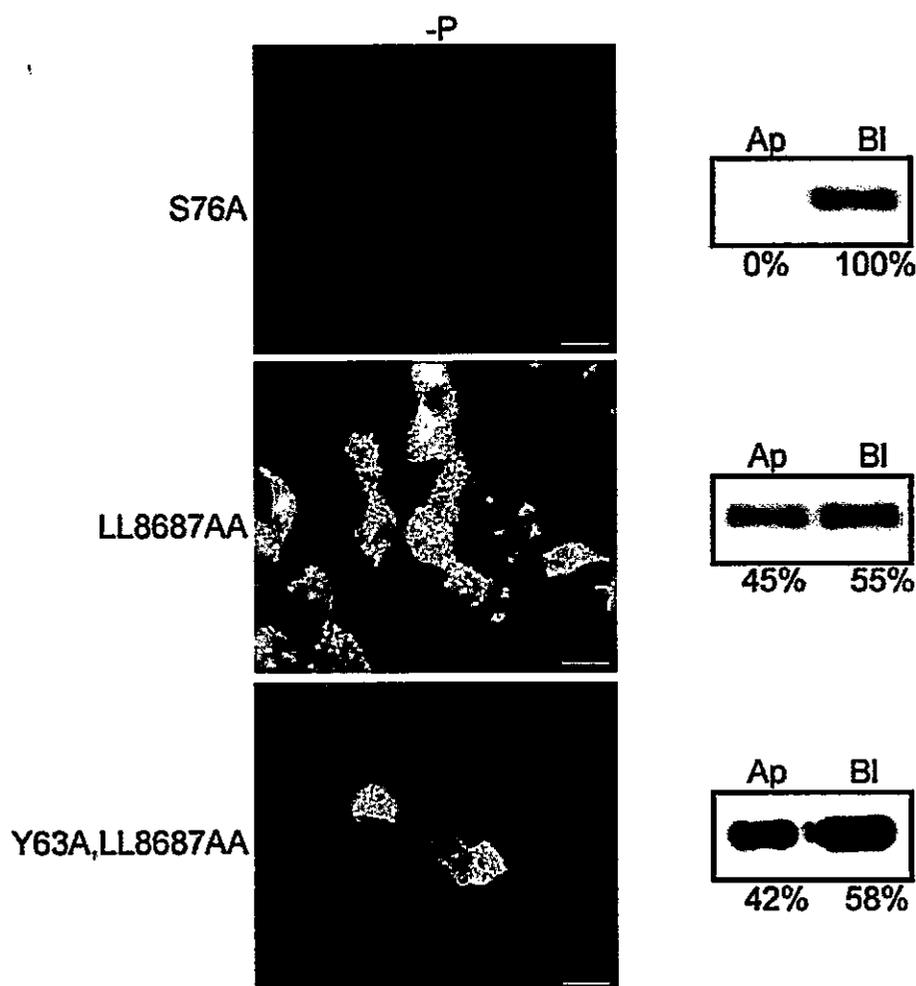


Figura 9. Localización de los minireceptores S76A, LL86,87AA y Y63A,LL86,87AA en células MDCK.

IF y biotinilación de células MDCK transfectadas establemente con los minireceptores indicados. Se observa que el mLRP4 S76A a nivel de superficie se encuentra localizado exclusivamente en la superficie basolateral, al igual que el minireceptor wt, por tanto este residuo aminoacídico no tendría relevancia en la destinación del LRP. En cambio los minireceptores con el motivo dileucinas mutado y la doble mutante para este motivo dileucinas y el residuo Y63 se encontró localizado tanto en la superficie apical como basolateral, mediante IF y biotinilación. Barras= 10 µm.

1.2 Distribución intracelular de los minireceptores en células FRT

Las células FRT presentan algunas diferencias importantes en la localización específica de proteínas de membrana cuando son comparadas con células MDCK (Zurzolo y cols., 2002). Sin embargo, la localización polarizada de la mayor parte de proteínas transmembrana basolaterales es conservada entre células FRT, por lo tanto, es probable que estas células reconozcan señales basolaterales citosólicas al igual que como lo hacen las células MDCK. Por ejemplo, la localización basolateral del receptor de neurotrofina humano p75 está mediada por una señal discreta basada en un residuo de tirosina que es igualmente reconocido tanto por MDCK como por FRT (Lipardi y cols., 2002). Sin embargo, la polaridad de muchas proteínas apicales no es conservada en FRT, sugiriendo que ellas tienen diferentes mecanismos de segregación, como ocurre con la proteína del prion que tiene un tallo glicosilfosfatidilinositol (Sarnataro y cols., 2002).

Sobre la base de lo mencionado anteriormente, se decidió estudiar si las células FRT eran capaces de reconocer, de igual manera que las células MDCK, la información contenida en el minireceptor wt y con las mutaciones en el primer motivo NPxY, el cual resultó contener el residuo tirosina crítico para la localización basolateral en células MDCK.

La distribución de los minireceptores transfectados en estas células resultó ser, en general, muy similar a la distribución que presentaron estos minireceptores en células MDCK mediante IF. Así por ejemplo, el minireceptor wt presentó una notoria localización basolateral, la cual fue posible distinguir claramente. No se observó tinción positiva en células sin permeabilizar, dando cuenta que la distribución de LRP estaba restringida principalmente a la superficie basolateral de la célula. El minireceptor

mLRP4 N26A se distribuyó principalmente de manera intracelular, con una importante marca en estructuras tipo endosomas. En algunas células fue posible distinguir la presencia de la proteína en la membrana basolateral, sin embargo no fue comparable a la distribución que presentó el minireceptor wt. Finalmente, el minireceptor mLRP4 Y29A en estas células también se localizó en el dominio apical, al igual que ocurrió en células MDCK y en ningún caso fue posible distinguir la presencia de la proteína en la membrana basolateral en células permeabilizadas. La localización mediante IF de los distintos minireceptores transfectados en células FRT se muestran en la **Figura 10**.

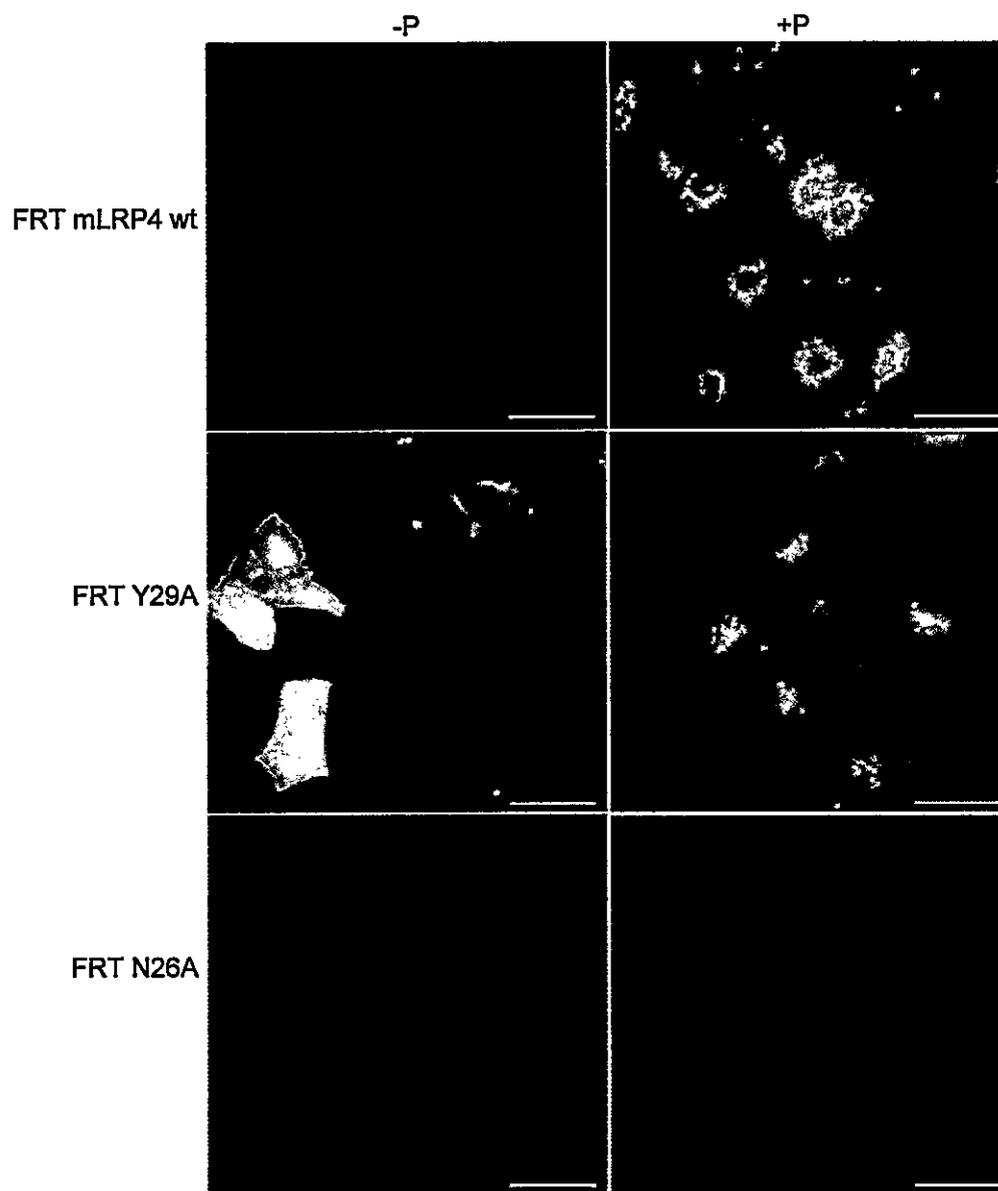


Figura 10. IF de células FRT transfectadas establemente con los minireceptores de LRP wt y con las mutaciones N26A y Y29A.

Representativas imágenes de microscopía de epifluorescencia. Se muestran células sin permeabilizar (-P) y células permeabilizadas (+P) incubadas con anticuerpo anti-HA policlonal 1:500 y anti-conejo Alexa 594 1:1.000. Se observa la notoria tinción de los bordes con el minireceptor wt, la clara tinción apical con el minireceptor Y29A y la tinción intracelular para el minireceptor N26A. Barras=10 μ m.

Una vez analizada la distribución en el estado estacionario de los distintos minireceptores transfectados establemente en las líneas celulares MDCK y FRT, y dado el comportamiento similar en ambos tipos celulares que presentó el minireceptor con la mutación en la asparragina 26, se estudió su localización en relación con el marcador antígeno-1 de endosoma temprano (EEA1).

Para ello se realizó una IF en células FRT y MDCK que expresan establemente el minireceptor N26A. A modo de comparación, la IF también se realizó en células que expresan el minireceptor wt. Tanto en células FRT como en células MDCK se observó una colocación parcial de ambos minireceptores con el marcador de endosoma temprano EEA1 (**Figura 11**), sin embargo ésta resultó ser más notoria para el minireceptor N26A, en el cual fue posible distinguir cuerpos vesiculares de gran tamaño, parcialmente positivos para ambos marcadores, los cuales se pueden ver con más detalle en las regiones amplificadas para cada célula.

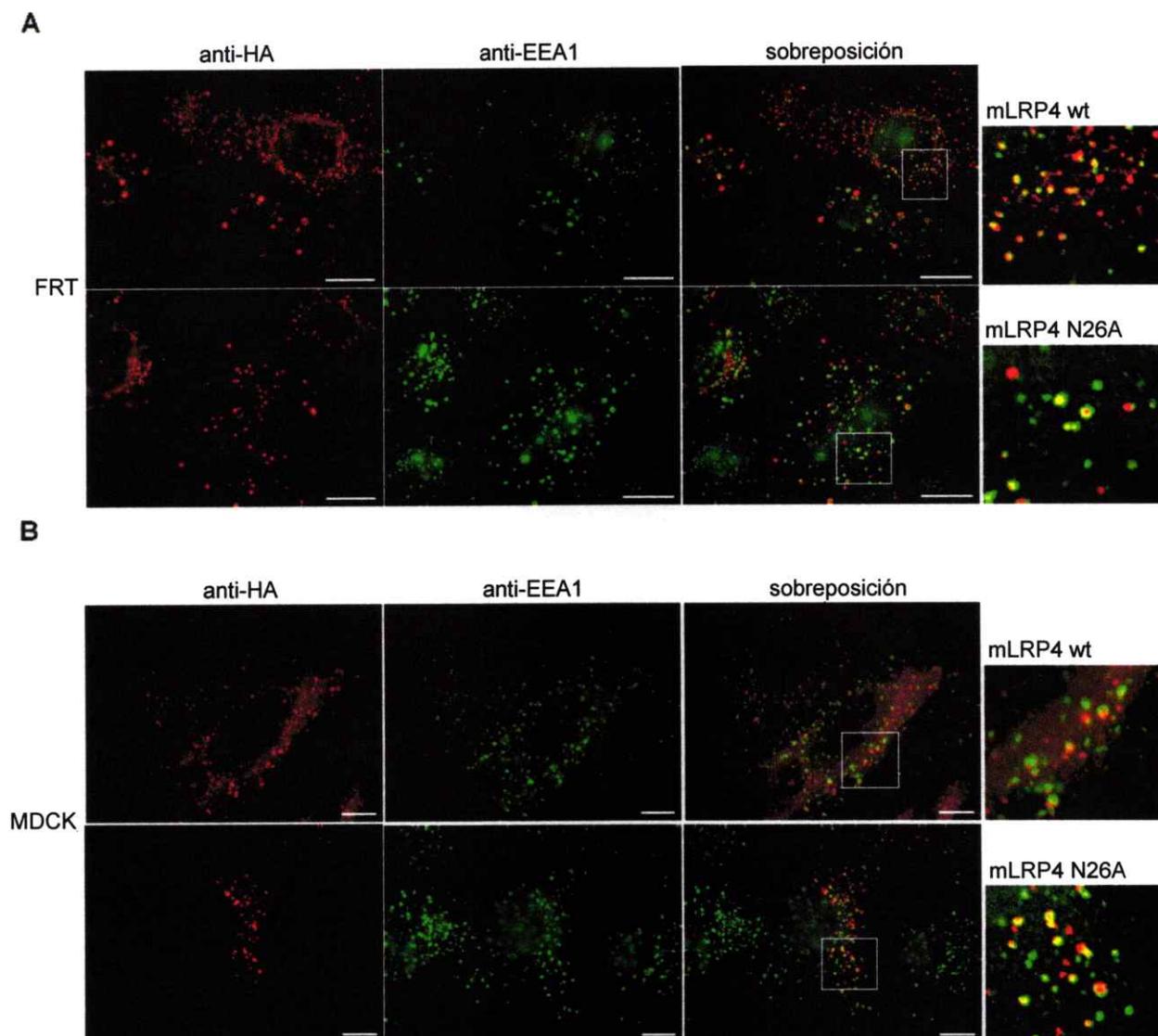


Figura 11. Colocalización de los minireceptores wt y N26A con el marcador de endosoma temprano EEA1 en células FRT y MDCK.

Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia muestran células permeabilizadas, incubadas con anticuerpo anti-HA policlonal 1:500 junto con el marcador endosomal temprano anti-EEA1 monoclonal 1:50. Se observa una parcial colocalización de los minireceptores con anti-EEA1 en ambos tipos celulares, siendo más notoria para el minireceptor N26A, donde se observan estructuras vesiculares de mayor tamaño. Se muestran con mayor aumento las estructuras endosomales, correspondientes a las regiones delimitadas en blanco. A. Células FRT. B. Células MDCK. Barra= 10 μ m.

1.3 Distribución intracelular de los minireceptores en neuronas de hipocampo

La distribución del minireceptor wt en células permeabilizadas resultó ser somatodendrítica, con vesículas restringidas exclusivamente a las dendritas y el soma de las células, a las cuales se les hizo una tinción de MAP2 endógeno como control de este dominio. No se observó la presencia de la proteína en el axón de la célula. Cuando se decidió observar cuál era la distribución que presentaba esta proteína a nivel de la superficie celular, se encontró que presentó la misma localización, es decir, el minireceptor llegó a la superficie de la célula en una manera restringida al dominio somatodendrítico. Vemos entonces que el comportamiento de distribución que posee este minireceptor es similar en los tipos celulares estudiados. El minireceptor mLRP4 N26A en células permeabilizadas resultó estar localizado en vesículas de gran tamaño al interior del soma y de algunas dendritas en las células. No se observó la presencia de marca en el axón. En células sin permeabilizar no se ve la presencia de la proteína en la superficie celular (datos no mostrados). Los resultados se muestran en la **Figura 12**.

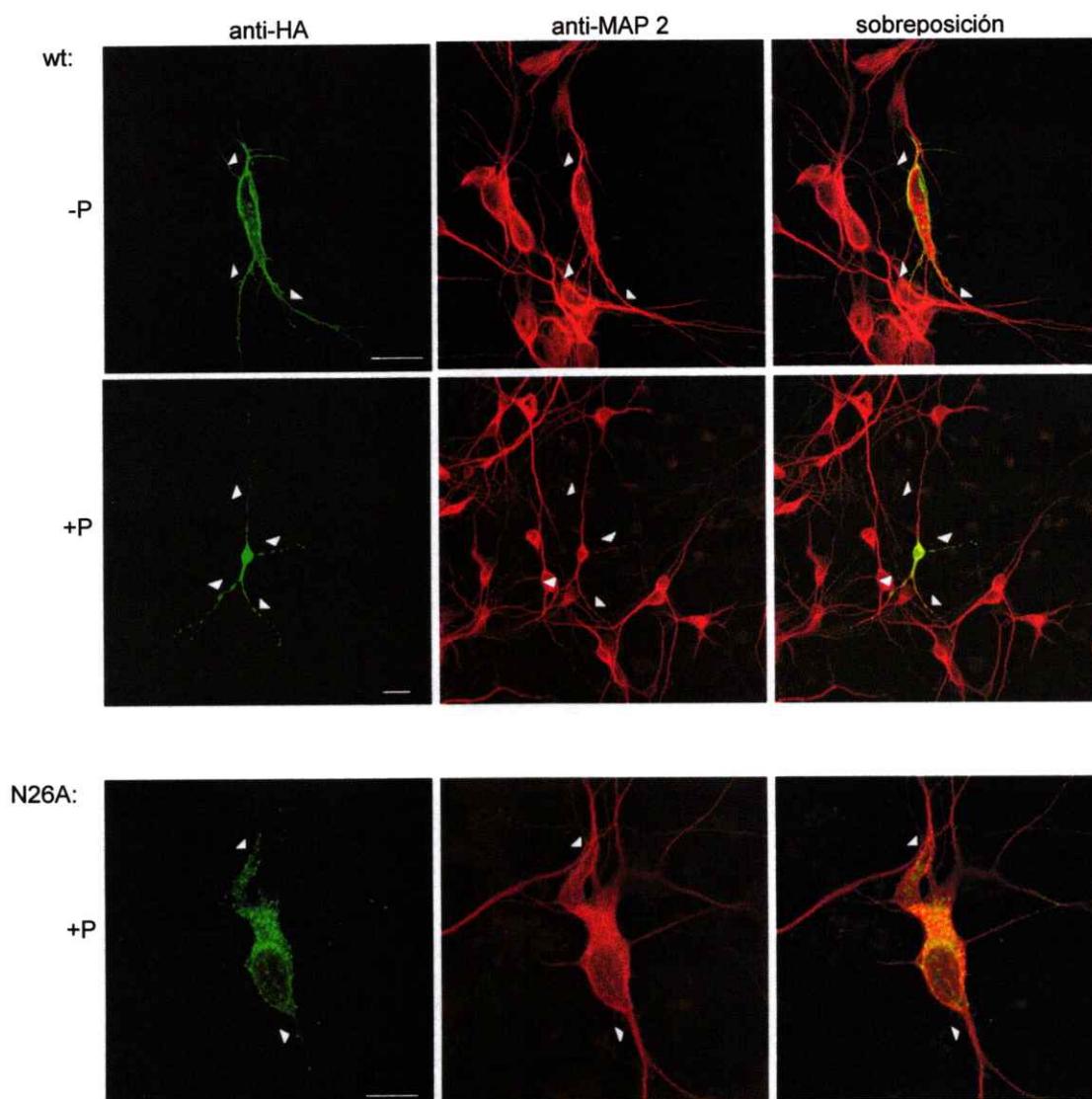


Figura 12. IF de neuronas de hipocampo transfectadas con los minireceptores de LRP wt y con la mutación N26A.

Imágenes de microscopía confocal. Se muestran células permeabilizadas (+P) y sin permeabilizar (-P), en las que se observa una distribución para el minireceptor wt tanto en el soma como en las dendritas (indicadas por puntas de flecha), mientras que para el minireceptor N26A se puede ver en mayor aumento una localización más bien vesicular dentro del soma. Las células fueron fijadas e incubadas con anticuerpo anti-HA policlonal 1:800 y anti-conejo Alexa 488 1:100. Anticuerpo monoclonal anti-MAP2 fue usado 1:100 y anti-ratón Alexa 568 1:100. Barras= 20 μ m.

Dado lo interesante que resultó la distribución del minireceptor N26A, y para descartar el hecho de una marca negativa en la superficie debido a una transfección negativa, se realizó un experimento más fino en el cual las células transfectadas con este minireceptor fueron incubadas con anticuerpo policlonal anti-HA por fuera de la célula, es decir, antes de permeabilizar, y con anticuerpo monoclonal anti-HA por dentro de la célula una vez que éstas fueron permeabilizadas. De esta manera ambas marcas pudieron ser visualizadas de manera conjunta para una misma célula. Se observó que aquellas que presentaron una importante marca intracelular, no presentaban tinción superficial. Como control se realizó lo anterior en conjunto con el minireceptor wt. Los resultados se muestran en la **Figura 13**.

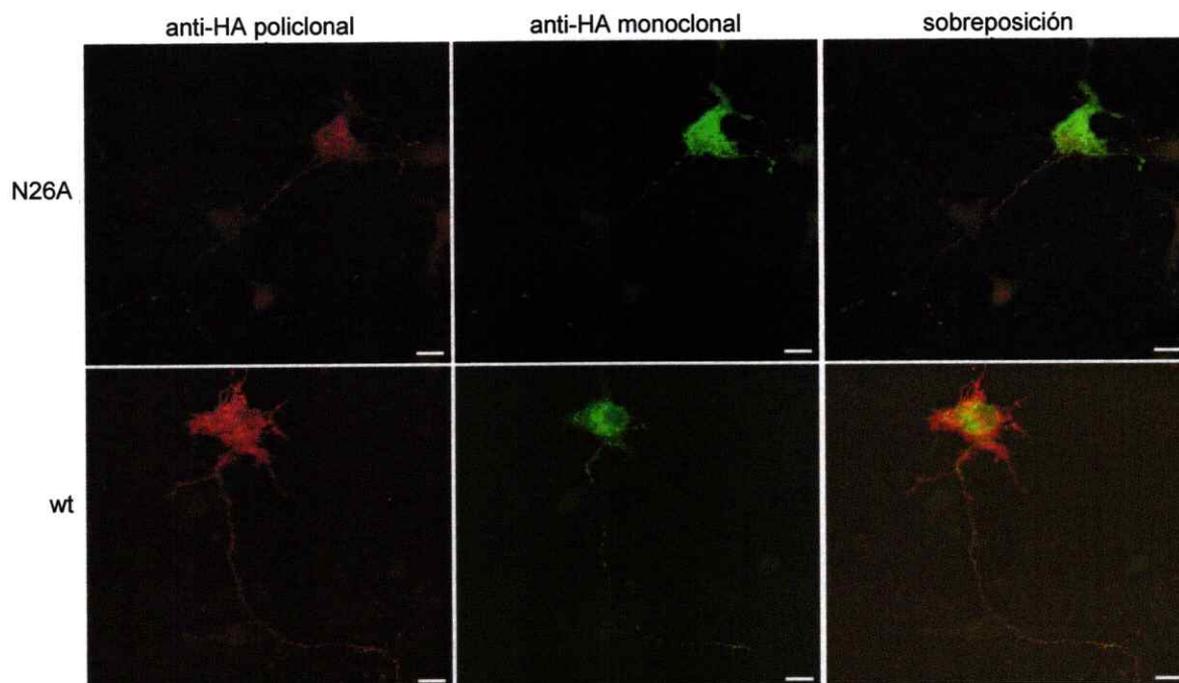


Figura 13. Distribución intracelular y superficial de los minireceptores de LRP wt y con la mutación N26A en neuronas de hipocampo.

Imágenes de microscopía confocal. IF que muestra en células sin permeabilizar (-P) incubadas con anti-HA policlonal y anti-conejo Alexa 594 una localización superficial para el minireceptor wt y casi nula presencia del minireceptor con la mutación en N26 en la superficie. Luego, estas mismas células fueron permeabilizadas (+P) e incubadas con anti-HA monoclonal y anti-ratón Alexa 488 para ver la marca intracelular. El resultado muestra que efectivamente ambas células están expresando los minireceptores transfectados. Barras= 10 μ m.

Al analizar la expresión del minireceptor Y29A en neuronas de hipocampo se observó que la distribución intracelular en células permeabilizadas resultó ser no polarizada, con una distribución tanto somatodendrítica como a lo largo del axón. Esto da cuenta de la importancia de este residuo de tirosina para un tráfico polarizado correcto de las vesículas que llevan el minireceptor en el interior de la célula neuronal. Estos datos además concuerdan con lo obtenido en células epiteliales, en las cuales este residuo de tirosina fue clave para la correcta localización basolateral de LRP. En cambio, en neuronas sin permeabilizar sorprendentemente se observó que la distribución de este minireceptor a nivel de la membrana plasmática resultó estar sólo en el tercio distal del axón y concentrada en el cono de crecimiento. Este hecho muestra la importancia de este residuo de tirosina en el fenotipo de distribución somatodendrítica de LRP. En la **Figura 14** se muestran las IF de células transfectadas con el minireceptor Y29A en condiciones sin y con permeabilización.

mLRP4 Y29A:

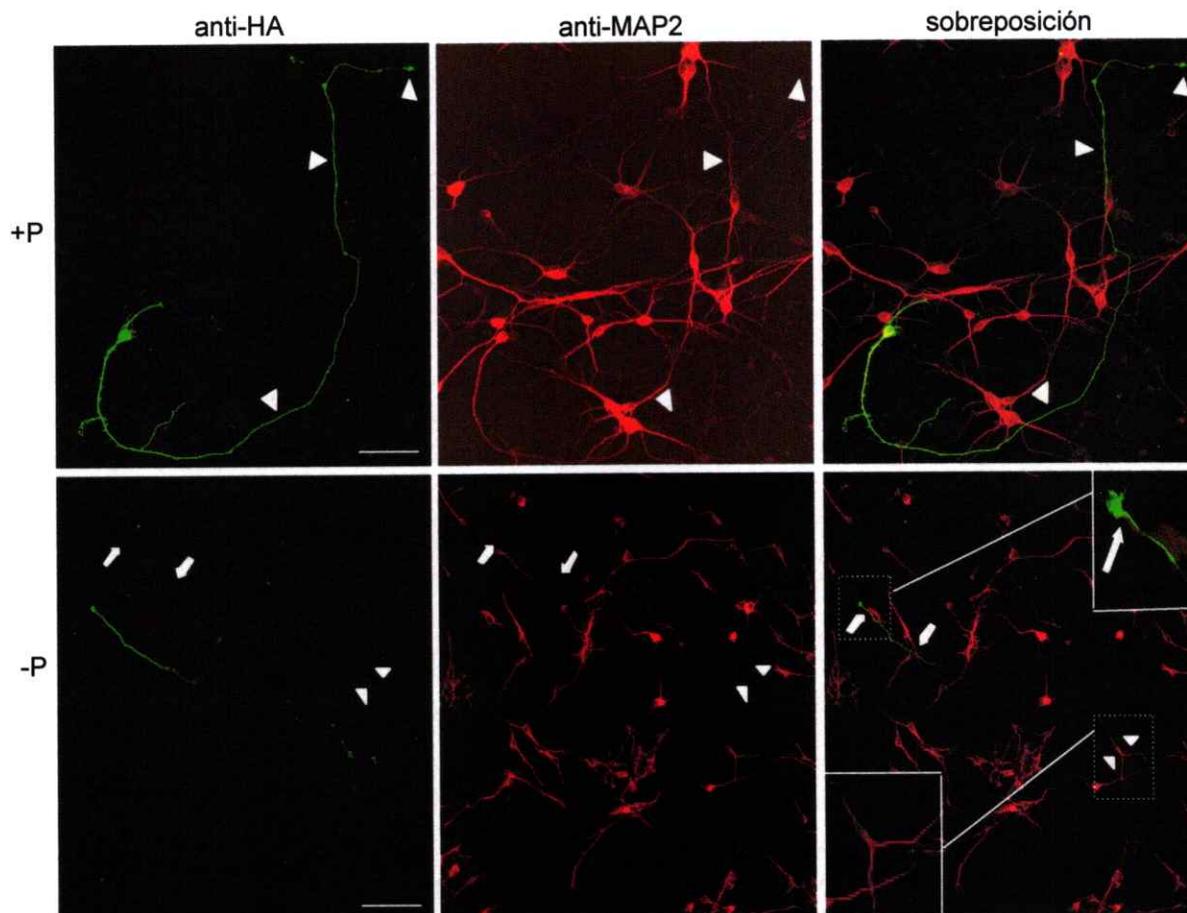


Figura 14. Expresión del minireceptor Y29A en neuronas de hipocampo.

Se observa la distribución intracelular no polarizada del minireceptor en células permeabilizadas, con una distribución tanto somatodendrítica como a lo largo del axón. En células sin permeabilizar se observó la distribución superficial del minireceptor, la cual resultó interesantemente estar sólo en el tercio distal del axón y concentrada en el cono de crecimiento. Se muestra en los insertos un aumento del soma y del cono de crecimiento. Barras= 100 μ m.

Para el caso de la expresión del minireceptor Y63A en neuronas de hipocampo, éste presentó una localización no polarizada, tanto a nivel intracelular como de la superficie celular, donde se observa la presencia del minireceptor en el soma, dendritas y axón en células permeabilizadas y no permeabilizadas. Por tanto, se puede decir que el residuo aminoacídico Y63 también es relevante para la localización correcta y somatodendrítica del LRP. Sin embargo, la importancia de este aminoácido en la información de distribución en el dominio somatodendrítico es menor a la de la tirosina 29, ya que con la mutación en la tirosina 63 el cambio de localización de LRP fue menos drástico. Otro minireceptor que se estudió fue el que contenía el motivo dileucina distal mutado. Este minireceptor LL86,87AA también resultó estar distribuido a lo largo de toda la célula, es decir, en una manera no polarizada, tanto a nivel intracelular como de superficie. Esto indica que este motivo de dileucinas también contribuye en la correcta localización polarizada de LRP. Los resultados anteriores sugieren la existencia de una compleja señal de destinación somatodendrítica presente en la región distal del dominio citosólico del LRP. En la **Figura 15** se muestran los resultados de IF correspondientes a los minireceptores conteniendo las mutaciones que afectan los motivos distales de la cola citosólica del LRP.

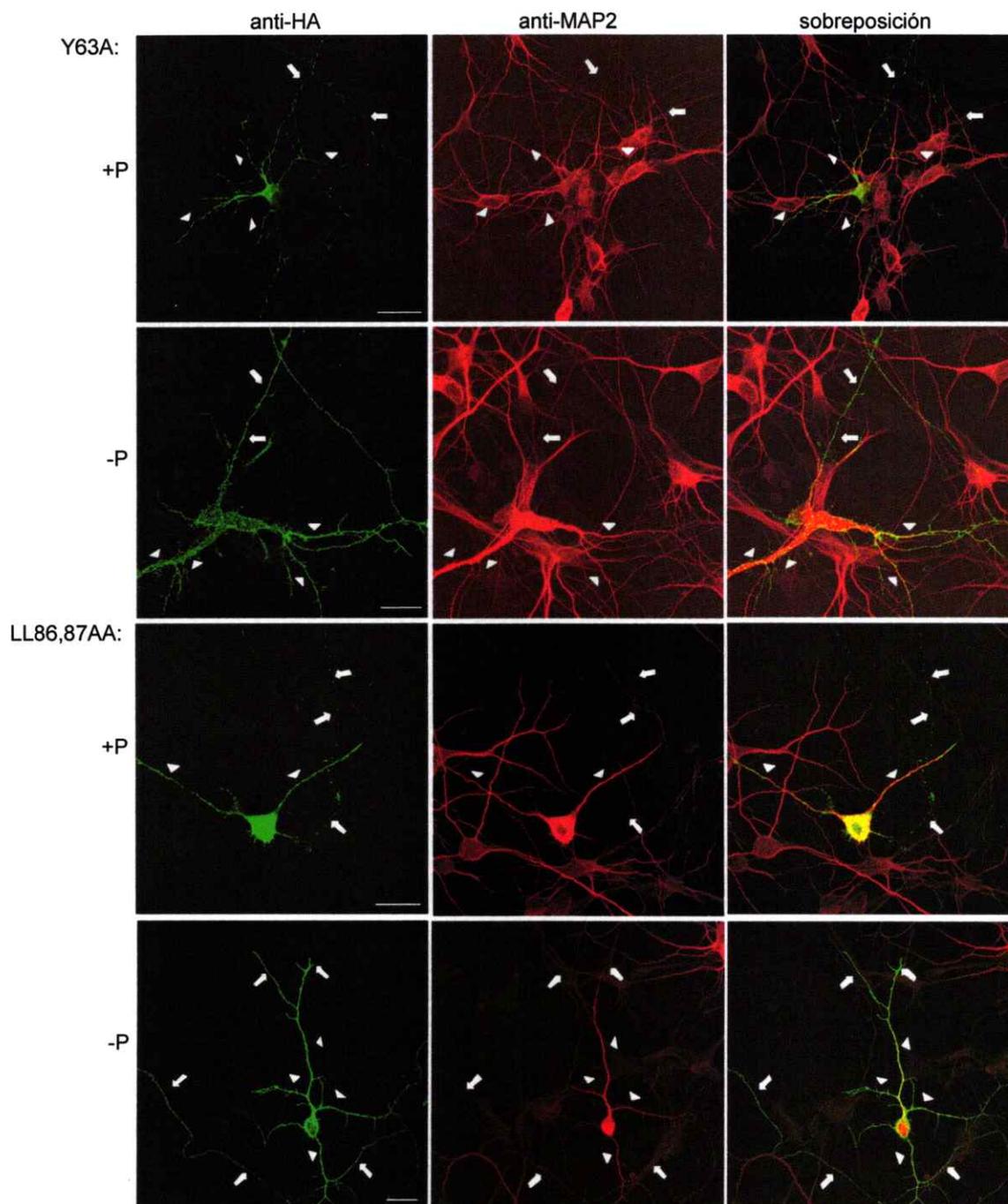


Figura 15. Expresión de los minireceptores Y63A y LL86,87AA en neuronas de hipocampo.

Ambos minireceptores presentaron una localización no polarizada, tanto de manera intracelular como a nivel de superficie, lo cual se pudo observar en células permeabilizadas (+P) y no permeabilizadas (-P), respectivamente. Se distinguen las dendritas (indicadas por cabezas de flecha) y el (los) axones (indicados por flechas). Barras= 20 μ m.

Con el fin de resumir los resultados obtenidos anteriormente, a continuación se muestra en la **Tabla 3** los motivos aminoacídicos, con sus respectivas mutaciones puntuales, y el fenotipo encontrado correspondiente a los tres tipos celulares estudiados: células MDCK, FRT y neuronas de hipocampo.

Tabla 3: Resumen de la localización del minireceptor para las distintas mutaciones puntuales en los motivos aminoacídicos presentes en la cola citosólica del LRP.

| Motivos de la mitad proximal | A ₂₆ PXY | NPxA ₂₉ | A ₃₈ A ₃₉ | A ₄₃ A ₄₄ |
|--|---------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| N ₂₆ PTY ₂₉D ₃₈ D ₃₉ ...L ₄₃ L ₄₄ | Intracelular | Apical/axonal | Basolateral | Basolateral |

| Motivos de la mitad distal | A ₆₀ PXY | A ₆₃ XXφ | YXXA ₆₆ | SRHA ₇₆ LAS |
|--|---------------------|---------------------|--------------------|------------------------|
| N ₆₀ PVY ₆₃ ATL ₆₆SRHS ₇₆ LASL ₈₆ L ₈₇E ₉₂ DE..... | Basolateral | No polarizado | No polarizado | Basolateral |

| A ₈₆ A ₈₇ | A ₆₃ XXφ/A ₈₆ A ₈₇ |
|---------------------------------|---|
| No polarizado | No polarizado |

1.4 Estudio de la participación del primer motivo NPxY en la destinación del LRP

Debido al fenotipo de distribución distinto que presentaron los minireceptores con las mutaciones en la asparragina 26 y tirosina 29 presentes en el primer motivo NPxY, se quiso determinar en qué etapa del tráfico intracelular del LRP estos aminoácidos estarían siendo reconocidos y cumplirían un papel. Para esto se utilizó la técnica de microinyección, la cual permite sincronizar la salida de las proteínas en tráfico, en este caso de cada minireceptor desde TGN, previa acumulación a 20°C. Además se utilizó y microinyectó el DNA de una forma dominante negativa de la proteína accesoria de la endocitosis Eps15 (Eps15-GFP-E Δ 95/295), la cual se ha visto que inhibe la endocitosis mediada por clatrina (Benmerah y cols., 1999). Por lo tanto, al expresar ambas proteínas se determinó, de manera indirecta, hacia cuál dominio de la membrana plasmática llega primero un determinado minireceptor en su tráfico desde su salida de TGN hacia la superficie celular, donde será posible pesquisar al minireceptor pues no podrá ser endocitado. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 16**.

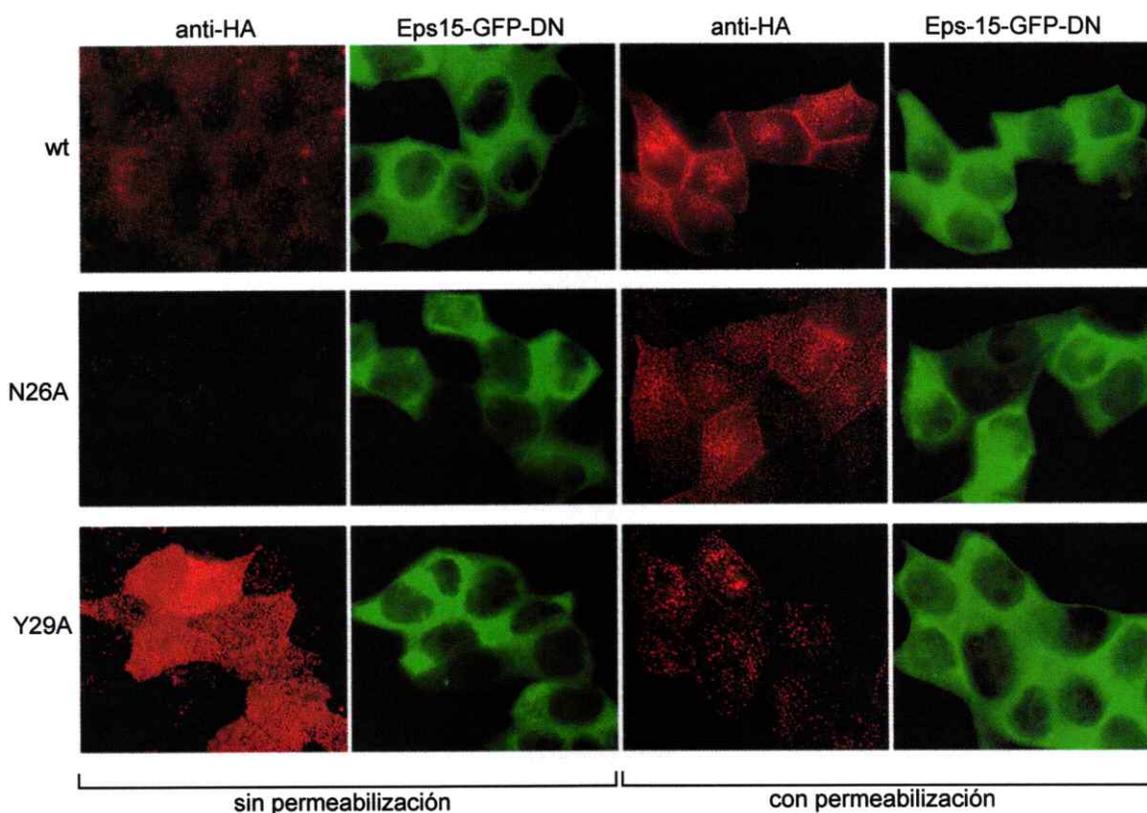


Figura 16. Microinyección de los minireceptores wt, N26A y Y29A en células MDCK.

Células MDCK fueron microinyectadas con los distintos minireceptores junto con una forma dominante negativa (DN) de Eps15 que tiene GFP. Después de 1 h de síntesis, las células fueron incubadas a 20°C por 2 h, en presencia de cicloheximida, y se permitió la salida de las proteínas desde TGN hacia la superficie celular por 3 h. En células sin permeabilizar sólo se observa marca apical para el mLRP4 Y29A, mientras que en células permeabilizadas los minireceptores wt y N26A alcanzaron la superficie basolateral.

Se observa en las IF que el minireceptor wt se encuentra localizado en la membrana basolateral, sugiriendo que este minireceptor fue destinado desde su salida de TGN directamente hacia el dominio basolateral. Estos resultados concuerdan con lo descrito mediante un experimento de pulso y caza y posterior biotilación selectiva, que da cuenta de la llegada directa del minireceptor wt en forma predominante hacia el dominio basolateral (Marzolo y cols., 2003).

Fue interesante el resultado para el minireceptor N26A, el cual en el estado estacionario se observó principalmente intracelular, esta vez se logró encontrar en la superficie basolateral, sugiriendo que este minireceptor una vez que sale desde TGN se destina directamente hacia el dominio basolateral y desde allí se endocita y queda retenido en estructuras endosomales. Lo anterior permitió descartar la alternativa de que este minireceptor llegue a los endosomas directamente desde TGN sin haber pasado por la superficie celular, pero no descarta que pudiera pasar por el compartimiento endosomal, en ruta a la membrana plasmática.

Finalmente, para el minireceptor Y29A, el cual contiene la información relevante de destinación basolateral, esta vez también fue localizado predominantemente en el dominio apical, sugiriendo que la destinación del minireceptor con la tirosina 29 mutada es directa desde TGN hacia la membrana apical, descartándose que ocurra una transcitosis, es decir, una llegada primero hacia la superficie basolateral y desde allí una destinación hacia la membrana apical, dado que con Eps 15 DN no se acumuló marca basolateral.

2. Estudio de la maquinaria intracelular en la segregación y destinación de LRP

2.1 Posible papel de SNX17

Sorting Nexin 17 (SNX17) es una proteína que ha sido recientemente descrita y que pertenece a la familia de las *Sorting Nexins*. Estas proteínas se caracterizan por poseer un dominio de homología al dominio phox, el cual le confiere la propiedad de unión a fosfolípidos presentes en las membranas celulares. Se ha descrito que SNX17 juega un papel en el tráfico intracelular del receptor de LDL y recientemente se ha sugerido que esta función estaría siendo realizada a través de la interacción con el motivo NPxY presente en la cola citoplasmática de este receptor (van Kerkhof y cols., 2005). Por otro lado, se tienen antecedentes donde se muestra que SNX17 interactúa con el motivo NPxY proximal presente en el dominio citosólico de LRP y que su función se ha visto involucrada en la modulación de la disponibilidad de LRP en la superficie celular, sugiriendo que esta proteína podría ser un importante componente de la maquinaria de segregación para el tráfico intracelular y/o reciclaje de LRP en células no polarizadas (van Kerkhof y cols., 2005). Por lo tanto, se decidió estudiar la participación que podría tener SNX17 en el tráfico intracelular de LRP en células polarizadas mediante el uso de los minireceptores con las distintas mutaciones puntuales en su cola citosólica.

En primer lugar, se determinó la presencia de SNX17 endógena en los tipos celulares en estudio. En la **Figura 17** se muestra el resultado del WB donde se observó que esta proteína efectivamente se expresa en células FRT y en células de cultivo primario de neuronas de hipocampo, aunque en baja concentración, mientras que en células MDCK la expresión de SNX17 endógena fue mayor.

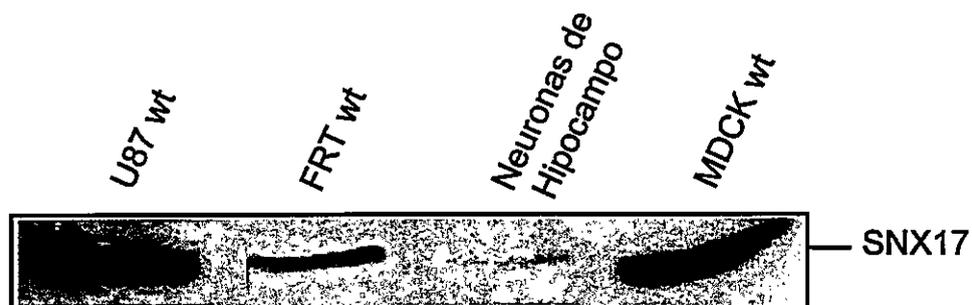


Figura 17. Expresión de SNX17 endógena en células polarizadas.

WB de extractos totales de células U87 wt (control positivo), FRT wt, neuronas de hipocampo y MDCK wt incubados con anticuerpo anti-SNX17. Las muestras fueron incubadas con anticuerpo policlonal anti-SNX17 1:3.000 toda la noche a 4°C. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-conejo HRP 1:10.000 por 2 h a temperatura ambiente.

Para un mayor estudio del papel funcional que podría tener SNX17 en el tráfico intracelular de LRP se juntaron los siguientes antecedentes: resultados obtenidos por el Laboratorio del Dr. Bu en EE.UU. determinaron que SNX17 interactúa con el primer motivo NPxY, específicamente con los aminoácidos isoleucina, asparragina, tirosina, puesto que al ser éstos cambiados por una alanina se pierde la interacción existentes entre ambas proteínas, como se observa mediante el ensayo de *pull down* que se muestra en la **Figura 18**.

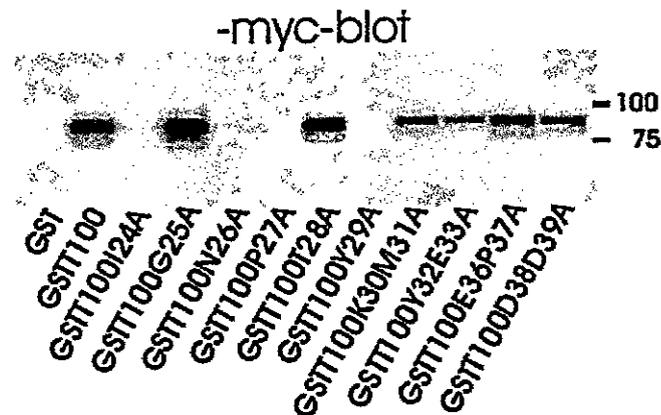


Figura 18. El motivo NPxY proximal de LRP es requerido para la interacción con SNX17.

Proteínas de fusión con GST de las colas citoplasmáticas de LRP wt (GST T100) o sustituciones por alanina de uno o dos residuos en la cola citoplasmática de LRP fueron incubadas con los lisados celulares de células HEK 293 transfectadas con myc-SNX17. Luego se realizó un WB utilizando anticuerpo anti-myc para la detección de las proteínas unidas. Como control negativo se utilizó GST solo. Se muestran los tamaños moleculares relativos (Figura 2D: Peter van Kerkhof, Jiyeon Lee, Lynn McCormick, Elena Tetrault, Wenyan Lu, Marissa Schoenfish, Viola Oorschot, Ger Strous, Judith Klumperman and Guojun Bu. 2005. Sorting nexin 17 facilitates LRP recycling in the early endosome. *EMBO J.*, en prensa).

Además, anteriormente se observó que el minireceptor con la mutación en la asparragina 26 mostraba una preferente distribución intracelular en forma de vesículas y que era poco probable de encontrarlo en la superficie de la célula. Por lo tanto, se decidió analizar si tanto el minireceptor N26A como SNX17 eran capaces de colocalizar en el mismo compartimiento vesicular.

La **Figura 19** muestra el resultado de una IF en la cual se realizó una transfección transiente de myc-SNX17 en la línea MDCK establemente transfectada con el minireceptor N26A. Se observa que existe una casi total colocalización de ambas proteínas, indicando que efectivamente éstas se encuentran localizadas en el mismo tipo de compartimiento intracelular.

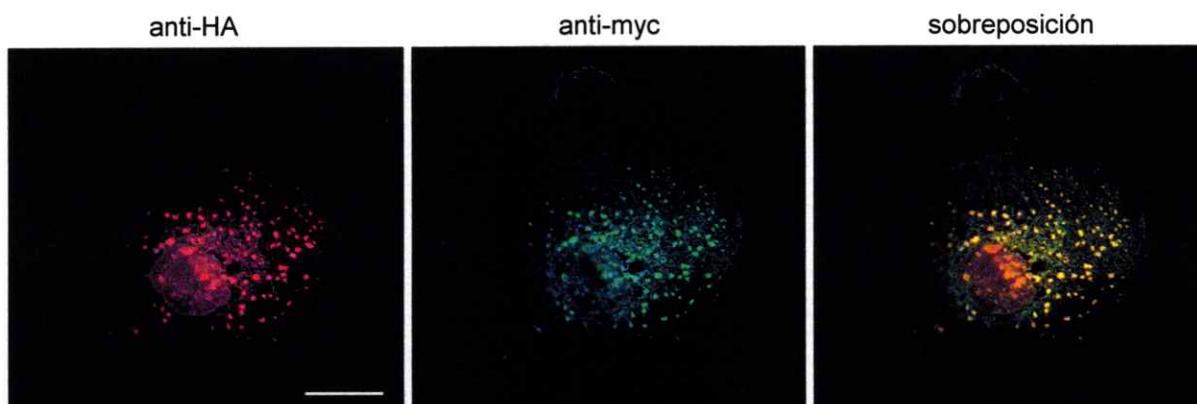


Figura 19. Colocalización del minireceptor N26A y myc-SNX17.

IF de una transfección transiente de myc-SNX17 sobre un clon estable de células MDCK expresando el minireceptor N26A. Se observa una casi completa colocalización de ambas proteínas. Se utilizó anticuerpo anti-HA policlonal 1:500 y anti-myc monoclonal 1:50. Barra= 10 μ m.

2.2 Posible papel de μ -1B

Estudios recientes publicados por el laboratorio muestran que el complejo adaptador AP-1B participa en la localización polarizada de LRP, sugiriendo que, al menos señales basadas en tirosina podrían ser relevantes en la localización del receptor (Marzolo y cols., 2003). Por lo tanto, se decidió investigar si existía una interacción entre el receptor y la subunidad μ -1B, que forma parte del complejo AP-1B. En la **Figura 20** se muestra el resultado de un experimento de co-inmunoprecipitación, en el cual se inmunoprecipitó el receptor con anti-LRP en células MDCK establemente transfectadas con el minireceptor wt y luego se reveló contra HA para ver si la subunidad μ -1B había inmunoprecipitado junto con el receptor.

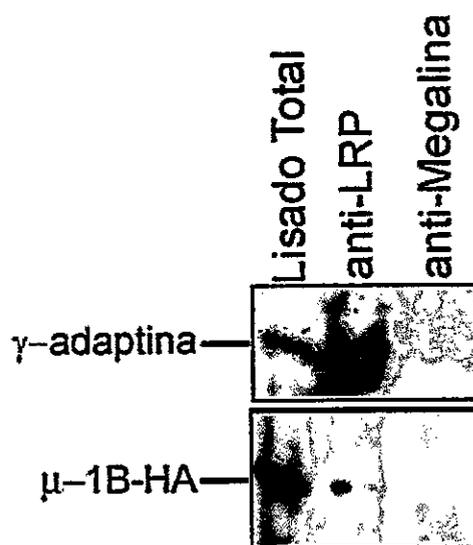


Figura 20. Coimmunoprecipitación de μ -1B-HA y γ -adaptina junto con el minireceptor wt.

Lisado de células MDCK wt transientemente transfectadas con μ -1B-HA fue incubado con anticuerpo anti-LRP policlonal. Luego se realizó un WB utilizando anticuerpo anti-HA monoclonal (Babco) 1:500 y anti- γ -adaptina monoclonal 1:150 para verificar la interacción entre el minireceptor y el complejo adaptador AP-1B. Se utilizó un anticuerpo no relacionado dirigido contra la cola de Megalina como control negativo de la interacción.

Se observa que efectivamente ambas proteínas se encontraban interactuando entre sí. Además fue posible distinguir la presencia de γ -adaptina que cae junto con μ -1B y el receptor lo cual indica que la interacción se está efectuando en conjunto con el complejo AP-1B completo y no con la subunidad μ -1B que pudiera estar en forma libre dentro de la célula.

7.- Papel de PKD

Otra proteína de la maquinaria intracelular que ha sido descrita es la Proteína Quinasa D (PKD) la cual participa en el tráfico desde TGN hacia la membrana plasmática. Recientemente se ha descrito que PKD tiene una función en la destinación directa de proteínas de membrana desde TGN hacia la membrana basolateral en células MDCK (Yeaman y cols., 2004). Por lo tanto se estudió la participación de PKD isoforma 1 en la destinación del minireceptor de LRP en células MDCK y en neuronas de hipocampo. Para ello, en ambos tipos celulares se realizó una transfección transiente de una mutante *kinase dead* dominante negativa (DN) de la Proteína Quinasa D 1 (PKD) que específicamente bloquea la yemación de vesículas secretorias desde el TGN y no afecta otras vías de transporte.

En células MDCK se realizó la transfección transiente de PKD 1 DN sobre aquellas células que expresan establemente el minireceptor wt, las que fueron fijadas a distintos tiempos posterior a la transfección: 24, 36 y 48 h. La expresión de PKD 1 DN afectó la distribución normal de las vesículas intracelulares que contienen al minireceptor, encontrándolas con una mayor concentración en la región perinuclear, en comparación con la distribución más homogénea de las vesículas en las células negativas para PKD y que sólo expresan el minireceptor. Los resultados de la IF 36 h posterior a la transfección se muestran en la **Figura 21**, donde este efecto fue mayor en comparación con 24 y 48 h posterior a la transfección (resultados no mostrados).



Figura 21. Transfección transiente de PKD 1 DN en células MDCK expresando establemente el minireceptor wt.

IF realizada 36 h posterior a la transfección de PKD isoforma 1 dominante negativo sobre células MDCK expresando el minireceptor wt. Se utilizaron los anticuerpos anti-HA monoclonal 1:30 y anti-ratón Alexa 488 1:500, anti-GST policlonal 1:1.000 (para ver PKD 1 DN) y anti-conejo Alexa 594 1:1.000. Se observa una distribución de vesículas HA positivas concentradas en la zona de TGN en las células positivas para PKD 1 DN, en comparación con la distribución que presentó el minireceptor en células que no se transfectaron con PKD 1 DN. Barras= 10 μ m.

Por otro lado se evaluó el efecto de PKD 1 DN sobre el LRP en neuronas de hipocampo. Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Alfredo Cáceres, Instituto Mercedes y Martín Ferreyra, en el marco de un trabajo en cooperación. Los resultados de IF muestran sorprendentemente que la expresión de la forma dominante negativa de PKD causó una despolarización de la distribución del minireceptor wt en células permeabilizadas, el cual se encontraba restringido en el dominio somatodendrítico, mientras que esta vez fue encontrado tanto en el soma, dendritas y en el axón. El resultado obtenido se muestra en la **Figura 22**.

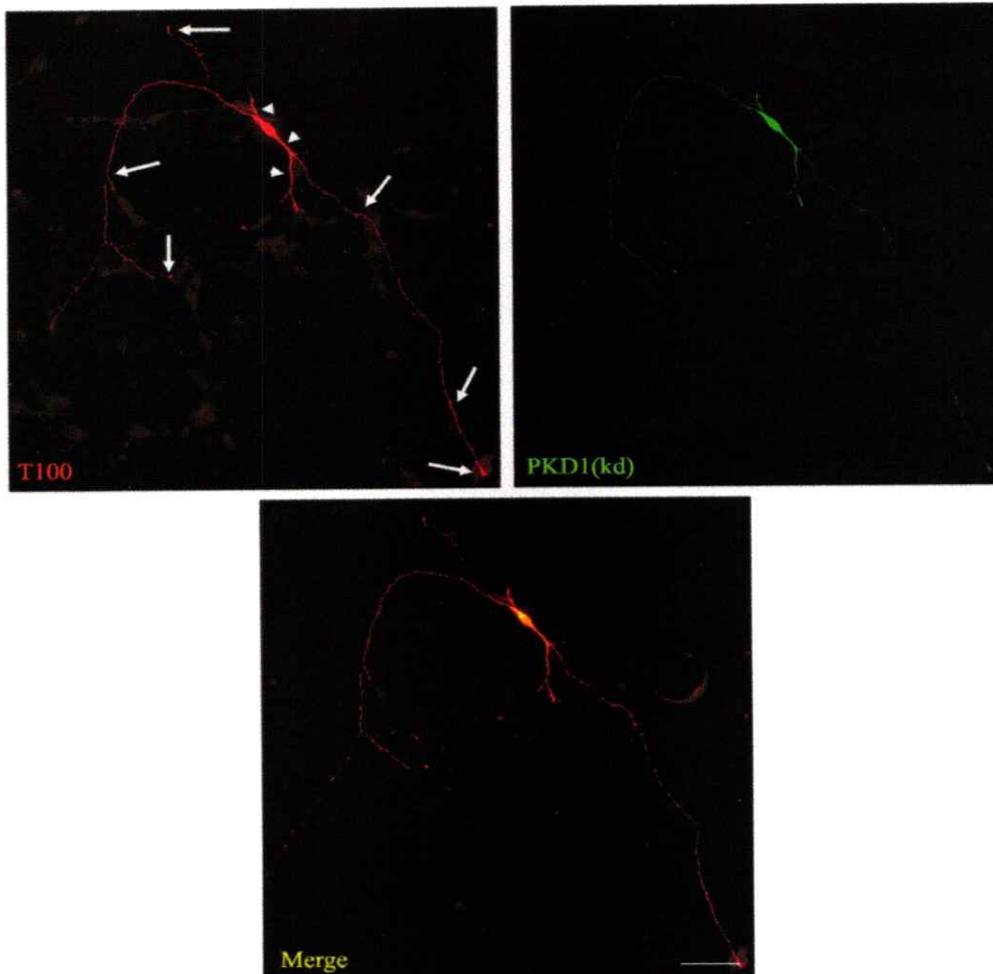


Figura 22. Transfección del minireceptor wt junto con PKD 1 dominante negativo en neuronas de hipocampo.

Se observa en células permeabilizadas que el minireceptor wt, al ser expresado junto con la forma dominante negativa de PKD 1 pierde la polaridad que había sido observada (ver figura 13) dejando de estar exclusivamente localizada en el dominio somatodendrítico, y siendo encontrada esta vez tanto en el soma y dendritas (puntas de flecha) como en el dominio axonal (notar que esta neurona presenta dos axones, indicados por flechas). Merge: superposición. Barra= 50 μm .

Esto sugiere que PKD podría ser un importante componente de la maquinaria de segregación de LRP en neuronas de hipocampo. Esto resulta de gran relevancia dado que es la primera evidencia del papel que puede tener PKD en este tipo celular y por otro lado contribuye a la dilucidación de los componentes de la maquinaria intracelular que estaría participando en neuronas, de la cual se conoce poco.

DISCUSIÓN

En este trabajo de memoria de título se han estudiado los determinantes celulares y moleculares de destinación de LRP a la superficie basolateral y somatodendrítica en tres tipos celulares con fenotipo polarizado: células epiteliales MDCK y FRT, y neuronas de hipocampo. Estas células tienen la particularidad de poseer su membrana plasmática regionalizada en dominios apical/axonal y basolateral/somatodendrítico, los cuales poseen una composición de proteínas y lípidos distinta (Cereijido y cols., 1978; Baas y cols., 1988; Rodríguez-Boulán y Nelson, 1989; Simons y Wandinger-Ness, 1990; Rodríguez-Boulán y Powell, 1992).

La hipótesis general de estudio de esta tesis es que en el dominio citoplasmático de LRP existen señales que determinan su tráfico intracelular y finalmente su distribución basolateral o somatodendrítica. Para proteínas de transmembrana es conocido que un motivo citosólico de vuelta β tipo I actúa como señal de destinación basolateral, que consisten en motivos basados en tirosina (Hunziker y col, 1991), leucina (Wehrle-Haller y Imhof, 2001) o dileucinas (Hunziker y Fumey, 1994), los que a menudo se encuentran cercanos a un grupo de aminoácidos acídicos. Para proteínas apicales se han postulado como señales de destinación la N-glicosilación (Scheiffele y cols., 1995), O-glicosilación (Yeaman y cols., 1997), el tallo GPI (Rodríguez-Boulán y Pendergast, 1988) y dominios de transmembrana que median la incorporación de las proteínas a balsas enriquecidas en colesterol y glicosfingolípidos (van Meer y Simons, 1988). Sin embargo, en recientes resultados publicados por nuestro laboratorio (Marzolo y cols., 2003) se encontró que la

distribución apical de Megalina no depende de su región transmembrana, la cual tiene propiedades de asociación a balsas enriquecidas en colesterol y glicoesfingolípidos, sino que la información de distribución apical se encuentra contenida en su dominio citosólico, siendo éste el primer caso descrito para una proteína apical.

En este trabajo se utilizó el receptor de la familia de receptores de lipoproteínas, LRP como modelo de estudio, puesto que en su dominio citoplasmático posee varios motivos consenso de señales basolaterales. Debido su gran tamaño (600 kDa), se diseñó una estrategia de estudio en la que se utilizó un minireceptor derivado del LRP para facilitar su manipulación a nivel de cDNA y de transfección celular. Este minireceptor constituyó una buena herramienta de estudio dado que su localización en células MDCK establemente transfectadas y su tráfico biosintético resultó ser similar al de la proteína endógena.

LRP se encuentra en la superficie sinusoidal del hepatocito, donde media la captación de remanentes de quilomicrones (Kenneth y cols., 2001), tPA (Biessen y cols., 1997), α_2 -macroglobulina (Sottrup-Jensen, 1989) y ApoE (Beisiegel y cols., 1989) entre otros. Encontramos que su localización es basolateral en células epiteliales MDCK y FRT. Datos publicados por nuestro grupo mostraron que, en la biosíntesis del LRP, éste se destina en forma directa desde TGN hacia el polo basolateral y una vez en la superficie es endocitado rápidamente para posteriormente volver a la membrana plasmática (Marzolo y cols., 2003). Además, la información de destinación basolateral se encuentra contenida en el dominio citoplasmático de LRP (Marzolo y cols., 2003). En neuronas, LRP se expresa en el dominio somatodendrítico (Brown y cols., 1997). Un objetivo de esta tesis fue determinar específicamente cuál de los posibles motivos aminoacídicos con putativa información de destinación basolateral, es el activo o dominante en la localización polarizada del LRP en células epiteliales y de tipo

neuronal. Otro aspecto de estudio en esta tesis, se dirigió a determinar la maquinaria intracelular de reconocimiento de la(s) señal(es) basolateral/somatodendrítica, y la de regulación del tráfico en ambos tipos celulares.

Los resultados obtenidos mediante las distintas técnicas utilizadas y en los distintos tipos celulares muestran que el residuo de tirosina en posición 29 dentro del dominio citosólico de 100 aminoácidos y presente en el primer motivo NPXY, resultó ser crítico para la localización basolateral de LRP, lo que es de gran relevancia ya que se logró identificar que la información basolateral dominante está determinada por un sólo residuo aminoacídico. La mutante en la asparragina de este motivo NPXY resultó tener una distribución intracelular, es decir, distinta a la distribución apical que presentó la mutante en la tirosina. Este resultado, fue validado además por el hecho que ambas mutaciones tuvieron el mismo efecto drástico en dos tipos de células polarizadas, neuronas y epiteliales, lo que sugiere la existencia de una maquinaria similar en el reconocimiento de señales en ambos tipos celulares como se ha descrito en el modelo de destinación apical/axonal (Dotti y Simons, 1990). La discrepancia del efecto de la mutación del NPXY, en N/A (intracelular) o en Y/A (apical/axonal), permite sugerir un modelo de señal de destinación basolateral/somatodendrítica en el que la tirosina se encontraría dentro de otro contexto, distinto al NPXY, posiblemente actuando en conjunto con un par de aminoácidos aspárticos que se encuentran distalmente en la secuencia, en las posiciones 38 y 39 del dominio citosólico de LRP. El efecto de los aminoácidos cargados negativamente en las señales basolaterales basadas en tirosina ha sido previamente descrito para la señales de otro receptor de la familia, el receptor de LDL (LDL-R) (Matter y cols., 1994). En la señal del LDL-R, tanto la señal de destinación basolateral débil (proximal), y que se manifiesta sólo en el receptor

(Jareb y Banker, 1998) lo cual hace a nuestro resultado aun más interesante. El minireceptor wt en neuronas permeabilizadas sólo fue encontrado en el dominio somatodendrítico, es decir, las vesículas que transportan al LRP son destinadas exclusivamente a este dominio, y son excluidas de transitar por el axón, así como también ocurre para el receptor de transferrina (Cameron y cols., 1991). Dado que las dendritas contienen microtúbulos con ambas orientaciones de polaridad, mientras que los microtúbulos axonales tienen una orientación uniforme de la polaridad con sus extremos (+) hacia el terminal del axón (Baas y cols., 1998), existe un modelo que propone que las vesículas que contienen proteínas, ya sea, dendríticas o axonales, se asocian exclusivamente a proteínas motoras dirigidas hacia el extremo (-) o (+) respectivamente. Esto podría explicar la restringida localización de LRP en el dominio somatodendrítico. Es así como se ha descrito la presencia de complejos adaptadores que enlazan las señales de segregación, contenidas en la proteína carga, a proteínas motoras específicas asociadas a los microtúbulos correspondientes, como se ha descrito para el receptor de manosa-6-fosfato y la proteína motora KIF13A (Nakagawa y cols., 2000).

Para el caso del minireceptor con la mutación en la tirosina 29, por los resultados de IF en neuronas sin permeabilizar, es claro que sólo ocurrieron eventos de fusión de vesículas en el extremo distal del axón. Sin embargo, dada su distribución intracelular no polarizada, no está claro si el minireceptor podría haber llegado a la superficie somatodendrítica, insertarse en la membrana plasmática y desde allí ser endocitada para luego dirigirse al axón y fusionarse (fusión selectiva), o bien si ocurrió una segregación directa de las vesículas desde TGN hacia el axón (destinación selectiva).

Dado que, para la función del LRP en neuronas, y posiblemente en epitelios, su localización es relevante y que el efecto de esta mutación podría hacer a un receptor no funcional, se podría suponer que sería poco probable o inviable encontrar mutantes naturales del LRP en el residuo de tirosina 29, a diferencia de las mutantes en el LDL-R asociadas a la hipercolesterolemia familiar (Koivisto y cols., 2001). De hecho el animal *knock out* para LRP es letal, y si las mutaciones en el primer motivo NPxY, en la asparragina o la tirosina, hacen al receptor predominantemente intracelular o apical respectivamente, esto sería prácticamente equivalente a la ausencia funcional del receptor, aunque sólo en células con fenotipo polarizado.

Dado que se encontró que los residuos de asparragina y tirosina del primer motivo NPxY fueron relevantes para la localización basolateral de LRP, surgió la interrogante de dilucidar la etapa del tráfico intracelular del receptor en la cual estos aminoácidos participan. Para cumplir este objetivo, los experimentos de microinyección constituyeron una valiosa herramienta metodológica, puesto que los resultados obtenidos a través de estos ensayos muestran la localización del receptor en un determinado tiempo y de manera sincronizada en las células microinyectadas, desde su salida de TGN previa acumulación en Golgi. Además, la utilización de una forma dominante negativa (DN) de Eps 15, que inhibe la endocitosis mediada por clatrina (Benmerah y cols., 1999) contribuyó a la retención de los minireceptores en la membrana plasmática una vez que fueron capaces de alcanzar la superficie. La distribución apical obtenida mediante los experimentos de microinyección de la mutante en la tirosina 29 sugiere fuertemente que este aminoácido podría estar participando dentro de una señal que determina la salida directa de LRP desde TGN hacia la superficie basolateral. Por otro lado, la distribución intracelular y basolateral que se logró observar con la mutante en la asparragina 26 sugiere que este

aminoácido podría participar en la segregación basolateral de LRP a nivel de compartimentos de reciclaje, dado que, como posee el residuo tirosina 29 intacto sería capaz de llegar a la membrana basolateral, sin embargo una vez que es endocitado, podría quedar retenido en compartimentos vesiculares y no ser capaz de volver a la superficie celular. Alternativamente, esta localización intracelular podría ser explicada por una mayor velocidad de endocitosis, en relación con el receptor normal, sin embargo esto se descarta por datos publicados que muestran que el receptor con la mutación A₂₆PxY presenta cambios en su cinética de internalización (Li y cols., 2000), y por otro lado se ha descrito recientemente que en células no polarizadas este minireceptor presenta una disminución en la vía del reciclaje (van Kerkhof y cols., 2005). Estos resultados son relevantes dado que se estaría mostrando que la alteración del motivo NPxY por sustitución del primer o último aminoácido por alanina no tiene el mismo efecto en el tráfico del receptor. Esto será incorporado dentro de un modelo que será discutido más adelante.

Dentro de la maquinaria intracelular que participa en el tráfico del LRP, una proteína que se estudió en este trabajo fue la Proteína Quinasa D 1 (PKD1), cuya actividad resultó ser crítica para una correcta destinación de LRP hacia la superficie basolateral. Así, al utilizar una forma dominante negativa de PKD 1 (PKD1 DN), LRP fue destinado al dominio apical en células MDCK y hacia el extremo distal del axón en neuronas. Estos hallazgos resultan muy interesantes puesto que, (i) se valida el hecho que el residuo de tirosina 29 sea importante para una salida directa desde TGN, ya que se ha visto que PKD es importante para la salida directa desde TGN de proteínas de membrana hacia la superficie basolateral en células MDCK (Yeaman y cols., 2003), y (ii) se encontró que el efecto de PKD 1 DN en neuronas también afecta la distribución somatodendrítica de LRP, encontrándose el receptor concentrado en el extremo distal

del axón a nivel de superficie, lo cual resulta más interesante aún puesto que es la misma distribución superficial obtenida (axón distal) que con la mutante en la tirosina 29. Por lo tanto, PKD participa en la maquinaria de segregación de LRP en neuronas, siendo por primera vez descrito un papel para PKD en la destinación de proteínas en este tipo celular.

Otra proteína de la maquinaria intracelular que se estudió fue μ -1B, subunidad que forma parte del complejo adaptador AP-1B, el cual se ha sugerido que participa en la segregación basolateral de proteínas de membrana conteniendo señales basadas en tirosina, por ejemplo como ocurre para el receptor de LDL (Fölsch y cols., 2001). Resultados publicados por nuestro laboratorio (Marzolo y cols, 2003) muestran que la localización de LRP en células epiteliales LLC-Pk1 depende de μ -1B, donde se describe que en células LLC-Pk1 wt, las cuales carecen de μ -1B, LRP tiene una localización no polarizada, mientras que la localización obtenida en células LLC-Pk1 transfectadas con μ -1B, LRP fue restringida al dominio basolateral. En el presente trabajo, mediante experimentos de co-inmunoprecipitación fue posible determinar la existencia de una interacción entre el complejo AP-1B y LRP. Por tanto, probablemente los motivos basados en tirosina contenidos en el dominio citosólico de LRP podrían estar siendo reconocidos por μ -1B. Se desconoce específicamente a cuál motivo de LRP se podría estar uniendo, sin embargo, los resultados de la localización no polarizada del minireceptor con la mutación en el residuo de tirosina 63, perteneciente al segundo motivo NPxY, junto con la similitud de la localización de LRP expresado en una condición en que μ -1B está ausente, como ocurre en células LLC-Pk1 wt, sugiere posiblemente que la subunidad μ -1B del complejo adaptador AP-1B podría estar reconociendo esta tirosina del segundo motivo NPxY de LRP. Es interesante destacar

que este residuo de tirosina 63 resultó ser importante tanto para la localización basolateral en células MDCK, como para una localización somatodendrítica en neuronas, en las cuales el minireceptor con dicha mutación también presentó una distribución no polarizada. Esto resulta relevante al considerar que en neuronas no se expresa μ -1B, lo cual permite sugerir la existencia en estas células de una subunidad tipo μ -1B aún no descrita. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que las señales de segregación de LRP son igualmente decodificados en neuronas y células epiteliales, aunque las neuronas no necesariamente tienen el mismo conjunto de proteínas adaptadoras.

Recientemente se ha descrito la existencia de SNX17 (Florian y cols., 2000), una proteína intracelular que forma parte de la familia de las *Sorting Nexins* (Haft y cols., 1998), y que ha sido descrita para regular el tráfico endocítico de P-selectina (Williams y cols., 2004). Trabajos recientes muestran que SNX17 interactúa con miembros de la familia del receptor de LDL, entre ellos el LRP, y que para el receptor de LDL aumenta la tasa de endocitosis, sugiriéndola como una nueva proteína adaptadora para ciertos miembros de esta familia de receptores (Stockinger y cols., 2002). Por otro lado, trabajos realizados por el laboratorio del Dr. Bu, el cual colabora con nuestro grupo, describieron el sitio exacto de LRP que interactúa con SNX17. Esta región resultó ser el primer motivo NPxY del dominio citosólico del receptor (involucrando además el residuo isoleucina en la posición 24), el cual corresponde al motivo que contiene los residuos de tirosina 29 y asparragina 26, importantes en la información basolateral del LRP. Estos antecedentes se utilizaron en este trabajo para estudiar la participación de esta proteína en el tráfico de LRP. La localización intracelular de SNX17 en células MDCK presentó un patrón similar al del minireceptor

N26A, lo cual llevó a estudiar la localización de ambas proteínas. Mediante IF se observó una completa colocalización del minireceptor N26A y la proteína SNX17 transfectada en células MDCK, indicando que a pesar de que no son capaces de interactuar entre sí, se encuentran localizadas en los mismos compartimentos intracelulares, lo que sugiere de manera indirecta un posible papel de SNX17 en el tráfico de LRP, y se podría sugerir que podría ser importante que ocurra esta interacción para una correcta salida de LRP desde las vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática en la etapa de reciclaje. Esto podría sugerir que el residuo asparragina 26 sería importante para el reciclaje de LRP, lo cual resulta de gran relevancia dado que apoyaría un modelo en que el reciclaje sería mediado por señal, a diferencia del modelo actualmente aceptado que postula que el reciclaje ocurre por defecto.

Resulta interesante mencionar que en trabajos realizados en células no polarizadas se ha visto que los minireceptores N26A y Y29A tienen un comportamiento similar, y que ambos reciclan a la superficie celular, pero más lentamente (van Kerkhof y cols., 2005), lo cual sugiere que las proteínas de la familia *Sorting Nexins*, al menos SNX17, cumplirían una función más importante en el tráfico de proteínas en células polarizadas que en células no polarizadas. Esta idea es absolutamente nueva en el estudio del tráfico intracelular de proteínas. Además, en este trabajo se pudo determinar por primera vez la expresión de SNX17 en neuronas de hipocampo, lo cual resulta de gran importancia considerando el limitado conocimiento acerca de la maquinaria de tráfico de proteínas que participa en este tipo celular. Dado que la mutante de la asparragina 26 en neuronas tuvo un comportamiento similar al que presentó en células epiteliales, sugiere que posiblemente podría tener un papel similar

en el tráfico de LRP, aunque aún queda por demostrar si existe co-localización intracelular entre ambas proteínas en estas células.

Sobre la base de lo observado mediante IF, la localización mayoritaria del LRP en el estado estacionario es en endosomas de reciclaje y una parte en endosomas perinucleares. Dado que LRP es un receptor altamente endocítico, para la interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo, se planteó que su distribución en el estado estacionario va a depender en mayor medida de los eventos de segregación que ocurran a nivel de reciclaje en comparación a los eventos de segregación que ocurran en la red trans Golgi. Los resultados de localización de los experimentos de microinyección junto con los posibles papeles de las proteínas citosólicas estudiadas, se plantea un posible modelo final para el tráfico de LRP, en el cual se distingue varios motivos de segregación presentes en su dominio citosólico y una maquinaria de segregación asociada a TGN y endosomas (**Figura 24**).

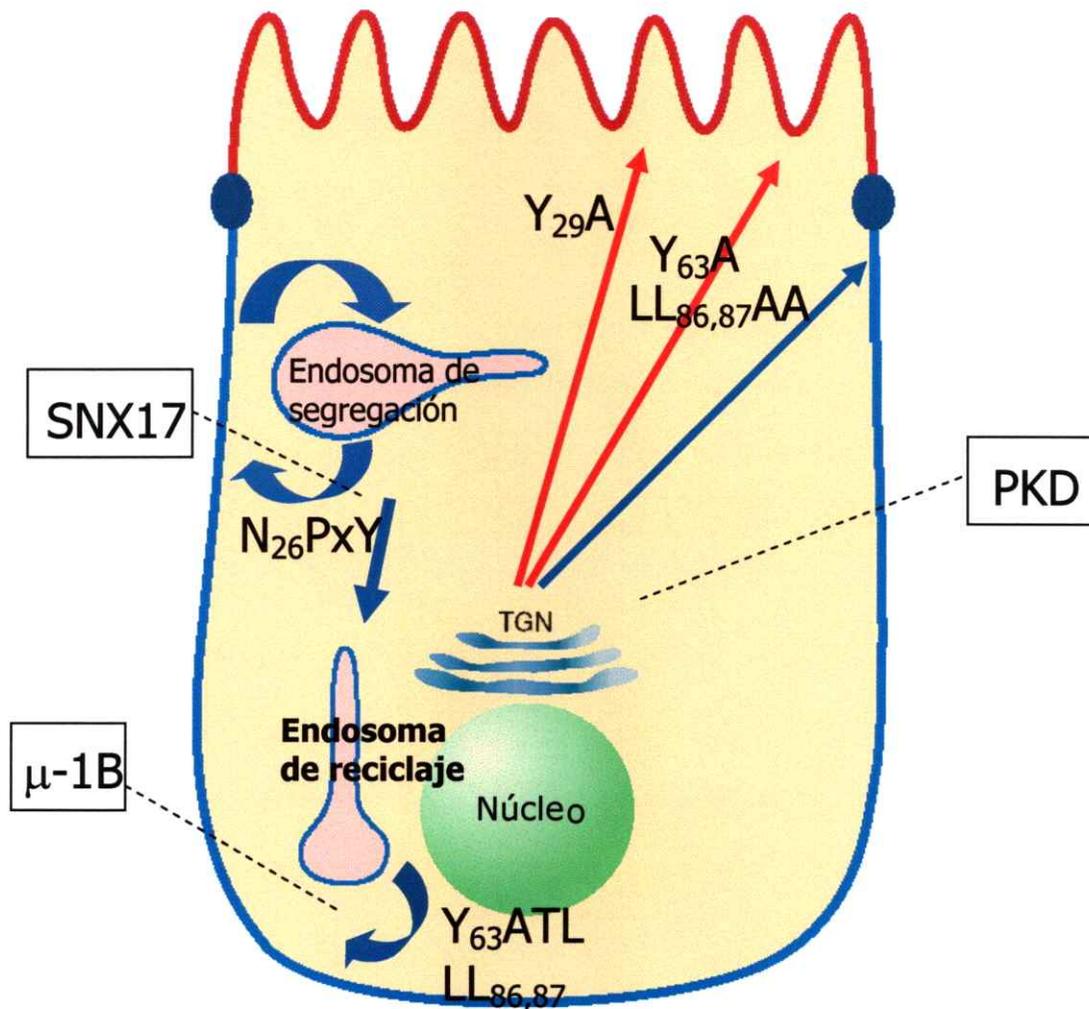


Figura 24. Modelo propuesto para el reconocimiento de las señales aminoacídicas en el dominio citosólico de LRP, en células epiteliales polarizadas. Se muestran los distintos eventos de segregación asociados a TGN y endosomas planteados para los motivos aminoacídicos presentes en el dominio citosólico de LRP. Se indican además los componentes de la maquinaria de tráfico estudiados y los sitios del tráfico donde pueden cumplir un papel.

Este modelo plantea la participación de dos motivos principales. Dentro de la mitad proximal de la cola citoplasmática del LRP, el residuo tirosina 29 conforma la señal de destinación directa del receptor desde TGN hacia el dominio basolateral o somatodendrítico. En la ruta endocítica, el receptor transitaría por compartimentos que contienen la proteína SNX17, para lo cual la información contenida en el residuo asparragina 26 resultaría clave para la interacción entre ambas proteínas, donde SNX17 permitiría la salida del receptor desde las estructuras endosomales (endosomas de segregación) hacia la superficie basolateral, en un proceso denominado *fast recycling*. Por lo tanto, el receptor con el residuo tirosina 29 mutado, sería destinado hacia la superficie apical o axonal y no transitaría por compartimentos positivos para SNX17. Otros eventos de segregación basolateral pueden ocurrir considerando la mitad distal de la cola citoplasmática del LRP, mediante la participación de μ -1B, donde el complejo adaptador AP-1B podría estar reconociendo la señal basada en tirosina del motivo Yxx ϕ , que solapa con el segundo motivo NPxY. También podría estar reconociendo, en alguna medida, al motivo dileucina distal, ya sea, porque ambos formarían parte de un único gran motivo, como se ha visto para el receptor de transferrina (Marks y cols., 1997), o porque la ausencia de uno u otro motivo provoca cambios conformacionales en la estructura terciaria de la cola citoplasmática que impedirían el reconocimiento correcto de las proteínas adaptadoras. Esto podría estar incluido dentro de un evento de reciclaje más lento, posterior al reciclaje temprano dependiente de SNX17 a nivel de los endosomas tempranos de segregación.

Finalmente, el conjunto de resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la distribución asimétrica de LRP es el resultado de un complejo proceso de decodificación celular de varias señales de segregación que coexisten en el dominio citoplasmático del receptor y probablemente de pasos secuenciales de reconocimiento de señal dentro de las vías secretorias y endocíticas.

CONCLUSIONES

- Las señales de destinación para LRP en células epiteliales como en neuronales son conservadas.
- En el dominio citoplasmático de LRP coexisten varias señales que participan en distintas rutas intracelulares, que finalmente dan cuenta de un fenotipo basolateral/somatodendrítico.
- La tirosina 29 del primer motivo NPxY constituye una señal basolateral/somatodendrítica autónoma de LRP, y es importante en la salida directa del receptor desde TGN hacia la superficie basolateral, tanto en células epiteliales como en neuronas de hipocampo.
- La tirosina 63 contribuye a la localización basolateral/somatodendrítica de LRP, formando parte de un motivo del tipo Yxx ϕ , y probablemente formaría parte de una señal de reconocimiento de μ -1B a nivel de una vía de reciclaje más lento.
- Los ácidos aspárticos proximales tienen una contribución en la información basolateral, probablemente formando parte de una señal junto con el primer motivo basado en tirosina.

- El motivo dileucina proximal y el principal sitio de fosforilación en la cola citosólica de LRP no contribuyen en su distribución basolateral/somatodendrítica.

- El motivo dileucina distal participa en la localización basolateral/somatodendrítica del receptor.

- SNX17 colocaliza completamente con el minireceptor con la mutación N26A en estructuras endosomales, parcialmente positivas para el antígeno-1 de endosoma temprano, EEA1.

- Células MDCK, FRT y neuronas de hipocampo expresan endógenamente la proteína SNX17 descrita recientemente.

- SNX17 podría estar participando en la regulación del tráfico intracelular de LRP en células polarizadas, posiblemente a nivel del reciclaje del receptor.

- El minireceptor de LRP interactúa con μ -1B y su localización basolateral en células epiteliales depende de esta subunidad proteica.

- La localización somatodendrítica de LRP en neuronas de hipocampo depende de PKD, lo que sugiere que las vesículas que transportan LRP desde TGN requieren de la actividad de esta quinasa en su formación.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonzo M., Fan L., Alarcon B. 1997. *J. Biol. Chem.* **272**:30748-30752.
- Ang A., Fölsch H., Koivisto U., Pypaert M., Mellman I. 2003. *J. Cell Biol.* **163**:339-350.
- Baas P., Deitch J., Black M., Banker G. 1988. *Proc Natl Acad Sci.* **85**:8335-8339.
- Barr V., Phillips S., Taylor S., Haft C. 2000. *Traffic.* **1**:904-916.
- Beisiegel U., Weber W., Ihrke G. et al. 1989. *Nature.* **341**:162-164.
- Benmerah A., Bayrou M., Cerf-Bensussan N., Dautry-Varsat A. 1999. *Journal of Cell Science.* **112**:1303-1311.
- Biessen E., van Teijlingen M., Vietsch H., Barrett-Bergshoeff M., Bijsterbosch M., Rijken D., van Berkel T. Kuiper J. 1997. *Circulation.* **95(1)**:46-52.
- Bomsel M., Prydz K., Parton R., Gruenberg J., Simons K. 1989. *J. Cell Biol.* **109**:3243-3258.
- Bressler S. et al. 1996. *Hum. Mol. Genet.* **5**:1589-1598.
- Brown D., Crise B., Rose J. 1989. *Science.* **245**:1499-1501.
- Brown M., Banker G., Hussaini I., Gonias S., Vanderberg S. 1997. *Brain Res.* **747**:313-317.
- Bu G., Marzolo M. P. 2000. *Trends Cardiovasc. Med.* **10(4)**:79-116.
- Cáceres A. et al. 1992. *Neuron.* **9(4)**:607-18.
- Cameron P., Sudhof T., Jahn R., De Camilli P. 1991. *J. Cell Biol.* **115**:151-164.
- Casanova J., Apodaca G., Mostov K. 1991. *Cell.* **66**:65-75.
- Cereijido M., Robbins E., Dolan W., Rotunno C., Sabatini D. 1978. *J. Cell Biol.* **77**:853-880.
- Cohen D., Musch A., Rodriguez-Boulan E. 2001. *Traffic.* **2**:556-564.
- Dotti C., Simons K. 1990. *Cell.* **62**:63-72.
- Ermekova K., et al. 1997. *J. Biol. Chem.* **272**:32869-32877.

- Florian V., Schluter T., Bohnensack R. 2001. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**:1045-1050.
- Folsch H., Ohno H., Bonifacino J., Mellman I. 1999. *Cell.* **99**:189-198.
- Folsch H., Pypaert M., Schu P., Mellman I. 2001. *J. Cell Biol.* **152**:595-606.
- Gan Y., McGraw T., Rodriguez-Boulan E. 2002. *Nature Cell Biol.* **4**:605-609.
- Gullapalli A., Garrett T., Paing M., Griffin C., Yang Y., Trejo J. 2004. *Mol Biol Cell.* **15**:2143-2155.
- Gumbiner B. 1990. *Curr. Op. Cell Biol.* **2**:881-887.
- Haft C., de la Luz Sierra M., Barr V., Haft D., Taylor S. 1998. *Mol Cell Biol.* **18**:7278-7287.
- Harris B., Lim W. 2001. *J. Cell Sci.* **114**:3219-3231.
- He C., Hobert M., Friend L., Carlin C. 2002. *J. Biol. Chem.* **277(41)**:38284-38293.
- Herz J., Clouthier D., Hammer R. 1992. *Cell.* **71**:411-4321.
- Herz J., Gotthardt M., Willnow T. 2000. *Curr. Opin. Lipidol.* **11(2)**: 161-6.
- Herz J., Strickland D. 2001. *J. Clin. Invest.* **108**:779-784.
- Hunziker W., Harter C., Matter K., Mellman I. 1991. *Cell.* **66**:907-920.
- Hunziker W., Fumey C. 1994. *EMBO J.* **13**:2963-2969.
- Hussain M., Strickland D., Bakillah A. 1999. *Annu. Rev. Nutr.* **19**:141-172.
- Jacob R., Naim H. 2001. *Curr. Biol.* **11**:1444-1450.
- Jareb M., Banker G. 1998. *Neuron.* **20**:855-867.
- Keller P., Toomre D., Diaz E., White J., Simons K. 2001. *Nat. Cell Biol.* **3**:140-149.
- Kenneth C., Yu W., Chen W. Cooper A. 2001. *J Clin Invest.* **107(11)**:1387-94.
- Kobayashi T., Storrie B., Simons K. Dotti C. 1992. *Nature.* **359**:647-650.
- Koivisto U., Hubbard A., Mellman I. 2001. *Cell.* **105**:575-585.
- Kreitzer G., Schmoranzler J., Low S., Li X., Gan Y., Weimbs T., Simon S., Rodriguez-Boulan E. 2003. *Nat. Cell Biol.* **5**:126-136.
- Kroschewski R., Hall, A., Mellman I. 1999. *Nature Cell Biol.* **1**:8-13.

- Kurten R., Cadena D., Gill G. 1996. *Science*. **272**:1008-1010.
- Li Y., Marzolo M.P., van Kerkhof P., Strous G., Bu G. 2000. *J. Biol. Chem.* **275(17)**:187-194.
- Li Y., Cam J., Bu G. 2001. *Mol. Neurobiol.* **23(1)**:53-67.
- Li Y., Lu W., Marzolo M.P., Bu G. 2001. *J. Biol. Chem.* **276(21)**:18000-6.
- Lipardi C., Ruggiano G., Perrone I., Paladino S., Monlauzeur I., Nitsch I., Le Bivic A. Zurzolo C. 2002. *Endocrinology*. **143(4)**:1291-1301.
- Lisanti M., Sargiacomo M., Graeve L., Saltiel A. Rodríguez-Boulán E. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**:9557-9561.
- Lock J., Stow J. 2005. *Mol Biol Cell*. **16(4)**:1744-55.
- Madrid R., Le Maout S., Janvier K., Benichou S., Merot J. 2001. *EMBO J.* **20(24)**:7008-7021.
- Marks M., Ohno H., Kirchhausen T., Bonifacino J. 1997. *Trends Cell Biol.* **7**:124-128.
- Marzolo M.P., Yuseff M., Retamal C., Donoso M., Ezquer F., Farfan P., Li Y., Bu G. 2003. *Traffic*. **4(4)**:273-88.
- Matter K., Hunziker W., Mellman I. 1992. *Cell*. **71**:741-753.
- Matter K., Mellman I. 1994. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:545-554.
- Matter K., Yamamoto E., Mellman I. 1994. *Journal of Cell Biology*. **126(4)**:991-1004.
- Mostov K., de Bruyn Kops A., Deitcher D. 1986. *Cell*. **47**:359-364.
- Mostov K., Cardone M. 1995. *Bioessays*. **17**:129-138.
- Mostov K., Verges M., Altschuler Y. 2000. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:483-490.
- Mostov K., Su T., ter Beest M. 2003. *Nature Cell Biology*. **5**:287-293.
- Nakada C., Ritchie K., Oba Y., Nakamura M., Hotta Y., Iino R., Kasai R., Yamaguchi K., Fujiwara T., Kusumi A. 2003. *Nat. Cell Biol.* **5**:626-632.
- Nakagawa T., Setou M., Seog D., Ogasawara K., Dohmae N., Takio K., Hirokawa N. 2000. *Cell*. **103**:569-581.
- Neels J. et al. 1999. *J. Biol. Chem.* **274**:31305-13311.
- Nelson W., Yeaman C. 2001. *Trends Cell Biol.* **11**:483-486.

- Obermoeller L., Chen Z., Schwartz A., Bu G. 1998. *J. Biol. Chem.* **273**:22374-22381.
- Odorizzi G., Trowbridge I. 1997. *J. Biol. Chem.* **272**:11757-11762.
- Orzech E., Cohen S., Weiss A., Aroeti B. 2000. *J. Biol. Chem.* **275**:15207-15219.
- Ponting C. 1996. *Protein Sci.* **5**:2353-2357.
- Rodriguez-Boulan E., Pendergast M. 1980. *Cell.* **20(1)**:45-54.
- Rodriguez-Boulan E., Nelson W. 1989. *Science.* **245**:718-725.
- Rodriguez-Boulan E. and Powell S. 1992. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:395-427.
- Sarnataro D., Nitscha L., Hunziker W. and Zurzolo C. 2000. *Traffic.* **1**:794-802.
- Scheiffele P., Peranen J., Simons K. 1995. *Nature.* **378**:96-98.
- Schneider W., Nimpf J. 1993. *Curr. Opin. Lipidol.* **4**:205-209.
- Schneider W., Nimpf J., Bujo H. 1997. *Curr. Opin. Lipidol.* **8**:315-319.
- Shipitsin M., Feig L. 2004. *Mol Cell Biol.* **24(13)**:5746-56.
- Simmen T., Honing S., Icking A., Tikkanen R., Hunziker W. 2002. *Nature Cell Biol.* **4**:154-159.
- Simons K., Wandinger-Ness A. 1990. *Cell.* **62**:207-210.
- Sottrup-Jensen L. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**:11539-11542.
- Springer T. 1998. *J. Mol. Biol.* **283**:837-862.
- Stockinger W., Sailer B., Strasser V., Recheis B., Fasching D., Kahr L. et al. 2002. *EMBO J.* **21**:4259-4267.
- Thomas D., Brewer C., Roth M. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**:3313-3320.
- Trommsdorff M., Borg J., Margolis B., Herz J. 1998. *J. Biol. Chem.* **273**:33556-33560.
- Trommsdorff M., Gotthardt M., Hiesberger T., Shelton J., Stockinger W., Nimpf J., Hammer R., Richardson J., Herz J. 1999. *Cell.* **97**:689-701.
- van Kerkhof P., Lee J., McCormick L., Tetrault E., Lu W., Schoenfish M., Oorschot V., Strous G., Klumperman J., Bu G. 2005. *EMBO J.* **24(16)**:2851-2861.
- van Meer G., Simons K. 1988. *J. Cell Biochem.* **36**:51-58.

- Wang Y., Zhou Y., Szabo K., Renfrew H. and Trejo J. 2002. *Mol. Biol. Cell.* **13**:1965-1976.
- Wehrle-Haller B. and Imhof B. 2001. *J. Biol. Chem.* **276**:12667-12674.
- Weimbs T., Low, S., Chapin S. and Mostov K. 1997. *Trends Cell Biol.* **7**:393-399.
- Williams R., Schluter T., Roberts M., Knauth P., Bohnensack R., Cutler D. 2004. *Mol Biol Cell.* **15**:3095-3105.
- Willnow T., Nykjaer A., Herz J. 1999. *Nat. Cell. Biol.* **1(6)**:157-162.
- Winckler B., Forscher P., Mellman I. 1999. *Nature.* **397**:698-701.
- Worby C., Dixon J. 2002. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**:919-931.
- Xu Y., Hortsman H., Seet L., Wong S., Hong W. 2001. *Nat Cell Biol.* **3**:658-666.
- Yeaman C., Le Gall A., Baldwin A., Monlauzeur L., Le Bivic A. and Rodriguez-Boulan E. 1997. *J. Cell Biol.* **139**:929-940.
- Yeaman C., Grindstaff K., Wright J., Nelson W. 2001. *J. Cell Biol.* **155**:593-604.
- Yeaman C., Ayala M., Wright J., Bard F., Bossard C., Ang A., Maeda Y., Seufferlein T., Mellman I., Nelson W. and Malhotra V. 2004. *Nat. Cell Biol.* **6(2)**:106-112.
- Zambrano N., et al. 1997. *J. Biol. Chem.* **272**:6399-6405.
- Zurzolo C., Polistina C., Saini M., Gentile R., Aloj L., Migliaccio G., Bonatti S., Nitsch L. 1992. *J Cell Biol.* **117**:551-564.