



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias

UCH-FC
Biotecnología
F219
C-1

**ESTUDIO DE LA FOSFORILACIÓN Y TRÁFICO DE
MEGALINA: POSIBLE PAPEL DE GSK3**



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

por

PAMELA SOLEDAD FARFÁN GONZÁLEZ

2008
Santiago - Chile

Director de Tesis: Dra. María Paz Marzolo Canales
Unidad de Estructura y Función Celular, Departamento de Biología Celular y Molecular
Centro de Regulación Celular y Patología "CRCP"
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile.



“ESTUDIO DE LA FOSFORILACIÓN Y TRÁFICO DE MEGALINA: POSIBLE PAPEL DE GSK3”

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

PAMELA SOLEDAD FARFÁN GONZÁLEZ

Dra. María Paz Marzolo Canales
Directora Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Christian González-Billault
Corrector

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, 2008



Pamela es la segunda hija de tres hermanos y desde pequeña ha vivido en Padre Hurtado junto con su familia. Ingreso a la Universidad de Chile al Programa de Bachillerato, donde reafirmo su gusto y entusiasmo por la ciencia, incorporándose, posteriormente, a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. A Pamela le gusta leer y escuchar música y disfruta reunirse con sus amigos a charlar. Pero por sobretodo esta orgullosa de haber estudiado en la Universidad de Chile y haber conocido amigos con los cuales formó duraderos lazos de amistad.



A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Maria Paz Marzolo, quien me recibió en su laboratorio y me guió en la elaboración de este trabajo, constituyendo para mí un ejemplo de dedicación y orden en el quehacer científico.

Quiero agradecer la colaboración de mis compañeros de laboratorio por su apoyo y consejos, no solo a los que están sino también a los que ya se fueron, especialmente a Isabel Yuseff, quien me guió en mis primeros pasos en el laboratorio.

Por último quiero agradecer a mi familia, mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional, su esfuerzo y cariño.



FINANCIAMIENTO

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

- Proyecto Fondecyt 1020746
- Proyecto Fondap 13980001
- MIFAB
- Fogarty International Research International Award (FIRCA) # TW06456



ÍNDICE



DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
FINANCIAMIENTO.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
Familia de receptores de LDL.....	1
Megalina/LRP2.....	4
Hipótesis de trabajo.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
II.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1. Materiales.....	13
1.1- Bacterias.....	13
1.2- Plasmidios.....	13
1.3- Líneas celulares.....	14
1.4- Anticuerpos.....	14
1.5- Oligonucleótidos.....	15
1.6- Secuencia oligonucleótidos.....	15
1.7- Reactivos.....	16

2. Métodos.....	18
2.1- Técnicas de biología molecular.....	18
2.1.1- Clonamientos.....	18
2.1.1.1- Generación de minireceptor fusionado a epítotope HA: m-Meg4.....	18
2.1.1.2- Mutagénesis sitio dirigida de bases que codifican para la serina del motivo PPPSP en el dominio citosólico de megalina de m-Meg4.....	19
2.1.2- Purificación de fragmentos de ADN.....	19
2.1.3- Obtención de bacterias competentes.....	20
2.1.4- Transformación de bacterias.....	20
2.1.5- Obtención del ADN plasmidial.....	21
2.1.6- Cuantificación del ADN plasmidial.....	23
2.1.7- Análisis del ADN plasmidial.....	23
2.2- Técnicas de biología celular.....	23
2.2.1- Cultivo de líneas celulares.....	23
2.2.2- Transfección de células.....	24
2.2.3- Inmunoblot.....	24
2.2.4- <i>Pull Down</i> GST.....	24
2.2.5- Fraccionamiento.....	25
2.2.6- Biotinilación selectiva de proteínas.....	26
2.2.7- Preparación de tubos iodogen para iodinación de proteínas.....	26
2.2.8- Iodinación de proteínas.....	26
2.2.9- Estudios de endocitosis: medición de la velocidad inicial de la	

internalización de megalina y de los minireceptores.....	27
2.2.10- Ensayo de unión de radioligando a 4°C.....	28
2.2.11- Estudios de fosforilación <i>in vivo</i>	28
2.2.12- Uso de inhibidores.....	29
2.2.13- Localización de proteínas por inmunofluorescencia.....	29
2.2.14- Análisis de la expresión de minireceptores por citometría de Flujo.....	30
2.2.15- Ensayo de reciclaje en células MDCK.....	30
III.-RESULTADOS.....	32
1- Generación del minireceptor de megalina m-Meg4	33
1.1- Generación de una mutante puntual en el motivo PPPSP del dominio citosólico de megalina en m-Meg4.....	35
2- Expresión del minireceptor m-Meg4 en células MDCK: generación de línea estable.....	35
2.1- Expresión de m-Meg4 detectada por inmunoblot e inmunoprecipitación	36
2.2- Expresión de m-Meg4 detectada por <i>Pull-Down</i>	36
2.3- Expresión y localización de m-Meg4 detectada por inmunofluorescencia indirecta.....	37
3- Estudios de fosforilación de megalina: posible papel en tráfico celular.....	39
3.1- Evaluación de la expresión de MegTPPPAP y m-Meg4PPPAP en células MDCK.....	41
3.2- Estudios de fosforilación de megalina en células MDCK.....	43
3.3- Evaluación de la participación de GSK3 en la fosforilación de megalina	45
3.3.1- Interacción de GSK3 con el dominio citosólico de megalina.....	51
3.4- La fosforilación del motivo PPPSP no modula la acción de otras quinasas	

en el dominio citosólico de megalina.....	51
3.5- Análisis funcional de la fosforilación del receptor.....	53
3.5.1- Análisis de la distribución polarizada de m-LRP4MegTPPPAP y m-Meg4PPPAP en células MDCK.....	53
3.5.2 Análisis del nivel de expresión de receptores en la superficie celular.....	56
3.5.3- Medición de la velocidad inicial de internalización.....	59
3.5.4- Estudios de Reciclaje.....	61
IV.- DISCUSIÓN.....	64
1. Generación de un minireceptor de megalina.....	64
2. La fosforilación de megalina depende de GSK3.....	65
3. La fosforilación dependiente del motivo PPPSP regula negativamente el Reciclaje de megalina.....	71
4. Megalina y señalización intracelular.....	72
V.- CONCLUSIONES.....	75
VI.- BIBLIOGRAFÍA.....	76



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Miembros de la familia de receptores de LDL.....	3
Figura 2. Esquema de la estructura de megalina y su dominio citosólico.....	7
Figura 3. Generación del vector m-Meg4.....	34
Figura 4. Análisis de expresión del minireceptor m-Meg4 en células MDCK.....	38
Figura 5. Esquema de minireceptores de Megalina.....	42
Figura 6. Expresión de m-LRP4MegTPPPAP y m-Meg4PPPAP en células MDCK.....	42
Figura 7. Fosforilación de los minireceptores m-LRP4MegTPPPAP y m-Meg4PPPAP en células MDCK.....	44
Figura 8. Fosforilación de minireceptores y receptor de megalina disminuye en presencia de LiCl, inhibidor de GSK3.....	47
Figura 9. Fosforilación del minireceptor y receptor de megalina disminuye en presencia de SB216763 un inhibidor específico de GSK3	48
Figura 10. GSK3 fosforila activamente el dominio citosólico de megalina en ausencia de ligandos.....	50
Figura 11. Interacción del dominio citosólico de megalina con GSK3 β	52
Figura 12. La serina del motivo PPPSP es esencial para la fosforilación del dominio citosólico de megalina.	52
Figura 13. Distribución en superficie celular de la mutante de fosforilación en células MDCK.....	55
Figura 14. Expresión de minireceptores en la superficie celular.....	57
Figura 15. Aumento de expresión de receptores en superficie de células tratadas con LiCl.....	58

Figura 16. La fosforilación dependiente del motivo PPPSP no regula la velocidad de internalización de Megalina.....	60
Figura 17. La fosforilación dependiente del motivo PPPSP regula la eficiencia de reciclaje.....	62

ABREVIATURAS

A	: absorbancia
ADN	: ácido desorribonucleico
Amp	: ampicilina
ARN	: ácido ribonucleico
ApoER2	: Receptor 2 de la ApoE
ATP	: adenosina 5`- trifosfato
BIP	: proteína de unión
BN	: línea celular de saco vitelino de rata
BSA	: albúmina de suero bovino
CHO	: línea celular de ovario de hámster
Ci	: Curie
CKII	: Caseína quinasa II
Dab2	: <i>Disabled-2</i>
DMEM	: medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	: dimetilsulfóxido
dNTPs	: desoxinucleótidos
DTT	: dithiothreitol
ECL	: quimioluminiscencia aumentada
EDTA	: ácido etilen-diamino-tetra-acético
EGF	: factor de crecimiento epidermal
F-12 Ham	: Medio nutritivo F-12 Ham
FBS	: suero fetal bovino
µg	: microgramos

G418	: genética
GFP	: proteína fluorescente verde
GSK3	: Quinasa glicógeno sintasa
GST	: glutation-S-transferasa
HA	: hemaglutinina del virus influenza
Hepes	: ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico
IF	: inmunofluorescencia
kan	: kanamicina
kDa	: kilo Dalton
μl	: microlitros
LB	: medio de cultivo Luria Bertani
LDL	: lipoproteína de baja densidad
LRP1	: proteína relacionada al receptor de LDL 1
LRP5/6	: proteína relacionada al receptor de LDL 5 y 6
MDCK	: línea celular epitelial proveniente de riñón distal de perro
min	: minutos
mM	: milimolar
ml	: mililitros
μm	: micrometros
μM	: micromolar
ng	: nanogramos
NPxY	: asparragina - prolina - cualquier aminoácido – tirosina
PAGE	: electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	: pares de bases

PBS	: tampón fosfato salino
PCR	: reacción de polimerasa de DNA en cadena
PEG	: polietilenglicol
PI3-K	: fosfatidilinositol-3-quinasa
PKA	: proteína quinasa A
PKB	: proteína quinasa B
PKC	: proteína quinasa C
PKG	: proteína quinasa G
PMSF	: fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PTH	: hormona paratiroidea
PVDF	: difluoruro de polivilideno
RAP	: proteína asociada a receptor
RBP	: proteína de unión a retinol
rpm	: revoluciones por minuto
SDS	: dodecilsulfato de sodio
seg	: segundo
TE	: Tris EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-teterametiletildiamina
Tris	: tris(hidroximetil)aminometano
VLDL	: lipoproteína de muy baja densidad
YFP	: proteína fluorescente verde

RESUMEN

Megalina es una proteína de transmembrana de 600 kDa miembro de la familia de receptores LDL que se expresa en la cara apical de células polarizadas, principalmente del epitelio absortivo, como en el riñón, pulmón y tiroides. Este receptor tiene una importante participación en la unión y endocitosis de variadas moléculas como apolipoproteínas, vitaminas y hormonas con sus proteínas transportadoras y otros. Megalina posee un ectodominio con cuatro dominios de unión a ligandos, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con varios motivos, tales como un motivo rico en prolinas un motivo de interacción con dominios PDZ, motivos de LL, NPXY, NxxY y YXX ϕ y sitios de consenso de fosforilación por PKC, PKA y CK-II. Debido al gran tamaño de megalina, los estudios del tráfico intracelular y su regulación no se pueden realizar con el receptor completo. En esta tesis se hicieron construcciones derivadas de megalina, es decir minireceptores, para facilitar su estudio. Se generaron clones de células estables evaluándose nivel de expresión, correcto plegamiento y expresión en la superficie celular de los minireceptores. Evidencias de nuestro laboratorio han demostrado que el dominio citosólico de megalina es fuertemente fosforilado *in vivo* e *in vitro* y que el motivo determinante en la fosforilación corresponde a un residuo de serina que se encuentra dentro del motivo rico en prolinas PPPSP. En esta tesis se determinó que, en células de fenotipo polarizado MDCK, que expresan minireceptores de megalina, la fosforilación disminuyó significativamente al mutar la serina, del motivo rico en prolinas distal, por una alanina y que el efecto de esta disminución incrementó la expresión de la mutante en la superficie de la célula. Este fenómeno no se debió a una variación en la velocidad de

internalización sino a un aumento en el reciclaje del receptor. Puesto que el motivo PPPSP es un sitio consenso para la quinasa glicógeno sintasa 3 (GSK3) se analizó el efecto de los inhibidores de esta quinasa, LiCl y SB216763, en la fosforilación y tráfico de minireceptores de megalina en MDCK y megalina endógena en células BN. Se demostró que, en ambos casos, en presencia de los inhibidores la fosforilación del receptor disminuye. Bajo esas condiciones, las células BN exhibieron un aumento en la expresión de megalina en la superficie y en las células MDCK expresando los minireceptores se midió un aumento en el reciclaje de los receptores. Estas evidencias muestran que la fosforilación regularía negativamente el reciclaje de megalina y que GSK3 estaría participando directamente en el proceso.

SUMMARY

Megalin is a transmembrane protein of 600 kDa, member of the LDL receptor family that is expressed in the apical pole of polarized cells, especially in absorptive epithelium such as kidney, lung and thyroid. This receptor has a relevant participation in the binding and endocytosis of several molecules including apolipoproteins, vitamin binding proteins, hormones and others. Megalin has an ectodomain composed by four ligand binding domains, a transmembrane domain and a cytoplasmatic domain with several interesting motifs, such as distal proline rich motif, a PDZ-domain interaction motif, several potential endocytosis motifs such as LL, NPXY, NxxY and YXX ϕ and PKC, PKA and CK-II consensus phosphorylation sites. The huge size of megalin made difficult to work with the full length receptor in cloning strategies, intracellular trafficking and regulation studies. As part of the objectives of this thesis, and in order to facilitate the work related to the study of megalin, we made constructs, derived of megalin cDNA, as a minireceptors and obtained cells stably expressing them. In these cells we evaluated, the minireceptors expression level, correct folding and cell surface expression. Evidences of our laboratory have previously demonstrated that the cytoplasmatic domain of megalin is significantly phosphorylated *in vivo* and *in vitro* and the determining motif for this phosphorylation corresponds to a serine residue, present within the proline rich motif PPPSP. In this thesis we determined that in cells with polarized phenotype, such as the MDCK cells expressing the megalin minireceptors, the phosphorylation was significantly diminished when the serine was replaced by an alanine. We also determined that, as a consequence of this reduced phosphorylation

the mutant minireceptor increased its expression at the cell surface. We showed that this phenomenon was not due to a change in the internalization rate, but to an increase in the receptor recycling. Since PPPSP motif is a Glycogen Synthase 3 kinase (GSK3) consensus site, we analyzed the effect of inhibitors of this kinase, using LiCl and SB216763, in the phosphorylation and traffic of megalin minireceptors in MDCK cells and of endogenous megalin in BN cells. We demonstrated that, in both cell types, the presence of GSK3 inhibitors decreased the phosphorylation of the receptor. In those conditions, BN cells exhibited an increase in the expression of megalin at the cell surface and in MDCK cells, expressing the minireceptors, there was an increase in the recycling of the receptors. Altogether these evidences show that megalin phosphorylation is negatively regulating its recycling and that GSK3 would be participating directly in the process of megalin phosphorylation.

I.- INTRODUCCIÓN

Familia de receptores de LDL.

Los miembros de la familia de proteínas de membrana de baja densidad, donde el receptor de LDL (LDLR) es el miembro prototípico, está compuesta por diez receptores que participan en variadas funciones, tales como endocitosis y señalización, inducida por la unión de numerosos ligandos (Bu y Marzolo 2000, Stolt y Bock 2006). Los receptores de LDLR pueden encontrarse en una amplia variedad de especies que se extiende de ascárides a insectos y vertebrados (Nykjaer y Willnow 2002). Además regulan varios otros procesos biológicos incluyendo el metabolismo de lípidos y de ciertas vitaminas. Algunos tienen funciones durante la embriogénesis y ha sido establecido que todos los miembros de la familia están presentes en sistema nervioso central (CNS) (Fisher y Howie 2006).

Los receptores de la familia del LDLR se expresan en la superficie celular y son proteínas de membrana tipo I, poseen un dominio extracelular amino terminal, un dominio de transmembrana y un dominio citoplasmático carboxilo terminal. La mayor similitud entre los receptores se encuentra a nivel del dominio extracelular, que contiene los dominios de unión a ligandos formados por motivos que contienen repeticiones del tipo complemento y repetidos tipo factores de crecimiento epidermal (EGF), ambos ricos en residuos de cisteína y dominios YWTD pobres en residuos de cisteína. Los motivos EGF e YWTD son necesarios para la disociación de ligandos del receptor en endosomas (Li y cols., 2001a). Además tienen un dominio citoplasmático relativamente corto con al menos un motivo NPXY. Los motivos NPXY están involucrados en el reclutamiento de proteínas adaptadoras, que forman parte de las

fovéolas cubiertas por clatrina (Stolt y Bock, 2006) como también en el reclutamiento de proteínas de señalización (Stolt y Bock, 2006). Otra característica que comparten estos receptores es que en el retículo endoplasmático rugoso, unen rápidamente y con alta afinidad a una proteína de 40 kDa llamada RAP. Esta proteína se localiza predominantemente en este organelo. Se une a todos los miembros de la familia LDL y su función es la de ser una chaperona, que participa en el plegamiento de los receptores (Bu y Marzolo 2000), además de proteger a los receptores recién sintetizados de la unión temprana de ligandos, lo cual evita la agregación y retención en el retículo endoplasmático de estas proteínas.

Los principales miembros de esta familia de receptores son: el receptor LDL, LRP1, LRP-1 β , Megalina o LRP2, MEGF7, ApoER2 y VLDLR, además de otros 3 receptores, mas distantes, LRP5, LRP6 y LR11/SorLA (Figura 1). Estos últimos no tienen todas las características estructurales que definen a los miembros de la familia. Por ejemplo LRP5 y LRP6 no contienen el motivo intracelular NPXY que contienen los miembros principales, pero tienen 5 copias de motivos PPP(S/T)P que participan en la señalización de estos receptores (Fisher y Howie 2006).

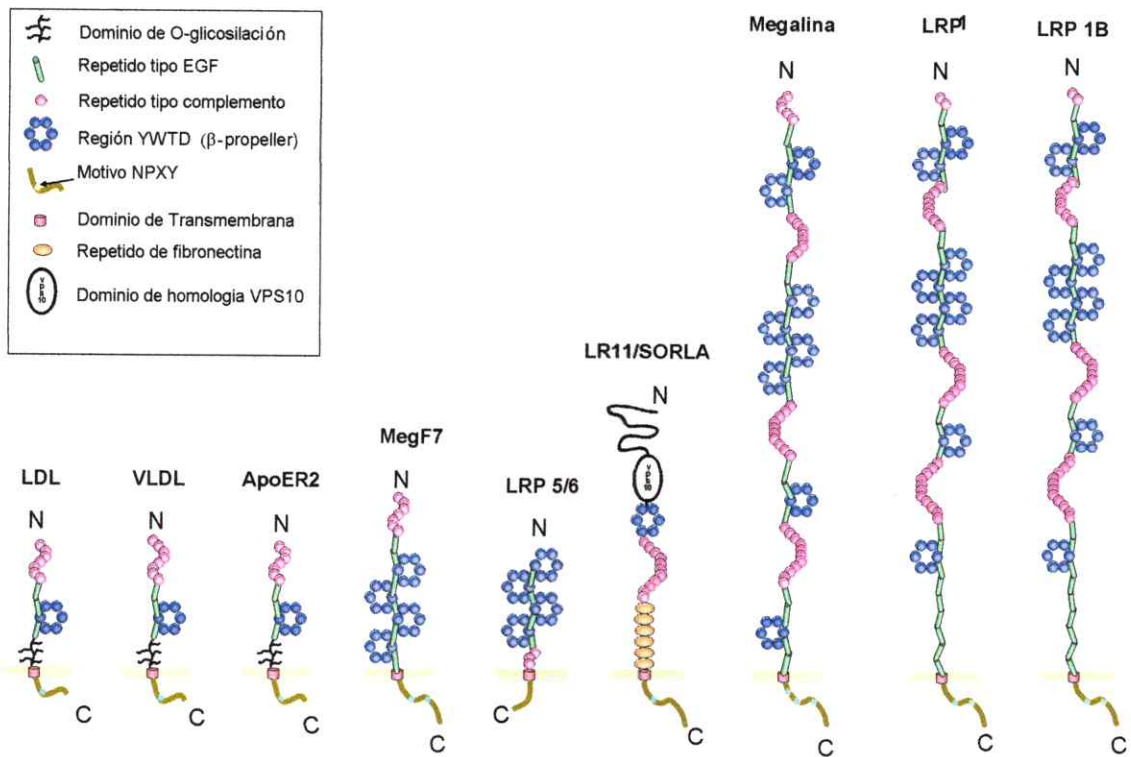


Figura 1. Miembros de la familia de receptores de LDL. Estos receptores se expresan en la superficie celular y están envueltos en varios procesos fisiológicos. Estructuralmente poseen un único dominio de transmembrana y en el ectodominio tienen repetidos tipo complemento que constituyen los dominios de unión a ligandos, además de repetidos EGF y motivos YWTD. Los receptores LRP5/6 y LR11/SORLA son miembros más distantes de la familia y no comparten todas las características estructurales de los demás receptores. (Modificado de esquema diseñado por Bárbara Ramos).

Megalina/LRP2.

Megalina es un receptor endocítico de 600 kDa y originalmente fue identificado como el antígeno involucrado en la nefritis de Heymann de ratas (Christensen y Birn 2001). Se expresa en el dominio apical de las células epiteliales polarizadas, principalmente en el epitelio absortivo del túbulo proximal del riñón y del saco vitelino, en los que hay una alta actividad endocítica y de degradación de ligandos (Moestrup y Verroust 2001). Otros sitios de expresión del receptor son el epitelio mamario, tiroides, epitelio interno del oído y epitelio ciliar del ojo, pulmón, ileon distal y vesícula biliar (Fisher y Howie 2006). Además se encuentra en plexo coroideo, epéndima, paratiroides, oviducto, útero y otros. La expresión de megalina en el desarrollo ha sido encontrada en trofoectodermo y neuroectodermo (Christensen y Birn 2001). Se ha descrito que megalina une *Sonic hedgehog* un importante morfógeno y la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), ambas moléculas de gran importancia durante el desarrollo del sistema nervioso central (Fisher y Howie 2006). Megalina une además una enorme variedad de ligandos de importancia en el desarrollo y en la vida adulta, entre los que se encuentran complejos de vitamina A, vitamina B12 y vitamina D con sus proteínas transportadoras, además de lipoproteínas, que contienen apoE, apoB, lipasas proteicas, complejos proteasas con sus inhibidores, tiroglobulina, y calcio entre otros. La unión de vitaminas y hormonas al receptor sugieren un papel de megalina en el metabolismo y homeostasis de vitaminas (Christensen y Birn 2001).

La importancia de megalina queda de manifiesto en los estudios con ratones nulos para este receptor, los que revelan que estos animales tienen un desarrollo anormal en riñón, pulmones y sistema nervioso central, la mayoría muere postnatalmente de insuficiencia respiratoria. Esto indica que la expresión de megalina se requiere en la formación de importantes estructuras del ratón durante el desarrollo

(Willnow y cols., 1996). Se ha planteado que la falta de la interacción descrita entre megalina y *Sonic hedgehog*, sería una de las causas que explicarían el fenotipo observado en estos ratones (McCarthy y cols., 2002). Además la unión de variados ligandos y el posible papel de megalina en la homeostasis de vitaminas esenciales también podrían explicar parte del fenotipo de estos animales.

Estructuralmente megalina humana está compuesta de 4655 aminoácidos, posee un dominio extracelular amino terminal único, un dominio de transmembrana de 23 aminoácidos y dominio citoplasmático carboxilo terminal. En su ectodominio contiene 36 repetidos clase A ricos en cisteínas los que forman cuatro grupos los cuales constituyen las regiones o dominios de unión a ligandos (Hjålm y cols., 1996). Estos están separados por repetidos EGF y regiones pobres en cisteínas las cuales contienen motivos YWTD, que están involucrados en la liberación pH dependiente de ligandos en compartimentos endosomales (Christensen y Birn 2002) (Figura 2 A). En su cola citoplasmática de 209 aminoácidos contiene motivos putativos de endocitosis como un motivo LL, tres del tipo NPXY y uno del tipo Yxx ϕ . Además contiene una secuencia rica en prolinas con homología a un dominio de unión SH3, un motivo PDZ y distintos motivos putativos de fosforilación, tales como sitios para PKC, CKII y un sitio para PKA (Marzolo y cols., 2003). Dentro de los putativos motivos de fosforilación es interesante notar la presencia de un sitio PPPSP, que no aparece mencionado entre los motivos del receptor en los trabajos en que se muestra el clonamiento de megalina (Hjålm y cols., 1996). Este motivo está dentro de la secuencia rica en prolinas, que recientemente se ha descrito es fosforilado por la quinasa glicógeno sintasa (GSK3) en los receptores LRP5/6 involucrados en la vía de señalización WNT (Zeng y col., 2005). La presencia de estos motivos citoplasmáticos sugieren para

megalina una posible función en señalización además de su papel como receptor endocítico (Christensen y Birn 2001) (Figura 2 B).

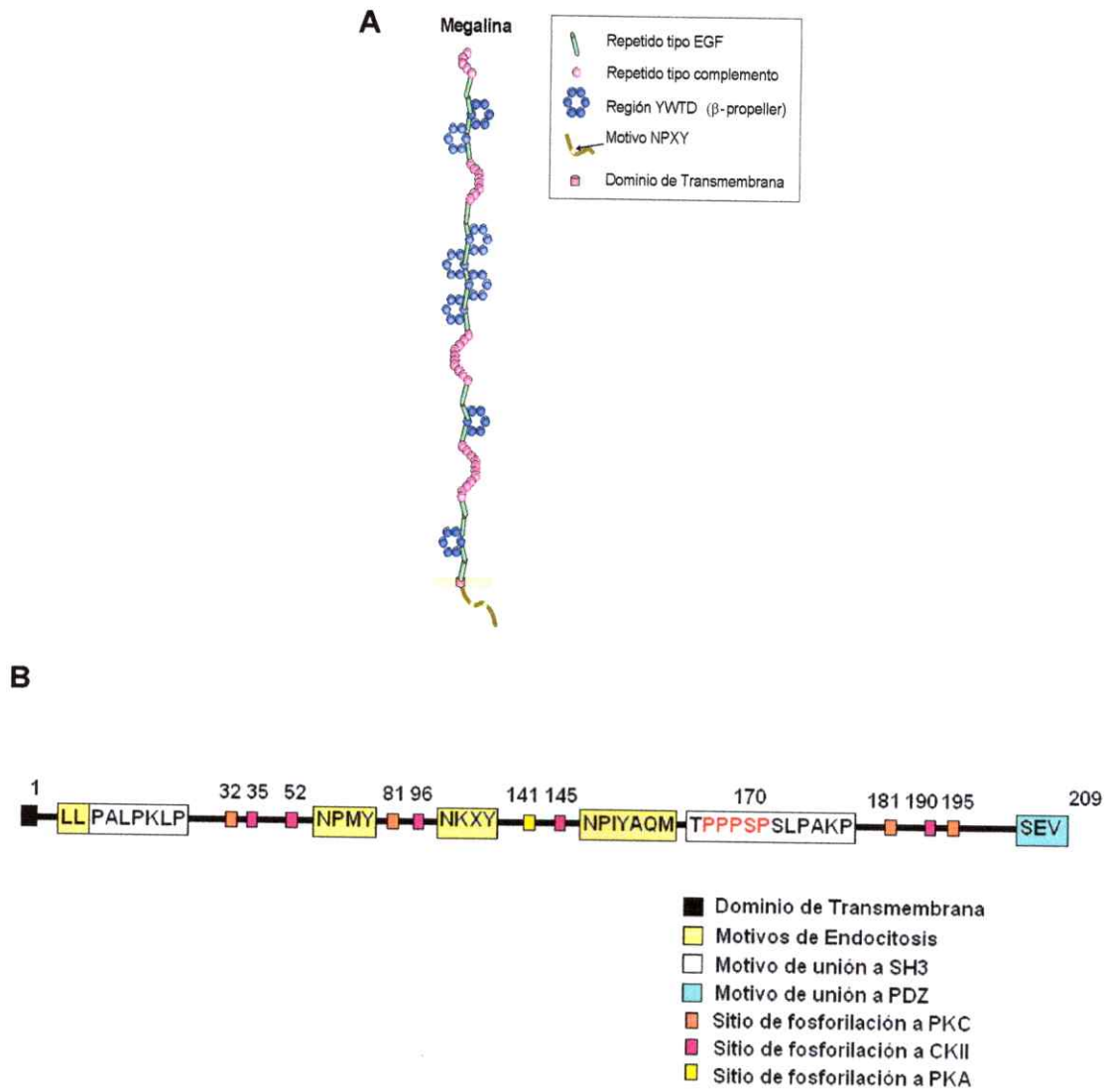


Figura 2. Esquema de la estructura de megalina y su dominio citosólico. A Estructuralmente megalina está constituido de cuatro dominios de unión a ligandos, un dominio de transmembrana y un dominio citosólico con motivos NPXY. **B** Esquema del dominio citosólico del receptor, donde se indican motivos de endocitosis y de unión de proteínas. Además de sitios putativos de fosforilación.

El transporte polarizado de megalina está determinado por información presente en su dominio citoplasmático (Marzolo y cols., 2003). En la membrana plasmática apical, el receptor se internaliza constitutivamente, mediante vesículas cubiertas por clatrina. Una vez en el endosoma megalina se disocia de sus ligandos y recicla a la membrana apical. Para alguno de sus ligandos, como tiroglobulina (Marino y cols., 2000) y *retinol binding protein* (Marino y cols., 2001), se ha visto que el receptor experimenta una ruta de transitosis apical- basolateral.

Se ha determinado que las funciones endocítica y de señalización de los miembros de la familia LDL son controlados por interacción con proteínas adaptadoras que reconocen motivos específicos dentro del dominio citoplasmático de estos receptores. Varias proteínas intracelulares se unen al dominio citosólico de megalina (May y cols., 2003a) incluyendo MAP quinasas, JIP-1 y JIP-2 (Gotthardt y cols., 2000), PSD95 (Larsson y cols., 2003) y proteínas adaptadoras como SEMCAP-1 (Gotthardt y cols., 2000), Dab2 (Oleinikov y cols., 2000) y ARH (Nagai y cols., 2003). Dab2 y ARH contienen dominios de unión a fosfotirosina (PTB), que reconocen motivos NPXY, cuando el residuo de tirosina no está fosforilado y se ha propuesto, que participan en la endocitosis y reciclaje del receptor (Maurer y Cooper 2005). En tejidos tales como en endodermo visceral, se ha demostrado que Dab2, esencial en el desarrollo embrionario, media la endocitosis de megalina junto con su co-receptor cubilina (Maurer y Cooper 2005). Sin embargo, se conoce poco del significado funcional de muchas de las interacciones entre megalina y estas proteínas citosólicas.

La fosforilación de proteínas también ha sido implicada en la regulación de diversos aspectos del tráfico intracelular de proteínas, como la endocitosis, transcitosis y cascadas de señalización. Se ha establecido que en el caso de miembros de la familia de LDL, el dominio citosólico de LRP1 es fosforilado. Sin embargo los estudios

realizados, no coinciden en si las quinasas que participan son las PKA o PKC α ni en si como consecuencia de esta fosforilación el receptor aumenta o disminuye la velocidad de internalización del receptor (Li y cols., 2001b, Ranganathan y cols., 2004). También, la unión de moléculas de señalización como PDGF resulta en la fosforilación de un residuo de tirosina del dominio citoplasmático de LRP1 y en el reclutamiento de src tirosinas quinasas (Boucher y cols., 2002). Otros miembros de la familia como los receptores ApoER2 y VLDLR, regulan la migración neuronal durante la embriogénesis por transducción de la señal de reelina a través de la membrana neuronal (Trommsdorff y cols., 1999). La unión de reelina al dominio extracelular de estos receptores, resulta en la fosforilación de una tirosina del adaptador Dab1 por la familia de Src quinasas (Hiesberger y cols., 1999). También LRP6, envuelto en la vía de señalización WNT canónica, es fosforilado por la quinasa glicógeno sintasa (GSK3) y caseína quinasa I (CKI) en respuesta a ligandos, en los motivos PPPSP presentes en el dominio citoplasmático del receptor (Tamai y cols., 2004).

Como se ilustra en la Figura 2 B, megalina posee en su dominio citosólico, numerosos motivos de interacción con proteínas y varios sitios de consenso de fosforilación, entre los que se encuentran sitios putativos para las quinasas PKA, PKC y CKII, además de un motivo PPPSP. Datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que el dominio citoplasmático de megalina es fuertemente fosforilado *in vivo* (Yuseff y col., 2007). Esto sugiere que la fosforilación es importante para la función del receptor y podría estar involucrada en diversos procesos tanto de su tráfico celular como en aspectos de señalización intracelular (Yuseff, 2005; Yuseff y col., 2007). En la tesis doctoral de María Isabel Yuseff se hicieron estudios con construcciones que contenían el dominio citosólico de megalina, con el fin de identificar los motivos que participan en la fosforilación del receptor. Se determinó que los sitios PKC, PKA y CKII no

contribuyen de manera importante en este proceso. Pero, al mutar la serina del motivo PPPSP por una alanina se encontró una disminución casi completa de la fosforilación, por lo que se pudo concluir que el motivo PPPSP es el motivo que determina la fosforilación de megalina (Yuseff, 2005; Yuseff y col., 2007). **En esta tesis se estudió la expresión de una mutante de fosforilación PPPAP del dominio citosólico de megalina, en el contexto de células de fenotipo polarizado MDCK, para evaluar si la fosforilación modula el tráfico del receptor**

Puesto que la fosforilación del motivo PPPSP en receptores LRP5/6 es dependiente de GSK3, es muy probable que esta quinasa también este involucrada en la fosforilación de megalina. Pocas enzimas ejercen una amplia influencia regulatoria sobre la función celular como GSK3. Tiene dos isoformas GSK3 α y GSK3 β , pero se sabe poco acerca de las funciones específicas para cada una. Se han reportado mas de 40 proteínas que son fosforiladas por esta quinasa, incluyendo más de una docena de factores de transcripción (Jope y Johnson 2004). La actividad de esta quinasa influencia la dinámica del citoesqueleto y arquitectura celular, procesos transduccionales y transcripcionales, desarrollo y muerte celular (Jope y Johnson 2004). Recientemente se ha descrito, que la interacción directa entre PKB y megalina actúa como sensor de la concentración de albúmina en las células del túbulo proximal del riñón, determinando por transducción de señales la sobrevivencia o muerte de estas células (Caruso-Neves y cols., 2006). PKB reduce la actividad de GSK3 al fosforilar la serina 9 en GSK3 β o la serina 21 en caso de GSK3 α (Jope y cols., 2004). Ya que, PKB es un regulador negativo de la actividad de GSK3 puede que estas quinasas actúen concertadamente para regular la actividad de megalina. **En esta tesis se evaluó si efectivamente GSK3 participa en la fosforilación del receptor.**

Megalina junto con LRP1 y LRP1 β son de los miembros de la familia de LDL, de mayor tamaño. Para facilitar el estudio de este receptor se generó un minireceptor de megalina que contiene el dominio cuatro de unión a ligandos con el dominio transmembrana y el dominio citosólico del receptor. Esta construcción podrá ser utilizada en otras áreas y no solo para los estudios de esta tesis. Junto con los estudios de tráfico y fosforilación del receptor, el desarrollo de esta construcción constituyó también un objetivo abordado en este trabajo.

Sobre la base de los antecedentes aportados por estudios realizados en nuestro laboratorio, respecto a que el motivo PPPSP es determinante en la fosforilación del receptor, que la fosforilación de LRP5/6 en estos mismos motivos PPP(S/T)P dependen de GSK3 y que esta modificación post-traducciona l podría modular el tráfico del receptor, como ocurre con LRP1 por otros sitios, nos planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis de trabajo:

El dominio citosólico de Megalina se fosforila en un proceso dependiente de GSK3 y esta modificación tiene un papel en el tráfico del receptor.

Objetivo general:

Evaluar como la fosforilación de megalina afecta su tráfico y el papel de GSK3 en este proceso.

Objetivos específicos:

- 1- Construir un minireceptor que contenga el cuarto dominio de unión a ligandos de megalina y su dominio citoplasmático nativo o mutado.
- 2- Expresar de forma estable y caracterizar funcionalmente esta construcción en células MDCK
- 3- Expresar mutantes de megalina en el motivo PPPSP y evaluar la fosforilación y, o tráfico de estos receptores en células de fenotipo polarizado MDCK.
- 4- Evaluar la participación de la quinasa GSK3 en la fosforilación de megalina.

II. MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

1.1- Bacterias:

Se uso la siguiente cepa de *Escherichia coli*:

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

1.2- Plasmidios:

Se utilizaron los siguientes vectores de expresión para células eucariontes:

pcDNA3: Obtenido de Invitrogen Corp., San Diego, USA.

pmLRP4lrptmMegT: Codifica para un minireceptor (m) que contiene el cuarto dominio de unión a ligandos de LRP1 (LRP4), dominio transmembrana de LRP1 (lrptm) y el dominio citosólico de megalina (MegT) (construido por la Dra. Marzolo).

pMegTS170A: Fue generado en nuestro laboratorio a partir del vector pmLRP4lrptmMegT. Por medio de mutagénesis sitio dirigida, se reemplazó una base del codon que codifica para la serina 170 del dominio citosólico de megalina, por otra base que codifica un codon de alanina.

pMegTMT (MegT0): Codifica para un minireceptor que contiene el dominio transmembrana y citosólico de megalina, fusionado a un epítotope HA. Fue donada por el Dr. Scott Argraves (Department of Cell Biology and Anatomy, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina, USA).

pGSK3 β : Codifica GSK3 β humana fusionada a un epítotope HA. Fue donada por el Dr. Xi-He (Neurobiology Program, Children's Hospital Boston, Department of Neurology).

1.3- Líneas Celulares:

CHO-K1: Línea celular de ovario de hámster, fue obtenida desde American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA 20108 USA.

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

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

1.4- Anticuerpos:

Los siguientes anticuerpos fueron obtenidos de Molecular Probes (Europe BV, Leiden, Netherlands) Anti-IgG de pollo conjugado a Alexa 594, Anti-IgG de conejo y ratón conjugado a Alexa 488 y Kit de marcación Zenon Alexa 488 ratón IgG_{2a}.

De Chemicon International (Temecula, CA, USA) se obtuvieron los Anticuerpos anti HA pollo y anti-IgG de ratón, de rata y de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Los Anticuerpos anti Ecadherina, anti actina y anti tubulina fueron obtenidos de Sigma (Sigma Chemical, St Louis MO, USA).

Anticuerpo anti β catenina fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA), Anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 de Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA) y Anti IgG de ratón conjugado a R-Phycoerythrin (RPE) de Dako, Denmark.

Anticuerpo anti HA obtenido de un sobrenadante del Hibridoma Babco (12CA5) fue obsequiado por el Dr. Guojun Bu.

En el laboratorio se generó un anticuerpo anti megalina (antiMegT) policlonal de conejo contra el dominio citosólico del receptor. Fue preparado como se describe en Marzolo y cols., 2003.

1.5- Oligonucleótidos:

Los oligonucleótidos utilizados para los clonamientos se sintetizaron a través de Gene Link (Hawthorne, NY, USA) e IDT: St Louis, MO USA.

1.6- Secuencias de oligonucleótidos:

A) Partidores para amplificar el epítipo HA y el péptido señal de LRP1, usando como templado el vector pmLRP4lrptmMegT.

Secuencias	Sitio de corte
5PS-HA: 5'GATC <u>ACCGG</u> TCAGCCCACACCATG3'	Agel
3PS-HA: 5'GATC <u>GTCGAC</u> AGCGTAGTCCGGGAC3'	Sall

B) Partidores para mutagénesis sitio dirigida del dominio citosólico de megalina.

Secuencias
5'S170A: 5' GACACCACCTCCAGCACCTTCGCTCC 3'
3'S170A: 5' GGAGCGAAGGTGCTGGAGGTGGTGTC 3'

Secuencias
5'S170D: 5' GACACCACCTCCAGACCCTTCGCTCC 3'
3'S170D: 5' GGAGCGAAGGGTCTGGAGGTGGTGTC 3'

1.7- Reactivos:

Las proteínas de fusión GST-RAP, GST-Dab2, GST-MegT, proteínas GST y RAP fueron generadas en nuestro laboratorio.

Los siguientes reactivos se adquirieron de GIBCO (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA): Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), Nutrient F-12 Ham (F-12 Ham), DMEM sin metionina y cisteína, DMEM sin Ca^{++} , DMEM sin fosfato, L-glutamina, penicilina, estreptomina, G418, tripsina-EDTA y Opti-MEM, azul de tripan. El suero fetal bovino (FBS) fue de Hyclone (South Logan, UT, USA).

El material de cultivo de células eucarióticas se obtuvo Corning Incorporated (Acton, MA USA).

De Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) se adquirió, los inhibidores de proteasas individuales (leupeptina, aprotinina, pepstatina A, antipaina), PMSF, SB216763, esferas de agarosa unidas a glutatión, acrilamida, bisacrilamida, Tween-20, persulfato de amonio, TEMED, gelatina, saponina, para-formaldehído, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, EDTA, Hepes, bicarbonato de sodio, acrilamida y reactivos del sistema ECL. LiCl se adquirió de Mallinckrodt, Chesterfield, UK. Los films y líquidos de revelado fueron obtenidos de Fuji. De Winkler (Santiago, Chile) se obtuvo Tris base, reactivo de Bradford, dodecil sulfato de sodio, albúmina de suero bovino, 2-mercaptoetanol y cloruro de sodio. Butirato de sodio, tunicamicina, ampicilina, kanamicina, azul de bromofenol y glicina.

De Merck se adquirieron: etanol, isopropanol, ácido tricloroacético, ácido acético glacial, metanol, cloroformo, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, acetona, alcohol isoamílico (IAA), ácido clorhídrico, DMSO, glicerol y glucosa.

De Pierce (Rockford, IL, USA) se obtuvo Biotina Sulfo-NHS-LC, esferas de agarosa unidas a estreptavidina y esferas de agarosa unidas a proteína A. El estándar de peso molecular preteñido para proteínas, DTT, bisacrilamida, Tritón X-100 de BIO-RAD (Hercules, CA, USA). La membrana de transferencia Immobilon-P fue obtenida de Millipore (Billerica, MA, USA). El cloruro de amonio fue de Fisher Scientific (New Jersey, USA). La lipofectamina 2000 fue adquirida a Invitrogen (CARLSBAD, California, USA). El NaI¹²⁵ y la metionina-cisteína [S³⁵] fueron comprados a NEN Life Science Products. El [³²P]-Ortofosfato fue obtenido de la comisión chilena de energía nuclear (Santiago, Chile).

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

RNAasa A y *Pfu* DNA polimerasa se obtuvieron de FermentasTM (Vilnius, Lithuania) y Taq DNA polimerasa de PromegaTM (Madison, WI, USA). En tanto que, T4 DNA Ligasa, Platinum Pfx DNA Polymerase, DNA ladder de 100pb, 1kb DNA plus y fago λ digerido con Hind III, fueron obtenidos de Life TechnologiesTM, (Rockville, MI, USA).

Las distintas enzimas de restricción se obtuvieron de FermentasTM (Vilnius, Lithuania), de PromegaTM, (Madison, WI, USA) y Life TechnologiesTM, (Rockville, MI, USA).

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

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

2- Métodos

2.1- Técnicas de Biología Molecular.

2.1.1- Clonamientos

2.1.1.1- Generación de minireceptor fusionado a epítipo HA: m-Meg4.

Para amplificar por PCR el fragmento que contiene el epítipo HA y el péptido señal de LRP1 fue utilizado el plasmidio pmLRP4lrptmMegT y los primer 5' PS-HA y 3' PS-HA descritos en la sección 1.6 A. La reacción de PCR fue de 10 ul de buffer de PCR 10x, 8 ul de MgSO₄ 25 mM, 2 ul de d-NTPs 10 mM, 400 ng de cada oligonucleótido, 720 ng de ADN templado, 0,7 ul de Pfu DNA polimerasa (2,5 U/ul) y H₂O libre de nucleasas para completar un volumen de 100 ul. El programa de amplificación utilizado fue: 5 min a 94°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 60°C y finalmente 7 min a 60°C. Luego, el plasmidio YFP-Meg4, fue digerido con las enzimas de restricción Agel y Sall. El fragmento que contiene el dominio cuatro de los motivos de unión a ligandos de megalina la zona yuxtamembrana, transmembrana y dominio citosólico de megalina fue ligado al fragmento generado por PCR. La reacción de ligación fue de: 8 ng de inserto, 90 ng de vector, 3 ul de buffer de ligación 5x, 1 ul de ligasa (1U/ul) y H₂O libre de nucleasas para completar el volumen de 15 ul finales. Esta reacción se dejó por 16 horas a 14 °C. El producto de ligación fue transformado a bacterias competentes. Las colonias crecidas fueron sometidas a minipreparación y el ADN plasmidial chequeado por análisis de restricción.

2.1.1.2- Mutagénesis sitio dirigida de bases que codifican para la serina del motivo PPPSP en el dominio citosólico de megalina de m-Meg4.

Mediante PCR se mutó una base del codon que codifica para la serina del motivo PPPSP del plasmidio m-Meg4, este procedimiento se uso tanto para generar m-Meg4PPPAP como m-Meg4PPDP. Fueron usados los partidores descritos en la sección 1.6 B. La reacción de PCR fue la siguiente: 10 ul de buffer de PCR 10x, 2 ul de $MgSO_4$ 25 mM, 1 ul de d-NTPs 10 mM, 125 ng de cada oligonucleótido, 50 ng de ADN templado, 0,8 ul de Pfx (2,5 U/ul) y H_2O libre de nucleasas para completar un volumen de 50 ul finales. El programa de amplificación utilizado fue: 30 seg a 95°C, 18 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 55°C y 14 min a 68°C y finalmente 7min a 68°C. Posteriormente el ADN fue digerido con 1 ul de la enzima DpnI por 1 hora a 37 °C. Luego el ADN fue precipitado con etanol 90 % y acetato de sodio 3M pH 4,8 y resuspendido en 10 ul finales con H_2O libre de nucleasas. Posteriormente se transformó bacterias competentes con el ADN, las cuales se plaquearon en placas de LB-agar kanamicina resistentes (50 $\mu g/ml$). Las colonias crecidas fueron sometidas a minipreparación por kit E.Z.N.A para purificar ADN y fueron chequeadas por secuenciación.

2.1.2- Purificación de fragmentos de ADN.

Para la purificación de fragmentos de ADN se utilizaron el kit E.Z.N.A GelExtraction según las indicaciones del producto y columnas de lana de vidrio. En este ultimo caso, el ADN a purificar se corrió en un gel de agarosa desde la cual, se extrajo la banda de interés. Luego, se colocó en una columna construida de la siguiente manera: se tomó un tubo de 0,5 ml y se perforó el fondo con una aguja.

Posteriormente se rellenó el interior con lana de vidrio y se colocó dentro de un tubo de 1,5 ml. La banda cortada desde el gel de agarosa se introdujo dentro del tubo de 0,5 ml. Luego se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto (5417R, Rotor F45-30-11 (Hamburg, Germany)). Se tomó el filtrado que quedó en el tubo de 1,5 ml y se precipitó con etanol. Finalmente el ADN se resuspendió en H₂O.

2.1.3- Obtención de bacterias competentes

Las bacterias competentes se obtuvieron mediante el método de CaCl₂ a partir de cepas de *E. coli* DH5 α . Primero fueron crecidas en 40 ml de medio LB (Luria Broth: NaCl 1,0%, peptona al 1,0% y extracto de levadura al 0,5%) hasta alcanzar la fase logarítmica, detectada por absorbancia a 600 nm. Luego, las células se centrifugaron a 5500 rpm (Sorvall, Rotor SS-34 (Ramsey, Minnesota, USA)) por 5 min y el pellet obtenido fue resuspendido suavemente en 4 ml de una solución de CaCl₂ 75 mM, se incubaron durante 30 min a 4° C. Las células fueron centrifugadas nuevamente a 2500 rpm por 5 min (Sorvall, Rotor SS-34), resuspendidas en 2 ml de CaCl₂ 75 mM con glicerol al 15 % y dejadas a 4°C toda la noche para aumentar la competencia de las células. Posteriormente fueron alicuotadas y guardadas a -80° C.

2.1.4- Transformación de bacterias

Las bacterias competentes fueron incubadas en hielo con 30 ng a 150 ng de ADN plasmidial por 30 min. La mezcla se sometió a un choque térmico por 2 min a 42° C y se resuspendió en 450 μ l de medio LB. Las bacterias se recuperaron con agitación

suave a 37° C y se sembraron en placas de LB-agar al 1,5% en presencia de ampicilina 100µg/ml o kanamicina 50 µg/ml. Se crecieron a 37° C por toda la noche.

2.1.5- Obtención del ADN plasmidial

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

a) Preparación en gran escala de ADN (Maxipreparación)

Las bacterias transformadas con el ADN plasmidial fueron crecidas en 250 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de kanamicina durante 16 horas con agitación constante. Luego, se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación a 5000 rpm (Sorvall, Rotor GSA) por 15 min a 4° C y se resuspendieron en 15 ml de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, pH 8,0). Después de lisar las bacterias en 20 ml de solución II (NaOH 0,2 N, SDS al 1,0 %), se agregaron 15 ml de solución III (Acetato de Potasio 3 M, Ácido acético 0,7 M) y se incubó la mezcla en hielo por 5 min. El precipitado se centrifugó a 5000 rpm (Sorvall, Rotor GSA) por 10 min y se recolectó el sobrenadante, desde donde se precipitaron los ácidos nucleicos con 0,6 volúmenes de isopropanol. Los ácidos nucleicos se separaron del sobrenadante mediante centrifugación a 10000 rpm (Sorvall, Rotor SS34) por 10 min a 4° C y se resuspendieron en 3 ml de TE pH 8 mas 3 ml de LiCl 5 M para precipitar selectivamente el ARN. El ARN fue separado de la muestra mediante centrifugación a 5200 rpm (Sorvall, Rotor SS34) por 10 min. Se recolectó el sobrenadante y el ADN fue precipitado con 1 volumen de isopropanol, centrifugado a 7700 rpm (Sorvall, Rotor SS34) por 10 min a 4° C y resuspendido en 500 µl de TE pH 8. La muestra con ADN fue tratada con RNAasa para eliminar restos de ARN y

precipitada nuevamente con 500 μ l de una solución de PEG al 13 % con NaCl 1,6 M, centrifugada a 14000 rpm (5417R, Rotor F45-30-11) y resuspendida en 400 μ l de TE pH 8. Las proteínas de la muestra fueron eliminadas mediante extracciones sucesivas con fenol saturado con Tris pH 8,0 y una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (proporción 50:49:1). Finalmente la muestra de ADN fue resuspendida en 200 μ l de agua libre de nucleasas.

b) Preparación en pequeña escala de ADN (minipreparación)

Se hizo de dos maneras, una en la cual se utilizó el kit E.Z.N.A de Omega BioTek™ según las indicaciones del producto y otra donde se uso un método clásico. En este último, las colonias de bacterias fueron crecidas en 3 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina o 50 μ g/ml de kanamicina durante 16 horas con agitación constante. Luego, 1,5 ml de bacterias se centrifugaron a 10000 rpm por 2 minutos (5417R, Rotor F45-30-11) en un tubo eppendorf y se resuspendieron en 100 μ l de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, pH 8,0), incubando por 5 minutos a T°A. Después se lisaron en 200 μ l de solución II (NaOH 0,2 N, SDS al 1,0 %) y luego se agregaron 150 μ l de solución III (Acetato de Potasio 3 M, Ácido acético 0,7 M), en ambos casos se dejó la mezcla 5 minutos en hielo. Después se centrifugó la muestra a 12000 rpm por 5 minutos (5417R, Rotor F45-30-11). Las proteínas se eliminan con una extracción de fenol:cloroformo (1:1). La muestra de ADN se precipita con etanol 90% y acetato de sodio 3 M pH 4,8. Luego, el pellet de ADN fue lavado con etanol al 70 % en agua y posteriormente se resuspendió en 30 μ l de H₂O libre de nucleasas.

2.1.6- Cuantificación del ADN plasmidial

Se cuantificó mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm y usando la siguiente equivalencia: $\text{Concentración}_{\text{ADN}} = A_{260} \times 50 \text{ ug/ml} \times \text{factor de dilución}$. La calidad del ADN se evaluó calculando la razón entre la absorbancia medida a 280 nm y la obtenida a 260 nm (método espectrofotométrico).

2.1.7- Análisis del ADN plasmidial

El ADN se analizó mediante digestión con enzimas de restricción. Distintas alícuotas de ADN plasmidial se incubaron con 0,5-1 U de cada enzima de restricción y en presencia del buffer correspondiente para cada enzima, según las especificaciones del proveedor. Cada reacción fue incubada al menos 2 horas a 37° C y los productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%-1,0%.

2.2- **Técnicas de Biología Celular**

2.2.1- Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares CHO-K1, BN y MDCK se incubaron en 5 % CO₂ y 37° C. Las células CHO-K1 se crecieron en medio F12-Ham con 10% de suero fetal. Las células BN y MDCK se cultivaron en medio DMEM con 7,5 % suero fetal. Todos los medios fueron suplementados con penicilina/estreptomicina y con G418 0,4 mg/ml sólo para las líneas celulares transfectadas establemente.

2.2.2- Transfección de células

Las distintas líneas celulares se transfectaron utilizando 5 µg de DNA con Lipofectamina 2000 (GIBCO, BRL), como se describe en el protocolo del producto. Se seleccionaron colonias de células estables por su resistencia al antibiótico G418 a una concentración de 0,8 mg/ml. La expresión de las proteínas de interés se siguió por inmunoblot, inmunoprecipitación de células marcadas metabólicamente con ³⁵S Metionina/Cisteína o IF.

2.2.3- Inmunoblot

Las células fueron lisadas en tampón de lisis: tampón fosfato salino (NaCl 150 mM, Fosfato PBS) con Tritón X-100 1% e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Leupetin 50 µM, Pepstatin 1 µM y antipain 1 µM) a 4° C por 1 hora. Las proteínas de los lisados celulares fueron separadas por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y posteriormente transferidas a una membrana de "polyvinylidene difluoride (PVDF)". Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo primario. Los anticuerpos fueron incubados en tampón PBS con 3 % o 5 % de leche y Tween-20 al 0,05% o 0,1 % según el tipo de anticuerpo. Después de lavar 3 veces por 10 o 5 min, las membranas fueron incubadas con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) dirigido contra inmunoglobulinas de ratón, conejo o rata dependiendo del primer anticuerpo usado.

2.2.4- Pull Down GST.

Se prepararon extractos celulares lisando las células con tampón de *Pull Down* (Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Glicerol 10% v/v, Tritón X-100 0,1% v/v). Se

incubaron cantidades equivalentes de proteínas del extracto celular (0,5-1 mg) con la proteína de fusión GST-RAP o GST-Dab2 o GST-MegT, previamente unida a esferas de agarosa unidas a glutatión por 16 horas a 4°C o 4 horas, en el caso de GST-MegT. Las esferas se lavaron 4 veces en tampón de *pull down*, se hirvieron en tampón de carga y se separaron por *SDS-PAGE*. Un inmunoblot se desarrolló para detectar proteínas que interactúen con RAP o Dab2 o el dominio citosólico de megalina, MegT. En todos los experimentos se incluyó como control un *pull down* con cantidad equimolar de GST.

2.2.5- Fraccionamiento

Las células MDCK y BN fueron cultivadas en placas de 100 mm hasta 70% de confluencia. Una vez en este punto, fueron recolectadas con un *scraper* en 800 ul de tampón A (Tris 10 mM, pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂, KCl 10 mM, DTT 10 mM e inhibidores de proteasas) a 4 °C y se incubaron por 30 minutos en hielo. Luego, las células se pasaron suavemente por una jeringa G29 10 veces para después centrifugar a 700xg por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó a 100000xg en un rotor TFT 45,6 ángulo fijo (Beckmann), centrifuga Sorvall por 1 hora a 4 °C. Aquí se obtuvo el sobrenadante (fracción citosólica) y un pellet de membranas (fracción membrana) el cual se lava suavemente con 300 ul de tampón A y se resuspende en 100 ul de tampón C (Tris HCl 20 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM, TX-100 0,1%, NaCl 0,15 mM e inhibidores de proteasas). Las proteínas citosólicas fueron precipitadas con metanol/cloroformo (1:1) y los pellet de proteínas resuspendidos en 100 ul de tampón C. Las muestras fueron analizadas por inmunoblot.

2.2.6- Biotinilación selectiva de proteínas

Las células epiteliales que expresan las diferentes construcciones se cultivaron en filtros de policarbonato en cámaras Transwell. La confluencia fue seguida midiendo la resistencia transepitelial. Las células se biotinilaron de manera selectiva por el lado apical o basolateral, incubándolas con 0,5 mg/ml de biotina por 1 hora a 4° C. Después, las células se lavaron tres veces con PBS frío y la biotina libre se apagó por incubación con NH₄Cl 50 mM por 10 min dos veces. Las células se lisaron en tampón SA frío (Tris 20mM pH 8,0, NaCl 150mM, EDTA 5mM, BSA 0,2%, Tritón X-100 1% e inhibidores de proteasas). Las proteínas biotiniladas, de superficie celular, se incubaron con esferas de agarosa unidas a estreptavidina por 16 horas a 4°C. Posteriormente, las esferas se lavaron en forma sucesiva con las siguientes soluciones: HA mix (PBS, CaCl₂ 0,5 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA 0,5%, Tritón X-100 1%, SDS 0,1%), TPII (Tris pH 8,0 20mM, NaCl 150mM, EDTA pH 8,0 5mM, BSA 0,2%, SDS 0,1%), TPIII (Tris pH 8,0 20mM, NaCl 150mM, EDTA pH 8,0 5mM, BSA 0,2%) y Tris pH 8,0 50 mM. Las muestras se analizaron por inmunoblot.

2.2.7- Preparación de tubos iodogen para iodinación de proteínas.

Fue preparada una solución de Iodogen en cloroformo a una concentración de 1 mg/ml. Se colocaron 10 µl de la solución en un tubo y se secó con flujo de nitrógeno suave. Los tubos deben ser guardados en un desecador.

2.2.8- Iodinación de proteínas

Se preparó una solución de 50 µg de proteína a iodinar (RAP), 2 mCi de Na¹²⁵I y se llevó a un volumen final de 100 µl con tampón fosfato pH 7,5. Se agregó la

solución a un tubo Iodogen y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Luego se pasó la solución por una columna PD-10, previamente ambientada con PBS 0,01 % de Tween-20. Se colectaron 10 fracciones de 1 ml cada una. Se detectó la radiación γ emitida en un contador de partículas Gamma (Perkin Elmer, Life Sciences). Generalmente la proteína iodada aparece entre las fracciones 3-5. La proteína iodada fue guardada a 4°C y se utilizó durante los 5 días siguientes a su iodación.

2.2.9- Estudios de endocitosis: Medición de la velocidad inicial de internalización de megalina y de los minireceptores.

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

2.2.10- Ensayo de unión de radioligando a 4 °C

El procedimiento es similar al indicado para el ensayo de endocitosis, excepto porque las células se incubaron por 1 hora con ^{125}I -RAP 5 nM a 4° C (0,5 ml/pocillo) y no se realiza internalización a distintos tiempos. Luego de los lavados, se disocia el ligando unido con una solución ácida (ácido acético 0,2 M, pH 2,6, NaCl 0,1 M), la cual fue recolectada para medir en un contador gamma. Cada ensayo se hizo dos veces por triplicado. Las diferencias observadas entre las distintas células fueron valoradas estadísticamente mediante la aplicación del test *t-Student* utilizando el programa de análisis estadístico Sigma Plot 8.0.

2.2.11- Estudios de fosforilación *in vivo*

Células BN, que expresan megalina, o células MDCK, transfectadas en forma estable, se sembraron el día anterior en placas de 6 pocillos. Luego, se marcaron en paralelo con ^{35}S -metionina/cisteína o ^{32}P -Ortofosfato. Para ello, primero las células se lavaron con medio libre de metionina/cisteína o con medio libre de fosfato y posteriormente se marcaron con 200 μCi de ^{35}S -metionina/cisteína durante 4 horas o con 200 μCi ^{32}P -Ortofosfato, durante 2 horas a 37° C. Después de lavar 3 veces con PBS, las células se lisaron en PBS, TX-100 1% en presencia de inhibidores de fosfatasas (glicerolfosfato 1 mM, ortovanadato 1 mM y NaF 5 mM) y de proteasas (PMSF 1 mM, Pepstatin 1 μM , Antipain 1 μM y Leupeptin 50 μM) a 4 ° C durante 1 hora. Finalmente, los minireceptores se inmunoprecipitaron con un anticuerpo que reconoce el dominio citosólico de megalina. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por SDS-PAGE y se revelaron mediante autoradiografía. Las bandas fueron cuantificadas usando el programa Image J 1.34s.

2.2.12- Uso de inhibidores

El LiCl se usó a una concentración de 50 mM por 4 horas a 37° C en medio libre de suero. Los controles negativos se hicieron en presencia de NaCl 50mM. El stock de SB216763 se preparó a una concentración de 30 mM y se usó a una concentración de 30 μ M por 12 horas a 37°C en medio 3 % suero. Los controles negativos se hicieron en presencia de DMSO.

2.2.13- Localización de proteínas por inmunofluorescencia

Las células MDCK se crecieron en cubreobjetos hasta alcanzar confluencia y se lavaron con PBSc (PBS MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 0,1 mM) antes de fijarlas con paraformaldehído al 2 %, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PBSc y en algunos casos se permeabilizaron mediante la incubación con TX-100 al 0,2 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, las muestras se bloquearon con PBS-gelatina al 0,2 %, se incubaron con el primer anticuerpo durante 30 minutos a 37 °C y se lavaron suavemente con PBS. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo secundario (conjugado con un fluoróforo) en las mismas condiciones que el primer anticuerpo, se lavaron con PBS y agua destilada y se montaron con gelvatol en un portaobjetos. Las muestras se secaron a 65 °C por 25 minutos y se observaron a través de un microscopio de fluorescencia.

2.2.14- Análisis de la expresión de minireceptores por citometría de flujo

Células MDCK y BN fueron resuspendidas, mediante una incubación previa con una solución de disociación no-enzimática, PBS-EDTA. Para analizar la expresión de los receptores en la superficie celular, la mitad de células en PBS, provenientes de una placa de 100 con 70% de confluencia, se incubaron sucesivamente con un primer anticuerpo y segundo anticuerpo conjugado con un fluoróforo. En paralelo la otra mitad de células fueron permeabilizadas con PBS saponina 0,1 % ó 0,05 % en caso de células BN e incubadas con los anticuerpos bajo las mismas condiciones ya descritas, para cuantificar la expresión total de los minireceptores en cada línea celular. La fluorescencia inespecífica fue medida en una muestra en ausencia de un anticuerpo primario. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCAN Becton Dickinson (Franklin Lakes NJ, USA). Cada ensayo se hizo dos veces por duplicado. Las diferencias observadas entre las distintas células fueron valoradas estadísticamente mediante la aplicación del test *t-Student* utilizando el programa de análisis estadístico Sigma Plot 8.0.

2.2.15- Ensayo de reciclaje en células MDCK

Las células MDCK que expresan establemente los minireceptores se plaquearon a una densidad de 300 mil por pocillo de placa de 12. El día del ensayo las células se incubaron con alexa 488 conjugado con anticuerpo anti-HA (Kit de marcación Zenon Alexa 488 ratón IgG_{2a}) por 20 minutos a 37°C. Luego de remover del medio el anticuerpo fluorescente, las células fueron incubadas a 37°C por distintos tiempos en la ausencia o presencia de 24 ug/ml de anticuerpo anti-Alexa 488 IgG. Al finalizar cada incubación las células fueron colocadas en hielo y removidas con PBS-

EDTA. Posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo. El porcentaje de fluorescencia de cada tiempo fue calculado como la diferencia de fluorescencia entre el tiempo cero y los distintos tiempos de caza. Cada ensayo se realizó dos veces por triplicado. Las diferencias observadas entre los distintos clones fueron valoradas estadísticamente mediante la aplicación del test *t-Student* utilizando el programa de análisis estadístico Sigma Plot 8.0.

III.- RESULTADOS

En este trabajo se evaluó el papel de la fosforilación de megalina en el tráfico del receptor así como las quinasas involucradas en esta modificación. Para esto y dado que por el tamaño de megalina algunos de los estudios no se pueden realizar con el receptor completo, se generó una construcción derivada de megalina y además se utilizaron otras generadas en el laboratorio. El tráfico de los minireceptores, expresados en células epiteliales MDCK fue evaluado por varias técnicas como biotilación de superficie, citometría de flujo, unión de radioligando a 4° C, endocitosis y reciclaje. En tanto, los estudios de fosforilación fueron realizados *in vivo* y en ausencia de ligando en células MDCK expresando los minireceptores y células BN de saco vitelino de rata, que expresan megalina en forma endógena.

1- Generación del minireceptor de megalina m-Meg4

Durante la elaboración de esta tesis se generaron minireceptores de megalina que contienen los dominios uno, dos y cuatro de unión a ligandos del receptor. Uno de estos minireceptores, YFP-Meg4 posee el dominio cuatro de unión a ligandos, el transmembrana y el dominio citosólico de megalina, además de la proteína fluorescente amarilla. Se decidió generar una variante de YFP-Meg4, en el cual, YFP fue reemplazado en el mismo plasmidio, por el epítoto HA, puesto que nuestro laboratorio cuenta con las herramientas necesarias para la detección del epítoto HA (Figura 3 A).

El plasmidio YFP-Meg4 fue digerido con las enzimas de restricción AgeI y Sall liberando fragmentos de 7501 pb, 769 pb y 133 pb. El fragmento de 7501 pb, contiene el dominio 4 de unión a ligandos, transmembrana y dominio citosólico de megalina. Este fragmento fue ligado con otro proveniente de un PCR, de 117 pb de tamaño, amplificado a partir de mLRP4lrptmMegT, contiene el péptido señal de LRP1 y el epítoto HA. El ADN ligado fue transformado en bacterias DH5 α competentes, de las cuales se obtuvieron 5 colonias positivas (Figura 3 B). La colonia 2 fue chequeada por análisis de restricción. Las enzimas utilizadas Sall, HindIII y PstI liberan los fragmentos esperados (Figura 3 C).

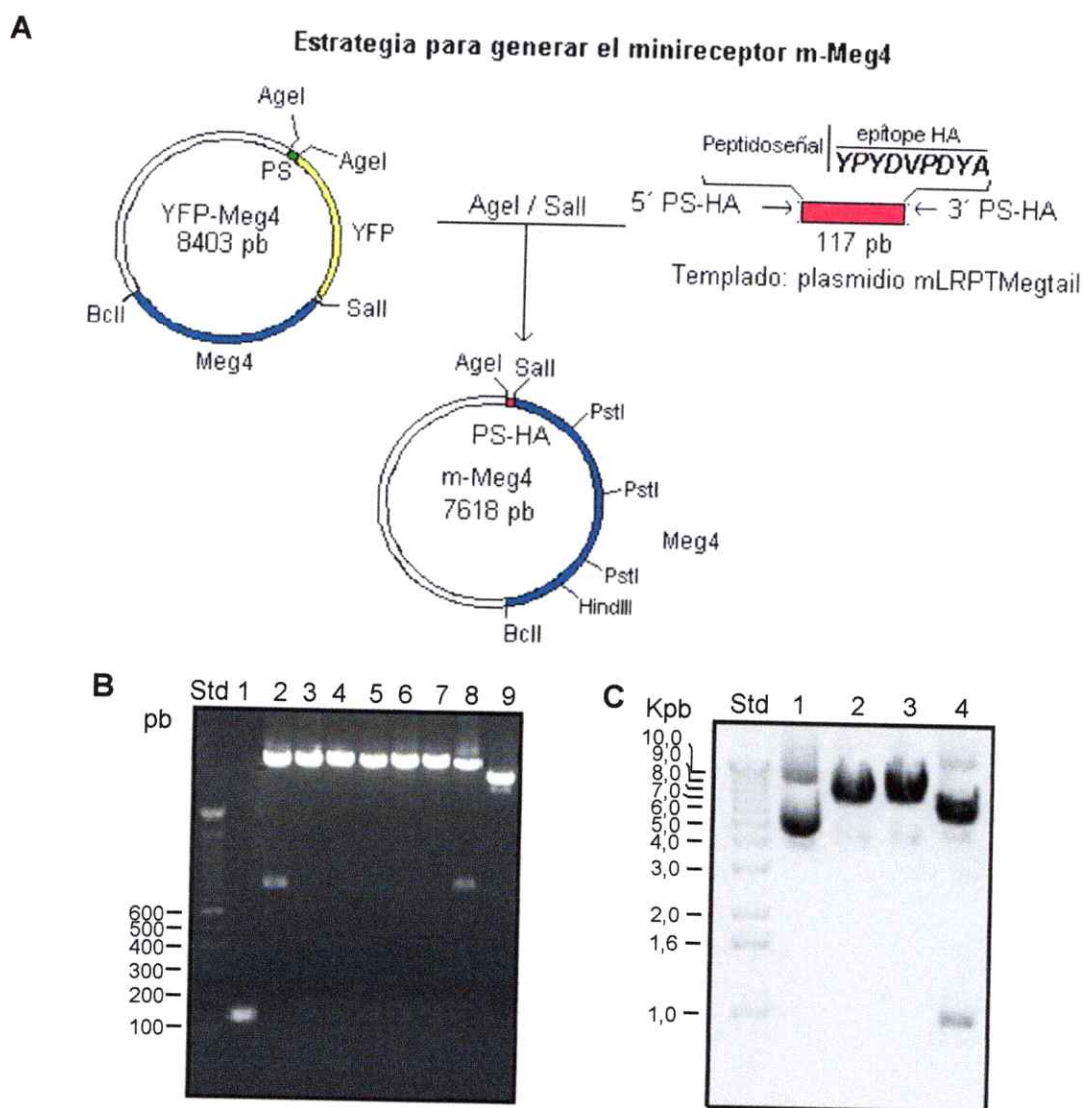


Figura 3. Generación del vector m-Meg4. En **A)** Representación esquemática del clonamiento de m-Meg4. El vector YFP-Meg4 es digerido con las enzimas de restricción Agel y Sall, para luego ligarlo a un fragmento de PCR de 117 pb, que codifica para el péptido señal de LRP y el epítipo HA. En **B)** se observa la digestión de ADN plasmidial de bacterias resistentes a kanamicina en un gel de agarosa al 1 %. Carril 1, control positivo del fragmento de 117 pb, carriles 2-9 distintos clones. Los clones 2, 3, 4, 5, 6 son positivos (carriles 3, 4, 5, 6 y 7), en tanto, los clones 1, 7 y 8 (carriles 2, 8 y 9) son negativos o tienen bandas extras. **C)** El clon 2 fue analizado con enzimas de restricción, la digestión con Sall y HindIII lineariza el vector observándose una banda de 7618 pb (carriles 2 y 3 respectivamente), en tanto que PstI liberó bandas de 5719 pb, 948 pb y 951 pb estas dos últimas no se resuelven bien en el gel, por tanto se ven como una sola banda (carril 4). El carril 1 es ADN sin digerir.

1.1- Generación de una mutante puntual en el motivo PPPSP del dominio citosólico de megalina en m-Meg4.

El motivo PPPSP del dominio citosólico de megalina es determinante en la fosforilación de esta proteína. Uno de los objetivos de esta tesis es caracterizar la función y tráfico del receptor al mutar la serina de este motivo por una alanina. En este contexto usando como templado el plasmidio m-Meg4 y los partidores señalados en la sección 1.6 B de Materiales y Métodos, se hizo mutagénesis sitio dirigida para obtener una mutante puntual, m-Meg4PPPAP, el cual fue revisado por secuenciación.

Tanto m-Meg4 como m-Meg4PPPAP fueron analizados por secuenciación y cortes con enzimas de restricción. En el paso siguiente, se generaron líneas celulares estables con m-Meg4 evaluándose, posteriormente su expresión a nivel de proteína. La mutante m-Meg4PPPAP se analiza en la tercera parte de resultados.

2- Expresión del minireceptor m-Meg4 en células MDCK: generación de línea estable.

El minireceptor de megalina, se transfectó establemente en células MDCK, línea celular epitelial polarizada, derivada de riñón de perro, modelo para estudiar el tráfico de megalina que normalmente está en la cara apical de las células epiteliales. Se determinó su nivel de expresión, localización en la superficie celular y de manera indirecta, un plegamiento correcto. Con este fin, se utilizan técnicas de inmunoblot, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia y *pull-down*.

2.1- Expresión de m-Meg4 detectada por inmunoblot e inmunoprecipitación

Tanto por inmunoblot como por inmunoprecipitación se observa la expresión del minireceptor m-Meg4 como una banda de aproximadamente 200 kDa en células MDCK (Figura 4 A). La inmunoprecipitación se realizó a partir de células marcadas metabólicamente con metionina/cisteína-³⁵S por 4 horas. Posteriormente las células se lisaron y la proteína de interés se inmunoprecipitó utilizando anticuerpo anti-MegT, que permite detectar a las proteínas por su dominio citoplasmático. Estos resultados, indican que el minireceptor tiene un buen nivel de expresión en células. Además no se detectan otros fragmentos, los cuales podrían ser producto de la degradación del minireceptor

2.2- Expresión de m-Meg4 detectada por *Pull-Down*

Para este ensayo se usaron las proteínas de fusión GST-RAP y GST-Dab2. Dab2 es una proteína adaptadora que se une al dominio citosólico de megalina (Maurer y cooper 2005). RAP es una proteína chaperona de los receptores de la familia de LDL, que se une a los dominios de unión a ligandos del extremo extracelular (Bu y Marzolo 2000). Ha sido ampliamente usado como ligando en los estudios de los receptores de esta familia. La interacción del minireceptor con estas proteínas de fusión indicaría indirectamente, si hay o no plegamiento de este en los dominios extra e intracelulares. Los resultados muestran que el minireceptor m-Meg4 se plegó correctamente, ya que pudo ser precipitado de extractos celulares, en células MDCK, usando tanto GST-RAP como GST-Dab2. (Figura 4 B).

2.3- Expresión y localización de m-Meg4 detectada por inmunofluorescencia indirecta

Mediante inmunofluorescencia indirecta fue posible detectar la construcción expresada en las células MDCK. El minireceptor m-Meg4, detectado con anticuerpo anti-HA, llegó a la superficie de la célula y pudo distinguirse un patrón apical, concordante con lo visto para la megalina endógena (Marzolo y cols. 2003) (Figura 4 C). Este resultado indica que el minireceptor se localiza en el sitio esperado y no es retenido en ningún compartimento interno.

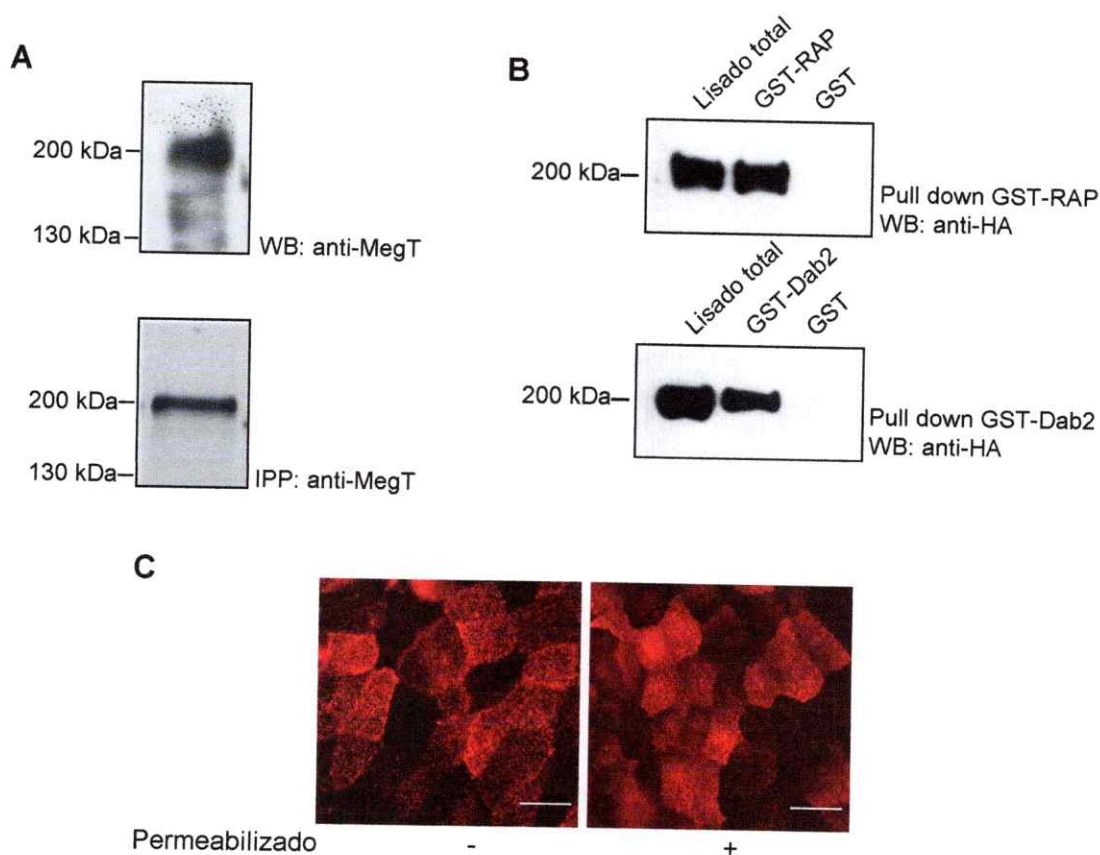


Figura 4. Análisis de expresión del minireceptor m-Meg4 en células MDCK. A) Inmunoblot de extractos celulares usando un anticuerpo anti-MegT e inmunoprecipitación de células transfectadas con el minireceptor marcadas con metionina/cisteína-³⁵S por 4 horas. Las proteínas fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-MegT. En ambos casos las muestras fueron separadas mediante SDS-PAGE 6 %. **B)** Células MDCK expresando establemente m-Meg4 fueron cultivadas en placas de 100 mm y los extractos celulares incubados con las proteínas de fusión GST-RAP o GST-Dab2 por 16 horas a 4°C. Posteriormente, las proteínas unidas a la resina conteniendo GST con RAP o Dab2 se separaron por SDS-PAGE y fueron analizadas por inmunoblots con anticuerpo anti-HA. En el experimento se incluyó un control con GST. Se observó interacción de proteínas. **C)** Células que expresan m-Meg4, fueron cultivadas en portaobjetos hasta confluencia y fijadas con paraformaldehído 2%. Las proteínas fueron detectadas usando un anticuerpo anti-HA y un segundo anticuerpo anti-ratón cy3 (rojo). Los resultados muestran que el minireceptor m-Meg4 expresado en células MDCK llega a la superficie celular. Inclusive se observa un patrón apical. Las barras equivalen a 10 μ m.

Los resultados obtenidos indican que el minireceptor m-Meg4 se expresa adecuadamente en células MDCK. Por tanto, en los estudios posteriores de función y tráfico de la siguiente etapa, se utilizó esta construcción.

3. - Estudios de fosforilación de megalina: posible papel en tráfico celular

El estudio de la fosforilación de megalina es un tema que ha sido abordado por nuestro laboratorio con anterioridad a esta tesis y ha sido recientemente publicado (Yuseff y col., 2007). Algunos de estos estudios fueron realizados durante la tesis doctoral de la Dra. María Isabel Yuseff. Los principales resultados obtenidos, indican que megalina se fosforila en forma importante *in vivo* y que los sitios putativos de fosforilación para PKA, PKC y CKII del dominio citosólico no participan de forma importante en este proceso. Se estableció que un residuo de serina presente en el motivo del tipo PPPSP del dominio citosólico de megalina es determinante en la fosforilación del receptor.

En esta tesis a diferencia de los estudios anteriores, se evaluó la fosforilación de la mutante PPPAP en el contexto de células de fenotipo polarizado MDCK, contexto celular donde principalmente se expresa megalina y se determinó si GSK3 al igual que en los receptores LRP5/6 participa en la fosforilación del receptor (Zeng y cols. 2005).

Para realizar los estudios de fosforilación y de tráfico de megalina, se utilizaron dos minireceptores que contienen el dominio citoplasmático de megalina, m-LRP4MegTPPPAP, que ya fue usado en los estudios previos a esta tesis y m-Meg4TPPPAP generado a partir de m-Meg4 por medio de mutagénesis sitio dirigida. El minireceptor mLRP4MegTPPPAP fue generado a partir de mLRP4lrptmMegT, también por medio de mutagénesis sitio dirigida en el dominio citosólico de megalina.

mLRP4lrptmMegT ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio y validado como una herramienta útil para el estudio del tráfico de megalina (Marzolo y cols., 2003). Las células transfectadas que expresan este minireceptor se denominan mLRP4MegT. Esta proteína contiene como ectodominio el cuarto dominio de unión a ligandos de LRP1, el dominio de transmembrana de LRP1 y el dominio citosólico de megalina (Figura 5). El ectodominio es procesado por furina, por tanto, al transitar por la zona trans del aparato de Golgi es procesado por esta enzima generando dos productos que quedan unidos no covalentemente, uno de 120 kDa que contiene el ectodominio y otro de 97 kDa que posee el dominio de transmembrana y citosólico del receptor. En estos minireceptores m-LRP4MegT y m-LRP4MegTPPPAP el fragmento de 97 kDa, que contiene el dominio citoplasmático de megalina, experimenta fosforilación, indicando que el proceso probablemente ocurre en o después que el receptor ha pasado por la red trans Golgi, donde ocurre el procesamiento por furina (Yuseff, 2005).

m-Meg4 está formado por el cuarto dominio de unión a ligandos de megalina, el dominio de transmembrana y dominio citosólico del receptor (Figura 5). En su estructura es un minireceptor más parecido a megalina de lo que es m-LRP4MegT. La proteína m-Meg4, no se procesa por furina y por tanto, el minireceptor completo es fosforilado. Antes de comenzar los estudios se generaron líneas estables en células MDCK que expresan MegTPPPAP y m-Meg4PPPAP.

3.1- Evaluación de la expresión de MegTPPPAP y m-Meg4PPPAP en células MDCK.

Con el propósito de estudiar la fosforilación de megalina y su probable papel en el tráfico del receptor, se generaron líneas estables en células MDCK que expresen los minireceptores m-LRP4MegTPPPAP y m-Meg4PPPAP. Por medio de inmunoblot se observan las bandas de proteínas de 120 kDa y 97 kDa de m-LRP4MegT y m-LRP4MegTPPPAP generadas luego del corte por furina junto con las bandas de proteínas de 220 kDa correspondientes al precursor de cada minireceptor mutante o nativo sin procesar. En el caso de m-Meg4 y m-Meg4PPPAP se observan en ambos casos bandas de proteínas de 200 kDa en las células MDCK (Figura 6). El resultado del inmunoblot indica que ambos minireceptores mutantes se expresan adecuadamente en las células y con el tamaño de bandas esperado, respecto a los minireceptores nativos correspondientes. En la siguiente etapa se analizó el comportamiento de las mutantes de fosforilación en un ensayo de fosforilación *in vivo* en las células MDCK.

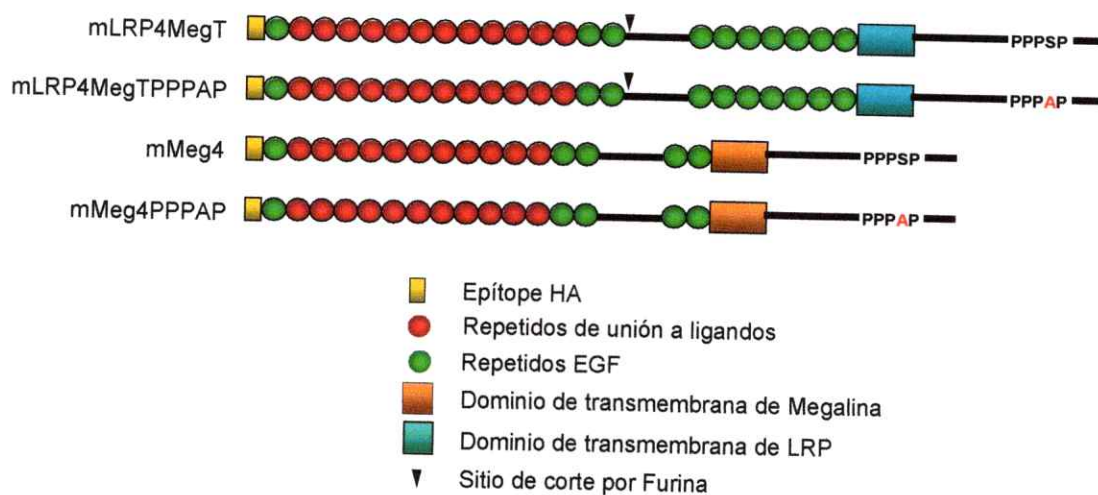


Figura 5. Esquema de minireceptores de Megalina. El minireceptor mLRP4MegT esta formado por el cuarto dominio de unión a ligandos y el dominio de transmembrana de LRP1, fusionado al dominio citosólico de megalina. En tanto, mMeg4 esta formado por el cuarto dominio de unión a ligandos, dominio de transmembrana y dominio citosólico de megalina. Ambas construcciones poseen el epítipo HA. Las variantes mLRP4MegTPPPAP y mMeg4PPPAP tienen reemplazada la serina del motivo PPPSP del dominio citosólico de megalina por una alanina.

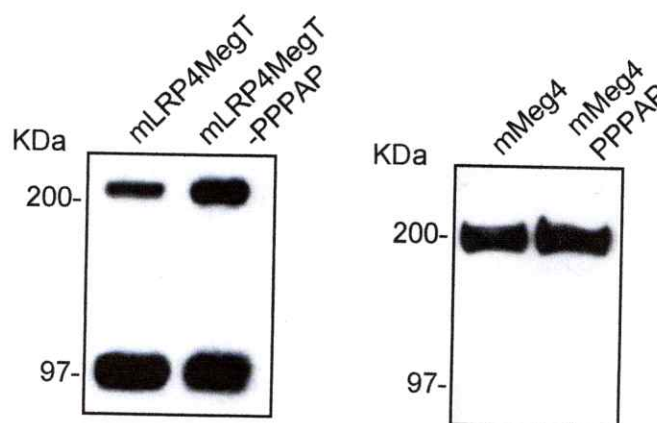


Figura 6. Expresión de m-LRP4MegTPPPAP y m-Meg4TPPPAP en células MDCK. Se obtuvieron extractos celulares mediante lisis celular y se analizaron las proteínas de interés, resolviéndolas en SDS PAGE al 6%. Los minireceptores fueron detectados por inmunoblot usando un anticuerpo anti-HA. Ambas minireceptores mutantes se expresan adecuadamente en las células y con un tamaño de bandas de proteínas similar a los minireceptores nativos respectivos.

3.2- Estudios de fosforilación de megalina en células MDCK

Células MDCK que expresan la mutante m-LRP4MegTPPPAP y la mutante m-Meg4PPPAP, fueron usadas para ensayos de fosforilación *in vivo*. Ambas mutantes mostraron una significativa disminución en el nivel de fosforilación de un 60% en caso de m-LRP4MegTPPPAP (Figura 7 A, B) y 90% en caso de m-Meg4PPPAP (Figura 7 C, D), confirmando los datos previos que indican que la serina del motivo PPPSP determina la fosforilación de megalina y sugiere que podría constituir un sitio de fosforilación del receptor.

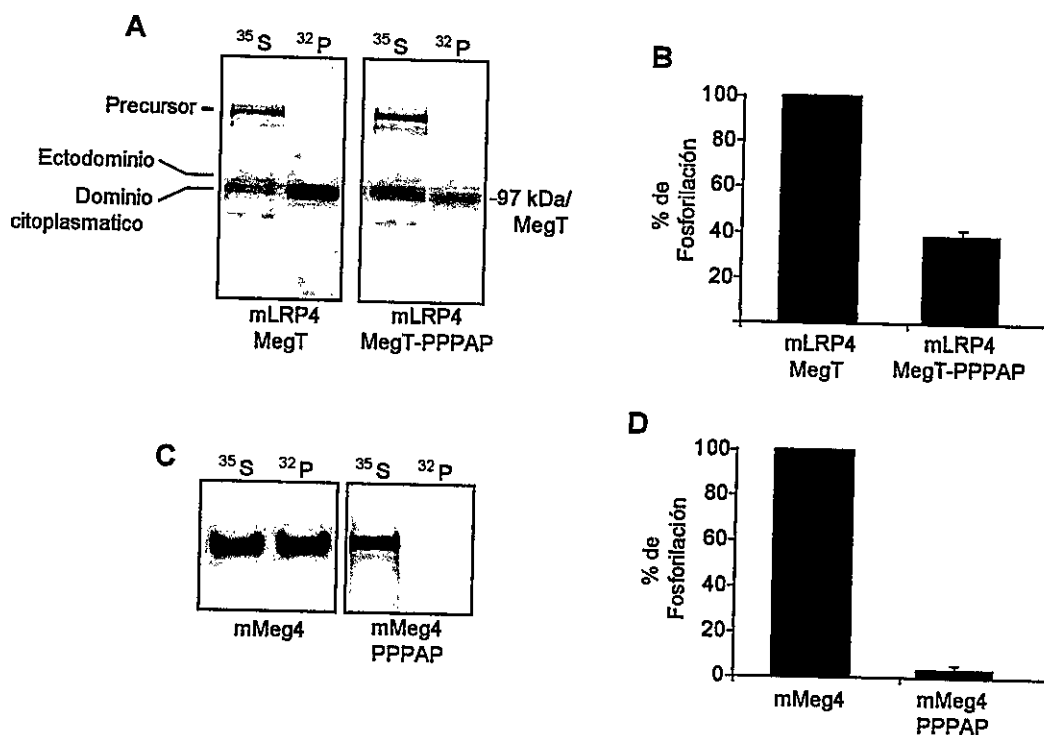


Figura 7. Fosforilación de los minireceptores m-LRP4MegT-PPPAP y m-Meg4-PPPAP en células MDCK. A Células MDCK expresando m-LRP4MegT o m-LRP4MegT-PPPAP y C Células MDCK expresando m-Meg4 o m-Meg4-PPPAP se marcaron metabólicamente con ³⁵S-metionina/cisteína por 4 horas o con ³²P-ortofosfato por 2 horas. Luego, las células se lisaron y los minireceptores se inmunoprecipitaron usando un anticuerpo anti-MegT. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por SDS-PAGE 6% y autoradiografía. B y D cuantificación de las proteínas marcadas muestran que la mutación del residuo serina dentro del motivo PPPSP disminuye significativamente el grado de fosforilación en ambos minireceptores.

3.3- Evaluación de la participación de GSK3 en la fosforilación de megalina

Estudios previos de nuestro laboratorio han indagado en la participación de distintas quinasas en la fosforilación de megalina, pero sobre la base de los sitios consenso para las quinasas PKA, PKC y CKII. Puesto que el motivo PPPSP es un sitio consenso para GSK3 (Zeng y cols. 2005) se evaluó la fosforilación del receptor en presencia de LiCl un inhibidor de esta quinasa (Jope, 2004). Como control de una efectiva inhibición de GSK3 por LiCl se verificaron los niveles citosólicos de β catenina. Esta proteína, esencial en la vía de señalización Wnt, es sustrato de GSK3. En la ausencia de ligando Wnt, la actividad de GSK3 no está inhibida, resultando en la fosforilación de β catenina soluble y en la posterior degradación de la proteína, mediada por ubiquitinación (Feyt y cols. 2005). Alternativamente cuando la señal Wnt inhibe la actividad de GSK3, los niveles intracelulares de β catenina aumentan (Feyt y cols. 2005). Por esto, se miden los niveles citosólicos de esta proteína, para determinar de forma indirecta la actividad de GSK3. Por medio de un ensayo de fraccionamiento celular se aísla la fracción de citosol en células MDCK y células BN tratadas con LiCl 50 mM por 4 horas. Se observó en ambos tipos celulares, un aumento en los niveles citosólicos de β catenina (Figura 8 D y E respectivamente). En esas condiciones experimentales, se encontró que la fosforilación de megalina en las células BN disminuye en presencia de LiCl un 80 %, en tanto que, en el caso de m-LRP4MegT y m-Meg4, esta fosforilación disminuyó un 40% y un 37% respectivamente (Figura 8 A, B y C). Estos resultados, principalmente el observado en las células BN, indicarían que GSK3 es requerida para la fosforilación *in vivo* de megalina. Se ha descrito que LiCl no es un inhibidor selectivo de GSK3, tiene un número de actividades

adicionales, que pueden complicar la interpretación de los datos (Coghlan y cols., 2000). Por esto se usó el inhibidor SB216763, el cual inhibe GSK3 selectivamente para confirmar estos resultados. Se usó a una concentración de 30 mM por 12 horas en las células MDCK m-LRP4MegT y en células BN. Se observó una disminución de la fosforilación de 44 % y 37,5 % respectivamente, lo cual confirmaría la participación directa o indirecta de GSK3 en la fosforilación del receptor (Figura 9 A y B).

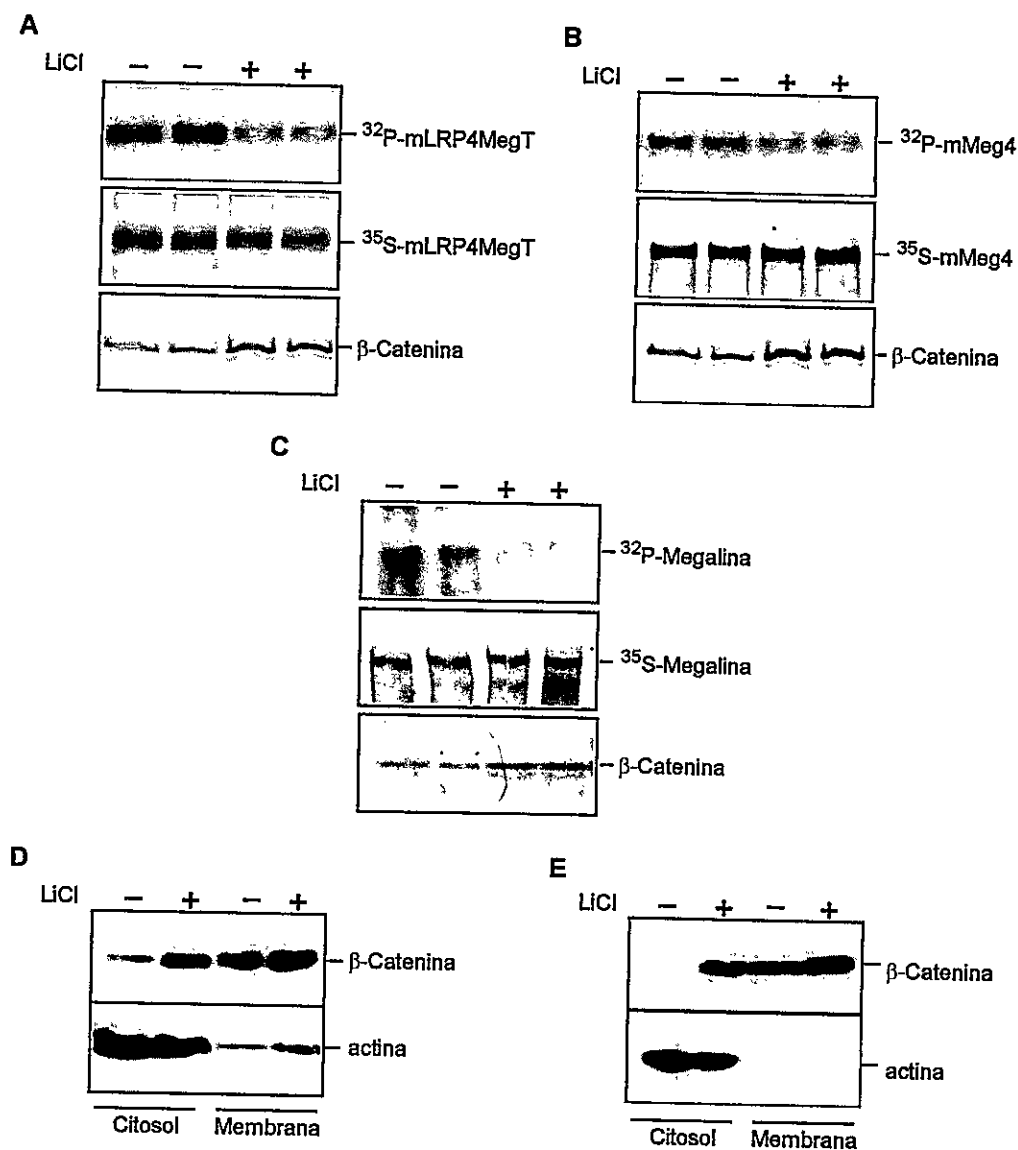


Figura 8. Fosforilación de minireceptores y receptor de megalina disminuye en presencia de LiCl, inhibidor de GSK3. A Células MDCK expresando m-LRP4MegT, **B** células MDCK expresando m-Meg4 y **C** células BN, se marcaron metabólicamente con ^{35}S -metionina/cisteína por 4 horas o con ^{32}P -ortofosfato por 2 horas en presencia de LiCl un inhibidor de GSK3 o NaCl como control. Los minireceptores y megalina fueron inmunoprecipitados desde los lisados celulares con un anticuerpo anti-MegT. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por SDS-PAGE 6% y autoradiografía. El nivel de fosforilación de m-LRP4MegT, m-Meg4 y megalina se redujo en presencia de LiCl. La cantidad de β -catenina aumento en los tres casos en presencia de LiCl. **D** Fraccionamiento en células MDCK y **E** fraccionamiento en células BN, ambas tratadas con 50 mM de LiCl o con NaCl como control. El tratamiento con LiCl inhibe GSK3, aumentando los niveles citosólicos de β -catenina. Actina fue usado como control de carga en la fracción de citosol.

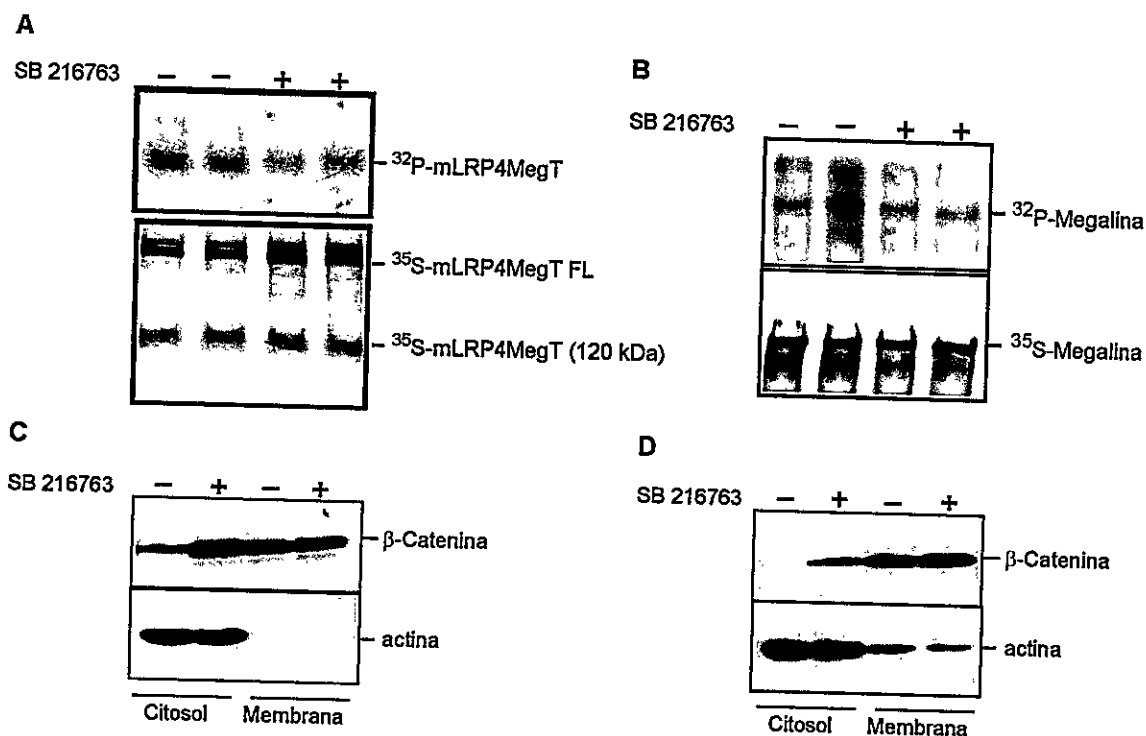


Figura 9. Fosforilación del minireceptor y receptor de megalina disminuye en presencia de SB216763 un inhibidor específico de GSK3. A Células MDCK m-LRP4MegT y B células BN que expresan megalina endógena, fueron tratadas con SB216763 30 μM por 12 horas. Luego fueron metabólicamente marcadas con ^{35}S -metionina/cisteína por 4 horas o con ^{32}P -ortofosfato por 2 horas. Los minireceptores y megalina fueron inmunoprecipitados desde los lisados celulares con un anticuerpo anti-MegT y posteriormente las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por SDS-PAGE 6% y autoradiografía. En ambos casos se observó una disminución en la fosforilación de las proteínas de células que fueron tratadas con el inhibidor específico de GSK3 SB216763. C Fraccionamiento de células MDCK m-LRP4MegT y D fraccionamiento de células BN, ambas tratadas con SB216763 30 μM por 12 horas. Los niveles citosólicos de β -catenina aumentan en las células tratadas con SB216763, lo cual confirma la inhibición de GSK3.

Los datos obtenidos en esta etapa indican que GSK3 estaría participando directa o indirectamente en la fosforilación constitutiva de megalina. Esto se apoya, principalmente en los resultados aportados por las células BN, que expresan de manera endógena el receptor y en los cuales se observa una disminución en el nivel de fosforilación de megalina al usar dos inhibidores distintos de GSK3. Esto también ocurre en el caso de m-LRP4MegT y m-Meg4.

GSK3 regula, de forma central, muchas funciones celulares, por lo cual es controlada a distintos niveles en la célula. Nos preguntamos si esta fosforilación tan activa del receptor se debía a algún estímulo, producto de que en nuestras condiciones experimentales las células no fueron previamente depletadas de suero, antes de los ensayos de fosforilación. Por lo cual, se repitieron los experimentos en células BN y MDCK m-Meg4 en presencia de LiCl 50 mM por 4 horas, pero depletando las células de suero durante toda la noche (16 horas). El resultado es similar a lo observado en la figura 8 (Figura 10 A). Esto indica que GSK3 esta fosforilando constitutivamente megalina y no estaría siendo activada por algún ligando o factor de transcripción presente en el suero, aunque no podemos descartar una regulación autocrina. Continuando con este punto y ratificando aun mas esa conclusión, se hizo un ensayo de fosforilación inhibiendo GSK3 con LiCl en células MDCK transfectadas transientemente con un constructo que únicamente posee el dominio citosólico del receptor y su transmembrana, MegT0 (Figura 10 B). En esa condición, la fosforilación del dominio citosólico de megalina disminuyó un 35 % respecto a la condición control (Figura 10 C). El resultado indica que GSK3 activamente fosforila megalina y en ausencia de ligando.

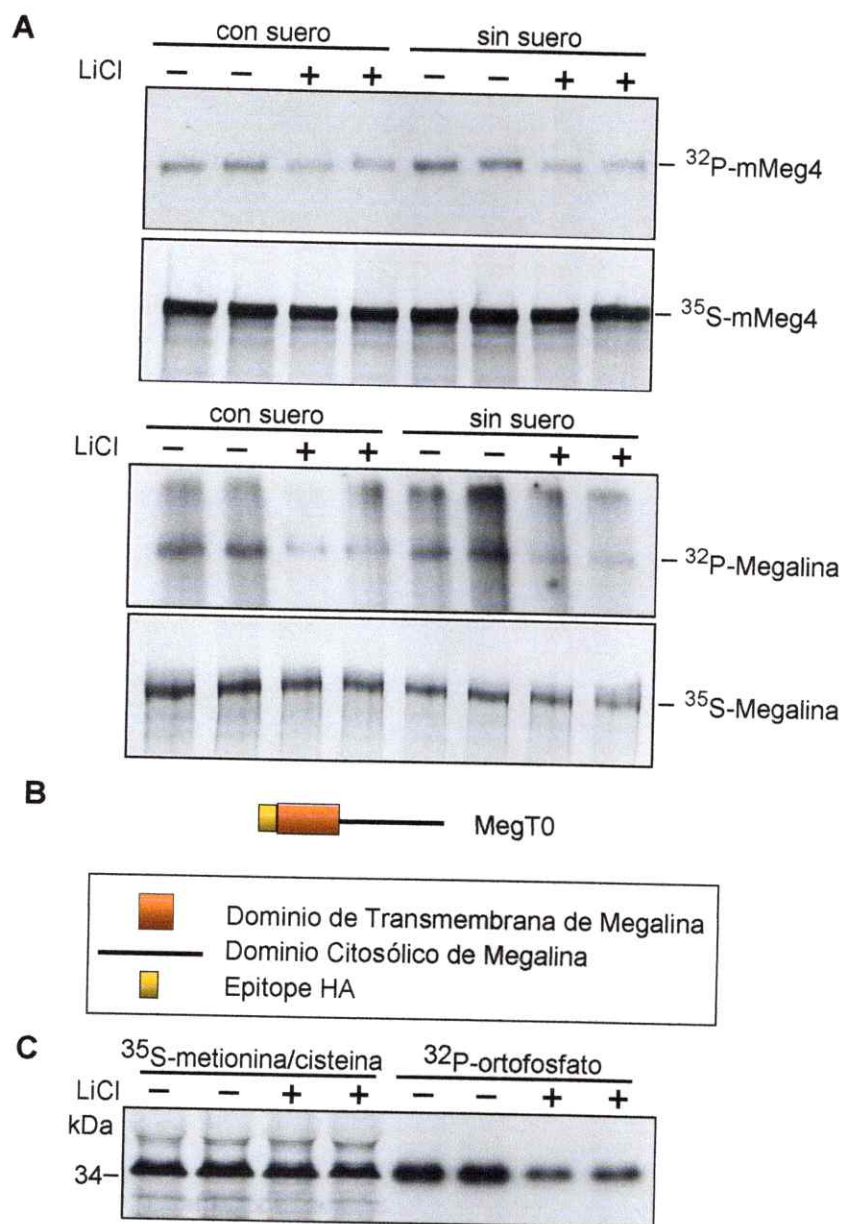


Figura 10. GSK3 fosforila activamente el dominio citosólico de megalina en ausencia de ligandos. **A** células MDCK que expresan m-Meg4 y células BN que expresan endógenamente megalina, fueron depletadas o no de suero por 16 h. Posteriormente se marcaron metabólicamente con ^{35}S -metionina/cisteína por 4 horas o con ^{32}P -ortofosfato por 2 horas. m-Meg4 y megalina fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-MegT y posteriormente las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por SDS-PAGE 6% y autoradiografía. **B** Esquema del minireceptor MegT0, contiene el dominio transmembrana y citosólico de megalina, además de un epítoto HA. **C** células MDCK transfectadas con MegT0 se marcaron metabólicamente con ^{35}S -metionina/cisteína por 4 horas o con ^{32}P -ortofosfato por 2 horas en presencia de LiCl o NaCl como control. MegT0 y megalina fueron inmunoprecipitados desde los lisados celulares con un anticuerpo anti-MegT.

3.3.1- Interacción de GSK3 con el dominio citosólico de megalina

Se trató de determinar si la interacción de GSK3 con megalina es directa o indirecta, para lo cual, se realizó un ensayo de *Pull-Down* con una proteína de fusión que contiene el dominio citosólico de megalina, GST-MegT y lisados de células CHO-K1 expresando transientemente una construcción de GSK3 β humana fusionada a un epítotope HA. El resultado muestra que el dominio citosólico de megalina, fue capaz de precipitar GSK3 β en el ensayo, lo que indica que hay una interacción directa entre esta quinasa y megalina (Figura 11).

3.4- La fosforilación del motivo PPPSP no modula la acción de otras quinasas en el dominio citosólico de megalina

Nos preguntamos si la fosforilación de PPPSP por GSK3 constituye un sitio para modular la acción de otras quinasas sobre el receptor. Para esto se hizo un ensayo de fosforilación utilizando células MDCK que expresan m-Meg4PPPDP, una variante de m-Meg4 en la cual la serina del motivo PPPSP fue reemplazada por un ácido aspártico, mediante mutagénesis sitio dirigida. La carga negativa de este aminoácido imita la del fosfato (Figura 12). El resultado indica que PPPSP no es un sitio de pre fosforilación generado por GSK3 para que otras quinasas, como PKA, PKC o CKII, puedan operar sobre megalina. No hay un aumento en la fosforilación del minireceptor m-Meg4PPPDP, aun cuando el aspártico imitaría la fosforilación de la serina 170 de megalina. Sin embargo, es claro que la serina del motivo PPPSP es fundamental para la fosforilación del dominio citosólico del receptor.

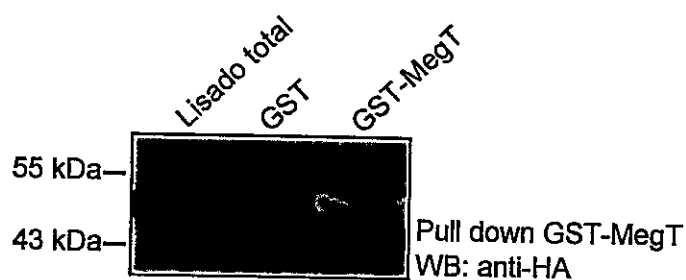


Figura 11. Interacción del dominio citosólico de megalina con GSK3 β . Extractos celulares de células CHO-K1 transfectadas transientemente con una construcción de GSK3 β humana fusionada a un epítipo HA, fueron incubados con la proteína de fusión GST-MegT por 3 horas a 4°C. Posteriormente, las proteínas unidas a la resina conteniendo GST-MegT se separaron por SDS-PAGE y fueron analizadas por inmunoblots con anticuerpo anti-HA. Se incluyó un control con GST.

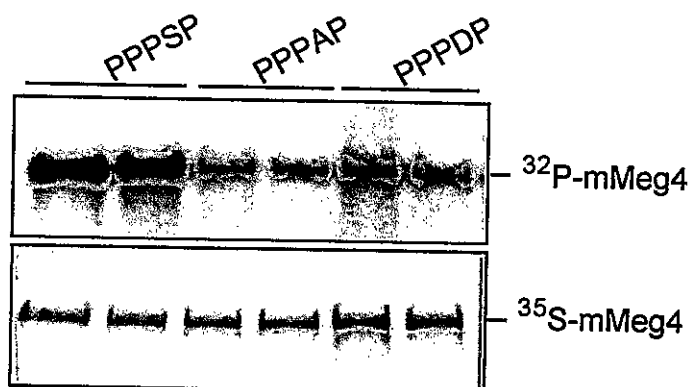


Figura 12. La serina del motivo PPPSP es esencial para la fosforilación del dominio citosólico de megalina. Células MDCK que expresan los minireceptores m-Meg4, m-Meg4PPPAP y m-Meg4PPDP, se marcaron metabólicamente con ^{35}S -metionina/cisteína por 4 horas o con ^{32}P -ortofosfato por 2 horas. Las proteínas fueron inmunoprecipitadas desde los extractos celulares con anti-MegT y analizadas por SDS-PAGE 6% y autoradiografía.

En la siguiente etapa se evalúa si la fosforilación dependiente del motivo PPPSP modula el tráfico del receptor. Usando m-LRP4MegT y m-Meg4 con sus mutantes junto con las células BN para evaluar a megalina endógena.

3.5- Análisis funcional de la fosforilación del receptor

La robusta fosforilación de megalina sugiere que esta modificación debiera cumplir un papel importante en la función o tráfico del receptor o tal vez participar en cascadas de señalización. Para estudiar los aspectos de tráfico en los cuales la fosforilación del motivo PPPSP del dominio citoplasmático podría estar involucrada se analizó la distribución polarizada, expresión en superficie, velocidad de internalización y reciclaje de los minireceptores en células MDCK. No se analizaron otros aspectos en los cuales la fosforilación del receptor podría estar participando, tales como transducción de señales.

3.5.1- Análisis de la distribución polarizada de m-LRP4MegTPPPAP y m-Meg4PPPAP en células MDCK.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta en células MDCK que expresan m-LRP4MegTPPPAP y m-Meg4PPPAP, se estableció que ambas proteínas llegan perfectamente a la superficie celular, al observar las células sin permeabilizar y además con un patrón apical, similar a los minireceptores nativos (Figura 13 A). Estos resultados fueron confirmados mediante la técnica de biotinylation en superficie en las células MDCK cultivadas en sistemas bicamerales sobre filtros (Figura 13 B). Los filtros bicamerales permiten separar las membranas apical y basolateral y acceder por

separado a estos dominios con la biotina. E-caderina es un marcador de membrana basolateral, que es utilizado como control de una correcta polarización de las membranas en este ensayo y del acceso de la biotina a la membrana basolateral. Sólo el fragmento de 97 kDa de los minireceptores m-LRP4MegT y m-LRP4MegTPPPAP se detecta en la superficie, dado que la forma procesada es la que llega mayoritariamente a la membrana. En tanto, en el caso de los minireceptores m-Meg4 y m-Meg4PPPAP se observan fragmentos de 200 kDa, correspondientes al tamaño completo de ambas proteínas. Estos datos demuestran que la fosforilación no regula la distribución apical de megalina.

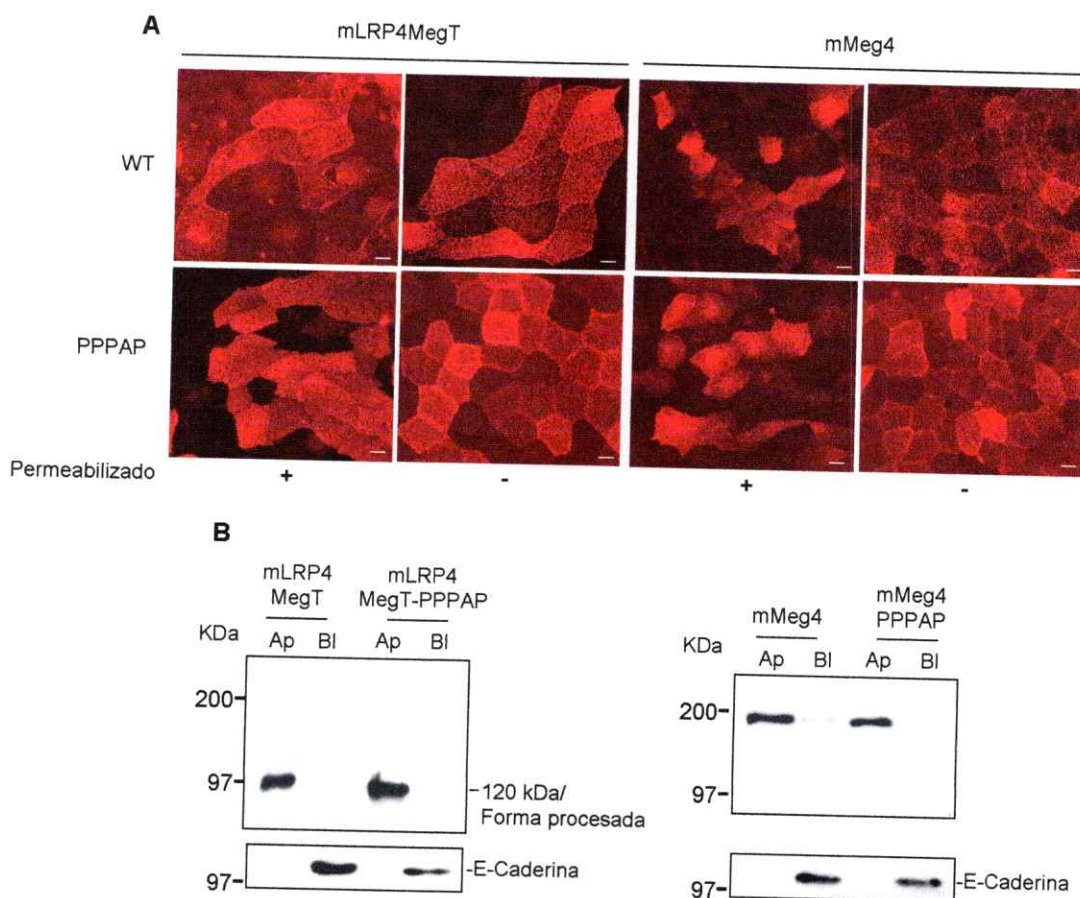


Figura 13. Distribución en superficie celular de la mutante de fosforilación en células MDCK. **A** Células MDCK expresando mLRP4MegT y m-Meg4 con su correspondiente mutante fueron crecidas en covers para analizar la localización de los minireceptores por inmunofluorescencia. Las células fueron fijadas e incubadas consecutivamente con un anticuerpo anti-HA y un anticuerpo anti-ratón conjugado con Cy3. Escala de barras 5 μ m. **B** Las células MDCK que expresan los minireceptores fueron crecidas en cámaras Transwell para formar una monocapa de células impermeables. En esas condiciones, las proteínas de superficie fueron selectivamente biotiniladas a 4°C y analizadas por inmunoblot. Los minireceptores, tanto nativos y mutantes de fosforilación, muestran una predominante localización apical. Como un control de la polarización de las células, la proteína endógena E-Cadherina fue detectada, mostrando una correcta localización basolateral.

3.5.2 Análisis del nivel de expresión de receptores en la superficie celular

Cambios en la expresión de superficie del receptor pueden reflejar alteraciones en el tráfico intracelular, por tanto, se analizan los niveles de expresión en la superficie celular del minireceptor m-LRP4MegTPPPAP con respecto al minireceptor sin mutar. Se utilizaron dos aproximaciones experimentales, por citometría de flujo (FACS) y unión de radioligando a 4°C, usando en este último caso, clones con niveles de expresión similares. Por FACS se observa que m-LRP4MegTPPPAP se encuentra cinco veces más en superficie comparado con el minireceptor sin mutar m-LRP4MegT (Figura 14 A). Este dato es confirmado por un ensayo de unión de radioligando a 4 °C con ¹²⁵I-RAP usando las células MDCK crecidas hasta confluencia para evitar el acceso del ligando a LRP expresado en las células, el cual es basolateral y también une este ligando (Figura 14 B).

Dado, los resultados obtenidos en la fosforilación de megalina en células BN en presencia de LiCl inhibidor de GSK3, se quiso evaluar la expresión en superficie de megalina endógena en esas condiciones realizando un ensayo de FACS y unión de radioligando a 4° con ¹²⁵I-RAP, en presencia de LiCl. En este ensayo se obtuvo un aumento significativo en la expresión del receptor en superficie en ambos ensayos (Figura 15 A y B). Lo mismo se observó al tratar a células MDCK m-LRP4MegT con LiCl en un ensayo de FACS (Figura 15 C). Estos resultados en células MDCK que expresan m-LRP4MegTPPPAP y principalmente los obtenidos en células BN tratadas con LiCl, sugieren que hay alteraciones en el tráfico del receptor, potencialmente la eficiencia de internalización y/o el reciclaje podrían ser regulados por fosforilación.

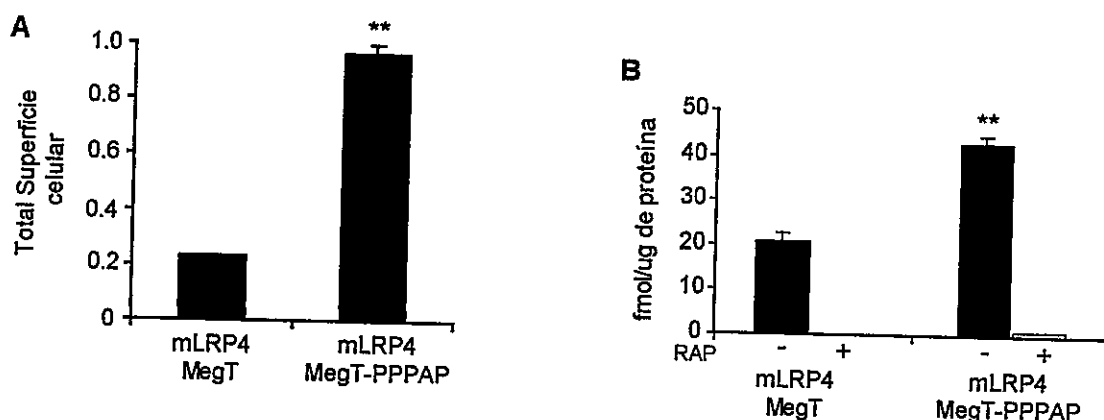


Figura 14. Expresión de minireceptores en la superficie celular. **A** Células MDCK expresando mLRP4MegT o mLRP4MegT-PPPAP sin permeabilizar o permeabilizadas con saponina 0,1%, fueron incubadas consecutivamente con un anticuerpo anti-HA y anti-ratón conjugado con RPE y analizadas por citometría de flujo. Los resultados se presentan como la razón del nivel de expresión observado en células sin permeabilizar versus células permeabilizadas. **B** Células MDCK expresando mLRP4MegT con su respectiva mutante. Se midió la eficiencia de unión a superficie celular de ^{125}I -RAP a 4°C por 1 hora en presencia o ausencia de RAP frío. Se observa que tanto en A como en B las células que expresan mLRP4MegT-PPPAP exhiben un aumento de expresión en la superficie celular, con respecto al minireceptor sin mutar. (** $p < 0.001$ versus control; *t*-Test).

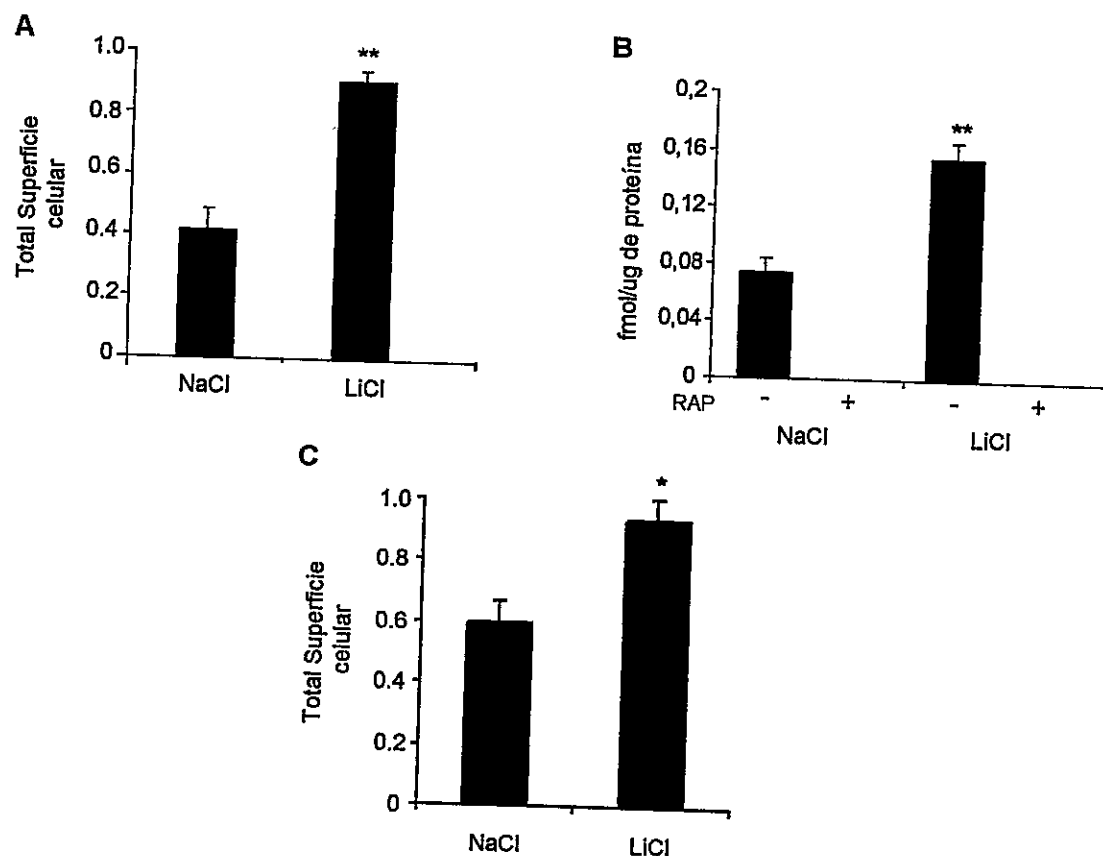


Figura 15. Aumento de expresión de receptores en superficie de células tratadas con LiCl. **A** Células BN que expresan megalina endógena y **C** Células MDCK expresando mLRP4MegT tratadas por 4 horas a 37 °C con LiCl 50 mM, fueron permeabilizadas con saponina 0,05% o 0,1% respectivamente o no permeabilizadas. Posteriormente se incubaron consecutivamente con un anticuerpo 1H2 y anti-ratón conjugado con Alexa 488 para células BN o un anticuerpo anti-HA y anti-ratón conjugado con Alexa 488 para células MDCK y analizadas por citometría de flujo **B** En células BN se midió la eficiencia de unión en superficie celular de ^{125}I -RAP a 4°C, luego de tratar con 50 mM de LiCl durante 4 horas a 37 °C. La expresión en la superficie celular del receptor y minireceptor fue significativamente mayor, después de tratar con LiCl. (** $p < 0.001$ versus control; * $p < 0.05$ versus control, *t*-test).

3.5.3- Medición de la velocidad inicial de internalización

Los datos de incremento de la expresión de megalina en la superficie celular sugieren como posibilidad que la velocidad de internalización del receptor sea regulada por la fosforilación de su dominio citoplasmático. En este sentido existen descritos en la literatura, estudios de otros miembros de la familia del receptor que avalan esta posibilidad; LRP1 es fosforilado por proteína kinasa A (PKA) en un residuo de serina, lo cual aumenta la velocidad de endocitosis del receptor (Li y cols., 2001b). Otros estudios indican, por el contrario, que la fosforilación por proteína kinasa C- α (PKC- α) en residuos de serina y treonina, regulan negativamente la velocidad de internalización del LRP1 favoreciendo la asociación con moléculas adaptadoras (Ranganathan y cols. 2004). Para determinar si la velocidad de internalización de megalina es regulada por fosforilación, se hizo un ensayo de endocitosis con ligando marcado, ^{125}I -RAP e incubando a distintos tiempos. Se observó que en células MDCK expresando m-LRP4MegTPPPAP, no hay ninguna diferencia con respecto al minireceptor sin mutar m-LRP4MegT. Lo mismo se observó al comparar la velocidad inicial de m-Meg4 y m-Meg4PPPAP (Figura 16 A). Puesto que GSK3 estaría involucrada en la fosforilación de megalina se hicieron ensayos de endocitosis con ^{125}I -RAP en presencia de LiCl y SB216763, en células BN que expresan megalina endógena y células MDCK expresando el minireceptor m-LRP4MegT. No se observaron cambios en la velocidad de internalización (Figura 16 B y C). Estos datos indican que la internalización de megalina no es modulada por la fosforilación dependiente del motivo PPPSP.

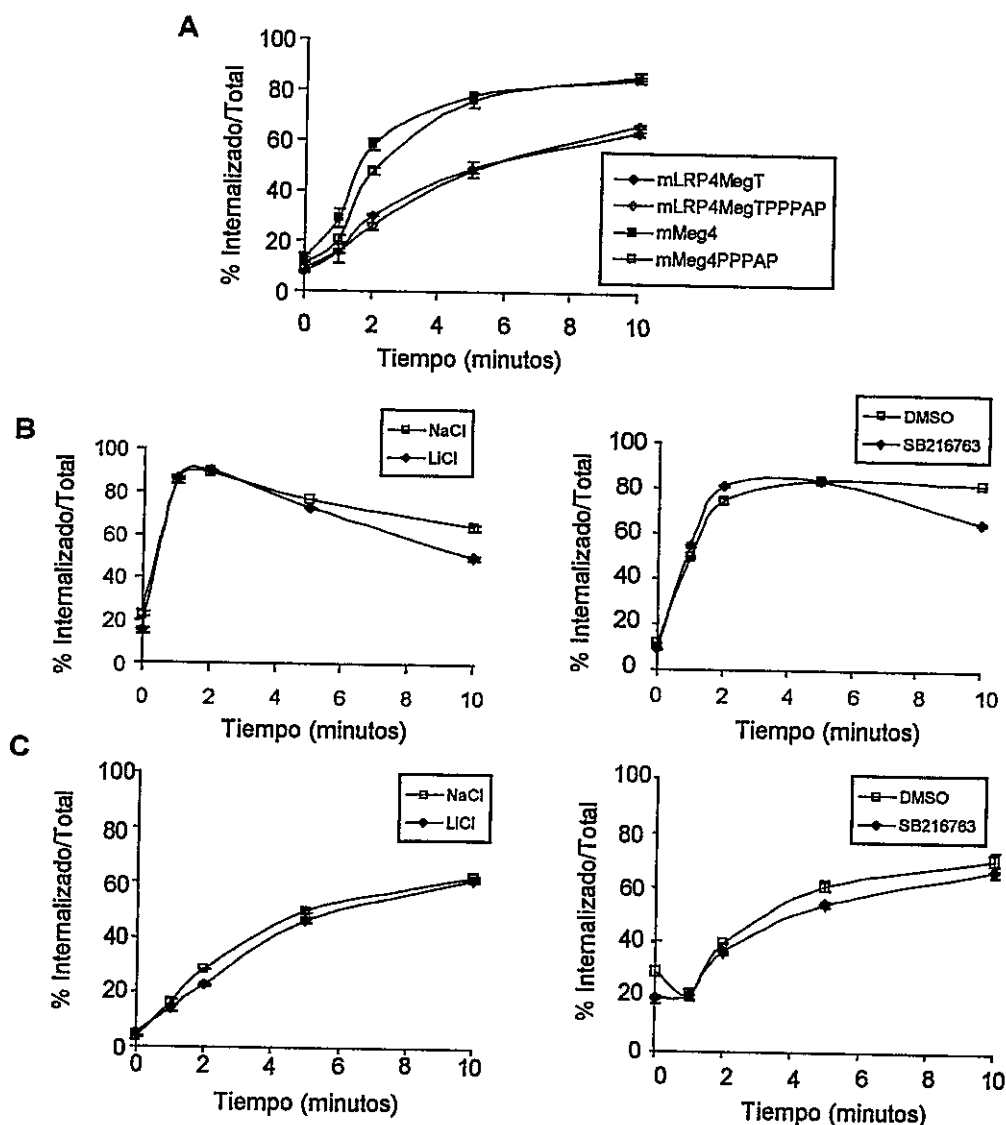


Figura 16. La fosforilación dependiente del motivo PPPSP no regula la velocidad de internalización de Megalina. **A** Células MDCK expresando los minireceptores m-Meg4, mLRPMegT y sus mutantes fueron incubadas con 5 nM ^{125}I -RAP por 30 minutos a 4°C, posteriormente fueron lavadas sobre hielo e incubadas a 37 °C a distintos tiempos, para permitir la internalización del ligando marcado unido a la superficie. La cantidad de ligando internalizado se calcula como fracción del ligando total (ligando que permanece sobre la superficie celular y cantidad internalizada). La velocidad inicial de los minireceptores mutantes no cambio respecto a los minireceptores nativos. **B** Análisis de la velocidad de endocitosis de megalina endógena en células BN tratadas con 50 mM de LiCl por 4 horas o con 30 μM de SB216763 por 12 horas y **C** células MDCK expresando mLRPMegT tratadas con los mismos inhibidores anteriores. Después del tratamiento las células fueron incubadas con 5 nM ^{125}I -RAP por 30 minutos a 4°C por diferentes tiempos, tal cual como en A. La velocidad inicial de megalina y el minireceptor no cambio bajo condiciones donde la actividad de GSK3 es inhibida.

3.5.4- Estudios de Reciclaje

Dado que la velocidad inicial de internalización no es regulada por la fosforilación dependiente del motivo PPPSP del dominio citosólico de megalina, se analizó como esta modificación podría alterar el reciclaje de la proteína. Se evaluó el reciclaje del receptor en un ensayo, en el cual, se marcó los minireceptores m-LRP4MegT y m-LRP4MegTPPPAP que están en la superficie celular con un anticuerpo conjugado con un fluoróforo y posteriormente se incubó a distintos tiempos con un anticuerpo contra el fluoróforo. Lo que se mide es la disminución de la fluorescencia a medida que los minireceptores reciclan a la membrana con el anticuerpo unido que no se alcanza a disociar en el endosoma. A mayor reducción de fluorescencia, mas eficiente es el reciclaje. Mediante este ensayo se mostró que efectivamente el reciclaje de megalina estaba aumentado en un 30% en las células MDCK que expresaban el minireceptor mutado m-LRP4MegTPPPAP (Figura 17 A). Se determinó el efecto de inhibir la actividad de GSK3 en el reciclaje del minireceptor m-LRP4MegT, por lo que se realizó el ensayo en presencia de LiCl. Se determinó que en presencia del inhibidor de GSK3, aumentaba la eficiencia del reciclaje en aproximadamente un 30 % (Figura 17 B). Estos datos indican que la fosforilación de megalina mediada directamente por GSK3, según el resultado del ensayo *in Vitro* (Figura 11), modula el reciclaje del receptor.

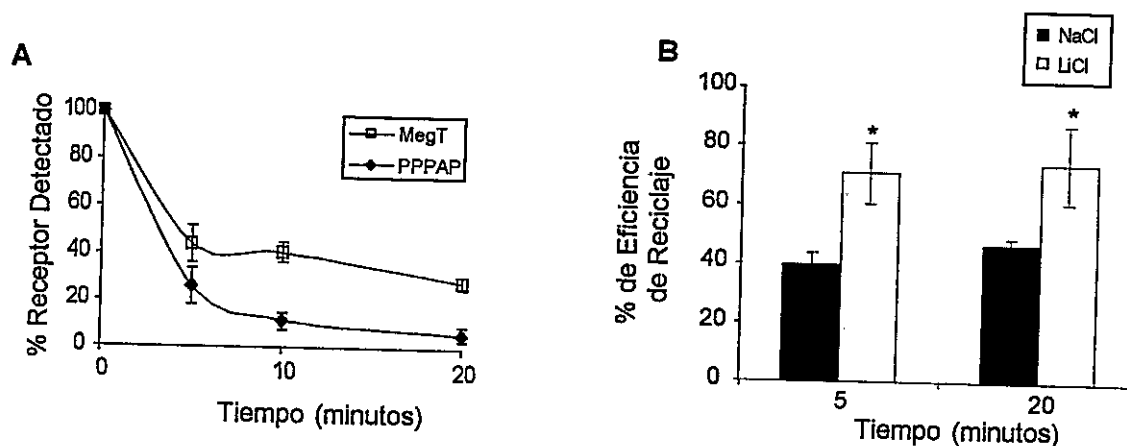


Figura 17. La fosforilación dependiente del motivo PPPSP regula la eficiencia de reciclaje. **A** Células MDCK que expresan mLRP4MegT y mLRP4MegT-PPPAP fueron marcadas con Alexa 488 conjugado con anticuerpo anti-HA por 20 minutos a 37°C y cazados por los tiempos indicados en presencia de anticuerpo anti-Alexa 488 IgG que apaga la señal de Alexa 488. Las células fueron procesadas por citometría de flujo y el porcentaje de fluorescencia restante fue calculado como se describe en Materiales y métodos. El ensayo fue hecho con dos clones independientes de mLRP4MegT y mLRP4MegT-PPPAP y los promedios \pm desviación estándar se muestran en el gráfico. (** $p < 0.001$ versus control; *t*-test). El resultado muestra un aumento de la eficiencia de reciclaje del minireceptor mutante. **B** Células MDCK expresando mLRP4MegT, fueron tratadas con LiCl o NaCl 50 mM por 4 horas y posteriormente se midió la eficiencia de reciclaje. Se observó que en las células tratadas con LiCl aumenta significativamente el reciclaje del minireceptor comparado a la condición control con NaCl (* $p < 0.05$ versus control; *t*-test).

Los resultados por FACS y unión de radioligando a 4°C indican una alteración en los niveles de superficie de células MDCK m-LRP4MegTPPPAP respecto al minireceptor sin mutar (Figura 14). Lo mismo se observa en caso de células BN y células MDCK m-LRP4MegT, tratadas con inhibidores de GSK3. Esta alteración de la expresión en superficie no se debe a cambios en la velocidad inicial de internalización, si no a un aumento en el reciclaje del receptor, como se determinó en células MDCK m-LRP4MegT (Figura 17). Esto indica por lo tanto, que la fosforilación de megalina afecta negativamente el reciclaje del receptor, regulando de esta manera la disponibilidad de la proteína en la superficie celular y por lo tanto, su función.

IV.- DISCUSIÓN

El trabajo de esta tesis se centró en megalina, una proteína de membrana de 600 kDa que funciona como receptor de una gran variedad de ligandos y que se expresa en túbulo proximal de riñón y distintos epitelios absortivos (Birn y cols., 2000). Funcionalmente megalina se ha implicado en la homeostasis de calcio y vitaminas y podría participar en eventos de transducción de señales (Christensen y Birn, 2001). El dominio citosólico del receptor esta constituido por varios motivos consenso de endocitosis y de interacción de proteínas como motivos ricos en prolinas y de unión a motivos PDZ. También tiene sitios putativos de fosforilación para PKA, PKC y CKII, junto con un sitio PPPSP dentro de un motivo rico en prolinas, que se ha descrito es fosforilado por la quinasa GSK3 en los receptores LRP5/6 (Zeng y cols., 2005). Nuestro laboratorio ha determinado que megalina es fosforilada de manera importante *in vivo* y que el sitio principal de fosforilación es el motivo PPPSP del dominio citosólico. En este trabajo demostramos que la fosforilación dependiente del motivo PPPSP modula el tráfico endocítico y disponibilidad en la superficie del receptor y que GSK3 está involucrada en este evento.

1. Generación de un minireceptor de megalina

Para abordar experimentalmente estos estudios, debido al gran tamaño del receptor y a la limitación que representa la manipulación y transfección de su ADN complementario (ADNc), primero se generó mediante técnicas de biología molecular un minireceptor de megalina que contiene el dominio cuatro de unión a ligandos, el dominio transmembrana y el dominio citosólico del receptor. Este minireceptor,

llamado m-Meg4 posee un epítotope HA de 9 aminoácidos provenientes de la proteína hemaglutinina para facilitar la inmuno detección de esta construcción.

La generación de este minireceptor de megalina permitirá estudiar aspectos de tráfico y señalización del receptor con una mayor facilidad de manipulación para realizar mutaciones en su secuencia que al utilizar el receptor completo.

Una vez obtenido el minireceptor de megalina, fue transfectado a células MDCK, línea celular epitelial derivada de riñón de perro. Por inmunoblot e inmunoprecipitación (Figura 4 A), se observó expresión en células de m-Meg4 y por inmunofluorescencia se determinó que la construcción se localiza de una manera apropiada llegando a la superficie celular y con un patrón apical (Figura 4 C). Además se determinó, de una manera indirecta por *pull-down*, que el minireceptor se plegó correctamente (Figura 4 B).

2. La fosforilación de megalina depende de GSK3

La fosforilación de receptores de la superficie celular es uno de los mas importantes mecanismos, por el cual, el tráfico o señales de transducción son regulados (Li y cols., 2001b). Los primeros estudios de megalina realizados en nuestro laboratorio demostraron que el receptor se fosforila *in vivo*. (Yuseff y col., 2007) Además se estableció que una parte importante de la fosforilación del dominio citosólico del receptor ocurre en forma constitutiva y en ausencia de la unión de ligandos al ectodominio, esto fue determinado por estudios en los cuales, se observó fosforilación de un minireceptor que contiene un ectodominio no funcional de GFP en contexto del transmembrana y dominio citosólico de megalina (Yuseff, 2005). Esta fosforilación constitutiva no dependería de PKA, PKC y CKII, dado que, al hacer mutaciones puntuales en los sitios putativos de fosforilación por estas quinasas, en el

dominio citosólico del receptor, no se observó una disminución en el nivel de fosforilación. Sin embargo, dado que todas las quinasas fueron capaces de fosforilar el dominio citosólico de megalina contenido en una proteína de fusión, durante un ensayo de fosforilación *in vitro*, no se puede descartar que los sitios putativos para CKII, PKC y PKA puedan ser fosforilados por la unión de ligandos específicos al ectodominio del receptor. Estudios posteriores, determinaron que un motivo PPPSP presente en el dominio citosólico de megalina es el determinante en la fosforilación del receptor (Yuseff, 2005)

En esta tesis evaluamos la fosforilación, de una mutante del motivo PPPSP expresada en células de fenotipo polarizado MDCK. Para estos estudios, se utilizó el minireceptor m-Meg4 y el minireceptor quimérico m-LRP4MegT, el cual, está constituido del dominio cuatro de unión a ligandos de LRP1, el dominio de membrana de LRP1 y el dominio citosólico de megalina. Este minireceptor ha sido ampliamente usado por nuestro laboratorio como un instrumento válido y útil para los estudios de tráfico del receptor (Marzolo y cols., 2003) y además se utilizó para hacer los primeros trabajos de fosforilación del dominio citosólico de megalina, en células CHO (Yuseff, 2005).

Los ensayos de fosforilación con células de fenotipo polarizado MDCK expresando los minireceptores nativos (m-Meg4 y m-LRP4MegT) y mutantes (m-Meg4PPPAP y m-LRP4MegTPPPAP), confirmaron los datos obtenidos anteriormente en células CHO, que indicaron que la serina del motivo PPPSP determina la fosforilación del dominio citosólico del receptor (Yuseff, 2005) (Figura 7).

En los receptores LRP5/6 se encuentran repeticiones de 5 motivos del tipo PPP(S/T)P, los cuales al fosforilarse, por la unión de ligando al receptor reclutan axina, así se evita la degradación de β catenina y se activa la vía WNT. Los motivos de estos

receptores son fosforilados por GSK3 (Zeng y cols., 2005). GSK3 es una quinasa dirigida a prolinas que prefiere (S/T) P para fosforilación, se encuentra en todos los eucariontes y es una enzima clave para regular rutas de señalización y está envuelta en un amplio rango de procesos celulares (Doble y Woodgett 2003). Basándonos en estos antecedentes y dado que los receptores LRP5/6 pertenecen a la misma familia de megalina se comprobó, usando los minireceptores m-Meg4, m-LRP4MegT y las células BN de saco vitelino de rata que expresan endógenamente el receptor, que la fosforilación de megalina depende de la actividad de GSK3. Esto se determinó mediante el uso de inhibidores de esta quinasa como LiCl y SB216763. Se ha señalado, que LiCl no es un inhibidor selectivo de la quinasa, también afecta a otras enzimas (Coghlan y cols., 2000), por esto, además se usó el inhibidor SB216763. LiCl tiene dos mecanismos inhibitorios de GSK3 uno directo en el cual actúa como un inhibidor no competitivo de ATP y otro indirecto, el cual aun se encuentra en estudio, pero al parecer activaría PKB o PI3K, también se ha sugerido que inhibe las fosfatasa involucradas en la regulación de la actividad de GSK3 (Jope, 2004). En cuanto, a SB216763 inhibe directamente la quinasa, compitiendo con ATP (Coghlan y cols., 2000). Primero se evaluó la fosforilación del receptor en presencia de LiCl 50 mM, observándose que tanto en megalina de células BN, como en el minireceptor m-LRP4MegT y m-Meg4, disminuyó la fosforilación del dominio citosólico (Figura 8). Este resultado se repitió al tratar las células BN y MDCK que expresan el minireceptor m-LRP4MegT con el inhibidor específico de GSK3 SB216763 (Figura 9). La inhibición de la fosforilación en ambos casos coincide con un incremento en la estabilidad de β -catenina (Figura 8 D y E y Figura 9 C y D). Tomando juntos los resultados en células BN y MDCK que expresan los minireceptores, no tenemos dudas de que GSK3 participa en la fosforilación de megalina.

Tanto por los estudios realizados con anterioridad a este trabajo y los datos aportados aquí, sabemos que la fosforilación constitutiva de megalina, esta determinada por el motivo PPPSP y es dependiente de GSK3. Como ya se ha indicado, esta quinasa participa en muchas funciones celulares, por lo cual, su actividad esta muy regulada por la célula, mediante diversos mecanismos. Estos incluyen regulación de su actividad por fosforilación, localización intracelular o unión a proteínas. Los ensayos de fosforilación, fueron realizados en ausencia de ligando o algún estímulo externo. Sin embargo, previamente las células no se habían depletado de suero por 16 horas. Nos preguntamos si algún ligando o factor de transcripción presente en el suero, podría estar estimulando la actividad de GSK3, por lo que nuevamente se realizaron ensayos de fosforilación en presencia de LiCl, en células BN y MDCK expresando m-Meg4 (Figura 10 A). Los resultados volvieron a confirmar la participación de GSK3 en la fosforilación de megalina. El efecto de la inhibición de GSK3 por LiCl en la fosforilación del dominio citosólico del receptor es evidente aun si se utiliza una construcción sin dominio extracelular, como MegT0 (Figura 10 B y C). Es claro entonces, que GSK3 actúa sobre megalina constitutivamente y en ausencia de ligando, aunque no se puede descartar una regulación autocrina. Esto es interesante pues como se indicó la actividad de esta quinasa esta muy regulada y sujeta a variados estímulos. Un ejemplo cercano es β catenina, la cual, es permanentemente fosforilada por GSK3, formando parte de un complejo con axina que asegura a esta quinasa un acceso controlado al sustrato, hasta que llegue ligando wnt, lo cual, desencadena eventos que impiden la fosforilación de β catenina y su subsiguiente degradación. Es probable que en el caso de megalina, también este operando algún complejo de proteínas que asegure la fosforilación permanente del receptor. Es importante abordar este punto en estudios posteriores.

Nos preguntamos si GSK3, interactúa directa o indirectamente sobre el receptor. Para determinarlo de forma inicial, se hizo un ensayo de *pull-down* utilizando una proteína de fusión con el dominio citosólico de megalina y lisado de células CHO-K1 expresando de manera transiente GSK3 β humana recombinante (Figura 11). El resultado indica que hay interacción directa entre megalina y GSK3. Esto significa que esta quinasa directamente fosforila megalina y no estaría actuando por medio de un intermediario. De todas formas es necesario corroborar este resultado con nuevos ensayos, como una co-inmunoprecipitación.

Una característica importante de GSK3 es que tiene predilección por sustratos que han sido pre-fosforilados por otras quinanasas, como β -catenina por CKI, esto constituye un mecanismo para regular la fosforilación de ciertos sustratos (Jope, 2004). Sin embargo también puede fosforilar sustratos directamente como presenilina-1 (Twomey y McCarthy 2006) o LRP6 (Zeng y cols., 2005). Si bien megalina tiene otros sitios de fosforilación por PKA, PKC y CKII el uso de inhibidores contra estas quinanasas y mutantes puntuales de estos sitios no alteraron la fosforilación del receptor (Yuseff, 2005). Por esto pensamos que el dominio citosólico de megalina no necesita estar pre-fosforilado para que actúe GSK3, posiblemente la fosforilación del motivo PPPSP sea directa. Descartamos además que esta fosforilación constituya un sitio de pre-fosforilación necesario para fosforilar a los otros motivos, potencialmente para modular el acoplamiento de quinanasas al dominio citosólico del receptor. Esto dado que la mutante de m-Meg4 en la cual la serina del motivo PPPSP fue reemplazado por un ácido aspártico cuya carga negativa puede imitar un aminoácido fosforilado (Figura 12) no mostró fosforilación y se comportó igual que el mutante PPPAP. No podemos descartar que se necesite además, la unión de algún ligando específico o un estímulo adicional para que ocurra fosforilación por otras quinanasas. Tampoco, que en este caso

particular, el ácido aspártico no pueda imitar correctamente la fosforilación del residuo de serina en el motivo PPPSP, pero claramente muestra que el residuo de serina en el motivo PPPSP es esencial.

Los resultados obtenidos en este trabajo, unidos a los datos generados en nuestro laboratorio, nos permiten afirmar que la fosforilación del dominio citoplasmático de megalina es un proceso complejo que probablemente ocurre en más de un sitio e involucra diferentes quinasas (Yuseff y cols., 2007). Como hemos mencionado el dominio citosólico del receptor, además del motivo PPPSP contiene 4 sitios PKC, 8 sitios CKII y un sitio PKA, si bien los experimentos de fosforilación *in vitro* determinaron que todas estas quinasas fueron capaces de fosforilar el dominio citosólico de megalina, en los estudios de fosforilación *in vivo*, no se observó ningún cambio significativo al usar inhibidores específicos o mutantes puntuales contra PKA, CKII y PKC, esto a pesar de que CKII y PKC tienen varios sitios consenso cada uno. En cuanto a PKA, esta quinasa tiene un solo sitio putativo y dado la fuerte fosforilación del dominio citosólico, es posible que bajo estas condiciones experimentales, (ausencia de ligando), no se puedan detectar cambios en los niveles de fosforilación. Esto también puede explicar los resultados con inhibidores de tirosinas quinasas donde tampoco se observaron cambios en la fosforilación del dominio citosólico (Yuseff y cols., 2007). Estudios realizados sobre el receptor LRP1, con inhibidores de tirosinas quinasas, tampoco arrojaron cambios en los niveles de fosforilación del receptor (Li y cols., 2000b), sin embargo trabajos posteriores determinaron que la unión de PDGF, resultó en la fosforilación de un residuo de tirosina en su dominio citoplasmático (Ranganathan y cols., 2004). En caso del primer estudio, es claro, que la ausencia de ligando no permitió la detección de cambios en la fosforilación, además

con la metodología usada habría sido difícil detectar fosforilación de un solo residuo de tirosina. Esto nos indica que podría estar ocurriendo con megalina, nuestro ensayo no es sensible para detectar una probable fosforilación por las quinasas CKII, PKA, PKC ni en residuos de tirosinas, sin un estímulo. Esto es un tema que debe ser abordado en futuros estudios sobre el receptor.

3. La fosforilación dependiente del motivo PPPSP regula negativamente el reciclaje de megalina

Dado que, la fosforilación puede modular tráfico del receptor o transducción de señales, nosotros evaluamos si la fosforilación determinada por PPPSP tenía alguna función en el tráfico de megalina. Los estudios realizados con las mutantes m-LRP4MegTPPPAP y m-Meg4PPPAP determinaron que no había cambios en la destinación polarizada apical de los minireceptores (Figura 13), sin embargo, ocurría un aumento en la expresión de superficie de la construcción mutante m-LRP4MegTPPPAP con respecto al minireceptor nativo en células MDCK. (Figura 14). Puesto que, establecimos la participación de GSK3 en el proceso de fosforilación, confirmamos que en presencia de LiCl, también se observaba un aumento en la expresión de superficie de m-LRP4MegT y megalina endógena de células BN (Figura 15). Esto puede implicar que la fosforilación podría regular la interacción con proteínas adaptadoras involucradas en la internalización del receptor, sin embargo, en los ensayos de endocitosis de las mutantes y en presencia de los inhibidores de GSK3, este no se alteró (Figura 16). No obstante, cuando se realizó un ensayo de reciclaje se observó que la mutante m-LRP4MegTPPPAP presenta un aumento en la velocidad de reciclaje y esta observación coincide cuando las células MDCK que expresan el minireceptor nativo son tratadas con LiCl (Figura 17). Esto sugiere que la fosforilación

de megalina mediada por GSK3 podría bloquear negativamente el reciclaje. Fue descrito que GSK3 tiene un efecto inhibitorio sobre el reciclaje del tráfico de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ (Roberts y cols., 2004) pero probablemente es un efecto indirecto mediado por la fosforilación de la cadena liviana de la kinesina. Otra etapa del tráfico que puede ser modulada por fosforilación es la transcitosis. Se ha determinado que la fosforilación del receptor de inmunoglobulinas polimérico (pIgR) en un residuo de serina localizado en el dominio citoplasmático es requerida para una transcitosis eficiente del receptor desde el dominio basolateral al apical (Casanova y cols., 1990). Megalina promueve la transcitosis de tiroglobulina y la proteína transportadora de vitamina A, RBP (*retinol binding protein*), por lo que, no es infundado pensar que una probable fosforilación inducida por la unión de estos ligandos al ectodominio del receptor induzcan la transcitosis de megalina. Sin embargo, si la fosforilación determinada por el motivo PPPSP, también regula la transcitosis del receptor, es algo que aun no se ha evaluado.

4. Megalina y señalización intracelular

En este trabajo no se evaluó si la fosforilación de megalina modula señalización celular. Aunque se puede especular que la fosforilación determinada por el motivo PPPSP podría regular la interacción con proteínas citosólicas. A pesar de que se han descrito proteínas adaptadoras y de andamiaje que interactúan con el dominio citosólico del receptor (Gotthardt y cols., 2000) no se han identificado proteínas que se unan al motivo PPPSP. Estos motivos presentes en los receptores LRP5/6, son fosforilados por GSK3 y CKI, lo cual regula el reclutamiento de axina, activándose la vía Wnt, por estabilización de β -catenina (Zeng y cols., 2005). Sería interesante estudiar, si el receptor, por medio de su motivo PPPSP, participa en la vía Wnt, lo cual

tendría una importante repercusión en desarrollo y en los múltiples procesos y patologías en los que esta vía está involucrada.

En esta tesis demostramos que la fosforilación regula la expresión en superficie del receptor, lo cual, puede constituir un mecanismo por el cual señales celulares regulan la actividad de megalina. Algo similar ha sido descrito en la señalización hedgehog donde la fosforilación de *smoothened* causa una acumulación en la superficie celular del receptor y por tanto un aumento en la actividad de señalización, en respuesta al morfógeno *Sonic hedgehog* (Shh) (Jia y cols., 2004). Esto es interesante considerando que megalina también une el fragmento N-terminal de Shh (McCarthy y cols., 2002) y se ha visto similares defectos en los ratones nulos para megalina (Willnow y cols., 1996) o Shh (McCarthy y Agraves, 2003).

Se ha establecido que megalina regula la actividad de la isoforma 3 del intercambiador sodio protones (Biemesderfer y cols., 1999) y la endocitosis del cotransportador NaPi-IIa. La internalización de este transportador ocurre vía vesículas cubiertas por clatrina y es regulada por diferentes factores tales como PTH, el cual induce su endocitosis y degradación (Bachmann y cols., 2004). La hormona paratiroide también interactúa con megalina y activa una variedad de señales intracelulares incluidas PKA, PKC y PKG (Bacic y cols., 2003; Traebert y cols., 2000). Los elementos moleculares que regulan la endocitosis de estos transportadores permanecen desconocidos y es posible que la activación de estas quinasas pudiera directamente afectar la fosforilación de megalina facilitando la internalización y degradación lisosomal del transportador NaPi-IIa. Se ha reportado que megalina une PKB y regula su actividad, explicando el efecto anti-apoptótico que megalina tiene en las células del túbulo proximal a bajas concentraciones de albúmina (Caruso-Neves y cols., 2006). No sabemos si la fosforilación de megalina es importante en el reclutamiento de PKB, hay

que recordar que esta quinasa es un regulador de la actividad de GSK3, por tanto sería interesante estudiarlo.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la fosforilación del dominio citosólico de megalina, determinada por el motivo PPPSP, regula negativamente el reciclaje del receptor, controlando la disponibilidad del mismo en la superficie celular y este evento es dependiente directamente de la quinasa GSK3. Estos datos también sugieren de forma importante que megalina podría estar envuelta en cascadas de señalización.

V. – CONCLUSIONES

- 1- Se generó el minireceptor m-Meg4 que contiene el cuarto dominio de unión a ligandos, dominio transmembrana y dominio citosólico de Megalina y células MDCK que lo expresan en forma estable, para estudios funcionales del receptor.
- 2- Se logró establecer que la serina dentro del motivo PPPSP del dominio citosólico, es el mayor determinante en la fosforilación del minireceptor de megalina en células de fenotipo polarizado MDCK.
- 3- Se determinó que la actividad de la quinasa GSK3 es relevante en la fosforilación constitutiva de megalina y que interactúa directamente con el receptor.
- 4- La fosforilación de la serina del motivo PPPSP no tendría como función ser un requisito para la acción o acoplamiento de otras quinasas, en el dominio citosólico de megalina (sitio de *"priming"*).
- 5- Funcionalmente, se logró establecer que la fosforilación de megalina, determinada por el motivo PPPSP, no controla la distribución apical del receptor ni la velocidad de internalización del receptor.
- 6- La fosforilación determinada por PPPSP regula negativamente el reciclaje de megalina y por lo tanto cumple un papel en la disponibilidad del receptor en la superficie celular.

VI.- BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, E., Maday, S., Sfakianos, J., Hull, M., Winckler, B., Sheff, D., Fölsch, H., y Mellman, I. 2005. *J Biol Chem.* **170**: 595-605.
- Bachmann, S., Schlichting, U., Geist B., Mutig, K., Petsch, T., Bacic, D., Wagner, C. A., Kaissling, B., Biber, J., Murer, H., y Willnow, T.E. 2004. *J Am Soc Nephrol.* **15**: 892-900.
- Bacic, D., Capuano, P., Gisler, S.M., Pribanic, S., Christensen, E.I., Biber, J., Loffing, J., Kaissling, B., Wagner, C.A. y Murer, H. 2003. *Pflugers Arch.* **446**: 475-84.
- Biemesderfer, D., Nagy, T., DeGray, B. y Aronson, P.S. 1999. *J Biol Chem.* **274**:17518-17524.
- Bienz, M. y Clevers, H. 2003. *Nat Cell Biol.* **5**: 179-182.
- Birn, H., Vorum, H., Verroust, P.J., Moestrup, S.K. y Christensen, E.I. 2000. *J Am Soc Nephrol.* **11**: 191-202.
- Boucher, P., Liu P., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Anderson, R.G. y Herz, J. 2002. *J Biol Chem.* **277**:15507-13.
- Bu, G. 2001. *International review of cytology.* **209**: 79-114.
- Bu, G., Geuze, H.J., Strous, G.J. y Schwartz, A.L. 2002. *Mol Biol Cell.* **13**: 3325-3335.
- Bu, G. y Marzolo, M.P. 2000. *Trends Cardiovasc Med.* **10**: 148-155.
- Bu, G. y Renneke, S. 1996. *J Biol Chem.* **271**: 22218-22224.
- Caruso-Neves, C., Pinheiro, A.A., Cai, H., Souza-Menezes, J. y Guggino, W.B. 2006. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:18810-18815.
- Casanova, J.E., Breitfeld, P.P., Ross, S.A. y Mostov, K.E. 1990. *Science.* **248**:742-745.
- Christensen, E.I. y Birn, H. 2001. *AmJ Physiol Renal Physiol.* **280**: F562-573.
- Christensen, E.I. y Birn, H. 2002. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**: 256-266.
- Christensen, E.I., Birn, H., Verroust, P. y Moestrup, S.K. 1998. *Ren Fail.* **20**:191-199.
- Coghlan, M. P., Culbert, A.A., Cross, D., Corcoran, S.L., Yates, J.W., Pearce, N.J., Rausch, O.L., Murphy, G.J., Carter, P.S., Cox, L.R., Mills, D., Brown, M.J., Haigh, D., Ward, R.W., Smith, D.G., Murray, K.J., Reith A.D. y Holder J.C. 2000. *Chemistry & Biology.* **7**: 793-803.

- Cuitino, L., Matute, R., Retamal, C., Bu, G., Inestrosa, N.C. y Marzolo, M.P. 2005. *Traffic*. **6**: 820-838.
- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A. y Niehrs, C. 2005. *Nature*. **438**:867-872.
- Doble, B.W. y Woodgett, J.R. 2003. *J Cell Sci*. **116**:1175-86.
- Feyt, C., Kienlen-Campard, P., Leroy, K., N'Kuli, F., Courtoy, P.J., Brion, J.P. y Octave, J.N. 2005. *J Biol Chem*. **280**:33220-33227.
- Fisher, C.E. y Howie S. 2006. *Developmental Biology*. **296**: 279-297.
- Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M.F., Shelton, J., Richardson, J.A., Stockinger, W., Nimpf, J. y Herz, J. 2000. *J Biol Chem*. **275**: 25616-25624.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K. y Zeng, X. *Development*. 2004. **131**: 1663-1677.
- Herz, J. y Bock, H.H. 2002. *Annu Rev Biochem*. **71**: 405-34.
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A. y Herz, J. 1999. *Neuron*. **24**: 481-489.
- Hilpert, J., Nykjaer, A., Jacobsen, C., Wallukat, G., Nielsen, R., Moestrup, S.K., Haller, H., Luft, F.C., Christensen, E.I. y Willnow, T.E. 1999. *J Biol Chem*. **274**: 5620-5625.
- Hjalm, G., Murray, E., Crumley, G., Harazim, W., Lundgren, S., Onyango, I., Ek, B., Larsson, M., Juhlin, C., Hellman, P., Davis, H., Akerstrom, G., Rask, L., y Morse, B. 1996. *Eur J Biochem*. **239**: 132-137.
- Holmes, T.C., Fadool, D.A., Ren, R., y Levitan, I.B. *Science*. **274**: 2089-2091.
- Hussain, M.M., Strickland, D.K. y Bakillah, A. 1999. *Annu. Rev. Nutr*. **19**:141-172.
- Jia, J., Tong, C., Wang, B., Luo, L. y Jiang, J. 2004. *Nature*. **432**:1045-1050.
- Jones, S.E. y Jomary, C. *The international journal of biochemistry and cell biology*. 2002. **34**:427-431.
- Joep, R. S. 2004. *Clinical Neuroscience Research*. **4**: 171-179.
- Joep, R.S. y Jonson, G.V. 2004. *Trends Biochem Sci*. **29**: 95-102.
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C. y Pawson, T. 1991. *Science*. **252**: 668-674.
- Kounnas, M.Z., Loukinova, E.B., Stefansson, S., Harmony, J.A., Brewer, B.H., Strickland, D.K. y Argaves, S. 1995. *J. Biol. Chem*. **270**: 13070-13075.

- Larsson, M.H., Sakwe, A.M., Engstrom, A., Hoglund, A.S., Larsson, E., Robinson, R.C., Sundberg, C. y Rask, L. 2003. *Biochem J.* **373**: 381-91.
- Li, Y., Lu, W., Marzolo, M.P. y Bu, G. 2001a. *J Biol Chem.* **276**:18000-18006.
- Li, Y., Lu, W., Schwartz, A.L. y Bu G. 2002. *Biochemistry.* **41**: 4921-4928.
- Li, Y., van Kerkhof, P., Marzolo, M.P., Strous, G.J y Bu, G. 2001b. *Mol Cell Biol.* **21**:1185-1195.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., y He, X. 2002. *Cell.* **108**: 837-47.
- Madrid, R., Le Maout, S., Barrault, M.B., Janvier, K., Benichou, S. y Merot, J. 2001. *EMBO J.* **20**:7008-7021.
- Marino, M., Andrews, D., Brown, D. y McCluskey, RT. 2001. *J Am Soc Nephrol.***12**:637-648.
- Marino, M., Zheng, G., Chiovato, L., Pinchera, A., Brown, D., Andrews, D., y McCluskey, R.T. 2000. *J Biol Chem.* **275**:7125-7137.
- Marino, M., Zheng, G. y McCluskey, R.T. 1999. *J Biol Chem.* **274**:12898-12904.
- Marzolo, M.P., Yuseff, M.I., Retamal, C., Donoso, M., Ezquer, F., Farfan, P., Li, Y. y Bu, G. 2003. *Traffic.* **4**:273-288.
- Maurer, M.E. y Cooper, J.A. 2005. *J Cell Sci.* **118**: 5345-5355.
- May, P., Bock, H.H. y Herz, J. 2003a. *Sci STKE.* **176**: E12.
- May, P. y Herz, J. 2003b. *Traffic.* **4**: 291-301.
- McCarthy, R.A. y Argraves, W.S. 2003. *J Cell Sci.* **116**: 955-60.
- McCarthy, R., Barth, J., Chintalapudi, M., Knaak, C. y Argraves, W. 2002. *J. Biol. Chem.* **277**:25660-25667.
- McCormick, L.M., Urade, R., Arakaki, Y., Schwartz, A.L., y Bu, G. 2005. *Biochemistry.* **44**: 5794-5803.
- Mi, K., Dolan, P.J. y Jonson, G.V. 2006. *J Biol Chem.* **281**: 4787-4794.
- Moestrup, S.K. y Verroust, P.J. 2001. *Annu. Rev. Nutr.* **21**: 407-428.
- Morales, C.R., Zeng, J., Alfy, M.E., Barth, J.L., Chintalapudi M.R., McCarthy, R.A., Incardona, J.P. y Argraves, W.S. 2006. *J Histochem Cytochem.* **54**:1115-1127.

- Mostov, K.E. 1995. *Histol Histopathol.* **10**: 423-31.
- Nagai, M., Meerloo, T., Takeda, T. y Farquhar, M. 2003. *Mol Biol Cell.* **14**: 4984-4996.
- Nykjaer A. y Willnow T.E. 2002. *TRENDS in Cell Biology.* **12** : 273-280.
- Obermoeller, L.M., Chen, Z., Schwartz, A.L. y Bu, G. 1998. *J Biol Chem.* **273**:22374-22381.
- Oleinikov, A.V., Zhao, J. y Makker, S.P. 2000. *Biochem J.* **347**: 613-621.
- Ooka, S., Matsui, T., Nishioka, K. y Kato T. 2003. *Arthritis Res Ther.* **5**: R174-180.
- Pawson, T. y Scott, J.D. 1997. *Science.* **278**: 2075-80.
- Pilarsky, C. y Koch-Brandt, C. 1992. *Eur J Cell Biol.* **59**: 275-279.
- Ranganathan, S., Liu, C., Migliorini, M., Von Arnim, C., Peltan, I., Mikhailenko, I., Hyman, B.T. y Strickland D.K. 2004. *J Biol Chem.* **279**: 40536-40544.
- Rapacciuolo, A., Suvarna, S., Barki-Harrington, L., Luttrell, L.M., Cong, M., Lefkowitz, R.J. y Rockman, H.A. 2003. *J. Biol. Chem.* **278**: 35403-35411.
- Roberts, M.S., Woods, A.J., Dale, T.C., Van Der Sluijs, P. y Norman, J.C. 2004. *Mol Cell Biol.* **24**:1505-1515.
- Sorensen, S., Ranheim, T., Bakken, K.S., Leren, T.P. y Kulseth, M.A. 2006. *J. Biol. Chem.* **281**: 468-476.
- Spoelgen, R., Hammes, A., Anzenberger, U., Zechner, D., Andersen, O.M., Jerchow, B. y Willnow, T.E. 2004. *Development.* **132**: 405-414.
- Stolt, P.C. y Bock, H.H. 2006. *Cellular Signalling.* **18**: 1560-1571.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., y He, X. 2004. *Mol Cell.* **13**:149-156.
- Traebert, M., Volkl, H.B.J., Murer, H. y Kaissling, B. 2000. *Am J Physiol Renal Physiol.* **278**: F792-798.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A. y Herz, J. 1999. *Cell.* **97**: 689-701.
- Twoney, C. y McCarthy J.V. 2006. *FEBS Letters.* **580**: 4015-4020.
- van Kerkhof, P., Lee, J., McCormick, L., Tetrault, E., Lu, W., Schoenfish, M., Oorschot, V., Strous, G.J., Klumperman, J. y Bu, G. 2005 *EMBO J.* **24**: 2851-2861.

Willnow, T.E., Hilpert, J., Armstrong, S.A., Rohlmann, A., Hammer, R.E., Burns, D.K. y Herz, J. 1996. Proc Natl Acad Sci U S A. **93**: 8460-8464.

Yuseff, M.I. Megalina: Modelo de estudio de nuevos aspectos del tráfico intracelular constitutivo en células polarizadas. 2005. Tesis doctoral. Universidad de Chile.

Yuseff, M.I., Farfan, P., Bu, G. y Marzolo, M.P. 2007. Traffic. **8**: 1215-1230.

Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J. y He, X. 2005. Nature. **438**: 873-877.