

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PODOCALICINA
HUMANA EXPRESADA EN SISTEMAS HETERÓLOGOS

Tesis presentada por

Darío Fernández

Para optar al grado académico de Doctor

VºBº Directores de Tesis

VºBº Tutor de Tesis

Doctorando

Fdo. Dra. Matilde Sánchez Ayuso

Fdo. Dr. Ignacio Rodríguez Crespo

Fdo. Darío Fernández

Fdo. Dr. Roberto Parrilla

LA Dra. D^a. MATILDE SÁNCHEZ AYUSO, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, JUNTO A EL Dr. D. ROBERTO PARRILLA SÁNCHEZ, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS,

Informan que:

El trabajo de tesis titulado:

“Caracterización funcional de la podocalicina humana expresada en sistemas heterólogos”

presentado por Darío Fernández, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Medicina Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y , en nuestra opinión, reúne los requisitos necesarios para poder optar al grado de Doctor

Para que conste, firmamos la presente en Madrid a 04 de abril de 2011

Esta Tesis Doctoral desarrollada en el Centro de Investigaciones Biológicas, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ha sido financiada con las siguientes ayudas:

Beca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Banco Santander Central Hispano (CSIC-BSCH).

Contrato del Centro de Investigación Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERer). Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación.

Proyectos del Plan Nacional de I+D+i, Programa de Biomedicina, Ministerio de Ciencia e Innovación, SAF2004-04345, SAF2005-01261 y SAF2007-61701

Agradecimientos

La presente investigación representa un esfuerzo que culmina con varios años de estudios y dedicación hacia la ciencia.

Quiero mostrar mi agradecimiento a la Doctora Matilde Sánchez Ayuso, por sus observaciones atentas, sus críticas y sugerencias, sus investigaciones paralelas a las mías y a la orientación personal y profesional, que imprimió a mi labor para poder comenzar a recorrer el camino de la ciencia.

Expreso mi cordial gratitud al Doctor Roberto Parrilla por su participación y co-asesoramiento científico.

Estoy muy agradecido a todo el personal del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

También quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Fisiopatología de Transtornos Hemostáticos perteneciente al Departamento de Medicina Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas.

Darío Fernández

Madrid, 2011

A los que tienen la mirada en donde brilla mi infancia feliz,

Mario y Aurora.

A los que alumbran también mi hermandad,

Mario, Diego, Jorge y Gabriela.

A los que alegran mis días,

mis sobrinos Camila, Joel y Timoteo.

ÍNDICE

Índice

1. Introducción	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. La podocalicina forma parte de la familia de proteínas CD34	3
1.3. Expresión de la Podocalicina	8
1.4. Función de la Podocalicina	11
1.5. Podocalicina extracelular	20
1.6. Podocalicina y tumores	20
2. Objetivos y planteamiento experimental	25
3. Materiales y Métodos	33
3.1. Anticuerpos	33
3.10. Identificación de proteínas por espectroscopía de masas	39
3.11. Inmunoprecipitación	40
3.12. Microscopía de fluorescencia <i>in vivo</i>	40
3.13. Liberación de podocalicina al compartimento extracelular	41
3.14. Citometría de flujo	41
3.2. Líneas celulares y condiciones de cultivo	33
3.3. Preparación de lisados celulares	34
3.4. SDS-PAGE y análisis de Western	34
3.5. Expresión heteróloga de mutantes de delección de podocalicina humana	35
3.5.1. Construcción de un vector de expresión que codifica una proteína de fusión conteniendo el péptido señal de podocalicina y la proteína verde fluorescente (GFP)	35
3.5.2. Construcción de vectores de expresión que codifican proteínas de fusión de mutantes de delección de podocalicina, con la proteína verde fluorescente (GFP)	35
3.5.3. Transfección estable de células de ovario de hamster chino (CHO) con el vector de expresión de las mutantes de delección de podocalicina	36
3.6. Inmunofluorescencia	37
3.7. Ensayo de adhesión celular	38
3.8. Ensayo de migración celular	38

3.9. Detección de complejos multiproteicos mediante análisis electroforético en condiciones nativas.	
Electroforesis "Blue Native" (BN)	38
4. Resultados	45
4.1. Identificación de podocalicina en células CHO-PODXL _{GFP}	45
4.10. Detección de podocalicina en complejos multiproteicos de células CHO-PODXL _{GFP} deficientes en glicosilación y sialización	78
4.11. Papel del dominio citosólico en la adhesión y migración de células CHO-PODXL _{GFP}	80
4.11.1. Adhesión celular	83
4.11.2. Migración celular	84
4.12. Análisis morfológico <i>in vivo</i> y citométrico de células CHO expresando distintas mutaciones del dominio citosólico de podocalicina	87
4.13. Interacción de podocalicina con otras proteínas	91
4.14. Liberación de podocalicina al medio extracelular de células CHO-PODXL _{GFP} y análisis microscópico <i>in vivo</i> de la segregación de podocalicina	93
4.2. Distribución intracelular de la proteína de fusión de podocalicina con proteína fluorescente verde (CHO-PODXL _{GFP})	47
4.3. Relación entre la estructura del dominio extracelular de podocalicina y la capacidad de adhesión y migración de células CHO-PODXL _{GFP}	51
4.4. Análisis morfológico <i>in vivo</i> y citométrico de células CHO expresando distintas mutaciones del dominio extracelular de podocalicina	57
4.5. Adhesión celular de los mutantes de delección del dominio extracelular de podocalicina	64
4.6. Migración de células que expresan mutantes de delección del dominio extracelular de podocalicina	66
4.7. Detección de podocalicina en complejos multiproteicos de células CHO-PODXL mediante el procedimiento "blue-native" (BN)	69
4.8. Participación del sistema ubiquitina proteasoma en los complejos de alto peso molecular aislados por la técnica "blue native"	72

4.9. Detección de podocalicina en complejos multiproteicos de células TERA-1	77
5. Discusión	111
5.1. Correlación morfología-función en células CHO transfectadas con podocalicina o sus mutantes de delección	111
5.2. Relación estructura-función de la molécula de podocalicina	112
5.3. Participación de podocalicina en complejos multiproteicos de células CHO	113
5.4. Participación de la vía ubiquitina-proteasoma en el procesamiento y/o catabolismo de podocalicina	115
5.5. Asociación de podocalicina con proteínas intracelulares	116
5.6. Podocalicina extracelular	117
5.7. Propiedades funcionales de la podocalicina	121
6. Conclusiones	127
7. Bibliografía	131

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de la estructura de las proteínas de la familia CD34	4
Figura 2. Organización genómica	5
Figura 3. Árbol filogenético que muestra la relación entre las proteínas de ratón y humano, CD34, PODXL, endoglicano y una proteína no relacionada, CD43	6
Figura 4. Unión alternativa de exones	6
Figura 5. Fotografías de microscopio electrónico de transmisión de un capilar glomerular y de podocitos	12
Figura 6. Modelo molecular de podocilios propuesto por Mundel y Shankland, 2002	13
Figura 7. Esquema de la organización de los dominios de la familia NHERF.	14
Figura 8. Esquema de la interacción del complejo Podocalicina/NHERF2/ezrina con el citoesqueleto de actina	15
Figura 9. Modelo propuesto para la reorganización de actina en células MDCK a través de RhoA	16
Figura 10. Posible explicación de las funciones contradictorias de PODXL basada en los niveles de expresión	26
Figura 11. Caracterización de PODXL _{GFP} expresada en células CHO	46
Figura 12. Distribución intracelular de PODXL en células adheridas a fibronectina	48
Figura 13. Morfología <i>in vivo</i> de células CHO-PODXL _{GFP} . Aspecto tras la siembra	49
Figura 14. Microscopía de fluorescencia <i>in vivo</i> de células CHO-PODXL _{GFP}	50
Figura 15. Esquema de las mutantes de PODXL con deleciones en el dominio extracelular	52
Figura 16. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del marco de lectura de la PODXL humana	54
Figura 17. Análisis de Western de lisados de células CHO que expresan PODXL _{GFP} y las tres mutantes de deleción de PODXL	56
Figura 18. Microscopía <i>in vivo</i> de células CHO _{GFP}	58
Figura 19. Microscopía <i>in vivo</i> de células CHO-PODXL _{GFP}	59
Figura 20. Microscopía <i>in vivo</i> de células CHO-Δ45-PODXL _{GFP}	60
Figura 21. Microscopía <i>in vivo</i> de células CHO-Δ146-PODXL _{GFP}	61
Figura 22. Microscopía <i>in vivo</i> de células CHO-ΔC4-PODXL _{GFP}	62
Figura 23. Análisis de citometría de flujo de CHO _{GFP} , CHO-PODXL _{GFP} y mutantes de deleción CHO-Δ45-PODXL _{GFP} , CHO-Δ146-PODXL _{GFP} y CHO-ΔC4-	

PODXL _{GFP}	63
Figura 24. Experimento representativo de la capacidad de adhesión de células CHO que expresan PODXL o mutantes de delección fusionadas a GFP	64
Figura 25. Capacidad de adhesión de células CHO _{GFP} o CHO-PODXL _{GFP} , y mutantes de delección del dominio extracelular	65
Figura 26. Ensayo de cicatrización de herida	67
Figura 27. Expresión cuantitativa de la velocidad de cicatrización de herida mostrados en la Figura 26	68
Figura 28. Blue-Native-PAGE y análisis de Western blot de los complejos proteicos en lisados de células CHO-PODXL _{GFP}	70
Figura 29. Análisis de Western de electroforesis BN de lisados de células CHO-PODXL _{GFP}	71
Figura 30. Blue-Native-PAGE y análisis de Western blot de los complejos proteicos de lisados de células CHO-PODXL _{GFP}	73
Figura 31. Esquema del sistema ubiquitina-proteasoma	75
Figura 32. Efecto del inhibidor del proteasoma, MG-132, sobre la expresión de PODXL _{GFP} y ubiquitina	76
Figura 33. Blue-Native-PAGE y análisis de Western de complejos proteicos de lisados de células TERA-1	78
Figura 34. Análisis de Western del Blue-Native-PAGE de lisados de células CHO portadoras de mutaciones de glicosilación, expresando de forma estable CHO-PODXL _{GFP}	79
Figura 35. Esquema de las mutantes de podocalicina con delecciones en el dominio citosólico	81
Figura 36. Análisis de Western de lisados de células CHO que expresan PODXL _{GFP} y las dos mutantes de delección del dominio citosólico de PODXL.	82
Figura 37. Capacidad de adhesión de mutantes del dominio citosólico de PODXL	83
Figura 38. Valoración cuantitativa de los resultados obtenidos con los experimentos de adhesión mostrado en la Figura 37	84
Figura 39. Ensayo de cicatrización de herida	85
Figura 40. Valoración cuantitativa de los resultados del experimento de cicatrización de herida de la Figura 39	86
Figura 41. Microscopía <i>in vivo</i> de células CHO- Δ yuxtamembrana-PODXL _{GFP}	88
Figura 42. Microscopía <i>in vivo</i> de células CHO- Δ DTHL-PODXL _{GFP}	89
Figura 43. Microscopía de fluorescencia de células adheridas a fibronectina inmovilizada que expresan PODXL _{GFP} y las mutantes de delección del dominio	

citosólico	90
Figura 44. Análisis de citometría de flujo de CHO _{GFP} , CHO-PODXL _{GFP} y mutantes de delección CHO-Δyuxtamembrana-PODXL _{GFP} , y CHO-ΔDTHL-PODXL _{GFP}	91
Figura 45. Análisis de Western de los inmunoprecipitados obtenidos con los anticuerpos: anti-PODXL, anti-ezrina, anti-NHERF y anti-cortactina	92
Figura 46. Morfología <i>in vivo</i> de células CHO-PODXL _{GFP}	93
Figura 47. Progresión <i>in vivo</i> a lo largo de los filopodios de podocalicina fluorescente en células CHO-PODXL _{GFP}	94
Figura 48. Esquema de las proteínas de fusión que contienen PODXL con GFP en el extremo carboxilo (A) o en el extremo amino (B)	95
Figura 49. Presencia de PODXL en el medio extracelular	96
Figura 50. Detección por análisis de Western de PODXL y de GFP en lisados de células TERA-1, PODXL _{GFP} ó GFPPODXL	97
Figura 51. Detección por análisis de Western de PODXL y de GFP en el medio de cultivo de células TERA-1, PODXL _{GFP} o GFPPODXL	98
Figura 52. Detección de podocalicina en la fracción particulada del medio de cultivo de células TERA-1 y CHO-PODXL _{GFP}	100
Figura 53. Microscopía electrónica de transmisión de la fracción de microvesículas (a) y células CHO-PODXL _{GFP} (b-f). Aumentos: (a y f) 100.000x; el resto 300.000x	101
Figura 54. Detección de PODXL o GFP en lisados celulares, microvesículas (MV) y medio de cultivo (MC) de células CHO-PODXL _{GFP}	101
Figura 55. Sitios potenciales de corte de PODXL por metaloproteinasas	102
Figura 56. Efecto de ésteres de forbol (PMA), inhibidores de PKC (estaurosporina) o de metaloproteinasas matriciales sobre el aumento inducido por PMA de PODXL soluble en el medio de cultivo de células CHO-PODXL _{GFP}	103

Índice de Tablas

Tabla 1. Expresión de podocalicina en los tres miembros de la familia CD34	10
Tabla 2. Identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas extraídas de las bandas 1, 2 y 3 de la Figura 11.B.	47
Tabla 3. Identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas extraídas de las bandas 1-3 del panel A de la Figura 30	74

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

cADN: ADN complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BSA: albúmina de suero bovino

Células MDCK: del inglés "Madin-Darby Canine Kidney Cells", células de riñón canino

CHO-PODXL_{GFP}: Células de ovario de hamster chino, transfectadas con podocalicina humana acoplada a la proteína verde fluorescente

DMEM: "Dulbecco's Modified Eagle Medium", medio modificado de Dulbecco

DMSO: dimetil sulfóxido

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfatos

EDTA: ácido etilen-diamin-tetracético

g: unidad de fuerza relativa de centrifugación

G418: geneticina, análogo neomicina

GFP: proteína verde fluorescente

h: hora

HEV: del inglés, "High endothelial venules"

Ig G: inmunoglobulina G

Kb: kilobases

kDa: kilodaltons

min: minutos

mRNA: ARN mensajero

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PKC: Proteína Quinasa C

PMA: del inglés: "Phorbol 12-Myristate 13-Acetate", Forbol 12-Miristato 13-Acetato

PODXL: podocalicina

SDS: dodecil sulfato sódico

seg: segundos

TE: tampón tris-EDTA

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Antecedentes

En 1970 Michael y colaboradores (Michael, Blau y Vernier 1970) mostraron que la cara luminal de los podocitos o células epiteliales del glomérulo renal, estaban recubiertas de una superficie que podía ser digerida con neuraminidasa a la cual denominaron "polianión epitelial" por su afinidad por colorantes catiónicos. Posteriormente, otros autores (Kerjaschki, Sharkey y Farquhar 1984), aislaron una sialoproteína glomerular de unos 140 kDa, tingible por colorantes catiónicos, digerible por neuraminidasa y capaz de fijarse a aglutinina de germen de trigo. Estos autores concluyeron que esta proteína era el equivalente bioquímico del polianión del epitelio glomerular, descrito por medios histoquímicos, y la denominaron podocalicina (PODXL) dada su localización en el glicocalix de los podocitos glomerulares. Trabajos posteriores demostraron que su carga negativa era debida a su alto contenido en sulfato y ácido siálico (Dekan, Gabel y Farquhar 1991). Se ha considerado que la podocalicina o, para ser más precisos, su carga superficial, es esencial para mantener la estructura de las células epiteliales (podocitos) de los glomérulos renales e impedir la oclusión de las rendijas epiteliales, también denominadas espacios urinarios (Charest y Roth 1985, Kerjaschki y col. 1984, Michael y col. 1970).

La importancia patológica de la podocalicina se apoya en los hallazgos de la disminución del contenido glomerular de ácido siálico, distorsión de la estructura de los podocitos y obliteración de las rendijas epiteliales en casos de nefrosis humana de "cambios mínimos" o en nefrosis experimentales (Caulfield, Reid y Farquhar 1976, Seiler y col. 1977).

1.2. La podocalicina forma parte de la familia de proteínas CD34

CD34, podocalicina y endoglicano se agrupan como una familia de proteínas (familia CD34) en base a la conservación de la organización de sus dominios (Figura 1) (Sasseti, Van Zante y Rosen 2000, Doyonnas y col. 2001, Nielsen, Doyonnas y McNagny 2002) así como de su

organización genómica (Doyonnas y col. 2001, Nielsen y col. 2002, Li y col. 2001).

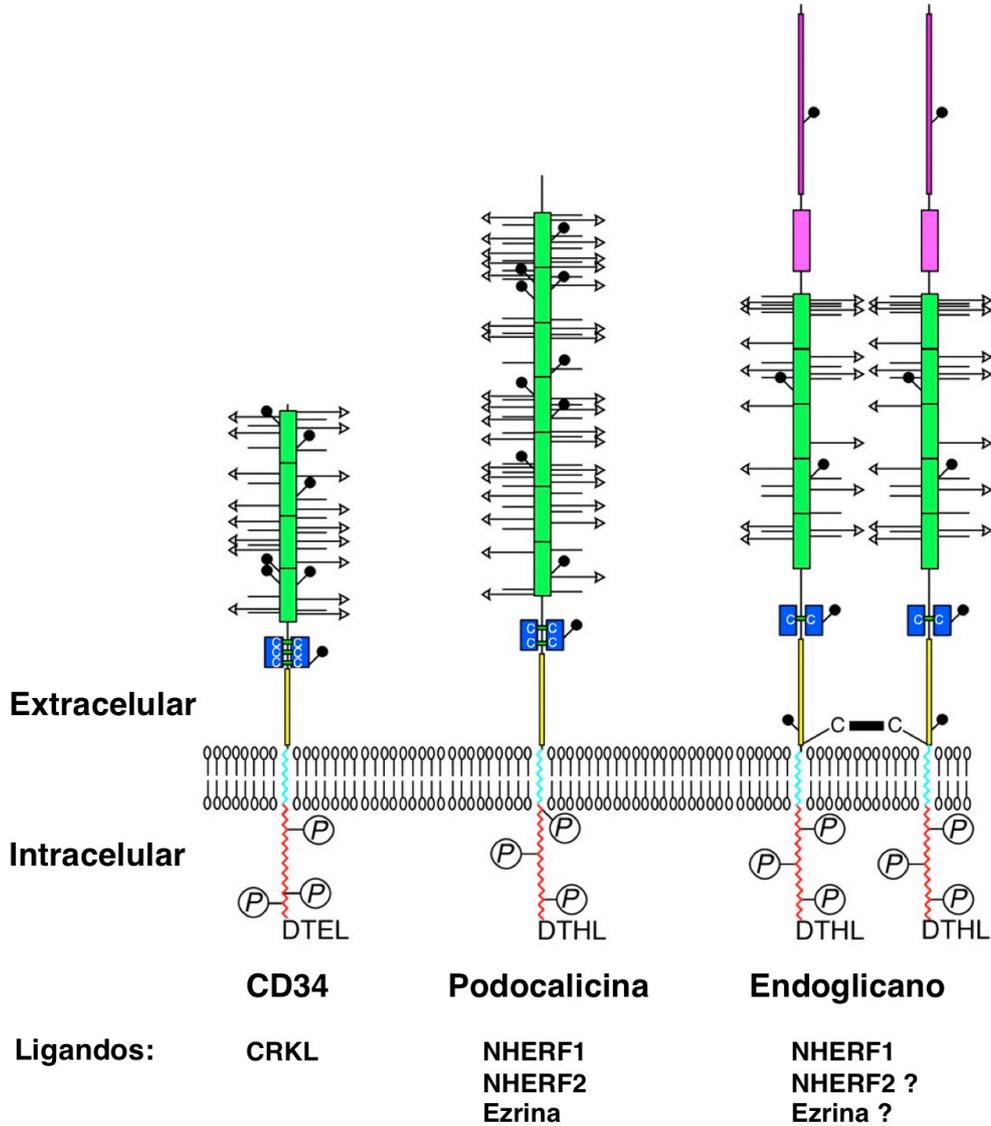


Figura 1. Esquema de la estructura de las proteínas de la familia CD34. CD34, PODXL y endoglicano, tienen un dominio mucina extracelular rico en serina, treonina y prolina (verde), O-glucosilado (líneas horizontales) y sializado (líneas horizontales con cabeza de flecha). Se indican los sitios putativos de N-glicosilación (líneas con círculos). También tiene un dominio globular que contiene cisteína (azul oscuro) y una región peduncular yuxtamembranar (amarillo). El dominio transmembranar (azul claro) continúa con la cola citoplasmática (marcada en rojo) que contiene sitios de fosforilación putativos y un dominio carboxi-terminal de sitios de unión a PDZ (DTEL o DTHL). El residuo cisteína extracelular no apareado del endoglicano puede facilitar la homodimerización. El endoglicano también contiene un dominio extracelular poco usual, rico en ácido poliglutámico (caja rosa). (Reproducido de Nielsen y McNagny, 2008).

A nivel genómico todos los miembros de esta familia son codificados por ocho exones (Figura 2), con exones parálogos codificando dominios proteicos parálogos, evidencia de un origen común (Li y col. 2001, Doyonnas y col. 2001, Nielsen y col. 2002).

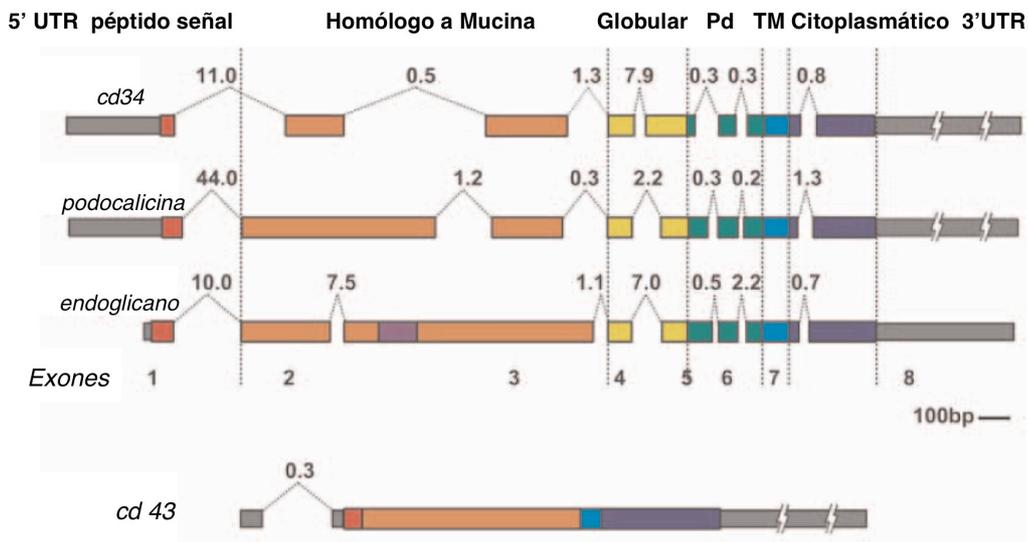


Figura 2. Organización genómica. Cada proteína es codificada por ocho exones, cada uno de los cuales codifica el correspondiente dominio de cada proteína. Reproducido de Furness y McNagny, 2006. Pd (pedúnculo) TM (transmembrana)

Este dato permite establecer que este grupo de proteínas forma una familia, ya que como se muestra en la Figura 3.A, el árbol filogenético no indica la existencia de un antepasado común en base a la secuencia de aminoácidos, mientras que la Figura 3.B, muestra la relación entre las diferencias de secuencia de los dominios entre los miembros de la familia.

Existen variantes de CD34 y de podocalicina producidas por el ensamblaje alternativo de ARN. En ambos casos se utiliza un exón 8 alternativo dando lugar a ARNm que codifica proteínas con un dominio citosólico truncado que no se ha hallado en el gen de endoglicano (Li y col. 2001, Krause y col. 1994) (Figura 4).

La estructura de los tres miembros de la familia consiste, en base a información bioquímica y a las secuencias de aminoácidos, en un dominio mucina, animo-terminal, extracelular, seguido de un dominio globular

con un pedúnculo, una zona que atraviesa la membrana plasmática una sola vez y un dominio citosólico intracelular (Figura 1).

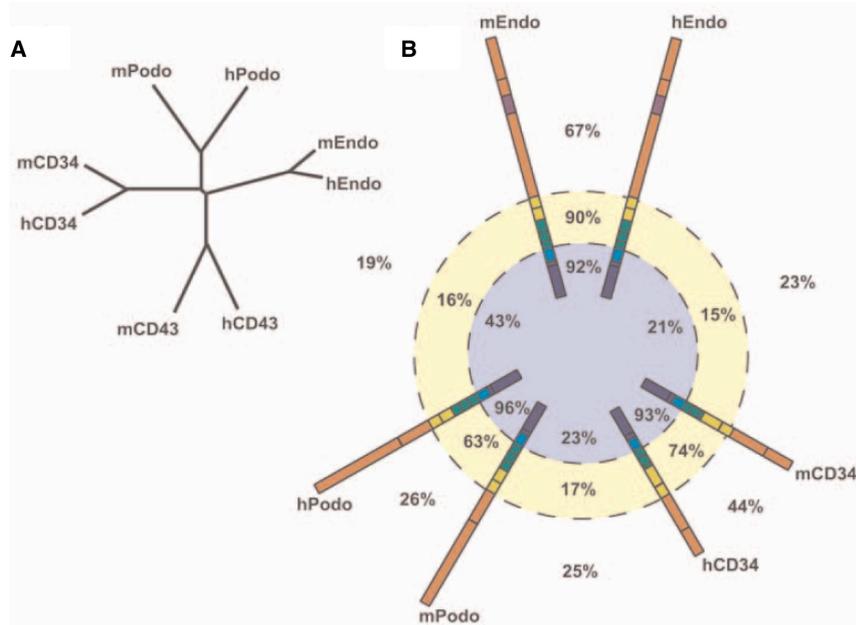


Figura 3. A. Árbol filogenético que muestra la relación entre las proteínas de ratón y humano, CD34, PODXL, endoglicano y una proteína no relacionada, CD43. Resaltando la dificultad de asignar estas tres proteínas a una sola familia basándose sólo en la secuencia de aminoácidos. Las longitudes de las ramas son proporcionales a la distancia calculada.

B. Representación esquemática de la relación entre las secuencias de aminoácidos de CD34, PODXL y endoglicano resaltando las diferencias entre los distintos dominios. Los colores significan: naranja, dominio mucina; amarillo, dominio globular; verde, pedúnculo; cian, transmembrana y azul, cola citoplasmática. Los números indican el porcentaje de identidad entre las proteínas vecinas. Los dominios se agrupan de la siguiente forma: Mucina, globular + transmembrana, transmembrana + cola citosólica. Reproducido de Furness y MacNagy, 2006.

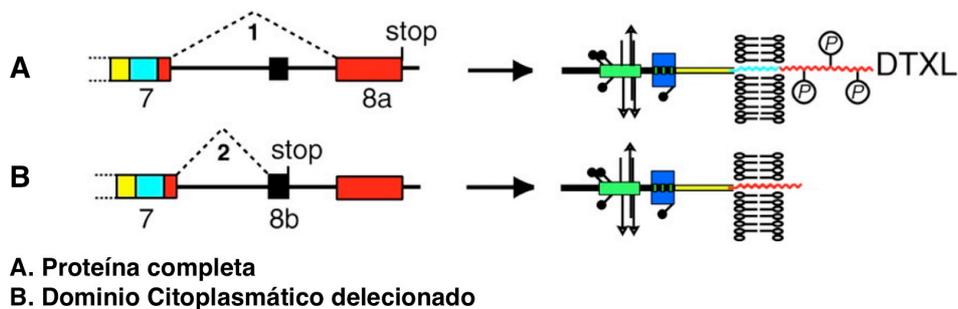


Figura 4. Unión alternativa de exones. CD34 y PODXL tiene el mismo patrón de ensamblaje alternativo y pueden existir como versiones truncadas a las que le falte la mayor parte del dominio citosólico. Reproducido de Nielsen y McNagy, 2008.

Los miembros de la familia CD34 han sido identificados en vertebrados, ratón, humano, perro y pollo, y se han hecho predicciones sobre la existencia en el pez cebra (Furness y McNagny 2006). No se han identificado proteínas homólogas en urocordados, invertebrados, ni en otros eucariontes, por lo que parece probable que el gen parental apareciera en vertebrados y fuera sometido a duplicación génica con la finalidad de acomodar algún aspecto del desarrollo de los vertebrados que no es compartido por otros cordados (Furness y McNagny 2006).

Los dominios mucina son comunes a un amplio rango de proteínas de membrana que incluyen a las mucinas, sialomucinas (a la que pertenece la familia CD34), ligandos de lectinas y algunos receptores de membrana. Los dominios mucina están modificados por moléculas de carbohidratos unidas por el oxígeno del grupo hidroxilo de serina y treonina (*O*-glicosilación), que son normalmente codificadas por un exón único. Suelen ser ricos en serina, treonina y prolina y generalmente muy poco conservados a nivel de secuencia de aminoácidos. En el caso de la familia CD34, los dominios mucina están escasamente glicosilados en asparagina (*N*-glicosilación) y altamente modificados por *O*-glicosilación (Sasseti y col. 2000, Kerjaschki y col. 1984, Sutherland y col. 1988). La mayor parte de la *O*-glicosilación está también sializada, lo que junto con la sulfatación contribuye a dotar a esta proteína de fuerte negatividad (Hemmerich, Butcher y Rosen 1994, Bistrup y col. 1999, Fieger, Sasseti y Rosen 2003). El dominio mucina de los miembros de la familia CD34 tiene la capacidad de unirse al receptor de leucocitos, L-selectina (Baumheter y col. 1993, Sasseti y col. 1998, Paavonen y Renkonen 1992). Hasta ahora, no se ha conseguido atribuir una función específica a los dominios globulares y pedunculares de ningún miembro de la familia. Por el contrario, dada la conservación de su secuencia de aminoácidos, el dominio citosólico se supone que podría tener funciones importantes. Se han identificado varios ligandos (Felschow y col. 2001, Li y col. 2002, Meder y col. 2005, Schmieder y col. 2004, Takeda 2003, Takeda y col. 2001, Tan y col. 2006) de podocalicina y su señalización se supone que pudiera estar regulada por fosforilación (Takeda y col. 2000, Fackler y col. 1990, Fackler, Civin y May 1992).

Las diferencias más notables entre la estructura de la PODXL, CD34 y endoglicano están en el dominio globular, la podocalicina contiene dos pares de cisteínas, CD34 tres, mientras que el endoglicano posee sólo un par en la zona yuxtamembranar, que no está apareada por lo que se supone que pudiera estar implicada en la homodimerización (Brown, Greaves y Molgaard 1991, Fieger y col. 2003, Kershaw y col. 1997, Sasseti y col. 2000). Otra diferencia importante está en el dominio extracelular mucínico con el siguiente orden de tamaños: endoglicano > PODXL > CD34 (Sasseti y col. 2000, Sasseti y col. 1998, Krause y col. 1994) (Figura 1).

1.3. Expresión de la Podocalicina

La podocalicina es conocida también como progenitor transformado de Myb-Ets (MEP) 21, proteína 1 similar a PODXL (PCLP1), trombomucina y gp135. Fue identificada inicialmente como un marcador de los podocitos del glomérulo renal (Kerjaschki y col. 1984). Su función ha sido analizada principalmente en riñón.

La podocalicina se expresa en el endodermo primitivo, ectodermo y en los precursores mesodérmicos intraembrionarios (Doyonnas y col. 2005). Se expresa también en hemangioblastos de la región AGM (región aorta-gonadas-mesonefros) (McNagny y col. 1997, Hara y col. 1999), en la cara luminal del endotelio vascular (McNagny y col. 1997, Horvat y col. 1986), en los podocitos glomerulares del riñón (Kerjaschki y col. 1984, McNagny y col. 1997, Schnabel y col. 1989), en el neuroepitelio del ectodermo primitivo (Doyonnas y col. 2005) y en todos los elementos limítrofes del cerebro (Vitureira y col. 2005). Se expresa en otras zonas limítrofes, tales como células mesoteliales y la cara luminal de las cavidades recién formadas (Doyonnas y col. 2005, McNagny y col. 1997). En adultos, la podocalicina se expresa en los podocitos renales (Kerjaschki y col. 1984, Horvat y col. 1986) y en el endotelio vascular (Horvat y col. 1986).

La expresión de podocalicina en el endotelio embrionario es similar a la de CD34, que se encuentra en todo el endotelio vascular con expresión máxima en los vasos pequeños (Young, Baumhueter y Lasky 1995, Wood

y col. 1997) y que incluye las células endoteliales que circundan los islotes hematopoyéticos del saco vitelino (Young y col. 1995, Wood y col. 1997, Fennie y col. 1995) y el endotelio de la región AGM (Tavian y col. 1996, Ohneda y col. 1998). No se ha demostrado que las células PODXL⁺ del AGM sean las mismas que las que expresan CD34 o que las células PODXL⁺ tengan actividad de células madre mesenquima / estroma, como las CD34⁺ (Simmons y Torok-Storb 1991, Lee y col. 2000, Goan y col. 2000). Algunos autores han sugerido que los miembros de la familia CD34 pudieran ser capaces de una compensación funcional en los distintos tejidos (Furness y McNagny 2006). En el caso de tejidos adultos, CD34 y PODXL también coinciden en su expresión endotelial vascular y se ha descrito que la podocalicina es modificada en el endotelio vascular humano lo que posibilita la unión de L-selectina (Sasseti y col. 1998).

La tabla 1, (reproducida de Furness y McNagny 2006), resume datos sobre la expresión de los tres miembros de la familia CD34.

La primera descripción de la expresión de podocalicina en células hematopoyéticas se realizó en pollos, mediante la identificación de MEP21/trombomucina como marcador de progenitores hematopoyéticos multipotentes, tanto normales como transformados (McNagny y col. 1997, McNagny y col. 1992, Graf y col. 1992). Posteriormente, la expresión de podocalicina se ha descrito en células hematopoyéticas de ratones (Doyonnas y col. 2005, Hara y col. 1999, Kerosuo y col. 2004) y de humanos y la expresión se mantiene en células hematopoyéticas tempranas y a lo largo del desarrollo (Doyonnas y col. 2005). De forma similar a lo que ocurre con las células madre CD34⁺ hematopoyéticas, las células PODXL⁺ son capaces de reconstituirse a largo plazo en ratones (Doyonnas y col. 2005). No se sabe si ambas proteínas, CD34 y PODXL se coexpresan en células madre hematopoyéticas, ni tampoco si la expresión de podocalicina en estas células es dependiente de activación / proliferación, como ocurre con el CD34. La similitud en el perfil de expresión, así como en la capacidad de reconstitución apoya la idea de que los miembros de esta familia pueden aportar compensación funcional en el sistema hematopoyético. La podocalicina se expresa en estadios ulteriores a las células progenitoras hematopoyéticas, encontrándose en

trombocitos de pollo (McNagny y col. 1997) y células funcionalmente equivalentes en ratas (plaquetas) (Miettinen y col. 1999), así como en sus precursores (megacariocitos) (Miettinen y col. 1999).

Tejido/Células	CD34	PODXL	Endoglicano
Progenitores hematopoyéticos multipotentes			
Adultos	+	+	+
Embrionarios	+	+	¿?
Precursores			
Eritroides	-	+	¿?
Trombocíticos	+	+	¿?
Mieloides	+	-	¿?
Linfoides	+	-	¿?
Células hematopoyéticas maduras			
Células B	-	-	¿?
Células T	-	-	¿?
Macrófagos	-	-	¿?
Granulocitos	-	-	¿?
Eosinófilos	-	-	¿?
Células cebadas	+*	-	¿?
Eritrocitos	-	+**	¿?
Plaquetas	-	+	¿?
Endotelio vascular	+	+	+
Músculo liso	-	-	+
Podocitos	-	+	¿?
Cerebro (Neural)	-	+***	+
Elementos limítrofes mesoteliales	-	+	¿?

Tabla 1. Expresión de podocalicina en los tres miembros de la familia CD34.

* Sólo en murinos; ** Sólo en eritrocitos embrionarios o anémicos;

*** Sólo en la capa ependimal.

En plaquetas sin activar, la podocalicina se encuentra en depósitos intracelulares y en la superficie celular es activada en respuesta a estimulación por trombina (Miettinen y col. 1999). Esto es similar a lo que ocurre con el CD34 en las células madre hematopoyéticas, en las que

se expone en la superficie celular en respuesta a la activación celular (Fackler y col. 1992, Ogawa y col. 2001)

La podocalicina también se expresa en células eritroides nucleadas y esta expresión se correlaciona con alta velocidad de hematopoyesis, incluyendo repuestas de anemia y siembra de progenitores eritroides al nuevo microambiente hematopoyético (Doyonnas y col. 2005).

En resumen, se puede concluir que los patrones de expresión de las proteínas de la familia CD34 son singulares, pero con cierto grado de solapamiento. Las tres proteínas se expresan en precursores hematopoyéticos embrionarios y en células endoteliales vasculares. Esto sugiere la existencia de un potencial de compensación funcional. Por el contrario, la expresión de podocalicina es única en células cebadas (CD34), podocitos (PODXL) y linfocitos (endoglicano) (Drew y col. 2002, Kerjaschki y col. 1984, Sasseti y col. 2000).

1.4. Función de la Podocalicina

La podocalicina se expresa en la superficie de las estructuras ciliares especializadas de los podocitos renales (podocilios) (Kerjaschki y col. 1984) (Figura 5).

Los podocitos son células epiteliales que recubren los capilares glomerulares y sus extensiones (podocilios) forman las "rendijas" de filtración que permiten que el plasma sea filtrado desde los capilares y penetre en el espacio urinario de la cavidad glomerular libre de proteínas. La podocalicina es la sialoproteína mayoritaria de los podocilios (Kerjaschki y col. 1984, Horvat y col. 1986). Cualquier tratamiento sistémico con agentes que eliminan o neutralizan la carga negativa de la superficie de los podocilios produce el colapso de estas estructuras dando lugar a la disfunción renal (Seiler y col. 1977, Kerjaschki y col. 1984, Kerjaschki, Vernillo y Farquhar 1985, Seiler, Venkatachalam y Cotran 1975). La organización de los podocilios depende de la presencia de podocalicina puesto que en su ausencia se produce una desorganización estructural de los podocitos, anuria y mortalidad perinatal (Doyonnas y col. 2001). Se ha postulado que la carga negativa de la podocalicina contribuiría a mantener las rendijas de filtración abiertas. Esta posibilidad

es consistente con los experimentos que demuestran que los tratamientos que neutralizan o eliminan la carga negativa de podocalicina afectan también a su localización. En contra de esta hipótesis estaría el hecho de que la podocalicina no se localiza en las rendijas de filtración sino en la cara luminal de los podocilios (Kerjaschki y col. 1984). También es posible que el dominio mucínico, que es el que aporta la alta carga negativa sea importante para otros aspectos de la señalización vía podocalicina que permita mantener la estructura normal. Esta posibilidad se apoya en que los tratamientos que dan lugar a la neutralización de la carga superficial negativa de la podocalicina producen un desacoplamiento de podocalicina con el citoesqueleto (Takeda y col. 2001).

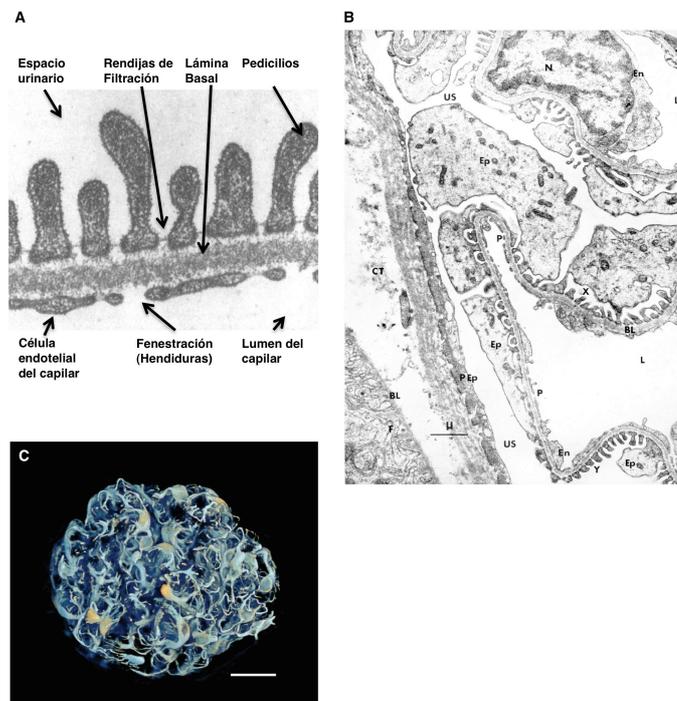


Figura 5. (A), (B) Fotografías de microscopio electrónico de transmisión de un capilar glomerular y de podocitos. Las proyecciones del podocito contienen numerosos filamentos y microtúbulos y la proyección del pie terminal de cada podocilio es continua con una gruesa lámina basal que comparte con el endotelio capilar fenestrado. El cuerpo celular del podocito, del que emergen numerosas proyecciones citoplásmicas, contiene un núcleo complejo con hendiduras profundas. El citoplasma, presenta un aparato de Golgi bien desarrollado, polirribosomas y cisternas de retículo endoplásmico rugoso. BL, lámina basal; CT, citoplasma; En, célula endotelial Ep, célula epitelial; N, núcleo; L, lumen; US, espacio urinario; X e Y, podocitos (Kessel *et al.*, 1979). (C) Células renales de rata fijadas y teñidas con marcadores de podocitos y las MPs (azul) y para los núcleos de los podocitos (marrón). (Reproducido de Kessel y Kardon, 1979)

La Figura 6, muestra un esquema de la distribución de podocalicina en los podocilios y su conexión con el citoesqueleto de actina a través de proteínas adaptadoras.

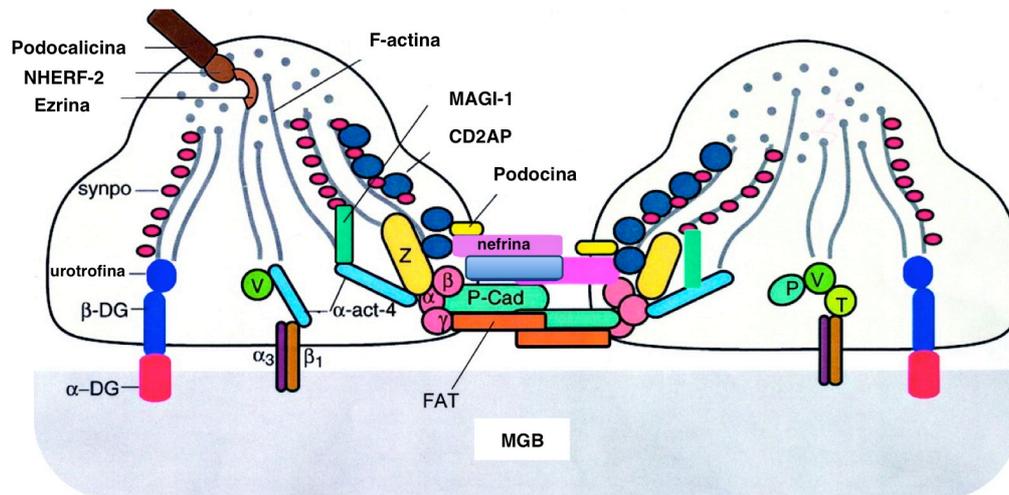


Figura 6. Modelo molecular de podocilios propuesto por Mundel y Shankland, 2002. Este esquema muestra podocilios adyacentes con un complejo de proteínas de la rendija de filtración. MGB, membrana glomerular basal; α -act4, α -actinina 4; α 31, α 31-integrina; α -DG, α -dextroglucano; β -DG, β -dextroglucano; NHERF2, Factor 2 regulador del intercambiador Na^+/H^+ ; P, paxillina; P-Cad, P-cadherina; synpo, sinaptopodina; T, talina; V, vinculina. Reproducido de Mundel y Shakland, 2002.

La podocalicina se une por su extremo carboxilo a la proteína adaptadora NHERF-2 (factor 2 regulador del intercambio Na^+ / H^+ , también conocido como E3KARP (proteína reguladora de la quinasa A tipo 3 del intercambiador Na^+ / H^+) y SLC9A3R2 (factor 2 regulador de la isoforma A3 de la familia 9 del transportador de soluto) (Li y col. 2002, Takeda y col. 2001, Takeda 2003). NHERF-2 es una proteína adaptadora citosólica de señalización. La Figura 7, muestra esquemáticamente su estructura, según Takeda y col. (Takeda y col. 2001).

Las proteínas NHERF contienen dos dominios PDZ en tándem (PSD-95, Dlg, ZO-1) y un dominio de unión al complejo ERM (ezrina, radixina, moesina) en el extremo carboxilo (Voltz, Weinman y Shenolikar 2001). Se puede unir a proteínas del citoesqueleto mediante interacción con miembros de la familia ERM, que a su vez interaccionan con el

citoesqueleto de actina (Louvet-Vallee 2000). La interacción de los miembros de la familia ERM con el citoesqueleto de actina está regulada mediante señalización (Louvet-Vallee 2000). La familia de las proteínas NHERF tienen unas reglas complejas en la regulación del tráfico de proteínas a través de la membrana, así como de la actividad y reclutamiento de moléculas señalizadoras (Voltz y col. 2001). En los podocitos, podocalicina, NHERF-2, y ezrina forman un complejo que se cree es capaz de fijar podocalicina al citoesqueleto de actina y que se representa de forma esquemática en la Figura 8 (Takeda y col. 2001).

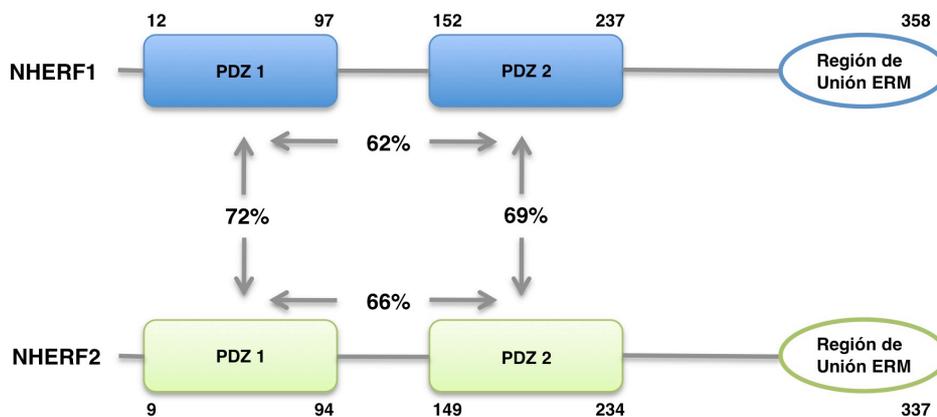


Figura 7. Esquema de la organización de los dominios de la familia NHERF. NHERF1 y NHERF2 contienen dos dominios PDZ y una región de unión ERM en el extremo carboxi-terminal. Los dominios PDZ de NHERF2 tienen un 60-70% de identidad de cada uno con el otro así como con los correspondientes dominios de NHERF1. Reproducido de Takeda y col. 2001.

NHERF-2 tiene una expresión muy restringida y no se expresa en tejidos hematopoyéticos (Furness y McNagny 2006), aunque sí se expresa su pariente próximo NHERF-1 (Tan y col. 2006). Dada la similitud entre NHERF-1 y -2, se asume que las dos proteínas ligarían podocalicina. NHERF-1 y podocalicina colocalizan en una línea celular derivada de riñón de perro (MDCK) (Meder y col. 2005, Schmieder y col. 2004) y los dominios PDZ-2, de la proteína NHERF-1 y NHERF-2 son los reponsables de la unión a podocalicina mediante el dominio carboxi-

terminal DTHL, de ésta, observado por inmunoprecipitación (Takeda y col. 2001).

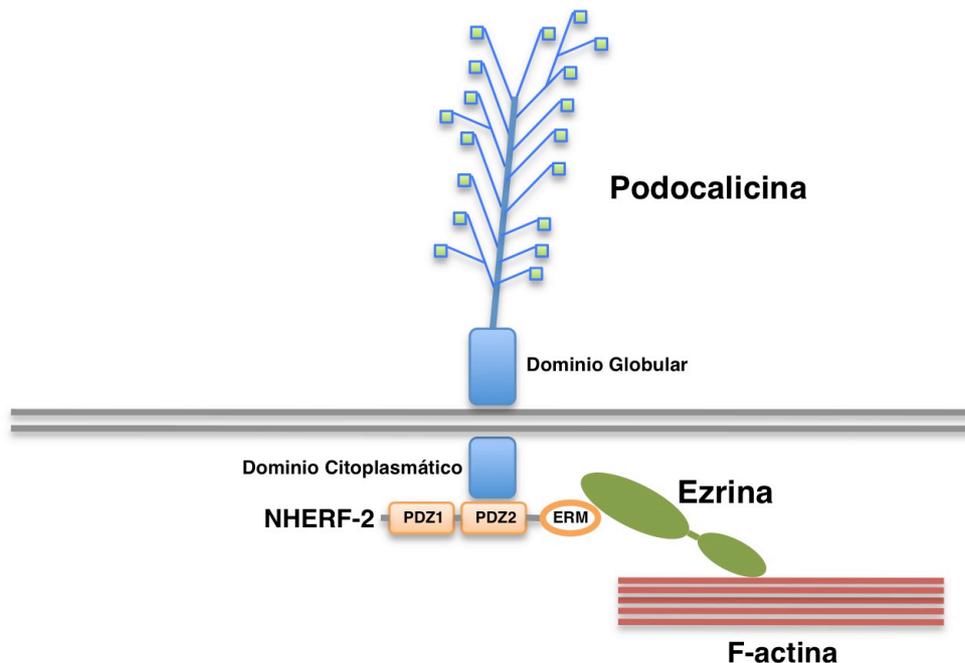


Figura 8. Esquema de la interacción del complejo Podocalicina/NHERF2/ezrina con el citoesqueleto de actina. PODXL se liga al segundo dominio PDZ-2 de NHERF2 a través de su extremo carboxi-terminal. NHERF2 se liga al extremo amino-terminal de ezrina fosforilada a través de su región de fijación ERM del extremo carboxi-terminal. La ezrina fosforilada se fijaría al citoesqueleto de actina a través del sitio de unión carboxi-terminal. Reproducido de Takeda y col. 2001.

En células hematopoyéticas hay interacción entre proteínas endógenas (Tan y col. 2006). La interacción entre PODXL y NHERF-1 tendría lugar mediante el segundo dominio PDZ de NHERF-1 y los 4 aminoácidos del extremo carboxi-terminal (DTHL) de podocalicina (Takeda y col. 2001, Tan y col. 2006). La proteína CD34 posee un dominio similar, DTEL, en el extremo carboxilo; al contrario de podocalicina, el extremo carboxilo de CD34 no interacciona con NHERF-1 (Tan y col. 2006). Sólo una pequeña fracción de NHERF-1 es inmunoprecipitada con anticuerpos anti-PODXL en los precursores hematopoyéticos tempranos, lo que sugiere que la interacción que *in*

vitro es muy estable, en la célula es transitoria o regulada dinámicamente por una señal aún sin identificar (Tan y col. 2006).

La podocalicina, al igual que CD34, parece ser la diana de un proceso de fosforilación en respuesta a ésteres de forbol aunque se desconoce la quinasa implicada (Furness y McNagny 2006). La sobreexpresión de podocalicina en células de riñón de perro, células MDCK, induce la activación de RhoA (homólogo A de Ras) y un aumento de la fosforilación de NHERF-1 (Schmieder y col. 2004).

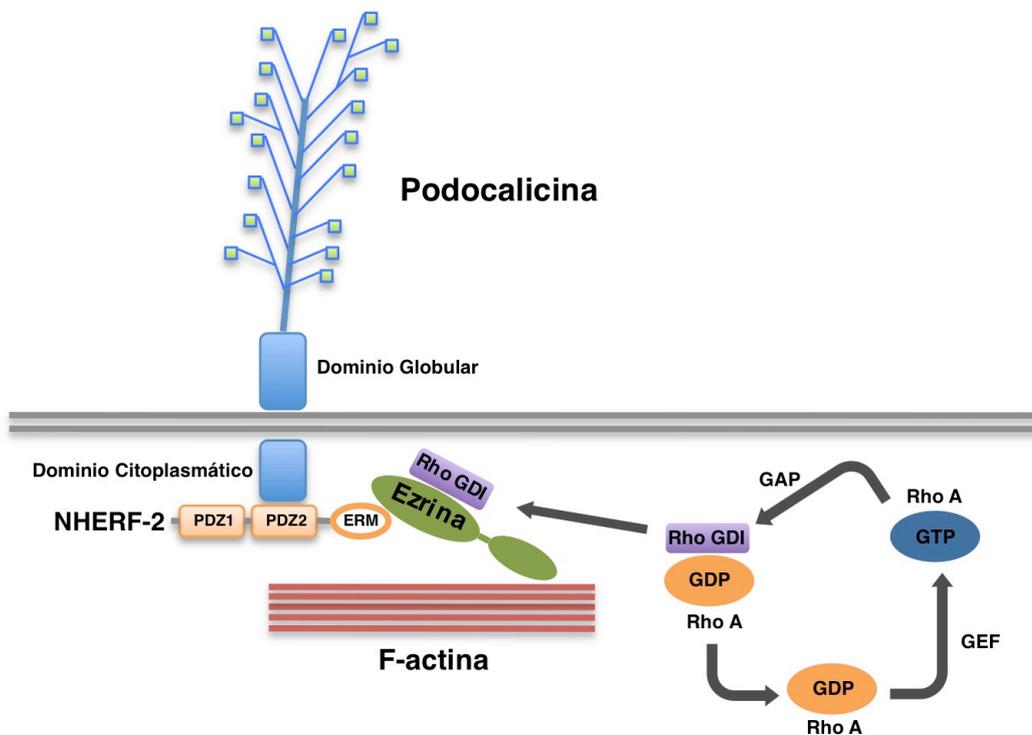


Figura 9. Modelo propuesto para la reorganización de actina en células MDCK a través de RhoA. Podocalicina interaccionaría con ezrina, directa e indirectamente, a través de NHERF1. La región yuxtamembrana de podocalicina interaccionaría directamente con el extremo amino-terminal de ezrina. El motivo PDZ de unión al extremo carboxi-terminal (flecha azul) interaccionaría con el segundo dominio PDZ de NHERF1. La ezrina asociada a podocalicina reclutaría RhoGDI, liberando GDP.RhoA. En presencia de NHERF1, RhoA-GDP se convierte en RhoA-GTP posiblemente porque NHERF1 reclutaría un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) para RhoA. RhoA-GTP activado interaccionaría con proteínas efectoras que conducen a la activación de ezrina, conectando podocalicina a actina y concentrando actina en el dominio apical. RhoA activado puede modular también la estructura y función de las uniones fuertes. Reproducido de Schmieder y col, 2004.

El esquema de la Figura 9, describe un modelo que explicaría la implicación de RhoA en la vía de señalización que conecta podocalicina con el citoesqueleto de actina. La interacción entre podocalicina y ezrina vía NHERF-1 desplazaría a RhoGD1 (homólogo de Ras, inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina) produciendo la activación de RhoA (Schmieder y col. 2004). Una explicación alternativa sería que la sobreexpresión de podocalicina daría lugar a una cascada de señalización en la que la activación de ezrina sería consecuencia de la activación de RhoA (Furness y McNagny 2006). En cualquier caso, está claro que la sobreexpresión de podocalicina permitiría su participación en las vías de señalización.

CD34 no se asocia con NHERF-1 (Li y col. 2002, Meder y col. 2005, Takeda 2003) lo que indicaría que si existiera una compensación funcional entre estas dos proteínas de la misma familia en las células madre embrionarias, NHERF-1 no formaría parte de la vía que compartieran. De igual manera, el CD34 tiene un sitio de unión para CrkL, miembro de la familia de proteínas adaptadoras Crk (Felschow y col. 2001). Las proteínas Crk contienen un dominio de homología Src 2 (SH2) (unión de fosfotirosina) y dos sitios de homología Src 3 (SH3) (unión de secuencias ricas en prolina) y unen proteínas que no tienen actividad quinasa intrínseca a las cascadas de señalización intracelulares, permitiendo la transmisión de señales. El sitio de unión de CrkL a CD34 no se conoce exactamente pero es dependiente de la secuencia yuxtamembranar, altamente conservada (Felschow y col. 2001), y estaría ausente en la podocalicina, lo que implica que CrkL no participaría en la hipotética vía compartida. Las secuencias intracelulares de podocalicina y endoglicano tienen un 43% de identidad, mientras que CD34 y PODXL solamente un 23%, por lo que no es de extrañar la existencia de ligandos distintos (Kershaw y col. 1997, McNagny y col. 1997, Sasseti y col. 2000, Simmons y Torok-Storb 1991, He y col. 1992) y sugiere que aunque las proteínas puedan tener solapamiento de funciones, puede haber también grandes diferencias.

Como hemos mencionado anteriormente, se acepta generalmente que el papel de podocalicina en los podocitos de riñón, sería el mantener

abiertas las rendijas urinarias debido a que las fuerzas de repulsión de su fuerte carga negativa le confieren propiedades antiadherentes. Sin embargo, trabajos previos de nuestro grupo muestran que la expresión de podocalicina recombinante aumenta la adhesión y migración celular sobre ligandos inmovilizados, así como la adhesión a células endoteliales o plaquetas (Larrucea y col. 2008, Larrucea y col. 2007), indicando la participación de podocalicina en los procesos de adherencia célula-célula o célula-matriz. Otros resultados que apoyan esta posibilidad se basan en que existe una correlación entre el grado de malignidad de algunos tumores y la expresión de podocalicina (Hara y col. 1999, Kelley y col. 2005, Schopperle, Kershaw y DeWolf 2003, Schmelz y col. 2005, Somasiri y col. 2004) y existe una correlación entre la presencia de variantes de podocalicina y el grado de malignidad y agresividad de los tumores de próstata (Casey y col. 2006). Las propiedades adherentes también están documentadas en la familia de proteínas CD34. Es conocido que los linfocitos se reclutan en los órganos linfoides secundarios mediante un proceso de varias etapas que implica la unión de baja afinidad al endotelio vascular linfoide especializado, conocido como células endoteliales venulares altas (High-endothelial venules, HEV), seguida de la unión firme y la migración transendotelial (Butcher y Picker 1996, Lasky 1992). Durante la primera etapa de unión de baja afinidad la L-selectina de los linfocitos reconoce la forma sulfatada de Sialyl Lewis X (SLeX), un carbohidrato tetrasacárido que está presente como una modificación post-traducional de ciertas proteínas que se expresan en las células HEV. El CD34, PODXL y endoglicano sufren un proceso de glicosilación singular cuando se expresan en las HEV, que consiste en modificaciones de SLeX que les permite interactuar con L-selectina, por tanto, confiriendo a las células propiedades adherentes (Baumheter y col. 1993, Fieger y col. 2003, Sasseti y col. 1998, Sarangapani y col. 2004). La expresión de podocalicina en células de ovario de hamster chino (células CHO) que da lugar a un aumento de la adhesión de las células CHO transformadas a plaquetas va acompañada de la interacción de PODXL con P-selectina (Larrucea y col. 2007) y las propiedades adherentes y migratorias de podocalicina están disminuidas

cuando la sobreexpresión se produce en células CHO glucomutadas deficientes en ácido siálico (Larrucea y col. 2008). Recientemente, se ha descrito que la podocalicina es ligando de E- y L-selectina en células de carcinoma de colon (Thomas, Schnaar y Konstantopoulos 2009b) reforzando la hipótesis de que la función adherente de podocalicina está, de alguna forma, implicada en la progresión de metástasis tumorales.

Con el fin de conciliar el hecho de que una molécula como la podocalicina pudiera conferir propiedades adherentes y anti-adherentes (Nielsen y McNagny 2008) han propuesto la hipótesis de que los niveles de expresión de podocalicina pudieran alterar el contenido y la localización intracelular de otras moléculas reguladoras. Se sabe que la podocalicina tiene efecto "polarizante" sobre las células en las que se expresa. La Figura 6, muestra un esquema de la estructura molecular de los podocilios. En este esquema, se muestra que la podocalicina se sitúa en el extremo apical donde se establecerían los contactos con complejos moleculares que determinarían la unión al citoesqueleto de actina (Mundel y Shankland 2002). El modelo propuesto de la distribución de podocalicina (Figura 6) muestra que podocalicina se sitúa en la zona apical de los podocilios (Takeda 2003), de las células en las que se expresa y su expresión puede dar lugar a la expansión de los dominios apicales a expensas de los dominios basolaterales (Meder y col. 2005, Nielsen y col. 2007, Yu y col. 2007). Es posible, que la sobreexpresión de podocalicina produzca una acumulación de integrinas en otras zonas de la célula y que fuera la acumulación de integrinas la causa del aumento de adhesión. La Figura 10, muestra un esquema del modelo propuesto por (Nielsen y McNagny 2008). Este modelo, no explicaría el efecto de la sobreexpresión de podocalicina en células CHO aumentando su capacidad de adhesión y migración. Si bien la podocalicina expresada en células CHO se acumula en el frente de migración celular (Larrucea y col. 2008), el efecto adherente es impedido en presencia de la forma recombinante, soluble, del dominio extracelular de podocalicina, lo que implica que la capacidad adherente es mediada por podocalicina y no por otras moléculas de adhesión, como las integrinas.

1.5. Podocalicina extracelular

La presencia de podocalicina en el medio de cultivo de líneas celulares derivadas de tumores, tales como algunas líneas derivadas de cáncer de colon, Caco-2, Lovo, HCC-56 y LS123 (Ito y col. 2007), así como en células TERA-1 derivadas de un carcinoma embrionario (Ito y col. 2007, Kershaw y col. 1997, Schopperle y col. 2003) sugiere dos posibilidades, un procedimiento de escisión proteolítica "*shedding*", que libere al menos el dominio extracelular o un proceso de exocitosis con secreción de la proteína completa. Es interesante resaltar que el péptido detectado en el medio de cultivo de las líneas celulares de cáncer de colon es distinto al detectado en el medio de cultivo de las células TERA-1, en base a su distinta antigenicidad, indicando la ausencia de determinados epítomos (Ito y col. 2007). El estudio del perfil diferencial de los péptidos presentes en el medio de cultivo, realizado por la técnica SELDI, mostró la presencia de un péptido de 20 aminoácidos que contiene parte de la zona transmembrana y parte del dominio extracelular en células de cáncer de colon (Ito y col. 2007).

Poco se sabe sobre la función de las proteínas que son segregadas al medio extracelular. Un caso paradigmático de una proteína con funciones extra e intracelulares es el caso descrito, recientemente, de la proteína ALIX (Pan y col. 2008). Esta proteína es un adaptador citosólico implicado en la organización de los endosomas y en la formación del citoesqueleto de actina. Se requiere para el mantenimiento de los fibroblastos. Según parece, en el compartimento extracelular regularía la adhesión celular mediada por integrinas y el ensamblaje a la matriz extracelular (Pan y col. 2008).

1.6. Podocalicina y tumores

La podocalicina se expresa en casos de tumores malignos, como cáncer de mama, testículo, próstata y leucemia (Kelley y col. 2005, Schopperle y col. 2003, Somasiri y col. 2004). Utilizando técnicas de "microarray" en tejidos de carcinomas invasivos se ha concluido que parece existir una correlación entre expresión de podocalicina y el grado de malignidad del tumor de mama (Somasiri y col. 2004). En el caso del

cáncer de próstata, se ha descrito una asociación entre una mutación en el gen de podocalicina y la malignidad del tumor. Se ha identificado una mutación con mantenimiento de marco de lectura y varias mutaciones sin sentido en el gen de podocalicina de 17 familias, estableciendo una relación entre cáncer de próstata, agresividad del tumor y las variantes de podocalicina (Casey y col. 2006). Todavía no se conocen las implicaciones fisiológicas de estas observaciones, pero se piensa que la alteración de la carga negativa de la podocalicina podría aumentar la motilidad celular y su capacidad invasiva o la de alterar la asociación de podocalicina con el citoesqueleto de actina (Nielsen y McNagny 2009). También se ha asociado podocalicina con el cáncer de testículo. Se considera a podocalicina como un marcador de tumores de células germinales no seminomatosas (Schopperle y col. 2003). También se ha encontrado podocalicina en sobrenadantes de líneas celulares de carcinomas embrionarios (Schopperle, Armant y DeWolf 1992).

Los adenocarcinomas ductales pancreáticos son positivos para podocalicina, al contrario que el tejido pancreático normal (Ney y col. 2007) y también se ha descrito estimulación y patrones de tinción alterados de podocalicina en carcinomas hepatocelulares (Heukamp y col. 2006, Chen y col. 2004) considerándose como un marcador precoz de la enfermedad.

La relación entre podocalicina y leucemia se basa en estudios realizados con microarrays y biopsias de tejido y se ha visto que se expresa en la mayoría de los blastocitos y en una gran mayoría de casos de leucemia mieloide aguda (AML) y de leucemia linfoblástica aguda (ALL) (Kelley y col. 2005).

Como se puede apreciar, la expresión de podocalicina se ha asociado con diversos cánceres y tipos de leucemias. Una posible razón para explicar la desregulación de podocalicina en casos de proliferación tumoral pudiera ser la expresión anormal de p53, ya que la podocalicina es regulada negativamente por p53 (Stanhope-Baker y col. 2004) y se ha descrito que existe una correlación entre expresión de podocalicina y tinción de p53 en carcinomas invasivos de mama (Somasiri y col. 2004). Dado el papel de la podocalicina recombinante en el control de la

adhesión celular y su presencia en tumores invasivos sugiere que su participación en fenómenos de adhesión celular pudiera facilitar la formación y progresión de metástasis.

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

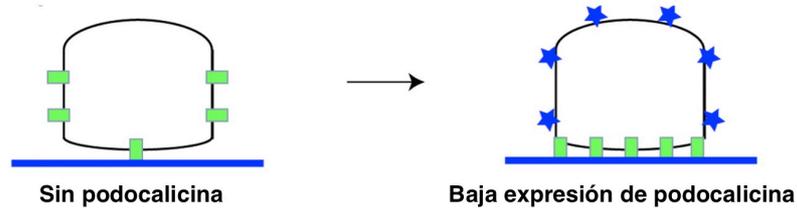
2. Objetivos y planteamiento experimental

Resumiendo las observaciones descritas en el apartado anterior, la familia de proteínas CD34 desempeña una importante función en adhesión celular. La función mejor documentada de esta familia de proteínas es promover la adhesión de linfocitos. Como hemos descrito anteriormente, los linfocitos inmaduros son reclutados en los órganos linfoides secundarios en un proceso de varias etapas que implica su unión de baja afinidad y dependiente de L-selectina al endotelio vascular especializado, "high endothelial venules" (HEV). En la década de 1990s, se descubrió que CD34 tenía afinidad por L-selectina lo que llevó a postular la capacidad adherente de las células que expresan CD34 y que posteriormente se ha ampliado a los otros miembros de la familia (Healy y col. 1995, Hu y Chien 1998, Majdic y col. 1994, Larrucea y col. 2007, Larrucea y col. 2008). En el caso de la podocalicina, su importante papel en la estructura y función de los podocitos renales se asoció a su fuerte carga negativa a la que atribuían la capacidad antiadherente que mantendría abiertas las "rendijas urinarias". Esta posible contradicción ha sido discutida por distintos autores y se ha formulado la hipótesis, comentada anteriormente, de que la tasa de expresión de podocalicina puede hacer variar la capacidad adherente o antiadherente de las células (Nielsen y McNagny 2008). Según estos autores, bajos niveles de expresión establecen dominios apicales, forzando a las integrinas a localizarse en la superficie basal de las células y por tanto aumentando la adhesión celular. Por el contrario, altos niveles de expresión de podocalicina inducirían la relocalización de actina para apoyar la formación de microvilli, con la consecuente disminución de actina en la zona basolateral y por tanto una disminución de la adhesión mediada por integrinas (Figura 10).

Esta hipótesis es cuestionable dado que se ha descrito que las células CHO con sobreexpresión de podocalicina (Larrucea y col. 2008, Larrucea y col. 2007) tienen mayor capacidad adherente y, por otra parte, la silenciación del gen de podocalicina en células TERA-1 que expresan podocalicina de forma constitutiva disminuye la adhesión de las células a ligandos inmovilizados (Larrucea y col. 2008). Estas observaciones no

parecen compatibles con que la capacidad de adhesión esté relacionada con la baja expresión de la proteína.

A. Aumento de adhesión inducido por podocalicina



B. Aumento de la formación de microvilli inducido por podocalicina y disminución de la adhesión

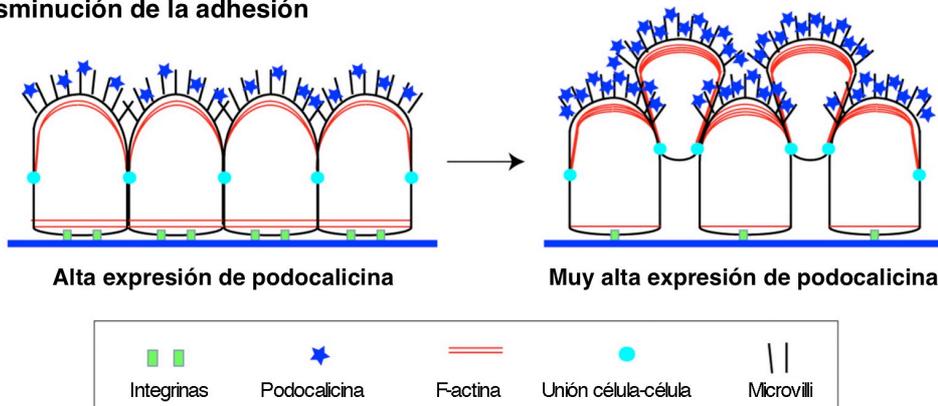


Figura 10. Posible explicación de las funciones contradictorias de PODXL basada en los niveles de expresión. Reproducido de Nielsen y MacNaghy, 2008.

Otra posible explicación de las discrepancias sobre la capacidad adherente de podocalicina se basa en las posibles diferencias en el grado de glicosilación y sialización del dominio extracelular de podocalicina. La propuesta de que la podocalicina glicosilada en las HEV es capaz de ligar L-selectina (Sasseti y col. 1998) y, por tanto, de interactuar con integrinas, abre la posibilidad de que otros tipos celulares tengan, también, capacidad de modificar el dominio extracelular de manera que sean capaces de activar integrinas y la capacidad adherente. De hecho, la interacción de los miembros de la familia CD34 con E y L-selectina ha sido descrita en células de cáncer de colon (Thomas y col. 2009b) y la P-selectina está implicada en la interacción entre células CHO que sobreexpresan podocalicina y

plaquetas (Larrucea y col. 2007). Argumentos a favor de esta posibilidad se basan, también, en los experimentos realizados con células CHO glucomutantes que sobreexpresan podocalicina en las que la capacidad de adhesión a ligandos inmovilizados está alterada (Larrucea y col. 2008).

La posible diferencia en los tipos celulares en los que se expresa podocalicina puede estar, también, relacionado con las diferencias en su función. Hemos mencionado anteriormente que el extremo citoplasmático de la proteína es necesario para que se manifieste su capacidad de adhesión a ligandos inmovilizados (Larrucea y col. 2008). Esta observación permite postular que la respuesta celular a la expresión de podocalicina puede ser modulada por el medio intracelular, y los datos existentes indican que la sobreexpresión de podocalicina permite su participación en las vías de señalización (Schmieder y col. 2004). Por lo tanto, las diferencias fisiológicas y bioquímicas entre los distintos tipos celulares podrían determinar la interacción de la proteína con las vías de señalización intracelulares y, por tanto, la respuesta celular.

Tampoco podemos olvidar los datos existentes en relación con la presencia de podocalicina en el medio de cultivo de distintas líneas de células derivadas de tumores (Ito y col. 2007). Esta observación, junto con el hecho de que la presencia de podocalicina recombinante en el medio de cultivo es capaz de interferir con la capacidad de adhesión de células CHO-PODXL_{GFP} a ligandos inmovilizados (Larrucea y col. 2008) abre la posibilidad de que la podocalicina extracelular sea capaz de modular la capacidad adherente de las células CHO-PODXL_{GFP} dependiendo de que esté completa o que sean fragmentos de la proteína los que aparecen en el medio extracelular por un proceso de escisión proteolítica "*shedding*", específico de cada tipo celular.

En resumen, existen distintas hipótesis para explicar las discrepancias observadas en la función de podocalicina y se requiere un mayor conocimiento de las bases moleculares de la función de podocalicina para poder determinar cual es su función fisiológica en cada tipo celular o tejido.

El objetivo general de esta tesis ha sido el de progresar en el conocimiento de las condiciones que favorecen los procesos de adhesión a ligandos inmovilizados y la migración de células que expresan podocalicina, con sobreexpresión heteróloga. El modelo experimental que hemos utilizado es el de células CHO con sobreexpresión estable de podocalicina humana completa o de mutaciones con deleciones de distintos dominios de la proteína.

Los objetivos parciales que nos hemos planteado han sido los siguientes:

- A. Estudiar la relación existente entre la estructura del dominio extracelular de la podocalicina y la capacidad de adhesión y migración de células CHO-PODXL_{GFP}. Para ello, hemos diseñado y preparado construcciones en vectores de expresión en las que el dominio extracelular de podocalicina ha sido modificado para, posteriormente, preparar líneas celulares estables que expresen estas construcciones.
- B. Participación de podocalicina en complejos multiproteicos de las células CHO-PODXL_{GFP}. La presencia de podocalicina en complejos multiproteicos indicaría su inserción en los mecanismos de respuesta de las células CHO. Para abordar este objetivo, hemos utilizado la técnica electroforética en condiciones nativas "Blue Native" (BN) que permite detectar complejos multiproteicos en lisados celulares.
- C. Determinar el papel del dominio citosólico en la respuesta celular.
- D. Análisis del proceso de liberación de podocalicina al medio de cultivo de células CHO-PODXL_{GFP}. La utilización de células que expresan PODXL_{GFP} permite analizar microscópicamente, *in vivo*, la distribución y el tráfico intracelular de podocalicina, así como, su eventual liberación al medio extracelular. Hemos generado proteínas de fusión de podocalicina con GFP unida a su extremo amino-terminal. La utilización de líneas celulares que expresen esta proteína de fusión nos podrá dar información

sobre el/los posible/es mecanismo(s) de escisión del ectodominio de podocalicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1. Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales de ratón: anti-Podocalicina humana B34D1.3; y anti-Podocalicina 1401F9.15, fueron generados en nuestro laboratorio (Rodríguez et al, 2006). Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-Ubiquitina Ub (10C2-2): sc-58448, anti-Cortactina (A4): sc-55578, anti-Ezrina (3C12): sc-58758, anti-Podocalicina (3D3): sc-23904; anti-NHERF-1 (4i337) sc-71697; de cabra anti-Podocalicina (K19): sc-10503; y de conejo anti-GFP (FL): sc-8334, se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos secundarios anti-ratón de cabra, anti cabra IgG de conejo y anti conejo de cabra, conjugados con (H+L)-HRP se obtuvieron de BIO-RAD (Hércules, CA).

3.2. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares con sobreexpresión estable de PODXL_{GFP} o de GFP fueron preparadas en nuestro laboratorio (Larrucea y col. 2007, Larrucea y col. 2008), mantenidas y crecidas en medio DMEM-HT (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina-G 100 U/mL (Gibco) y estreptomycin 100 mg/mL (Gibco), a 37°C y 5% CO₂. Las mismas condiciones de cultivo se utilizaron para el crecimiento de células con expresión de las mutaciones deletacionales de PODXL_{GFP} que utilizamos en este trabajo.

Las células parentales de CHO (W5), y las mutantes Lec 1, Lec 2 y Lec 8, transfectadas con PODXL_{GFP} o GFP (Larrucea y col. 2007, Larrucea y col. 2008) fueron crecidas en medio de cultivo alfa MEM (Gibco), suplementado con 10% SFB, penicilina-G 100 U/mL (Gibco) y estreptomycin 100 mg/mL (Gibco), a 37°C y 5% CO₂.

Las células TERA-1, fueron crecidas en medio McCoy's 5 A, con 10% de SFB, 1 mmol/L glutamina, penicilina-G 100 U/mL (Gibco) y estreptomycin 100 mg/mL (Gibco), a 37°C y 5% CO₂.

3.3. Preparación de lisados celulares

Las células fueron lisadas en tampón 50mM Tris-ClH, pH 7.4, 150 mM de ClNa, 1% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas de Roche, conteniendo 0,03% de azida sódica. Los lisados fueron incubados 45 minutos en hielo, centrifugados a 15.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y al sobrenadante se le midió la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad).

3.4. SDS-PAGE y análisis de Western

Los lisados celulares fueron preparados en tampón de lisis (1% triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5 e inhibidores de proteasas 10 mg/mL leupeptina, 10 mg/mL pepstatina, 1 mg/mL Pefabloc SC, 1 mg/mL aprotinina (Roche, Indianapolis, IN), 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (100 mM stock en etanol), incubados en hielo durante 1 hora y centrifugado a 15.000 xg a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante se cargó en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5% bajo condiciones reductoras. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y visualizadas por incubación con los anticuerpos indicados en cada caso.

Los anticuerpos primarios se utilizaron según especificaciones de la casa comercial y los obtenidos en nuestro laboratorio según Rodríguez y col., 2006. Incubados en una dilución 1:1000 para los comerciales y 1:15 para los obtenidos en nuestro laboratorio, toda la noche a 4°C, las membranas fueron lavadas 3 veces con un volumen igual de TTBS e incubadas posteriormente con el anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios fueron utilizados en una dilución 1:10000 en TTBS 0,1% de BSA durante 2 horas a temperatura ambiente y lavados 3 veces en TTBS. Para revelar, fueron incubados 2 minutos con una solución de 2,5mM de Luminol y 0,4mM de ácido p-cumárico en tampón 50 mM Tris-ClH pH 8.5; 0,03% de H₂O₂ 30% y expuestos a diferentes tiempos para su posterior revelado.

3.5. Expresión heteróloga de mutantes de delección de podocalicina humana

3.5.1. Construcción de un vector de expresión que codifica una proteína de fusión conteniendo el péptido señal de podocalicina y la proteína verde fluorescente (GFP)

Para generar una proteína de fusión del péptido señal de podocalicina con GFP (PS-PODXL_{GFP}), amplificamos la secuencia del péptido señal por PCR a partir del vector de expresión pcDNA3-podocalyxin utilizando los siguientes oligonucleótidos, complementarios con los nucleótidos 977-1007 a 1079-1109 del cDNA de podocalicina y conteniendo las dianas de restricción SacII y BamHI.

sp hpodxl SacII Kozak ATG:

5'-CCC CGC GGC GAC GCC ACC ATG GGC TGC GCG-3'

3' sp hpodxl BamH1 woSC:

5'-CGG CGA GGA TCC CGA CGG CAG CAG CGG CGG-3'

El producto de PCR correspondiente al péptido señal lo clonamos en el vector pCR 2.1-TOPO, de donde, posteriormente, aislamos un fragmento de 178 pb por digestión con Hind III y Xba I. El fragmento de 178 pb fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, seguido de una extracción con el kit Qiagen y se digirió con los enzimas de restricción Sac II y Bam H1. El fragmento obtenido se clonó en el vector pEGFP-N1 digerido, previamente, con los mismos enzimas.

3.5.2. Construcción de vectores de expresión que codifican proteínas de fusión de mutantes de delección de podocalicina, con la proteína verde fluorescente (GFP)

Para construir la proteína de fusión del péptido señal-mutantes de delección de podocalicina y GFP, se generaron productos de PCR utilizando el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen) que contiene el gen de la podocalicina humana (pcDNA3-podocalyxin). Para todas las mutaciones del dominio extracelular, $\Delta 45$ -PODXL_{GFP}, $\Delta 146$ -PODXL_{GFP} y $\Delta C4$ -PODXL_{GFP} se utilizó el mismo oligonucleótido antisentido del extremo 3' correspondiente al fragmento 1846-1822 de PODXL humana: 5'-CAG AGG ATC CAA GAG GTG TGT GTC-3' y conteniendo la diana de restricción

BamH1. Los oligonucleótidos utilizados para el extremo 5' fueron:

Mutación $\Delta 45$ -PODXL_{GFP}:

5'-TCT AAC AAA ACA GGA TCC ACT CCA GCA-3'

Mutación $\Delta 146$ -PODXL_{GFP}:

5'-ACA GCT AAA CCT GGA TCC ACA AGC AGC CAG-3'

Mutación $\Delta C4$ -PODXL_{GFP}:

5'-CGC TTC AGC GGA TCC CTC ATC ATC ACC ATC-3'

Todos ellos también contienen la diana de restricción BamH1. Los productos de PCR fueron digeridos con BamH1, purificados y clonados en el vector PS-PODXL_{GFP}, previamente, digerido con BamH1.

Para obtener las mutaciones de delección correspondientes al dominio citosólico se generaron productos de PCR utilizando el vector de expresión pcDNA3 que contiene el gen de la podocalicina humana (pcDNA3-podocalyxin) y el oligonucleótido sp_{-h}podxl-SacII-Kozak ATG, el mismo utilizado para la obtención del vector de expresión que codifica una proteína de fusión conteniendo el péptido señal de podocalicina y GFP.

Los oligonucleótidos del extremo 3' fueron:

Mutante Δ DTHL-PODXL_{GFP}:

5'-CTA GAG GTG TGT GGA TCC CTC CTC ATC CAG-3'

Mutante Δ yuxtamembrana-PODXL_{GFP}:

5'-GGA GAG GCG GGA TCC GCA GCA GCC ATA GAG-3'

Todos ellos contiene una diana de restricción BamH1 y se eliminó la señal de terminación del extremo 3'. Los productos de PCR fueron digeridos con BamH1 y clonados en el vector pEGFP-N1 digerido, previamente, con BamH1 y desfosforilado para impedir la autoligación.

Todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación de ADN.

3.5.3. Transfección estable de células de ovario de hamster chino (CHO) con el vector de expresión de las mutantes de delección de podocalicina

Para la expresión estable de las mutantes de podocalicina, se transfectaron las células CHO empleando la técnica del fosfato de calcio y

se seleccionaron los clones con G-418 (800 µg/mL). Para enriquecer el cultivo con células CHO, expresando las distintas construcciones, se llevó a cabo una separación de células mediante el procedimiento de diluciones límite. La expresión de las mutaciones de podocalicina en los distintos clones se verificó por fluorescencia y mediante Western, utilizando anticuerpos anti-Podocalicina y/o anti- proteína verde fluorescente.

3.6. Inmunofluorescencia

La localización de las mutantes de delección de podocalicina en la membrana celular se determinó analizando su colocalización con faloidina, un marcador de actina. Para ello, los cubreobjetos fueron colocados dentro de placas de 24 pocillos, recubiertos con 10 µg/mL de fibronectina (Sigma), durante 2 horas a 37°C, lavados con PBS y bloqueados con PBS-BSA 1% durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, las células fueron añadidas a una concentración de 2×10^5 /mL e incubadas 3 horas a 37°C. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3% en PBS, 15 minutos a temperatura ambiente y permeabilizadas con Triton X-100 0.5% en PBS-BSA 0.5%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Para visualizar actina, las células permeabilizadas fueron incubadas con 50 ng/mL de faloidina-TRITC en PBS durante 1 hora a 37°C y lavadas tres veces con un volumen igual de PBS. Las preparaciones de células fueron montadas sobre Mowiol-DABCO (Sigma) y visualizadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX-50). Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital (DP70, Olympus).

3.7. Ensayo de adhesión celular

Las células CHO-PODXL_{GFP} y las mutantes en medio DMEM con SFB 10% se añadieron a placas de 6 pocillos, recubiertos con 10 µg de fibronectina en PBS durante 2 horas a 37°C. Después de bloquear con 1% albúmina en PBS fueron lavadas con PBS, resuspendidas en el medios de cultivo y sembradas por triplicado (75×10^3 células por pocillo). Después de incubar, durante los tiempos indicados, el medio de cultivo fue retirado y se lavaron tres veces con PBS. El análisis del grado

de adherencia fue visualizado con aumento de 10X en el microscopio de contraste de fases Olympus Scope IX-50. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Olympus DP-70 y el número de células adheridas fueron contadas en diferentes puntos del pocillo.

3.8. Ensayo de migración celular

La migración de las células CHO-PODXL_{GFP} se determinó mediante el ensayo *in vitro* de cicatrización de herida. Para ello, placas de cultivo fueron recubiertas e incubadas con una solución de 10 µg/mL de fibronectina, durante 2 horas, a 37°C, bloqueadas con 1% albúmina en PBS y lavadas con PBS. Se sembraron 25 x 10⁵ células en cada placa en medio DMEM con SFB 10% e incubadas a 37° con 5% CO₂ durante 12 horas. Se realizaron surcos ("heridas"), en forma de cruz, rayando manualmente la monocapa celular con una punta de micropipeta (P10). Las células fueron lavadas dos veces con PBS y se fotografiaron, inmediatamente, después de la incisión (hora 0). Posteriormente, se incubaron en el mismo medio durante los tiempos indicados. El análisis de la herida fue analizado con una magnificación 10X en el microscopio de contraste de fases Olympus IX-50. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Olympus DP-70 y el cierre de la herida se cuantificó midiendo el área restante de cada cruz con el software Image J.

3.9. Detección de complejos multiproteicos mediante análisis electroforético en condiciones nativas. Electroforesis "Blue Native" (BN)

La electroforesis BN se realizó según métodos descritos previamente (Schagger y von Jagow 1991, Schagger, Cramer y von Jagow 1994). Los lisados de células CHO-PODXL_{GFP} y de células TERA-1 fueron preparados en tampón de lisis (20 mM Bis Tris, 0,5 M de ácido aminocaproico, 20 mM de ClNa, 0,1% de tritón X-100 y 87% de glicerol) y 400 µg de proteína fueron aplicados a geles con gradientes del 5%-15% de poliacrilamida. Como marcadores de peso molecular se utilizaron 40 µg de ferritina (880

kDa y 440 kDa; Sigma, St. Louis, MO) y 60 µg albúmina (272 kDa, 204 kDa, 136 kDa y 68 kDa, Sigma, St. Louis, MO). La electroforesis se llevo a cabo en un aparato de la firma Hoefer, a 200V constante, toda la noche, usando en el cátodo un tampón 50 mM tricina, 15 mM Bis Tris, pH 7.0, 0,01% w/v Coomassie brilliant blue G250, de Serva (Heidelberg) y en el ánodo se utilizó un tampón con 50 mM de Bis Tris.

Para la resolución de los complejos de la primera dimensión de BN, en una segunda dimensión en geles SDS-PAGE, los carriles de la primera dimensión fueron cortados, equilibrados durante 2 horas en tampón Laemmli 1x en condiciones reductoras (2-β-mercaptoetanol) y colocados en la parte superior de los geles de SDS-PAGE al 12%. La segunda dimensión y el análisis de Western se realizaron de acuerdo a protocolos estándar utilizando el anti-PODXL B34D1.3, e IgG anti-ratón. En algunos casos los geles fueron revelados por tinción con sales de plata.

El análisis de la composición de los complejos multiproteicos se realizó por análisis de cambio de movilidad inducido por anticuerpo en condiciones nativas "native antibody based mobility shift" (NAMOS) (Schamel 2008, Swamy y col. 2007). Para ello, los lisados de células CHO-PODXL_{GFP} fueron incubados con el anticuerpo anti-PODXL B34D1.3 (Rodríguez y col. 2006), purificado en una columna de Proteína A-Agarosa a partir de líquido ascítico de ratones inyectados intraperitonealmente con el hibridoma productor de este anticuerpo (anti-PODXL B34D1.3). También se utilizó el fragmento Fab de este anticuerpo obtenido con el "Fab Micro Preparation Kit" de Pierce Biotechnology (Rockford, Il, EE UU). Los geles de la electroforesis BN de una sola dimensión fueron decolorados y transferidos a membranas para su análisis por Western.

3.10. Identificación de proteínas por espectroscopía de masas

Las bandas de interés detectadas por tinción con plata en geles SDS-PAGE fueron escindidas y la identificación realizada en la unidad de proteómica de la Facultad de Farmacia, Parque Científico de Madrid,

utilizando un espectrómetro de masas con una fuente de ionización MALDI (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization) y un analizador TOF (Time of Flight), modelo Voyager-DE™ STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems), con un sistema de adquisición de 2 GHz, una célula CID (Collisionally-Induced Dissociation) y la capacidad de adquirir espectros PSD. La búsqueda, en las bases de datos, se realizó con la herramienta de MASCOT GPS Explorer TM Software, versión 3.0 (Matrix Science, London, United Kingdom), y se utilizaron las bases de datos del NCBI no redundante o SWISSPROT.

3.11. Inmunoprecipitación

Lisados de células CHO-PODXL_{GFP} ó TERA-1 se prepararon en tampón RIPA-modificado (50 mM pH 7.4 Tris-ClH, 1% NP-40, 0.25 % Na-deoxicolato, 150 mM ClNa, 1mM PMSF, 1 mM PO₄Na₃, 1mM FNa e inhibidores de proteasas (Roche, Indianapolis, IN) ó tampón NP-40 (50 mM Tris-ClH pH 7.4, 150 mM ClNa, 1% de NP-40 e inhibidores de proteasas de Roche), según el caso. Después de añadir 50 µL de proteína G-sefarosa (Pharmacia) para eliminar proteínas unidas de forma inespecífica, los lisados fueron centrifugados a 2000 rpm y el sobrenadante incubado, toda la noche a 4°C, con el anticuerpo anti-podocalicina (3D3). 50 µL de proteína G-sefarosa fueron añadidos para extraer las proteínas inmunoprecipitadas, después de incubar a 4 °C durante 2 horas, fue centrifugado a 6000 rpm y el sedimento lavado 3 veces con tampón RIPA-modificado ó NP-40, centrifugado y resuspendido en 100 µL de tampón Laemmli 2x (Laemmli, 1970), hervido 5 minutos y centrifugado. El sobrenadante fue sometido a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7.5% y analizado por Western.

3.12. Microscopía de fluorescencia *in vivo*

La microscopía de fluorescencia *in vivo* de cultivos de células CHO-PODXL_{GFP}, se realizó utilizando un microscopio Leica AF6000 LX modelo

DMI6000B. El filtro usado fue L5, en el rango de excitación azul y con un filtro de excitación BP480/40.

3.13. Liberación de podocalicina al compartimento extracelular

Las células fueron mantenidas en medio sin suero durante 18 horas y resuspendidas con EDTA. Después de centrifugar a 35.000 rpm el medio de cultivo fue concentrado en columnas centriplus YM-3 de Amicon (Bedford, MA), hasta un volumen de 500 μ L, y sometido a SDS-PAGE y análisis de Western. En algunos experimentos aislamos microvesículas del medio extracelular. Para ello, el medio se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 minutos y el sedimento se resuspendió en tampón de lisis. Las proteínas del sobrenadante fueron sometidas a SDS-PAGE y los geles analizados por Western.

3.14. Citometría de flujo

Las células fueron resuspendidas en PBS-EDTA 0,5 mM, centrifugadas a 2000 rpm y lavadas tres veces con PBS, resuspendidas, finalmente, en 500 μ L de PBS a 4°C. La fluorescencia de las células fue determinada en un citómetro de flujo, modelo EPICS XL.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Identificación de podocalicina en células CHO-PODXL_{GFP}

Para el estudio funcional de la podocalicina (PODXL) hemos utilizado células CHO transfectadas de forma estable con plásmidos de expresión conteniendo cDNA de PODXL humana. Estas líneas celulares han sido desarrolladas en nuestro laboratorio y algunas de sus características bioquímicas han sido descritas previamente (Larrucea y col. 2007, Larrucea y col. 2008). Para valorar la eficacia de la transfección, utilizamos un plásmido de expresión portador de cDNA que codifica la proteína de fusión de PODXL con GFP, de manera que las células transfectadas se pudieran identificar, fácilmente, mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Como control, hemos utilizado células CHO transfectadas con plásmidos de expresión portadores de cDNA-GFP.

La identificación de la proteína expresada en estas células se llevó a cabo mediante:

1. Detección de podocalicina y/o GFP por análisis de Western de lisados de células CHO-PODXL_{GFP}.
2. Detección de podocalicina mediante análisis de Western de inmunoprecipitados obtenidos con anti-PODXL de lisados de células CHO-PODXL_{GFP}.
3. Identificación de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-PODXL en geles de electroforesis teñidos con plata mediante espectroscopía de masas.

La detección de podocalicina en lisados de células CHO-PODXL_{GFP} se muestra en la Figura 11.

Se detectaron dos formas de podocalicina de pesos moleculares aparentes de 150 y 200 kDa, esto es, muy superiores al peso molecular teórico de la proteína. Esta observación sugiere que la podocalicina recombinante expresada en células CHO, al igual que ha sido descrito en otras especies (Dekan y col. 1991), muestra un alto grado de glicosilación. La misma figura, muestra que los anticuerpos anti-GFP reconocen solamente una de las dos formas, la de mayor peso molecular

lo que indica que ambas proteínas difieren, al menos en la presencia de GFP, por lo que la proteína de fusión $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ sería la de mayor peso molecular aparente.

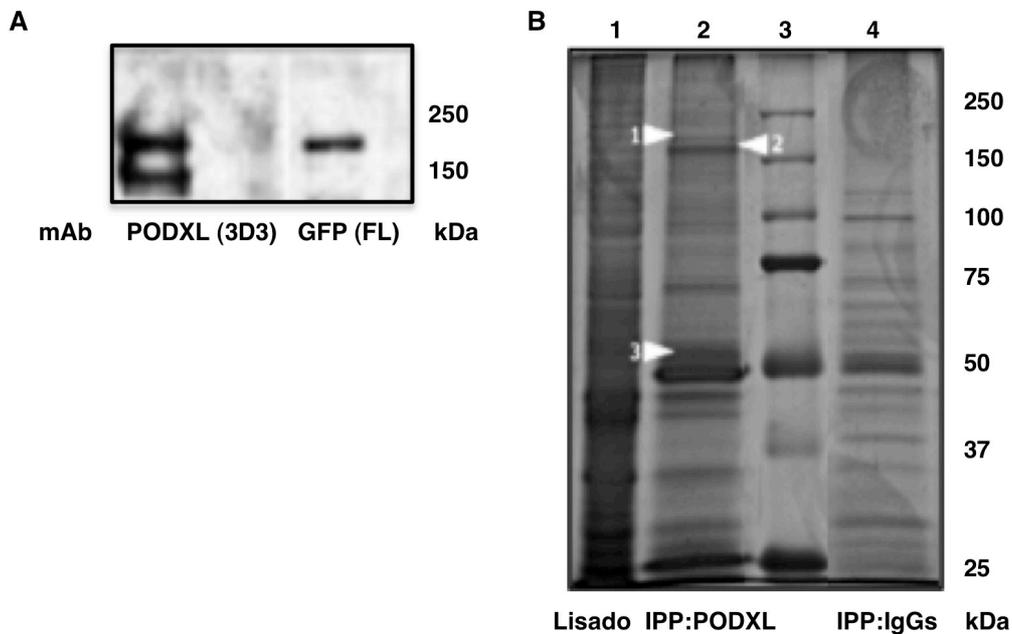


Figura 11. Caracterización de $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ expresada en células CHO.

- A) Análisis de Western de 30 μg de proteínas de un lisado de células CHO- $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$, separadas por SDS-PAGE (7,5%), con anticuerpos anti-PODXL (B34D1.3) o anti-GFP (FL): sc-8334 (Santa Cruz Biotechnology).
- B) SDS-PAGE (7.5%) de 50 μg de proteínas de lisado de células CHO- $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ (calle 1) y 25 μg de proteína inmunoprecipitada con anti-PODXL 3D3:sc-23904 Santa Cruz (calle 2) o con un anticuerpo irrelevante (calle 4). La calle 3, muestra el marcador de peso molecular (PM). Las flechas, en la calle 2, indican las bandas distintas de la calle 4.

La Figura 11.B, muestra la tinción con plata de geles de electroforesis obtenidos con inmunoprecipitados de células CHO- $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ con anti-PODXL y con un anticuerpo irrelevante como control. Se detectan tres bandas de pesos moleculares 200, 175 y 65 kDa que inmunoprecipitaron (IPP), específicamente, con anti-PODXL y que se corresponden con las bandas marcadas como 1, 2 y 3 en la Figura 11.B.

Estas tres bandas se analizaron por espectrometría de masas y los datos de la identificación se reseñan en la Tabla 2. Dos de las bandas analizadas fueron identificadas como podocalicina y sólo una de ellas

tuvo reacción positiva para GFP. La proteína 3, fue identificada como la cadena pesada de la inmunoglobulina utilizada en la inmunoprecipitación.

Proteína	Banda	Nombre Swiss Prot Número Acceso	PM (KDa)	Puntos Mascot	Péptido identificado
PODXL [Homo sapiens]	1	PODXL_HUMAN O00592	55.596	82	LGDQGPPEEAED R
Proteína fluorescente verde (GFP)	1	GFP_AEQVI P42212	26.886	68	SAMPEGYVQER TIFKDDGNYK
PODXL (Homo sapiens)	2	PODXL_HUMAN O00592	55,596	26	KLGDQGPPEEAEDRF
Región constante de la cadena pesada de IgG1	3	IGG1C AAB37381	36.510	67	VHNEGLPAPIVR

Tabla 2. Identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas extraídas de las bandas 1, 2 y 3 de la Figura 11.B. Las condiciones para la inmunoprecipitación, electroforesis y tinción con plata, así como el análisis de las bandas por espectrometría de masas se describen en Métodos.

4.2. Distribución intracelular de la proteína de fusión de podocalicina con proteína fluorescente verde (CHO-PODXL_{GFP})

La Figura 12, muestra que células CHO-PODXL_{GFP} quiescentes, mantenidas en ausencia de suero y ligandos, tienen forma redondeada y que la PODXL_{GFP} está distribuida uniformemente en la membrana plasmática. Cuando las células se cultivan en placas recubiertas con fibronectina, la PODXL_{GFP} aparece con un patrón "parcheado", de forma preferente en el polo de migración celular (Figura 12), esto es, en lamelipodios y también en protuberancias similares a filopodios. La tinción con faloidina nos ha permitido verificar la coincidencia de colocación de PODXL_{GFP} con actina en regiones del citoplasma, pero no en el aparato de Golgi (Figura 12, D y E).

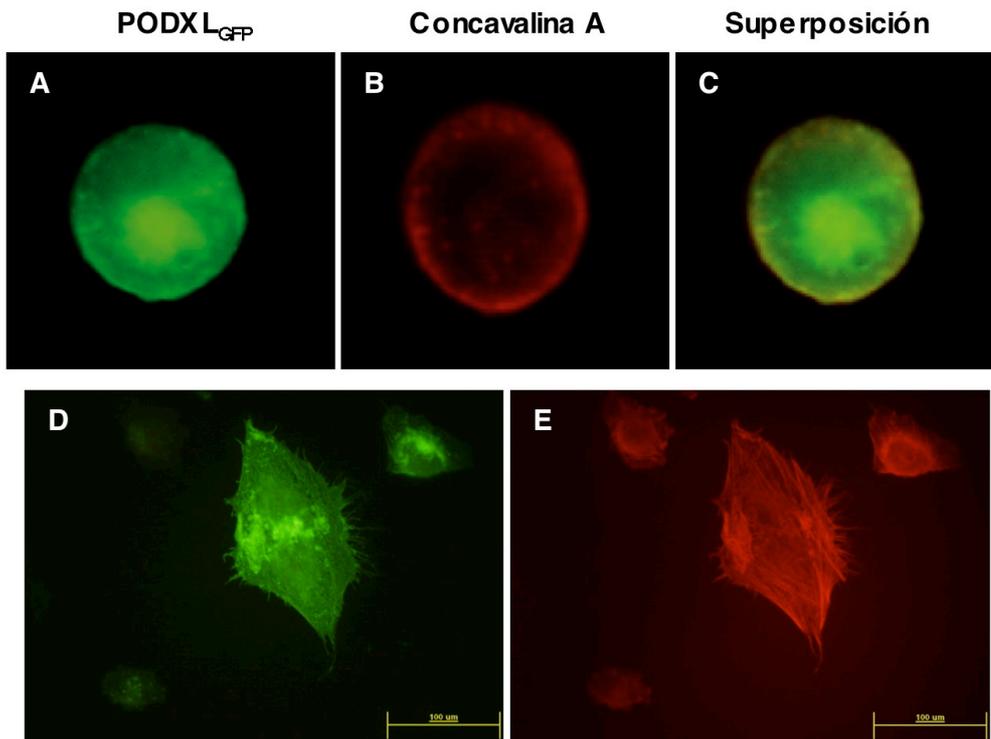


Figura 12. Distribución intracelular de PODXL en células adheridas a fibronectina.

PODXL en la membrana de células CHO-PODXL_{GFP} quiescentes mantenidas en ausencia de suero y de ligandos: A. PODXL_{GFP}, B. Concanavalina, C. Combinación de las dos anteriores.

En D y E, las células fueron cultivadas con una densidad de 2×10^5 células/mL sobre placas recubiertas de fibronectina. Después de dejarlas adherirse y extenderse fueron fijadas con paraformaldehído. La fotografía D, muestra la presencia de PODXL_{GFP} en lamelipodios, protuberancias similares a filopodios y protuberancias finas y en la E, teñidas con TRITC-faloidina, se observa el citoesqueleto de actina.

La expresión de podocalicina como una proteína de fusión con GFP nos ha permitido estudiar su distribución intracelular mediante microscopía de fluorescencia *in vivo*. Dicho estudio nos ha permitido verificar las observaciones hechas anteriormente en tejidos o células fijados. Hemos podido apreciar que la disposición “granular” de podocalicina es dependiente del tiempo de incubación transcurrido desde la siembra de las células.

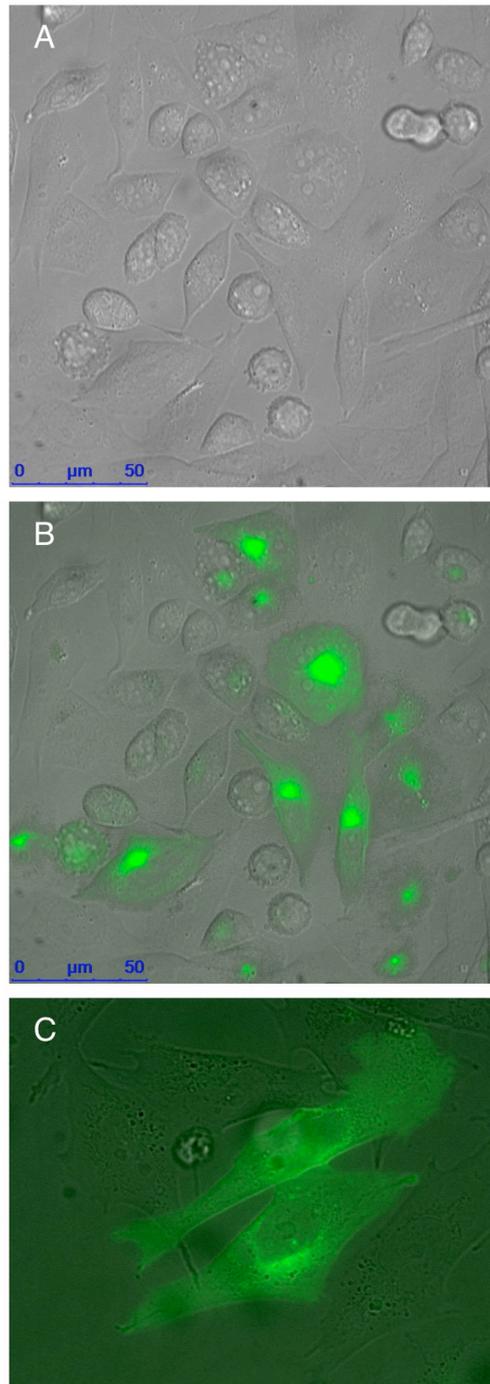


Figura 13. Morfología *in vivo* de células CHO-PODXL_{GFP}. Aspecto tras la siembra.

Células CHO cultivadas, según se describe en Métodos, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostatzado y con ambiente gaseoso de 95%O₂ y 5%CO₂. En el panel superior, se pueden ver las células recién sembradas en las que se aprecia su aspecto redondeado. En el panel central, es la misma preparación del panel superior con detección de fluorescencia, en la que se aprecia el escaso contenido de podocalicina, de localización preferente en el aparato de Golgi (63x). El panel inferior, muestra, con mayor detalle, las células más extendidas (100x).

La Figura 13, muestra como inicialmente las células en cultivo aparecen todavía redondeadas (Figura 13, panel superior). El panel medio, muestra como la fluorescencia de $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ es de localización perinuclear, probablemente localizada en el aparato de Golgi, como se puede apreciar con mayor detalle en el panel inferior.

La Figura 14, tomada a partir de al menos 10 horas de cultivo, muestra que la fluorescencia de $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ aparece dispuesta en los frentes de desplazamiento celular y en la membrana plasmática. En la misma figura, se aprecia también la progresión de gránulos de $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ a lo largo de los filopodios.

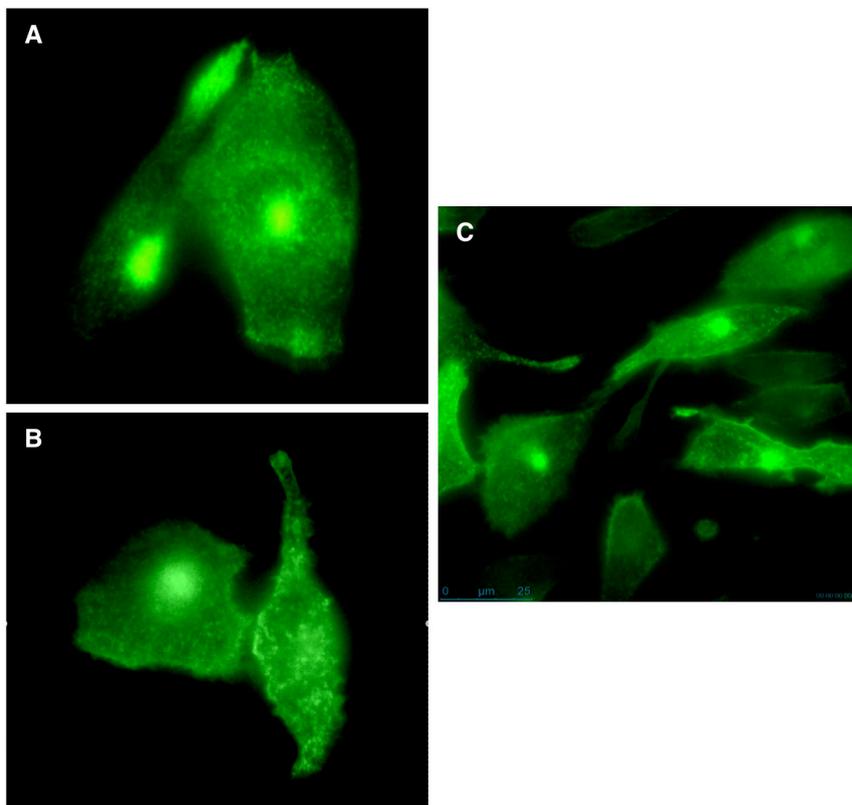


Figura 14. Microscopía de fluorescencia *in vivo* de células CHO- $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$.

Las células CHO- $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostatzado y con atmósfera de 95% O_2 y 5% CO_2 . A. Células a tiempos cortos de incubación, en las que se aprecia un escaso contenido de podocalicina de localización preferente en el aparato de Golgi. B. Las células aparecen más extendidas y la podocalicina aparece localizada en la membrana plasmática en forma granular, en el citoplasma, preferentemente, en los frentes de desplazamiento celular. C. Se aprecia la forma granular de podocalicina desplazándose a lo largo de un filopodio.(100x)

4.3. Relación entre la estructura del dominio extracelular de podocalicina y la capacidad de adhesión y migración de células CHO-PODXL_{GFP}

En nuestro laboratorio observamos, recientemente, que las células CHO-PODXL_{GFP}, cultivadas en ausencia de suero durante 18 horas, muestran un aumento de la velocidad de adhesión/extensión en placas recubiertas con fibronectina, en comparación con las células CHO_{GFP} (Larrucea y col.,2008).

Para determinar qué dominios extracelulares confieren propiedades adherentes y motrices a las células CHO-PODXL, hemos generado construcciones de PODXL-cDNA en las que, a partir del plásmido de expresión pEGFP-N1-PODXL, deletamos distintos fragmentos del cDNA de la podocalicina. La transfección de estas construcciones en células CHO expresaría las proteínas de fusión representadas a continuación en la Figura 15.

La construcción de los plásmidos de expresión correspondientes se realizó en dos etapas. Dado que el mantenimiento del péptido señal es necesario para la correcta inclusión de la proteína en la membrana celular, en primer lugar amplificamos por PCR la región de cDNA de podocalicina humana correspondiente al péptido señal (22 aminoácidos del extremo amino-terminal), que fue digerido, purificado en geles de agarosa y clonado en el vector pEGFP-N1, como se describe en Métodos. Una vez verificada la secuencia del péptido señal, se procedió a la segunda etapa, esto es, la incorporación de los cDNAs correspondientes a la región extracelular de podocalicina con las deletaciones deseadas. Las construcciones fueron diseñadas de acuerdo con la secuencia del gen (GenBank: U97519.1) y de la proteína descrita por Kershaw y col. (2000) y recogida en la base de datos UniProtK:B/Swiss-Prot, número de acceso O00592-1 (PODXL_Humana): Figura 16.

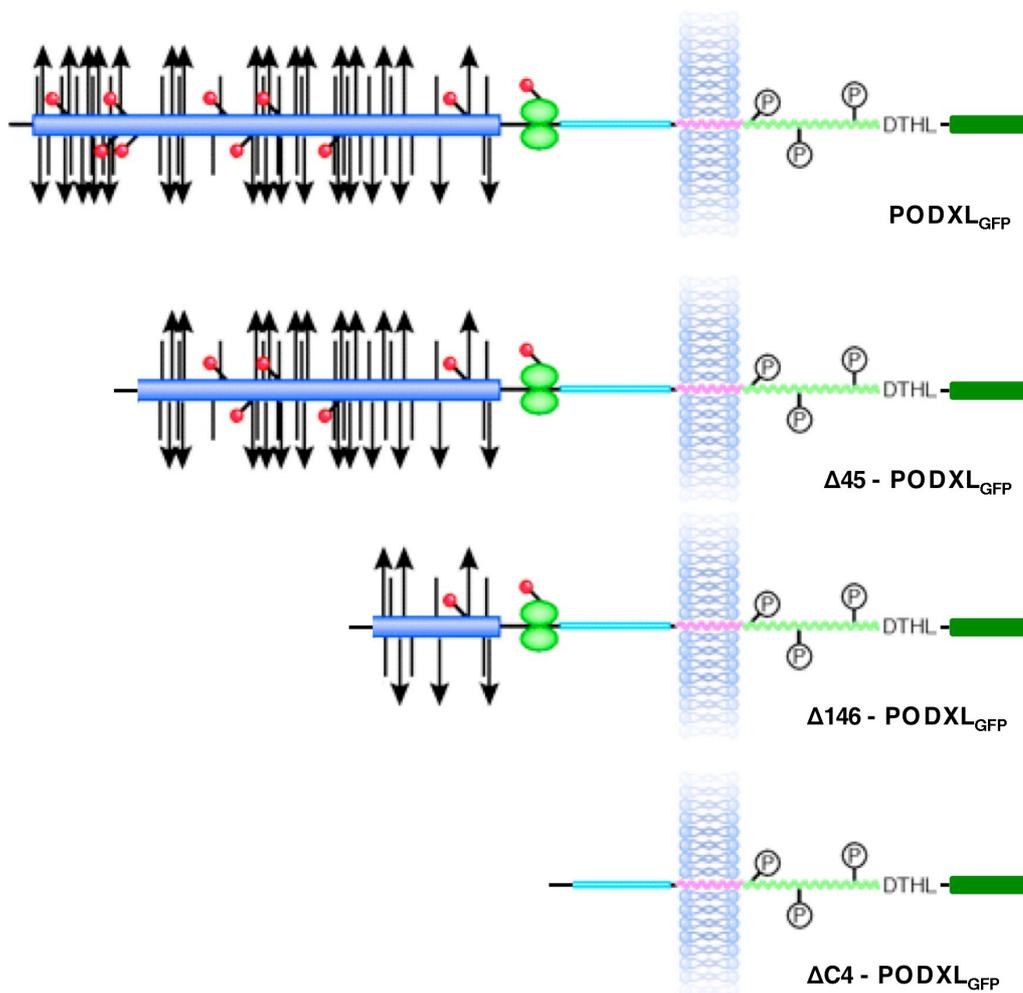


Figura 15. Esquema de las mutantes de PODXL con deleciones en el dominio extracelular.

Código de colores:

Péptido señal: Línea negra

Dominio extracelular mucina: azul

Dominio globular que contiene cisteína: verde

Región peduncular yuxtamembranar: celeste

Líneas verticales: O-glicosilaciones

Triángulos: sitios de sialización

Círculos rojos: N-glicosializaciones

Dominio transmembranar: rosado

Cola citoplasmática: verde claro

Dominio carboxi-terminal de sitios de unión PDZ: DTHL y posibles sitios de fosforilación

Verde oscuro: proteína verde fluorescente

1 AAACGCCGCCAGGACGCAGCCGCCGCCGCCGCTCCTCTGCCACTGGCTCTGCGCCCCAGCCCGGCTCTGTGCAGC 80
 81 GGCAGGGAGGAAGAGCCGCCGCAGCGGACTCGGGAGCCCCGGGCCACAGCCTGGCCTCCGGAGCCACCCACAGGCCTCC 160
 161 CCGGGCGGCGCCACGCTCCTACCGCCCGGACGCGCGGATCCTCCGCCGGCACCCGAGCCACCTGTCTCCCGGCCAGAGG 240
 241 CGACGACACGATGCGCTGCGCGCTGGCGCTCTCGGCGCTGTCTACTGTTGTCAACGCCGCCGCTGTGCCGTCGTCGC 320
 1 M R C A L A L S A L L L L L S T P P L L P S S P 24
 321 CGTCGCCGTCGTCGCCGTCGCCCTCCAGAATGCAACCCAGACTACTACGGACTCATCTAACAAAACAGCACCGACTGCC 400
 25 S P S P S P S P S Q N A T Q T T T D S S N K T A P T 50
 ↑
 401 CCAGCATCCAGTGTACCATCATGGCTACAGATACAGCCCAGCAGACAGTCCCCACTTCCAAGGCCAACGAAATCTT 480
 51 P A S S V T I M A T D T A Q Q S T V P T S K A N E I L 78
 481 GGCCTCGGTCAAGGGGACCACCCCTTGGTGTATCCAGTGACTACCCGGGACTACAACCCCTGGCTCAGCAAGTCTCAGGCC 560
 79 A S V K A T T L G V S S D S P G T T T L A Q Q V S G P 105

 561 CAGTCAACACTACCGTGGCTAGAGGAGGCGGCTCAGGCAACCCCTACTACCACCATCGAGAGCCCCAAGAGCACAAAAAGT 640
 106 V N T T V A R G G G S G N P T T T I E S P K S T K S 131
 ↑
 641 GCAGACACCACACTACAGTTGCAACCTCCACAGCCACAGCTAAACCTAACACCACAAGCAGCCAGAATGGAGCAGAAGATAC 720
 132 A D T T T V A T S T A T A K P N T T S S Q N G A E D T 158
 ↑
 721 AACAACTCTGGGGGAAAAGCAGCCACAGTGTGACCACAGACCTCACATCCACTAAGGCAGAACATCTGACGACCCCTC 800
 159 T N S G G K S S H S V T T D L T S T K A E H L T T P H 185
 801 ACCCTACAAGTCCACTTAGCCCCGACAACCCACTTTGACGCATCCTGTGGCCACCCCAACAAGCTCGGGACATGACCAT 880
 161 P T S P L S P R Q P T L T H P V A T P T S S G H D H 211

 881 CTTATGAAAATTTCAAGCAGTTCAAGCACTGTGGCTATCCCTGGCTACACCTTCACAAGCCCGGGATGACCACCACCT 960
 188 L M K I S S S S S T V A I P G Y T F T S P G M T T T L 238
 961 ACCGTCATCGGTATCTCGCAAAGAACTCAACAGACCTCCAGTCAGATGCCAGCCAGCTCTACGGCCCCCTCCCTCCAGG 1040
 239 P S S V I S Q R T Q Q T S S Q M P A S S T A P S S Q E 265
 1041 AGACAGTGCAGCCCAGGACCCGGCAACGGCATTGAGAACACCTACCCTGCCAGAGACCATGAGCTCCAGCCCCACAGCA 1120
 266 T V Q P T S P A T A L R T P T L P E T M S S S P T A 291
 1121 GCATCAACTACCCACCGATACCCAAAACACCTTCTCCACTGTGGCTCATGAGAGTAACTGGGCAAAGTGTGAGGATCT 1200
 292 A S T T H R Y P K T P S P T V A H E S N W A K C E D L 318
 1201 TGAGACACAGACACAGAGTGAGAAGCAGCTCGTCCTGAACCTCACAGGAAACCCCTCTGTGCAGGGGGCGCTTCGGATG 1280
 319 E T Q T Q S E K Q L V L N L T G N T L C A G G A S D E 345
 ↑
 1281 AGAAATTGATCTCACTGATATGCCGAGCAGTCAAAGCCACCTTCAACCCGGCCCAAGATAAGTGGGCATACGGCTGGCA 1360
 346 K L I S L I C R A V K A T F N P A Q D K C G I R L A 371
 1361 TCTGTTCCAGGAAGTCAGACCGTGGTCTCAAAGAAATCACTATTACACTAAGCTCCCTGCCAAGGATGTGTACGAGCG 1440
 372 S V P G S Q T V V V K E I T I H T K L P A K D V Y E R 398
 1441 GCTGAAGGACAAATGGGATGAACTAAAGGAGGCGGGGTGAGTACATGAAGCTAGGGGACCAGGGGCCACCGGAGGAGG 1520
 399 L K D K W D E L K E A G V S D M K L G D Q G P P E E A 425

1521	CCGAGGACCGCTTCAGCATGCCCTCATCATACCATCGTCTGCATGGCGTCATTCTGCTCCTCGTGGCGGCCCTCTAT	1600
426	<u>E D R F S M P L I I T I V C M A S F L L V A A L Y G</u>	451
1601	GGTGTGTCACCAGCGCCTCTCCAGAGGAAGGACCAGCAGCGGCTAACAGAGGAGTGCAGACAGTGGAGAATGGTTA	1680
452	<u>C C H Q R S S Q R K D Q Q R L T E E L Q T V E N G Y H</u>	478
1681	CCATGACAACCAACTGGAAGTGATGGAGACCTCTTCTGAGATGCAGGAGAAGAAGTGGTTCAGCCTCAACGGGGAGC	1760
479	<u>D N P T L L E V M E T S S E M Q E K K V V S L N G E L</u>	505
1761	TGGGGGACAGTGGATCGTCCCTCTGGACAACCTGACCAAGGACGACCTGGATGAGGAGGAAGACACACCTCTAGTCC	1840
	<u>G D S W I V P L D N L T K D D L D E E E D T H L *</u>	529
1841	GGTCTGCGGTGGCTCCAGCAGCACACAGACTCCAGACCAACACCCCAAGTCCGTTGGATGGGGAAGGGAAGA	1920
1921	CTGGGGAGGAGAGTGAATCCGAGGGGTGTCCCCTCCCAATCCCCCAGGGCCTTAATTTTCCCTTTTCAACCTGAAC	2000
2001	AAATCACATTTCTGTCCAGATTCCTCTTTGTAATAAACCCTAGTGCCTGAGCTCAGTGTGCTGGATGATGAGGGAGAT	2080
2081	CAAGAAAAGCCAGTAAAGGACTTTATAGATGAACATGGAATCCCTTCATTCTGCAGTGAGATGCCGAGACCTGAA	2160
2161	GAGGTAAAGTGAATGCCCAGGTGACAGCCACTTTGTGACAGAGCCAGGATGAGACAAGAATTTCCATTTGCACCTATG	2240
2241	CACACTGCTGTGTTTACATGTGCTTCCGTCAGAGCAGTCCCGGGCAGGGGTGAAACTCCAGCAGGTGGCTGGGCTGGA	2320
2321	AAGGAGGGCAGGGTACATCTCTGGCTCGGTGGGATCTGACGACCTGAAAGTCCAGTCCCAAGTTTCTTCTCTACCC	2400
2401	CAGCCTCGTGTACCATCTTCCACCCCTCTATGTTCTTACCCCTCCCTACACTCAGTGTGTTGTTCCCACTTACTCTGTCC	2480
2481	TGGGGCTCTGGGATTAGCACAGGTTATTCATAACCTTGAACCCCTTGTTCGGATTTCGATTTTCTCACATTTGCTTCG	2560
2561	TGAGATGGGGCTTAACCCACACAGGTCTCCGTGCGTGAACAGGTCGTCTAGGGGACCTGCGTGCAGGTGAGGAGAGA	2640
2641	AGGGGACACTCGAGTCCAGGCTGGTATCTCAGGGCAGCTGATGAGGGGTCAGCAGGAACACTGGCCCATGGCCCTGGCA	2720
2721	CTCCTTGCAGAGGCCACCCACGATCTTCTTTGGGCTTCCATTTCCACCAGGACTAAAACTGCTGTAGCTAGTGAGAGC	2800
2801	AGCGTGTCTCTTTTGTGTTCACTGCTCAGCTGATGGGAGTGATTCCTGAGACCCAGTATGAAAGAGCAGTGGCTGCAG	2880
2881	GAGAGGCTTCCCGGGGCCCCCATCAGCGATGTGCTTTCAGAGACAATCCATTAAGCAGCCAGGAAGGACAGGCTTTC	2860
2861	CCCTGTATATCATAGGAACTCAGGGACATTTCAAGTTGCTGAGAGTTTGTATAGTTGTTTTCTAACCCAGCCCTCCA	2940
2941	CTGCCAAAGGCCAAAAGCTCAGACAGTGGCAGAGCTCCAGTTAGCTCATCTCACTCACTCTGATTTCTCTGTGCCACAG	3020
3021	GAAAAGAGGGCCTGGAAGCGCAGTGCATGCTGGGTGCATGAAGGGCAGCCCTGGGGGACAGACTGTTGTGGGAACGTC	3100
3101	ACTGTCTGGCTGGAGCTAGGCCTTGTCTTCCCTCTCTGTGAGCTAGTGGGCTGCTGCGGTTCTCTTGCAGTTT	3180
3181	CTGGTGGCATCTCAGGGGAACACAAAAGCTATGTCTATTTCCCAATATAGGACTTTTATGGGCTCGGCAGTTAGCTGCCA	3260
3261	TGTAGAAGGCTCTAAGCAGTGGGCATGGTGGGTTTCACTGATGAGAAGGGGAATCCTGTGTGGAATGTTGAACCT	3340
3341	TCGCCATGGTCTCCATCGTTCTGGGCGTAAATTCCTGGGATCAAGTAGGAAAATGGGCAGAACTGCTTAGGGGAATGAA	3420
3421	ATTGGCTTTTTCGGGTGAAACCCACACCTCCAGGGTCTTAAGAGTCAGGCTCCGGCTGTAGTAGCTCTGATGAAATAG	3500
3501	GCTATCCACTCGGGATGGCTTACTTTTTAAAGGGTAGGGGGAGGGGCTGGGGAAGATCTGTCTGCACCACTGCTCTAA	3580
3581	TTCTTCTCACAGTCTGTAGCCATCTGATATCTTAGGGGAAAAGGAAGGCCAGGGGTTACATAGGGCCCCAGCGAGT	3660
3661	TTCCAGGAGTTAGAGGGATGCGAGGCTAACAAAGTTCAAAACATCTGCCCCGATGCTCTAGTGTGTTGGAGGTGGCGAG	3740
3741	GATGGAGAACAGTGCTGTTTGGGGGAAAACAGGAAATCTGTGTAGGCTTGTAGTGGGTTGCTTCTCTTCTGCCCAG	3820
3821	CGCTGGGTTCTCTCCACCCAGTAGGTTTCTGTGTGGTCCCGTGGGAGAGGCCAGACTGGATTATTCCTCCTTGTCTGA	3900
3901	TCCCTGGGTCACTTCCACAGCCAGGGCTTTTGACGGGACAGCAAAATAGGCCCTCGCAAAATCAATCAAAGGCTGCAAC	3980
3981	CTATGGCTCTTGGAGACAGATGATGACTGGCAAGGACTAGAGAGCAGGAGTGCCGGCCAGGTCGGTCTGACTCTCCT	4060
4061	GACTCTCCATCGCTCTGTCCAAGGAGAACCAGGAGAGGCTCTGGGCTGATTGAGAGGTTACTGCTTTATATTCGTCACAA	4140
4141	CTGTGTTAGTCTAGGCTTAGGACAGCTTTCAGAATCTGACACCTTGCCTTGTCTTGGCCACCAGGACACTATGTCAACAG	4220
4221	GCCAAACAGCCATGCATCTATAAAGGTCATCTCTTCTGCCACCTTTACTGGGTTCTAAATGCTCTCTGATAATTCAGAG	4300
4301	AGCATTGGGCTGGGAAGAGGTAAGAGGAACTAGAAGCTCAGCAGTAAACAGGTTGTAGCAAAAGCAGTATTATC	4380
4381	ATCAACTCTTTCAGTGGTAACTGTGTTTCCCAAGCTGCACAGGAGGCCAGAAACCAAGATGATGATGATGATGATGATG	4460
4461	CTACTGTGATGAGAGTGGGGAGACAGGCAGCAAGCTTATGAAGGAGTACAGAATATTTCTTGGCTTGTAAAGCAGAA	4540
4541	ACGGGTTAATCTAGTCTAGGCCAGATTTTTTCCCGCTTGATAAGGAAAGCTAGCAGAAAGTTATTTAAACCACTTC	4620
4621	TTGAGCTTTATCTTTTGGACAATATACTGGGAAACTTTGAAGAACAAGTCAAACTGATACATATACATATTTTTTT	4700
4701	TGATAATGTAATACTAGTACCATGTTAACCTACCTGCAGCTTTTAAAGTGAACATACTTTGAAAAGCATTATGTTAG	4780
4781	CTGAGTGTAGGCCAAGTTTTTCTCTGACAGGAATGTAATGTTCTACTGAAAATGACAAGTTTTTGTCTGATTTTTTT	4860
4861	TTTTAAACAAAAATGAAATATAACAAGCAAACTTATGATAAAGTATTTGCTTGTAGATCAGGTGTTTGTGTTTGT	4940
4941	TTTTAATTTTTAAATGCAACCCCTGCCCTTCCAGCAAAGTCAAGCTCCATTTTCAGTAAAGGTTGGAGTCAATATGCT	5020
5021	CTGGTTGGCAGGCAACCTGTAGTCAATGGAGAAAGTATTTCAAGATCTAGTCCAATCTTTTCTAGAGAAAAGATAAT	5100
5101	CTGAAGCTCACAAGATGAAGTACTTCTCAAAATCAGTGGTTCAGGACAGAAACAAGATTAACCTGGATCCACAG	5180
5181	ACTGTGCGCCTCAGAAGGAATAATCGGTAATTAAGAATGCTACTCGAAGGTGCCAGAATGACACAAGGACAGAATTC	5260
5261	CTTCCAGTGTGTTACCTTAGCAAGGCTAGGGAGGCGATGAACACAACATAAGAAGTGGTCTTCTCACACTTTCTCTGA	5340
5341	ATCATTTAGGTTTAAAGATGTAAGTGAACAATCTTTCTTTCTGCAAGAAACAAAGTTTTGGATGAGCTTTTATATATGG	5420
5421	AACCTACTCCAAACAGGACTGAGGGACCAAGGAAACATGATGGGGGAGGCAAGAGAGGGCAAGAGTAAACTGTAGCATA	5500
5501	GCTTTTGTACGGTCACTAGTGTATCCCTCAGGCTGCTGCAACACAGCATGGAGGACACAGATGACTCTTTGGTGTG	5580
5581	GCTTTTGTCTGCAAGTGAATGTTCAACAGTTTGGCCAGGAACTGGGGGATCATATATGCTTGTAGTGGACAGGGGCTGA	5660
5661	AGTCACTGGAATTTACTGAGAACTGTTTGTAAAACATAGTTAATAATTTGCAATTTCTTACAAAAATATATTT	5740
5741	TGGAATAATGTACTGTCAATTAAGT	5768

Figura 16. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del marco de lectura de la PODXL humana.

Los 21 primeros aminoácidos hidrofóbicos subrayados representan el péptido señal. Los 26 aminoácidos hidrofóbicos con subrayado de mayor intensidad representan la región transmembrana. Se muestran los sitios potenciales de N-glicosilación (flechas) unión de glucosaminoglicano (líneas de

puntos) y uniones disulfuro (círculos negros). El dominio extracelular es rico en serinas y treoninas que podrían ser susceptibles de O-glicosilación.

Δ 45-PODXL: Se eliminaron los 45 primeros aminoácidos a partir del péptido señal (del 23 al 66, ambos inclusive), eliminando dos sitios potenciales de N-glicosilación (aminoácidos 33 y 43).

Δ 146-PODXL: Se eliminaron los 146 primeros aminoácidos a partir del péptido señal (del 23 al 169, ambos inclusive), eliminando cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (aminoácidos 33, 43, 104 y 144) y tres sitios posibles de unión de glucosaminoglucano (102-104, 115-117 y 160-162).

Δ C4-PODXL: A partir del péptido señal, delecionamos la secuencia de cDNA correspondiente a los residuos 23 al 365, ambos inclusive, eliminando cinco sitios potenciales de N-glicosilación (aminoácidos 33, 43, 104, 144 y 322), cuatro sitios potenciales para la unión de glucosaminoglucano (102-104, 115-117, 160-162 y 206-208) y cuatro cisteínas en las posiciones 314, 337, 351 y 367, que podrían formar dos puentes disulfuro.

La expresión de estas construcciones fue confirmada por análisis de Western de la correspondientes proteínas, utilizando un anticuerpo anti-GFP (FL): sc-8334, Santa Cruz, los anticuerpos anti-PODXL B34D1.3; 1401F1915, descritos previamente (Rodríguez y col. 2006) y anti-PODXL (3D3): sc-23904, Santa Cruz. La Figura 17, muestra que los diferentes anticuerpos reconocen bandas de distinto peso molecular, en cada una de las líneas celulares.

Dado que las proteínas altamente glucosiladas tienen una movilidad electroforética alterada en geles de SDS-PAGE, las diferencias que se observan en la Figura 17, no permiten determinar con precisión el peso molecular de la proteína expresada, pero el hecho de que guarden una proporción adecuada con el tamaño esperado permite confirmar su expresión.

La Figura 17, muestra que el anticuerpo B34D1.3 reconoce podocalicina en la línea celular que expresa podocalicina completa así como en la que expresa Δ 45-PODXL_{GFP}. El anticuerpo 3D3 y 1401F1915 reconocen podocalicina en tres líneas celulares, CHO-PODXL completa, CHO- Δ 45-PODXL_{GFP} y CHO- Δ 146-PODXL_{GFP}. Estas observaciones indican

que el anticuerpo B34D1.3 reconoce un epítipo de podocalicina localizado entre los aminoácidos 46 y 147, mientras que los otros dos anticuerpos, 3D3 y 1401F1915 reconocerían epítipos comprendidos entre los aminoácidos del inicio y antes del dominio de CHO- Δ C4-PODXL_{GFP}.

La utilización de anticuerpos contra el ectodominio de podocalicina y contra GFP, nos permitió estimar los tamaños de las proteínas expresadas en las distintas construcciones, incluyendo la Δ C4-PODXL_{GFP}, que no pudo ser detectada con los anticuerpos contra el dominio extracelular.

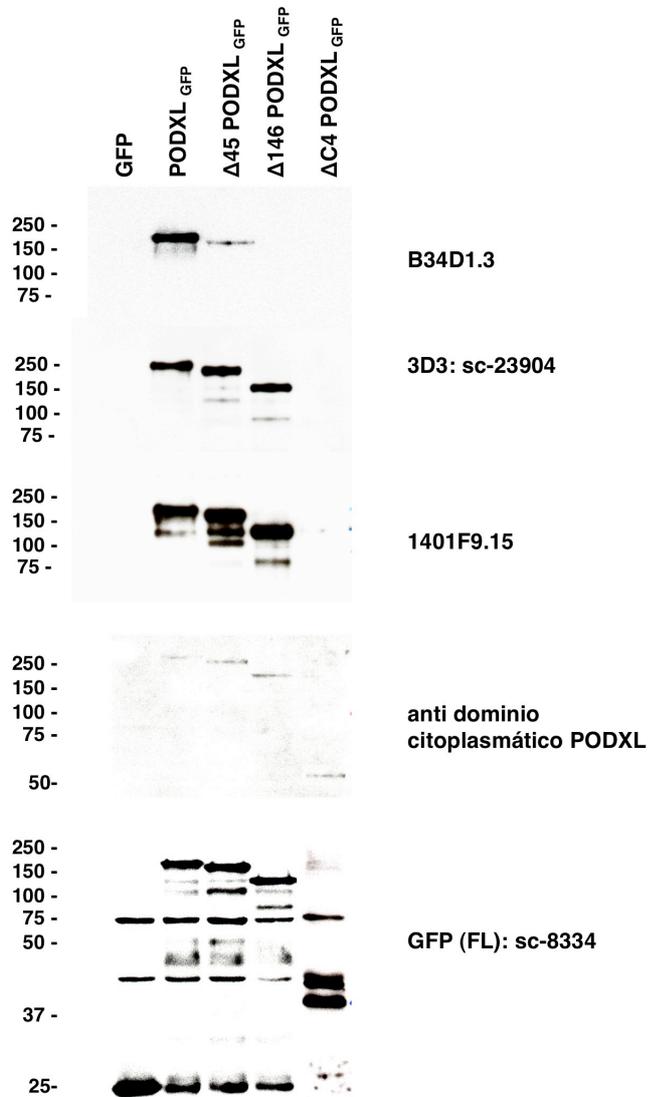


Figura 17. Análisis de Western de lisados de células CHO que expresan PODXL_{GFP} y las tres mutantes de delección de PODXL.

El análisis de Western fue realizado, utilizando los anticuerpos indicados.

4.4. Análisis morfológico *in vivo* y citométrico de células CHO expresando distintas mutaciones del dominio extracelular de podocalicina

Como controles, hemos utilizado células transfectadas con cDNA de la molécula completa de PODXL (CHO-PODXL_{GFP}) fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) y sólo a GFP. Mediante microscopía *in vivo* ("wide field") en condiciones controladas de temperatura y de gasificación. Las células CHO_{GFP} mostraron un aspecto ubicuo y difuso (Figura 18). Pudimos corroborar los rasgos anteriormente descritos (Figura 14) para las células CHO-PODXL_{GFP} como: aspecto fibroblastoide, disposición polar del Golgi y podocalicina de aspecto granular localizada preferentemente en los polos de desplazamiento celular (Figura 19).

Las células CHO que expresan de forma estable podocalicina con delección de los primeros 45 aminoácidos del extremo amino-terminal (CHO-Δ45-PODXL_{GFP}) mostraron una morfología preferentemente poligonal, con podocalicina abundante en el Golgi y abundantes formas granulares de podocalicina de disposición submembranar. El hallazgo más notable en estas células ha sido el aumento del número de filopodios, todos ellos con fluorescencia indicativa de su contenido de PODXL_{GFP} (Figura 20).

Las células con expresión estable de Δ146-PODXL_{GFP} (CHO-Δ146-PODXL_{GFP}) mostraron aspecto más fibroblastoide, con aparatos de Golgi prominentes y acumulación de gránulos de podocalicina en los extremos distales de los filopodios (Figura 21).

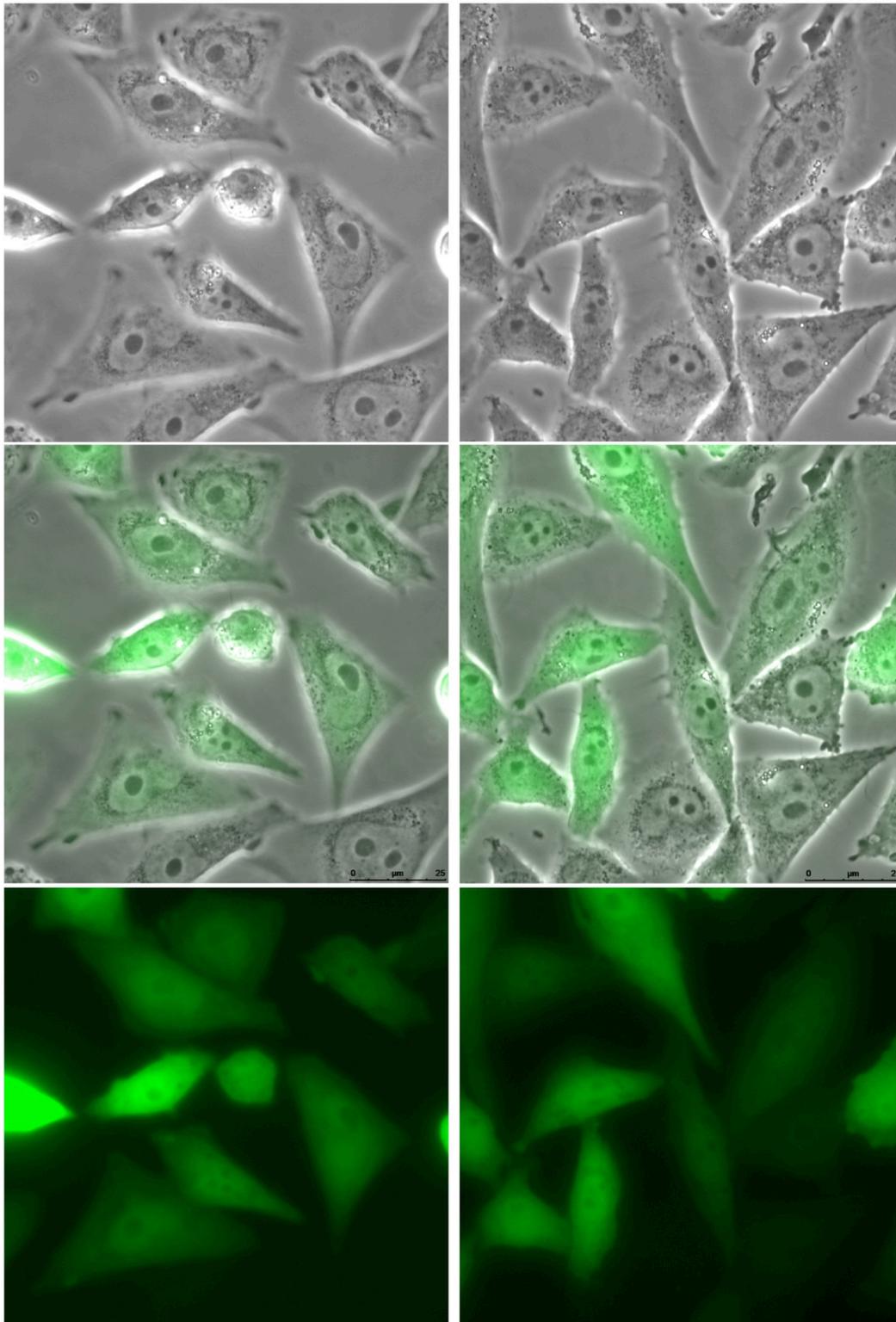


Figura 18. Microscopía *in vivo* de células CHO_{GFP}.

Células CHO_{GFP}, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostatzado y con ambiente gaseoso de 95%O₂ y 5%CO₂, (100x). Los paneles superiores, muestran las fotografías de microscopía de contraste de fases, los inferiores, la fluorescencia verde y los centrales, el solapamiento de ambas.

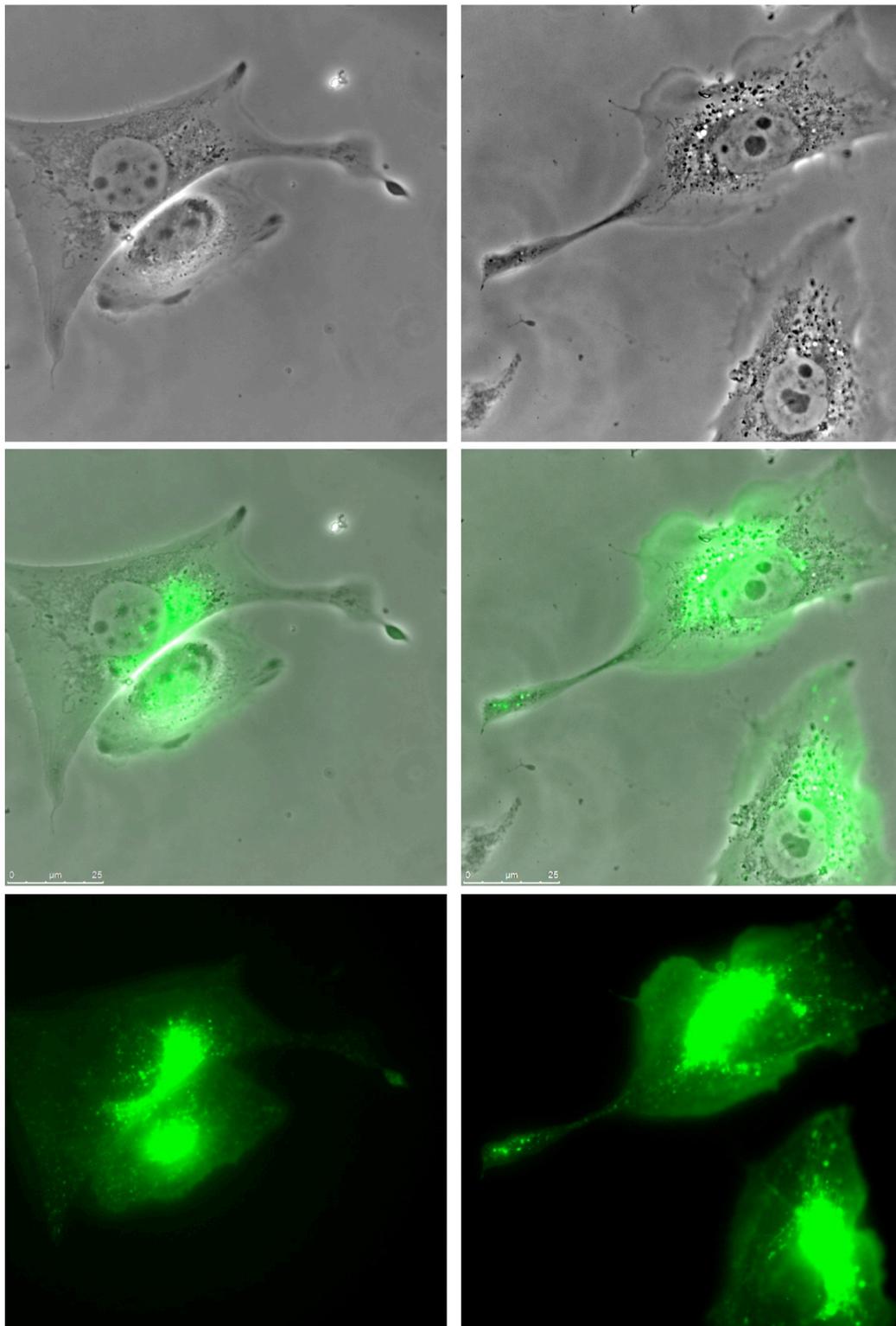


Figura 19. Microscopía *in vivo* de células CHO-PODXL_{GFP}.

Células CHO-PODXL_{GFP}, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostatzado y con ambiente gaseoso de 95%O₂ y 5%CO₂, (100x). Los paneles superiores, muestran las fotografías de microscopía de contraste de fases, los inferiores, la fluorescencia verde y los centrales, el solapamiento de ambas.

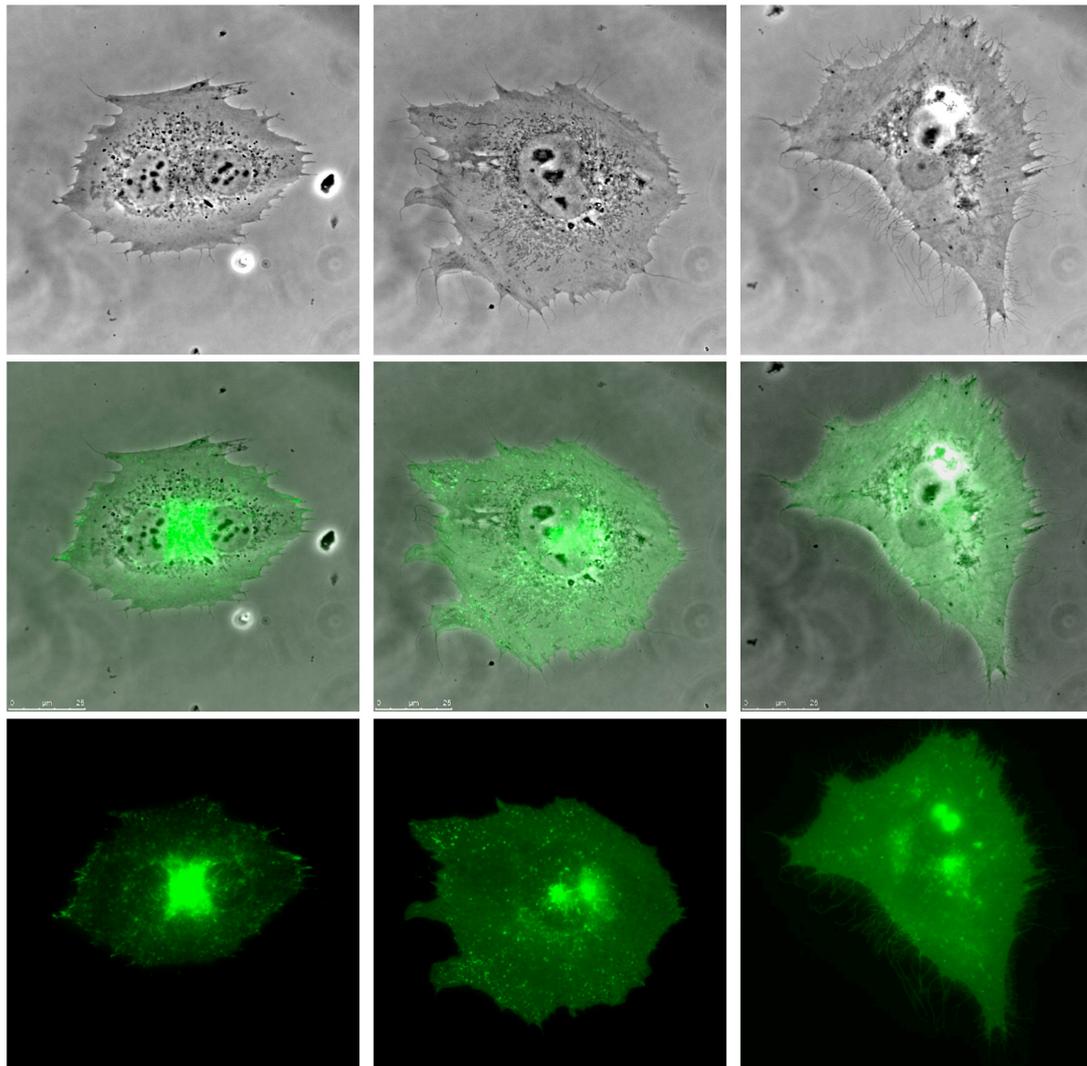


Figura 20. Microscopía *in vivo* de células CHO-Δ45-PODXL_{GFP}.

Células CHO-Δ45-PODXL_{GFP}, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostatzado y con ambiente gaseoso de 95%O₂ y 5%CO₂, (100x). Los paneles superiores, muestran las fotografías de microscopía de contraste de fases, los inferiores, la fluorescencia verde y los centrales, el solapamiento de ambas.

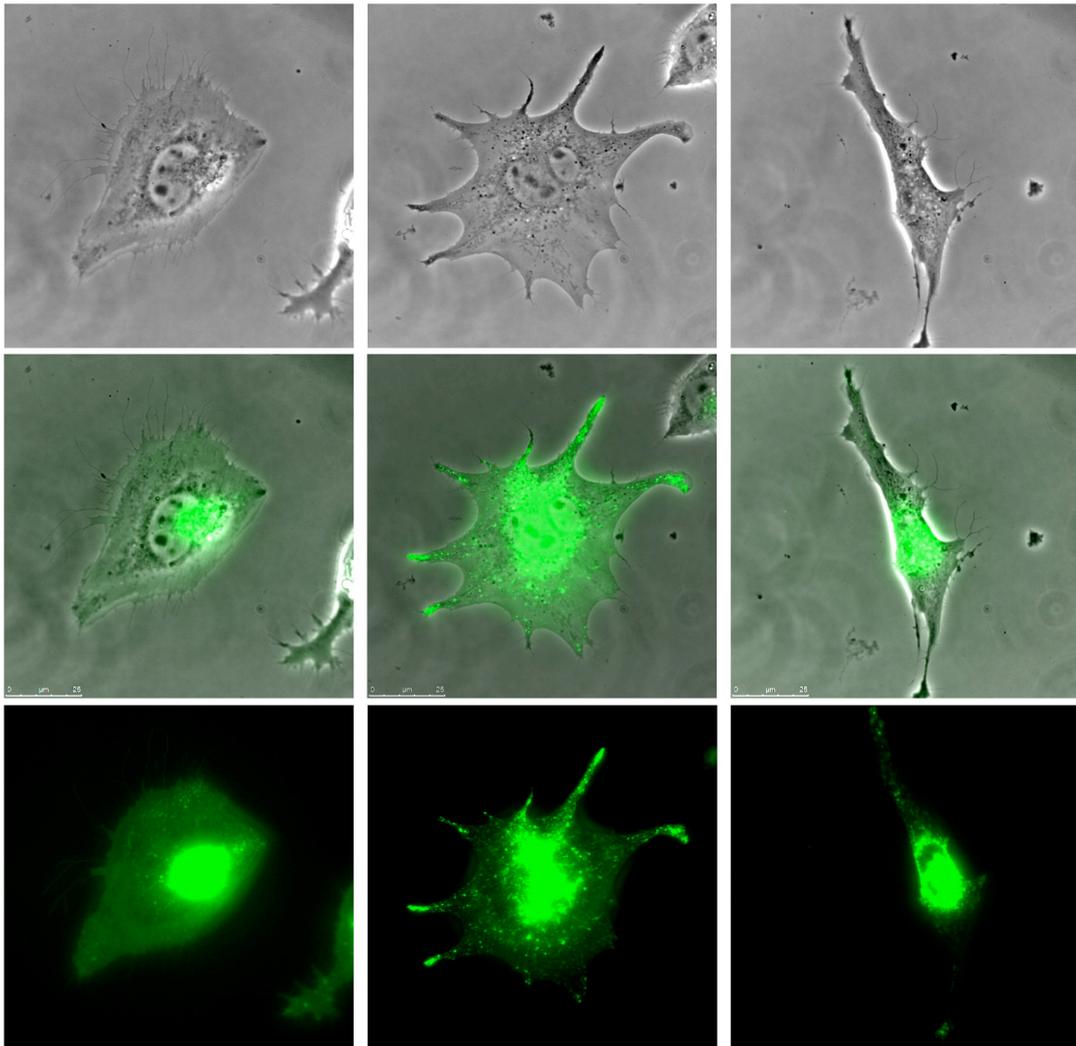


Figura 21. Microscopía *in vivo* de células CHO- Δ 146-PODXL_{GFP}.

Células CHO- Δ 146-PODXL_{GFP}, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostaticado y con ambiente gaseoso de 95%O₂ y 5%CO₂, (100x). Los paneles superiores, muestran las fotografías de microscopía de contraste de fases, los inferiores, la fluorescencia verde y los centrales, el solapamiento de ambas.

La expresión de la mutante en la que se produjo la delección de todo el ectodominio, incluidos los cuatro residuos de cisteína próximos a la región membrana (CHO- Δ C4-PODXL_{GFP}), mostraron aspecto fibroblastoide, con aparatos de Golgi habitualmente prominentes y escaso número de gránulos de PODXL_{GFP}, que se localizaron preferentemente en las regiones distales de los filopodios (Figura 22).

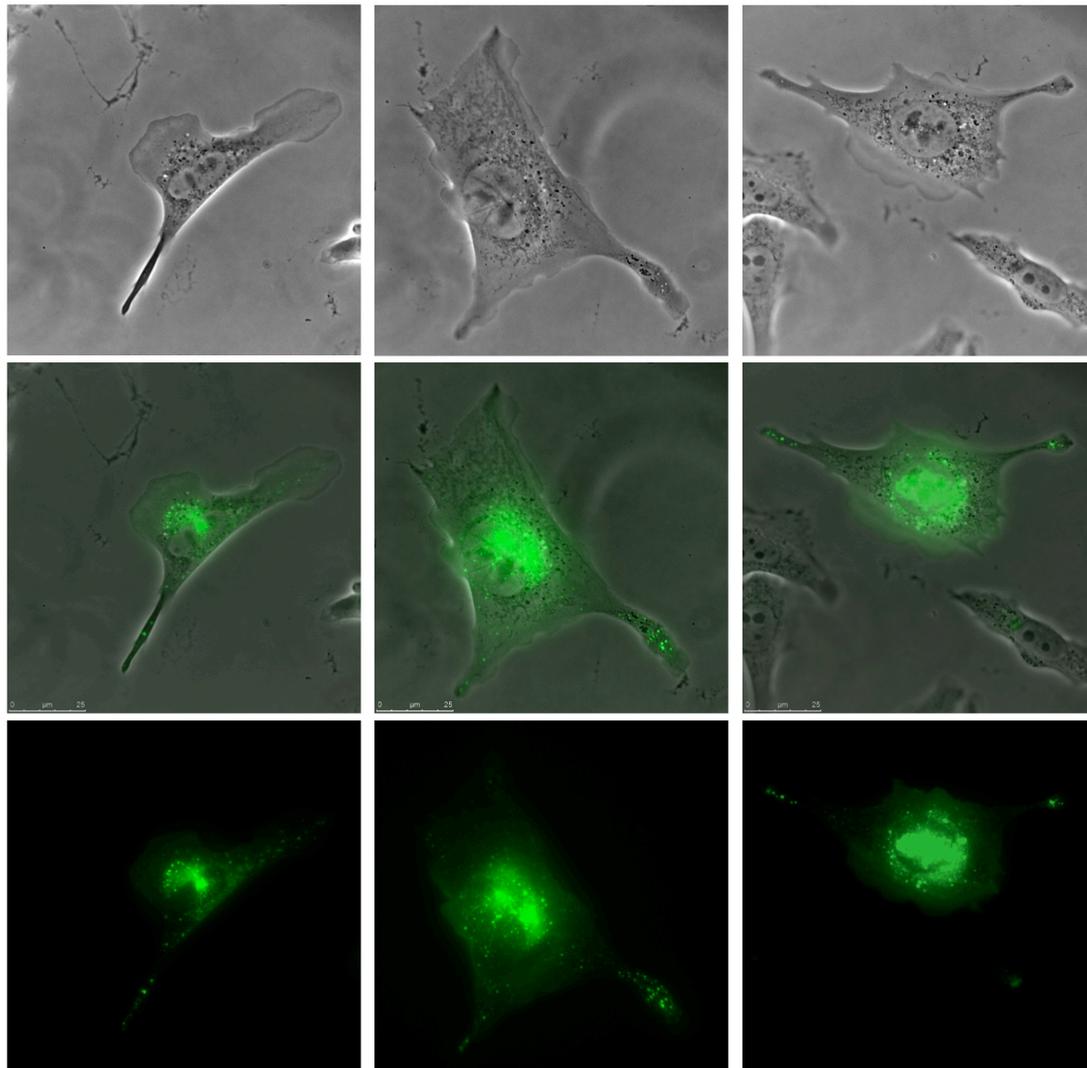


Figura 22. Microscopía *in vivo* de células CHO- Δ C4-PODXL_{GFP}.

Células CHO- Δ C4-PODXL_{GFP}, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostatzado y con ambiente gaseoso de 95%O₂ y 5%CO₂, (100x). Los paneles superiores, muestran las fotografías de microscopía de contraste de fases, los inferiores, la fluorescencia verde y los centrales, el solapamiento de ambas.

La Figura 23, muestra el análisis por citometría de flujo de CHO_{GFP}, CHO-PODXL_{GFP}, CHO- Δ 45-PODXL_{GFP}, CHO- Δ 146-PODXL_{GFP} y CHO- Δ C4-PODXL_{GFP}. Los datos obtenidos indican que el porcentaje de células con expresión detectable de proteínas fluorescentes fue, en todos los casos, superior al 80%.

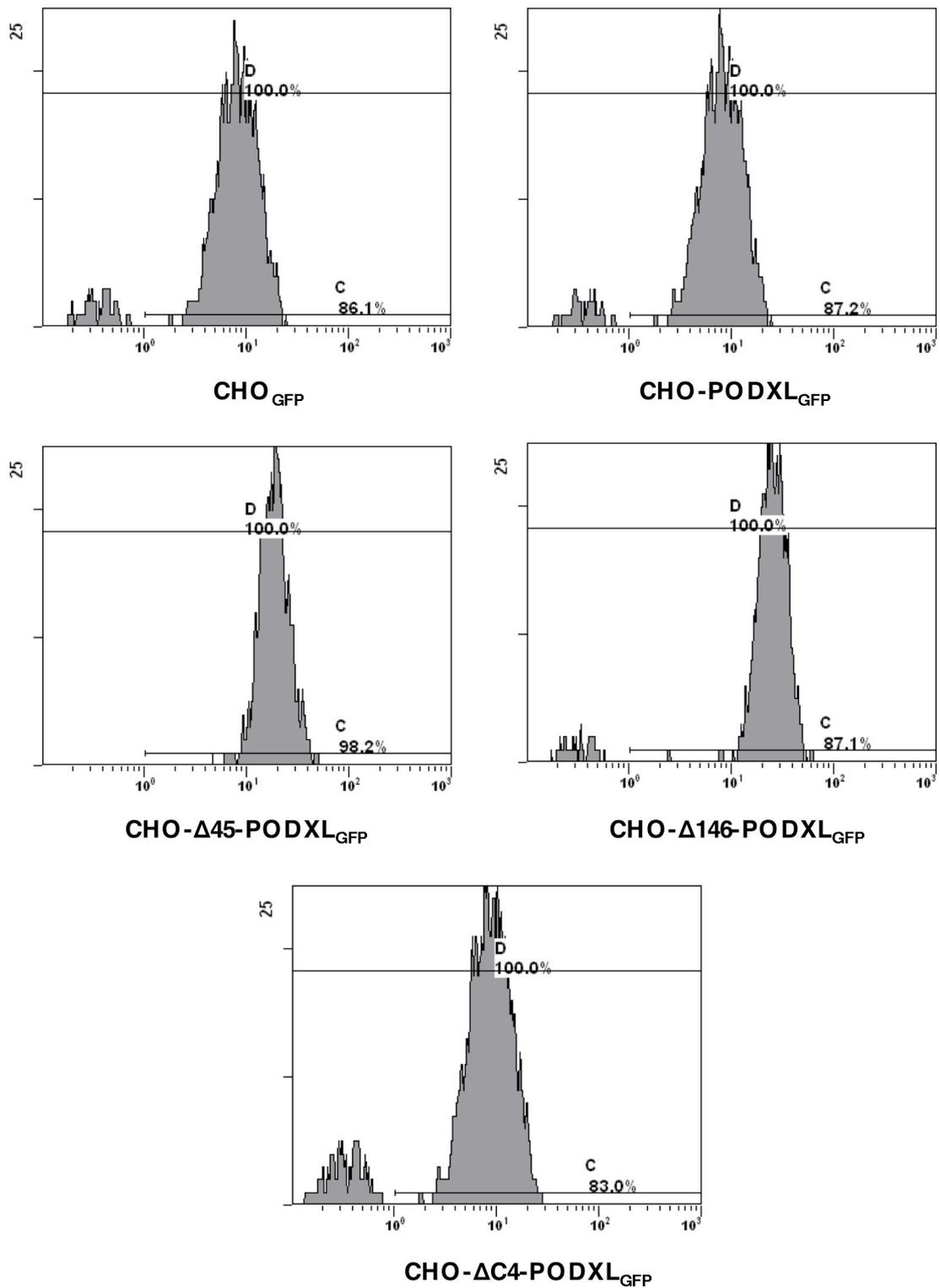


Figura 23. Análisis de citometría de flujo de CHO_{GFP} , $CHO-PODXL_{GFP}$ y mutantes de delección $CHO-\Delta 45-PODXL_{GFP}$, $CHO-\Delta 146-PODXL_{GFP}$ y $CHO-\Delta C4-PODXL_{GFP}$.

Las líneas celulares indicadas fueron analizadas por citometría de flujo, cómo se describe en Métodos.

4.5. Adhesión celular de los mutantes de delección del dominio extracelular de podocalicina

La Figura 24, muestra los datos de un experimento representativo de la capacidad de adhesión a sustratos inmobilizados, de células CHO_{GFP}, CHO-PODXL_{GFP} o de las mutantes de delección descritas anteriormente.

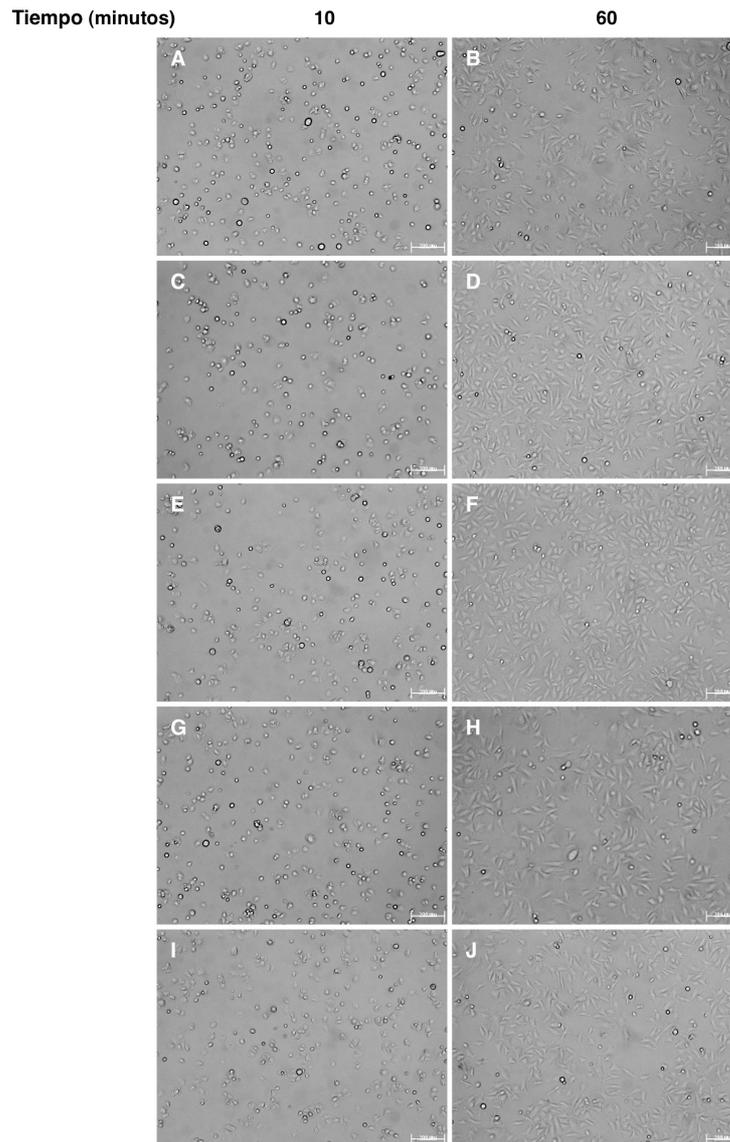


Figura 24. Experimento representativo de la capacidad de adhesión de células CHO que expresan PODXL o mutantes de delección fusionadas a GFP.

Las células (~75.000) se añadieron por triplicado a pocillos recubiertos de fibronectina, a los tiempos indicados, se tomaron fotografías de seis campos distintos con una cámara CCD Olympus DP70 utilizando un microscopio Olympus IX50. A y B. CHO_{GFP}, C y D. CHO-PODXL_{GFP}, E y F. CHO-Δ45-PODXL_{GFP}, G y H. CHO-Δ146-PODXL_{GFP} e I y J. CHO-ΔC4-PODXL_{GFP}.

El panel superior de la Figura 25, muestra la valoración cuantitativa de los resultados correspondientes al experimento de la Figura 24 y el panel inferior, los valores medios de tres experimentos distintos realizados como se describe en la Figura 25.A, en los que se utilizaron distintas cantidades de células.

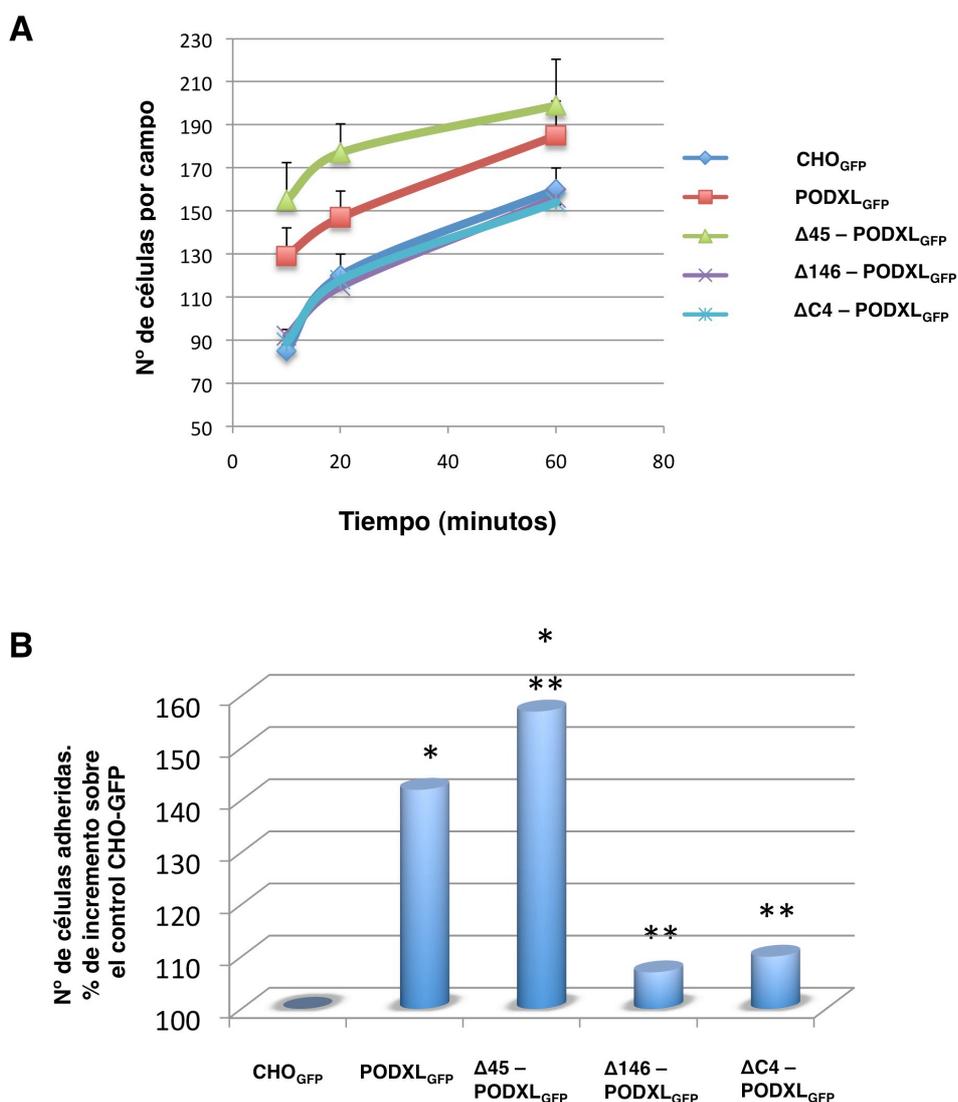


Figura 25. Capacidad de adhesión de células CHO_{GFP} o CHO-PODXL_{GFP}, y mutantes de delección del dominio extracelular.

- A)** Las condiciones experimentales son las descritas en la Figura 24. Los valores que se muestran son valores medios del número de células en cada uno de los pocillos.
- B)** Valores medios obtenidos, a los 20 minutos, de tres experimentos distintos realizados como se describe en (A). El número de células sembrado en cada pocillo fue de 75.000, 35.000 y 10.000. Los valores se expresan como porcentaje de incremento sobre el número de células adheridas a células CHO_{GFP}. Prueba T apareada: P<0.05 * respecto a células CHO_{GFP}; ** respecto a células CHO-PODXL_{GFP}.

Estos resultados confirman que las células CHO-PODXL_{GFP} tienen incrementada su capacidad de adherencia en comparación con las que expresan solamente GFP (40% de aumento a los 20 minutos). Es notorio que las células que expresan la mutante Δ45-PODXL tienen una capacidad de adhesión superior a las que expresan la molécula completa de podocalicina, PODXL_{GFP}. Por el contrario, las líneas que expresan las mutantes Δ146 y ΔC4 mostraron una capacidad de adhesión similar a las que expresan sólo GFP. Estos resultados sugieren que el aumento de la capacidad de adhesión inducido por la expresión de PODXL_{GFP} reside en el segmento de 101 aminoácidos comprendido entre Δ45-PODXL y Δ146-PODXL:

KTAPT**P**ASSVTIMATDTAQQ**S**TVPT**S**KANEILASVKATTLGV**S**SDSPGTTTLAQQV
SGPV**N**TTVARGGG**S**GNPTT**T**IES**P**K**S**TK**S**ADTTTVAT**S**TATAKPN

Este péptido fue analizado con las bases de datos de la Universidad Técnica de Dinamarca (www.cbs.dtu.dk). Contiene 3 sitios de O-glicosilación (en rojo) (predicción del DictyOGlyc 1.1 Server), 2 sitios de N-glicosilación (en azul), 10 sitios de fosforilación en serina y 8 sitios de fosforilación en treonina (ambos en naranja) (predicción del NetPhos 2.0 Server). La treonina-5 y serina-79 son sitios potenciales tanto de N-glicosilación como de fosforilación. Están marcados en rojo y negrita.

4.6. Migración de células que expresan mutantes de delección del dominio extracelular de podocalicina

El estudio de migración de las líneas celulares que expresan PODXL_{GFP} tanto completa como las mutantes de delección se realizó mediante el ensayo de "cicatrización de herida" en placas recubiertas de fibronectina. La Figura 26, muestra la herida a tiempo cero y después de 12 horas de cultivo de las líneas celulares CHO-PODXL_{GFP}, Δ45-PODXL_{GFP}, Δ146-PODXL_{GFP} y ΔC4-PODXL_{GFP}. Como control negativo se utilizó la línea celular que expresa sólo GFP.

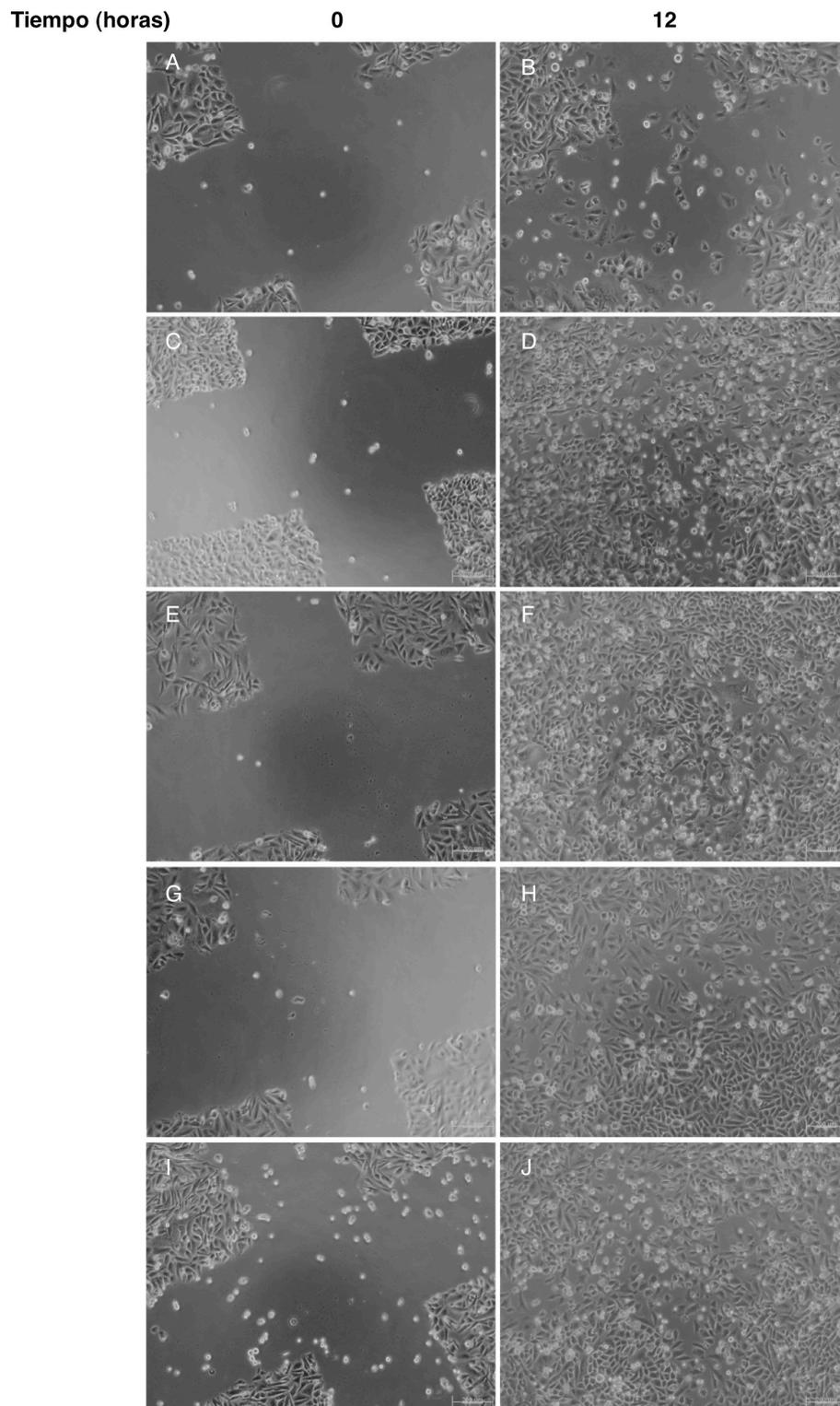


Figura 26. Ensayo de cicatrización de herida.

Las células se sembraron y se realizó la herida, como se describe en Métodos. Se tomaron fotografías a los tiempos 0, 4, 8, 12 y 16 horas con una cámara digital DP70 de Olympus y un microscopio IX50 de la misma marca. Este experimento se realizó cinco veces y se muestran las fotografías representativas de los tiempos 0 y 12 horas. (2x). A y B. CHO_{GFP}, C y D. CHO-PODXL_{GFP}, E y F. CHO-Δ45-PODXL_{GFP}, G y H. CHO-Δ146-PODXL_{GFP} e I y J. CHO-ΔC4-PODXL_{GFP}.

La Figura 27, muestra los resultados de la valoración cuantitativa de la velocidad de cicatrización a distintos tiempos de incubación.

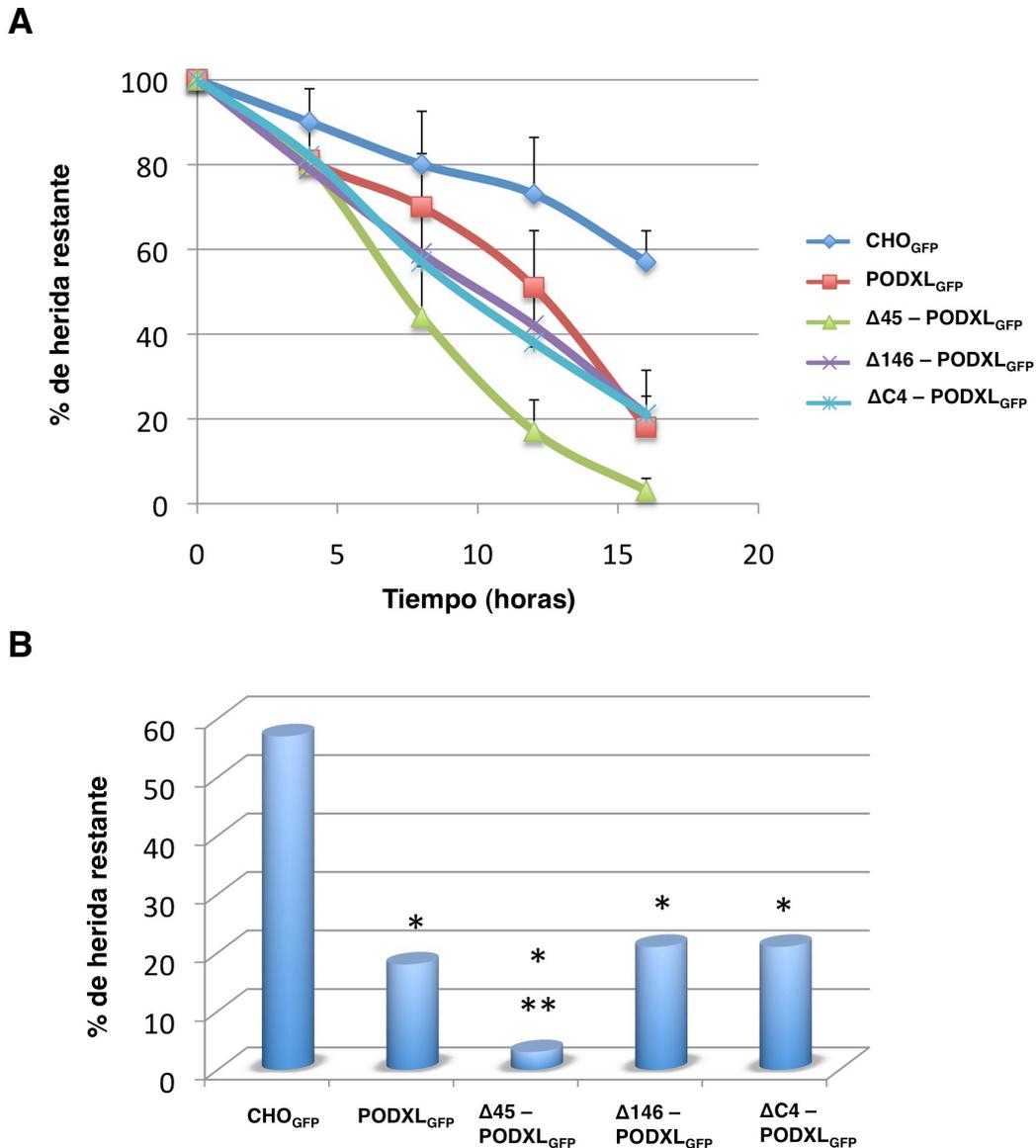


Figura 27. Expresión cuantitativa de la velocidad de cicatrización de herida mostrados en la Figura 26.

- A) Velocidad de cicatrización de herida. Los resultados representan la media de 5 experimentos y las barras verticales, la desviación standard.
- B) Porcentaje de herida restante a las 16 horas de incubación de los cultivos. Prueba de T apareada $P < 0.05$: * respecto a células que expresan GFP; ** respecto a células que expresan PODXL_{GFP}.

Se confirman los resultados anteriores que mostraron que la expresión de PODXL_{GFP} en células CHO produce un aumento de la

velocidad de migración. El hallazgo más llamativo de este estudio es que una de las líneas celulares que expresan mutantes de delección, específicamente la línea CHO- Δ 45-PODXL_{GFP}, mostró una velocidad de cierre de herida, es decir, de migración, mayor que la de las células que expresan la proteína completa, produciendo una oclusión casi completa de la herida a las 12 horas mientras que, a este tiempo, las células CHO-PODXL_{GFP} sólo han cerrado un 60% de los surcos. Tanto la línea celular CHO- Δ 146-PODXL_{GFP} como la CHO- Δ C4-PODXL_{GFP} ocuparon un 80% del espacio de los surcos a las 16 horas, igual que la PODXL_{GFP}. Esta observación sugiere que los dominios de la proteína capaces de incrementar la adhesión y la migración celular, es probable que no sean los mismos.

4.7. Detección de podocalicina en complejos multiproteicos de células CHO-PODXL mediante el procedimiento "blue-native" (BN)

La electroforesis "blue-native" (BN) es un procedimiento de separación de proteínas nativas basado en que la tinción con azul de Coomassie carga negativamente los complejos proteicos lo cual influye en su movilidad en un campo eléctrico (Schamel 2008). Con esta técnica se consigue una resolución mayor que con la filtración a través de geles o de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y se puede utilizar para complejos multiproteicos desde 10 KDa a 10 MDa. Además, se pueden acoplar a una segunda dimensión mediante electroforesis en SDS-PAGE (BN/SDS-PAGE), de forma tal que se puede determinar la composición de los distintos complejos multiproteicos. La combinación de esta técnica con el análisis de Western nos ha permitido detectar complejos multiproteicos que contienen podocalicina en lisados celulares de CHO-PODXL_{GFP} o de células tumorales humanas TERA-1.

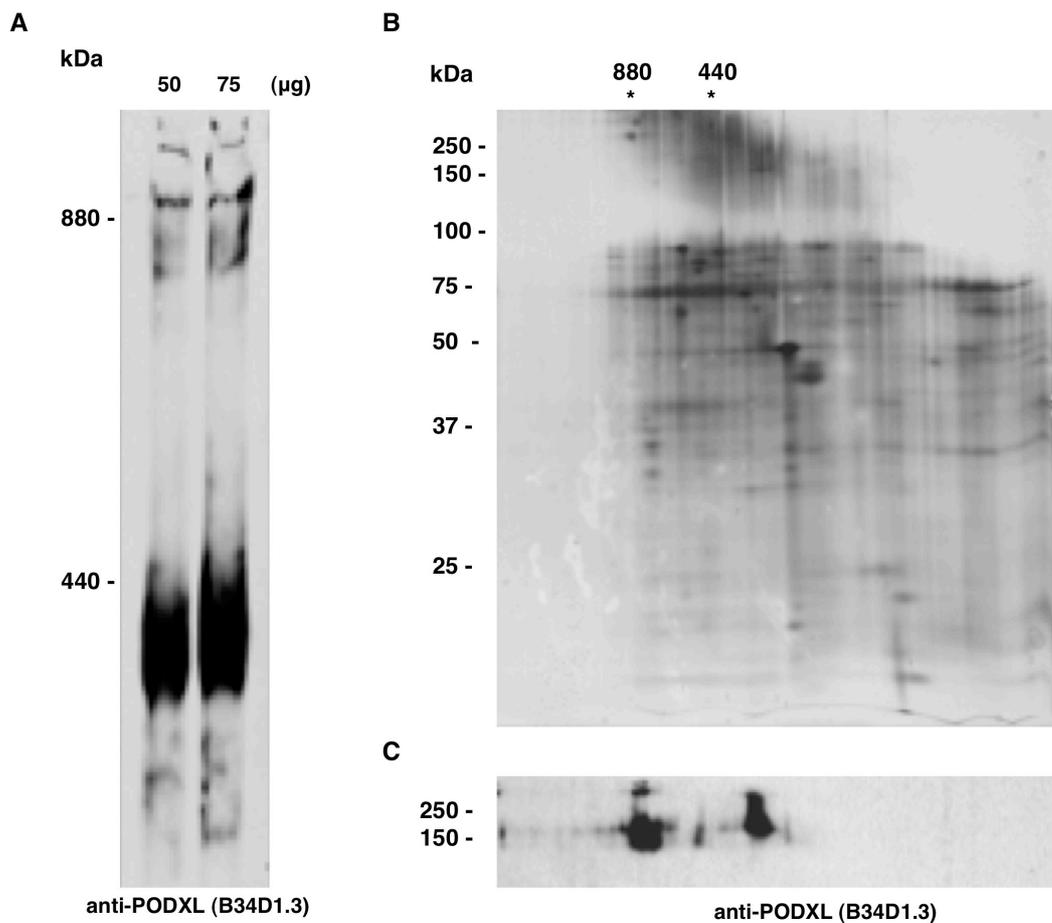


Figura 28. Blue-Native-PAGE y análisis de Western blot de los complejos proteicos en lisados de células CHO-PODXL_{GFP}.

- A) Análisis de Western de la primera dimensión de BN-PAGE (gradiente lineal 5-15%) de lisados de células CHO-PODXL_{GFP}. Se utilizó el anticuerpo B34D1.3.
- B) Tinción con plata de la segunda dimensión de la BN-PAGE (12%) de 400 µg de proteínas de lisado de células CHO-PODXL_{GFP}.
- C) Análisis de Western de la segunda dimensión de la BN-PAGE, panel B.

El análisis de Western de esta electroforesis utilizando el anticuerpo anti-PODXL B34D1.3 (Rodríguez y col. 2006) muestra la presencia de podocalicina en complejos de peso molecular aparente de ~880 KDa y en un complejo mayoritario de proteínas de aproximadamente ~400 KDa, como se observa en la Figura 28. Es interesante señalar que también se detectó la presencia de PODXL_{GFP} en complejos de alto peso molecular utilizando anticuerpos anti-GFP. La Figura 29, muestra el análisis de Western de la electroforesis BN de lisados de células CHO-PODXL_{GFP}, realizado con anti-PODXL y con anti-GFP.

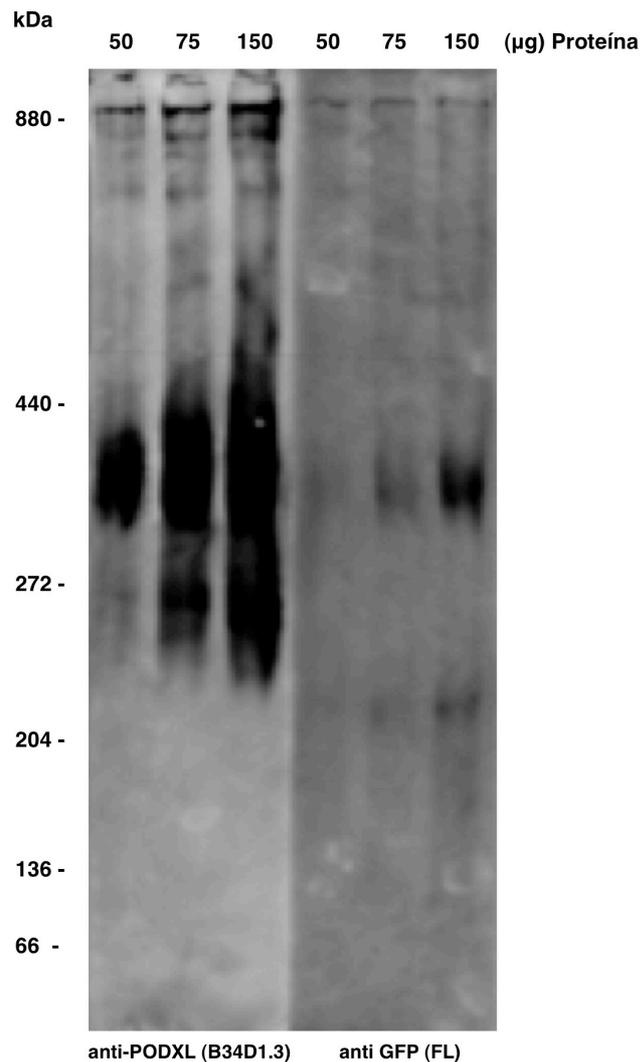


Figura 29. Análisis de Western de electroforesis BN de lisados de células CHO-PODXL_{GFP}.

Análisis de Western de la primera dimensión de BN-PAGE (gradiente lineal 5-15%) de 50, 75 y 150 µg de lisados de células CHO PODXL_{GFP}. Se utilizaron los anticuerpos anti-PODXL, B34D1.3 y anti-GFP (FL) de Santa Cruz.

Dado que el epítipo del anticuerpo B34D1.3 se localiza entre los aminoácidos 46-147 del extremo amino-terminal de podocalicina (Figura 17) y que la proteína GFP está unida en el extremo carboxilo, estos resultados indican que los complejos contienen la molécula PODXL_{GFP} completa. También se detectó, con anticuerpos anti GFP, una banda de ~200 KDa que no se pudo detectar con el anticuerpo B34D1.3 (Figura 29), lo que sugiere la presencia de una molécula de PODXL_{GFP} a la que le

faltan, al menos, los primeros 147 aminoácidos del extremo amino-terminal.

Los geles de electroforesis BN de lisados de células CHO-PODXL_{GFP} se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en una segunda dimensión. La Figura 28, muestra el análisis por Western de la electroforesis BN que confirma la presencia de podocalicina en complejos de 880 y 270 KDa aproximadamente. La Figura 28.B, muestra la tinción con sales de plata del gel de la segunda dimensión. En dicha figura, se ve que los complejos que contienen podocalicina se desdoblaron en proteínas de distinto peso molecular, lo que indica su naturaleza heterooligomérica. La Figura 28.C muestra, mediante el análisis de transferencia de Western, que el peso molecular de la podocalicina presente en los complejos multiproteicos se corresponde con el detectado en lisados de células CHO-PODXL_{GFP}.

4.8. Participación del sistema ubiquitina proteasoma en los complejos de alto peso molecular aislados por la técnica "blue native"

Con el fin de definir mejor los complejos de alto peso molecular realizamos una electroforesis en segunda dimensión mostrado en la Figura 30. La intención de esta electroforesis (4 horas, a 20 mA constantes) fue el poder analizar con mayor detalle las proteínas presentes en el complejo de alto peso molecular. El análisis de Western de la electroforesis BN se muestra en la parte superior de la Figura 30.

En la Figura 30, se muestra la tinción con plata de la segunda dimensión donde se observan al menos 4 manchas que podrían corresponder a proteínas de este complejo mayoritario. Los componentes de este complejo fueron analizados mediante espectrometría de masas. Tres de ellas fueron identificadas como componentes del proteasoma (Tabla 3). Dado que no existe información suficiente en los bancos de datos sobre proteínas de tejidos de hamster chino, partimos de la hipótesis que deberían tener una mayor similitud con las correspondientes proteínas de roedores (ratón y rata). El hecho de que los péptidos identificados sean similares no solamente entre los roedores, sino también en humanos, indica que se trata de proteínas de secuencias

muy conservadas y, por tanto, justifica la extrapolación de su identidad a las células CHO.

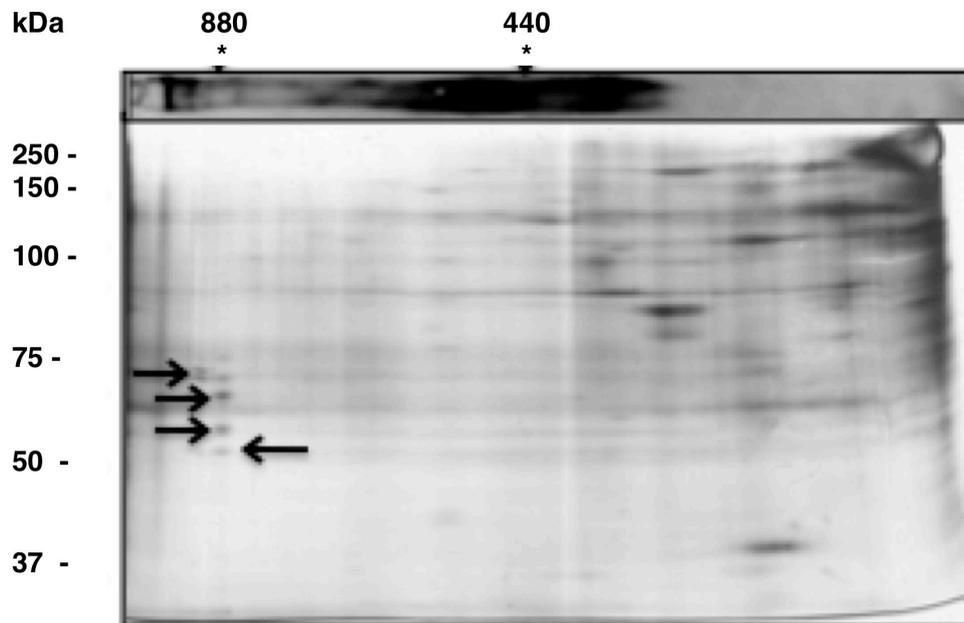


Figura 30. Blue-Native-PAGE y análisis de Western blot de los complejos proteicos de lisados de células CHO-PODXL_{GFP}.

La parte superior, muestra el análisis de Western de la primera dimensión en BN-PAGE (gradiente lineal 5-15%) de lisados de células CHO-PODXL_{GFP}. El anticuerpo anti-PODXL utilizado fue el B34D1.3. La parte inferior, muestra la tinción con plata de la segunda dimensión de la BN-PAGE (12%) de 250 μ g de proteínas de lisado de células CHO-PODXL_{GFP}. Las flechas indican las manchas que se analizaron por espectrometría de masas.

El proteasoma es una proteasa dependiente de ATP, que colabora con el sistema ubiquitina y cataliza la degradación rápida, precisa e irreversible de las proteínas marcadas por el sistema ubiquitina. Es un complejo multiproteico, inusualmente grande (26S), que consta de dos partes: el proteasoma 20S de aproximadamente 700 kDa y la partícula reguladora (19S) de aproximadamente 900 kDa. Ambas partes están compuestas de una serie de subunidades. La Figura 31, reproducida de una publicación de Murata, Yashiroda y Tanaka, 2009), muestra la complejidad del sistema ubiquitina proteasoma.

Proteína	Banda	Nombre Swiss Prot Número Acceso	PM (KDa)	Puntos Mascot	Péptidos identificados
Subunidad alfa tipo 7 del proteasoma (h/rn/ra)	1	O14818/ Q9Z2U0/ P48004	28041/ 20238/ 28683	22/ 22/ 22	R.LTVEDPVTVEYIT R.Y (h,rn,ra)
Subunidad 2 del activador del proteasoma (h/rn/ra)	2	P61289/ P97371/ Q63797	27555/ 26314/ 21520	143/ 107/ 96	R.DEAAYGELR.A (h) K.YFSERGDAAVAK.A (h,rn,ra) K.ASKETHVMDYR.A (h) K.TKVEAFQTTISK.Y (h,rn) K.IEDGNDFGVAIQEK.V (h,rn,ra) R.ALVHERDEAAYGELR.A (h)
Subunidad alfa 1, isoforma 1 del proteasoma (h/rn/ra)	3	P25786/ Q9R1P4/ P18420	14163/ 30505/ 29784	63/ 64/ 63	K.TQIPTQR.Y (h,rn,ra) R.FVFDRLPLVSR.L (h,rn,ra) R.ALRETLPAEQDLT TK.N (h,rn,ra) R.NQYDNDVTVWS PQGR.I (h,rn,ra)
Subunidad 26 del complejo mediador (h,rn,ra)	4	O95402/ Q7TN02/ -	65863/ 65052/ 61828	39/ 39/ 39	R.LGKLINDVR.K (h,rn,ra)

Tabla 3. Identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas extraídas de las bandas 1-3 del panel A de la Figura 30.

Las bandas están numeradas de acuerdo con la posición en el panel inferior de la Figura 30. Las proteínas reseñadas son las que tenían una mayor valoración Mascot y que eran o bien de humanos (h) o de roedores (ratón, rn; rata, ra).

La detección de podocalicina en la región de los componentes del proteasoma plantea la posibilidad de que la podocalicina se degrade por la vía ubiquitina-proteasoma lo que justificaría su aparición formando complejos. Aunque en los resultados de la Figura 30 no se detectara ubiquitina en los complejos de alto peso molecular, cabe la posibilidad de que no esté en cantidades detectables por análisis de Western. Analizamos esta posibilidad incubando células con el inhibidor del proteasoma MG132 (Lee y Goldberg 1998). Este compuesto es un aldehído peptídico (Cbz-leu-leu-leucina), análogo de las proteínas sustrato del sistema ubiquitina, potente inhibidor del estado de transición de la actividad quimotripsina del proteasoma. Su utilización no

impediría la ubiquitinización de proteínas ni su unión al proteasoma, pero si inhibiría la actividad proteolítica.

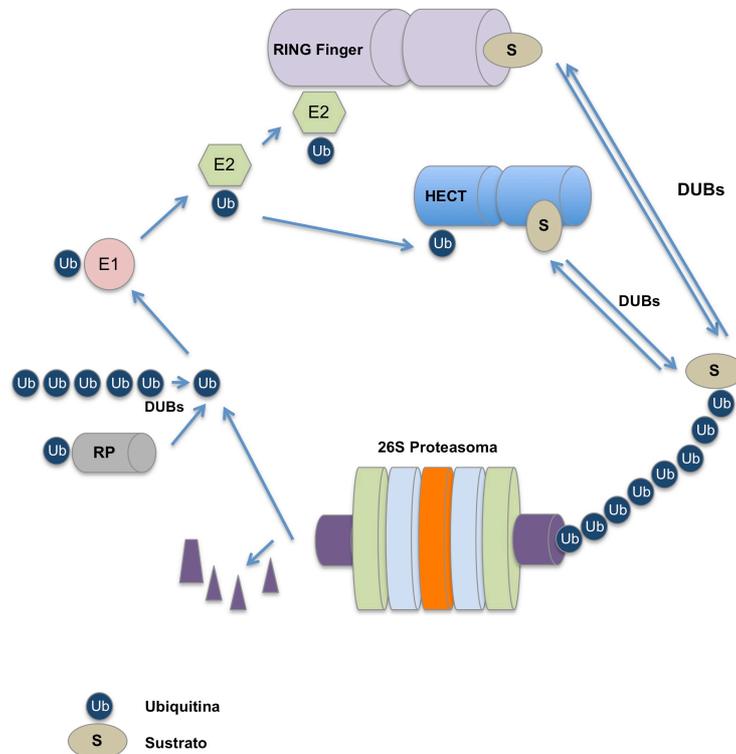


Figura 31. Esquema del sistema ubiquitina-proteasoma.

La ubiquitina (Ub) (poliubiquitina) lo forman moléculas de ubiquitina fusionadas en tándem. Los enzimas desubiquitinantes (DUBs) hidrolizan enlaces peptídicos intermoleculares para producir Ub libre. La vía de conjugación de Ub está formada por tres tipos de enzimas: E1 (enzima de activación), E2 (enzima de conjugación) y E3 (ligasa). Ub es activada por E1, formando un enlace tiol-éster de alta energía entre el residuo glicina carboxilo-terminal de Ub y la cisteína del sitio activo de E1 en una reacción dependiente de ATP. La Ub activada se transfiere a E2 y entonces E3 liga Ub a la proteína sustrato a través de residuos lisina. Los enzimas E3 son de dos tipos fundamentalmente. El anillo tipo (RING-type E3s) que une al E2 y al sustrato, ayudando a E2 a transferir Ub a la proteína sustrato y el anillo tipo HECT que forma un enlace tiol-éster con la Ub activada y se une a E2 antes de transferirla al sustrato. Los sustratos poliubiquitinados son reconocidos y degradados por el proteasoma 26S de una forma dependiente de ATP. Los DUBs eliminan poliubiquitina de las proteínas sustrato antes de que sean trasladados al proteasoma 20S y regeneran Ub libre. Reproducido de Murata y col. (2009).

El análisis de Western de la electroforesis BN (Figura 32) mostró que en presencia del inhibidor aparece una nueva banda, esto es, un nuevo complejo de alto peso molecular en el que se detecta podocalicina,

lo que es compatible con que la podocalicina sea degradada por el proteasoma y que, por tanto, forme parte de un complejo de alto peso molecular aparente. Este complejo no coincide con ninguno de los detectados en ausencia del inhibidor. Ahora bien, el aumento de intensidad detectado en los otros tres complejos en ausencia del inhibidor puede sugerir que corresponden a distintas conformaciones de un complejo PODXL-Ub-proteasoma.

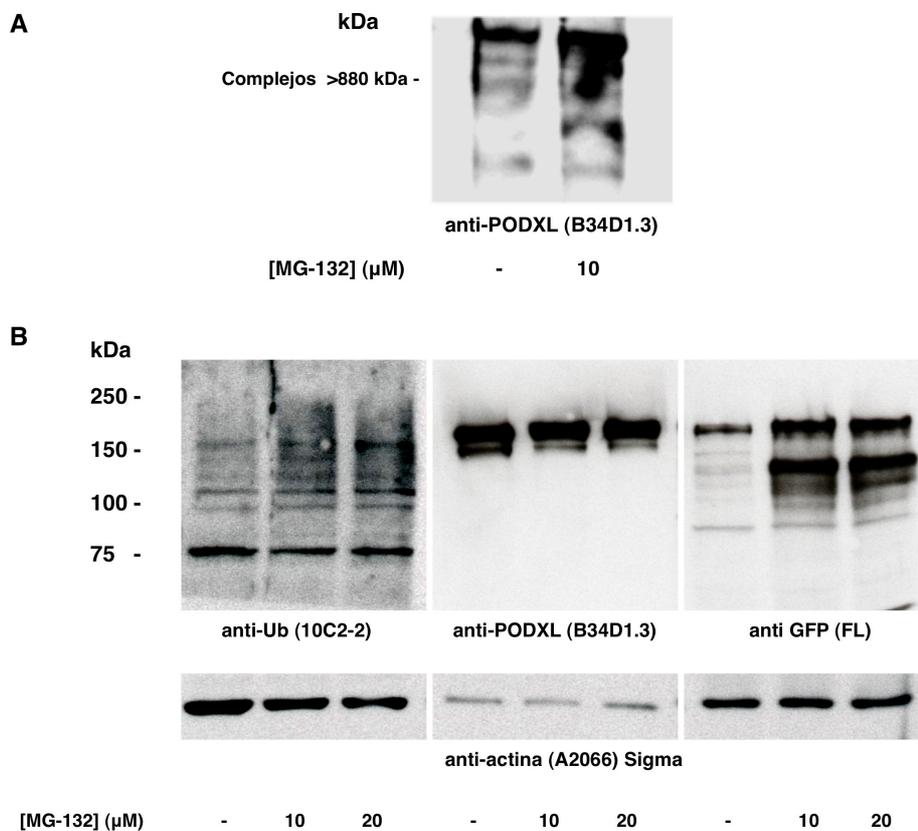


Figura 32. Efecto del inhibidor del proteasoma, MG-132, sobre la expresión de PODXL_{GFP} y ubiquitina.

- A) Análisis de Western de la primera dimensión de BN-PAGE (gradiente lineal 5-15%) de lisados de células CHO-PODXL_{GFP}. El anticuerpo anti-PODXL utilizado fue el B34D1.3.
- B) Análisis de Western de la electroforesis SDS-PAGE de 50 μg de proteínas de la fracción soluble de lisados de células CHO-PODXL_{GFP}, incubadas, en ausencia y en presencia del inhibidor de proteasoma, a concentraciones de 10 y 20 μM.

La Figura 32, también muestra el análisis de Western de los SDS-PAGE de lisados de células CHO-PODXL_{GFP}, en la fracción soluble. Se detectó podocalicina en la fracción soluble tanto con anti-PODXL como anti-GFP lo que indica que se trata de una molécula completa y, por su movilidad electroforética, del tamaño de la proteína nativa normal. No se pudo detectar podocalicina con anti-ubiquitina, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor del proteasoma.

En la fracción soluble se puede detectar con anti-GFP y con anti-ubiquitina una banda de aproximadamente 75 kDa, no detectable con el anticuerpo anti-PODXL. Esta observación puede ser interpretada como que fragmentos de PODXL_{GFP} que han perdido el extremo amino-terminal, esto es, al menos una parte del dominio extracelular, son ubiquitinados y dirigidos hacia el proteasoma. La intensidad de las bandas detectadas con ubiquitina aumenta con la concentración del inhibidor utilizado.

4.9. Detección de podocalicina en complejos multiproteicos de células TERA-1

La presencia de podocalicina en complejos multiproteicos de células TERA-1, se muestra en la Figura 33. La podocalicina en lisados de células TERA-1 tiene un peso molecular algo mayor (Figura 33.A) que el detectado en CHO-PODXL_{GFP} (Figura 11.A).

El análisis de Western de la electroforesis BN de la Figura 33.B, muestra la presencia de podocalicina en complejos multiproteicos de tamaños similares a los obtenidos con lisados de células CHO-PODXL_{GFP}. La resolución de estos complejos mediante SDS-PAGE (Figura 33.C) indica que el complejo de menor peso molecular se desdobra en proteínas de distintos pesos moleculares, indicando que se trata de un complejo multiproteico. Por el contrario, no se detectan proteínas que se deriven del complejo de mayor peso molecular (Figura 33.C), lo que sugiere que aunque la podocalicina se detecta por técnicas inmunológicas, ni esta proteína ni otras que puedan formar parte del complejo de mayor peso molecular están suficientemente representadas para ser detectadas por tinción con sales de plata.

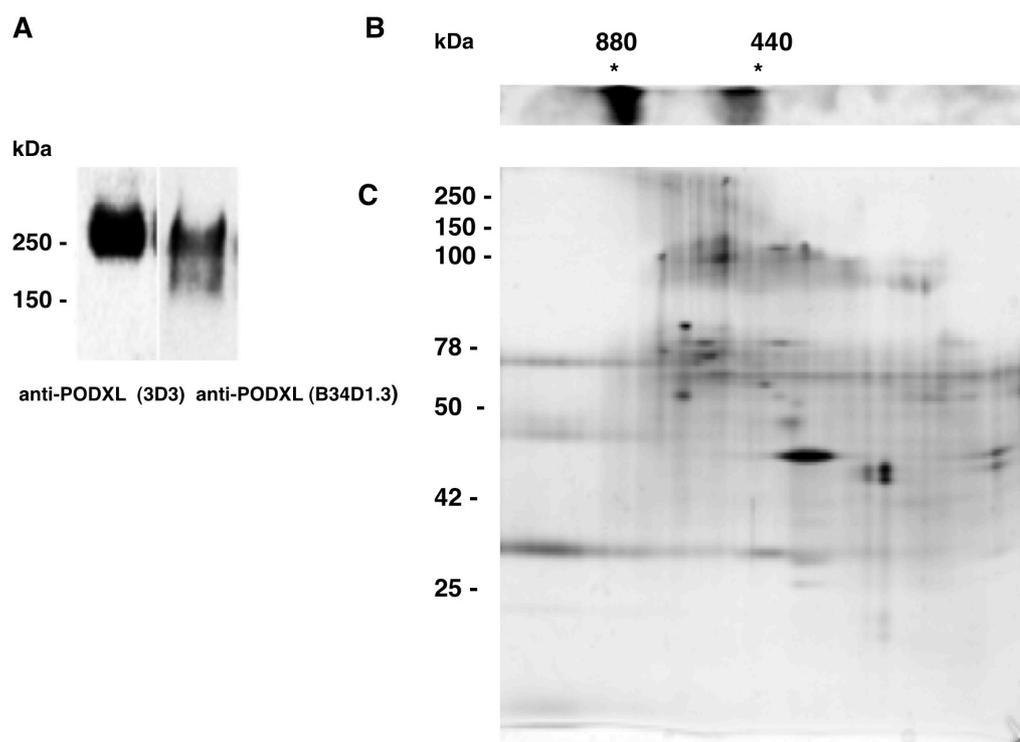


Figura 33. Blue-Native-PAGE y análisis de Western de complejos proteicos de lisados de células TERA-1.

- A) Análisis de Western de SDS-PAGE de 50 µg de proteína de lisados de células TERA-1.
- B) Análisis de Western de la primera dimensión de BN-PAGE (5-15%) realizado con 400 µg de proteína de lisado de células TERA-1. Anti-PODXL utilizado: B34D1.3
- C) Tinción con plata de la segunda dimensión del BN-PAGE (12%) de 400 µg de proteínas de lisado de células TERA-1.

4.10. Detección de podocalicina en complejos multiproteicos de células CHO-PODXL_{GFP} deficientes en glicosilación y sialización

La podocalicina es una proteína hiperglicosilada. Para analizar la importancia funcional de la glicosilación utilizamos dos líneas celulares glucomutantes de células CHO: Lec1, deficientes en la actividad N-acetilglucosaminil-transferasa, lo que da lugar a N-carbohidratos incompletos y Lec2, deficientes en el transportador de ácido siálico. También utilizamos una tercera línea celular, Lec8, que tienen una menor capacidad de transportar UDP-galactosa al Golgi, y que disminuye el contenido de ácido siálico celular. Como control, utilizamos la línea parental de células CHO, CHO-W5. Todas estas líneas celulares fueron transfectadas de

manera estable con un plásmido de expresión de $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ o GFP, de forma similar a la descrita en las células $\text{CHO-PODXL}_{\text{GFP}}$.

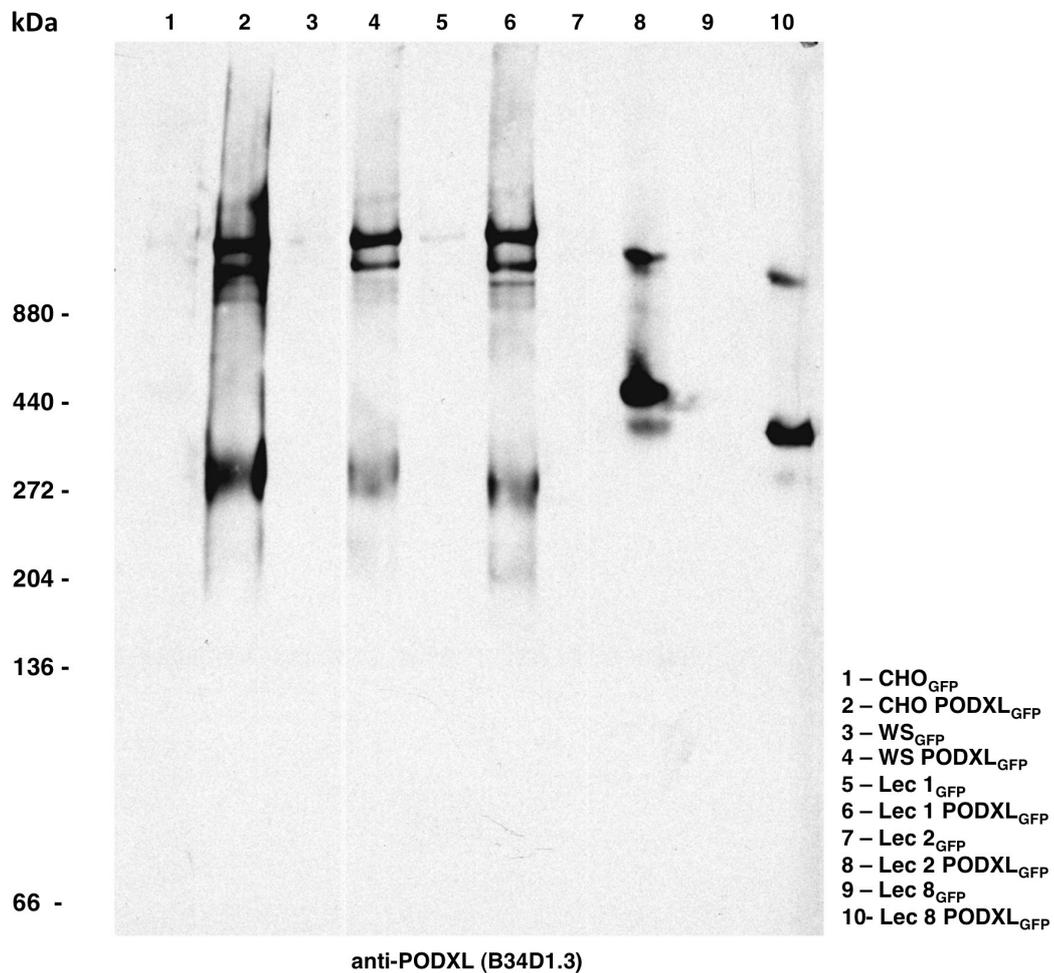


Figura 34. Análisis de Western del Blue-Native-PAGE de lisados de células CHO portadoras de mutaciones de glicosilación, expresando de forma estable $\text{CHO-PODXL}_{\text{GFP}}$.

Análisis de Western de la primera dimensión de BN-PAGE (gradiente lineal 5-15%) de lisados de células glucomutantes. Anti-PODXL utilizado fue el B34D1.3.

La Figura 34, muestra que la podocalicina se encuentra formando complejos multiproteicos similares en las células $\text{Lec1-PODXL}_{\text{GFP}}$ y en $\text{CHO-PODXL}_{\text{GFP}}$, indicando que el grado de glicosilación no es determinante para las interacciones moleculares de esta proteína. Sin embargo, en lisados de células de las líneas $\text{Lec2-PODXL}_{\text{GFP}}$ y $\text{Lec8-PODXL}_{\text{GFP}}$, la detección de podocalicina mostró un patrón diferente a las

células control. Las células Lec2, mostraron un único complejo positivo para podocalicina de peso molecular 880 KDa y dos complejos de peso molecular de aproximadamente, 300 y 350 KDa. El patrón de podocalicina detectada en lisados de células Lec8-PODXL_{GFP} fue similar al mostrado por Lec2, pero con una disminución en el peso molecular de todos los complejos de aproximadamente, 50 KDa. Estos resultados sugieren que la sialización, y no la glicosilación de proteínas, determina el tamaño y/o la composición de los complejos multiproteicos.

En resumen, la utilización de técnicas electroforéticas Blue-Native/SDS PAGE, permite concluir que, en células CHO-PODXL_{GFP}, la podocalicina forma parte de complejos multiproteicos de distinta composición y cuya composición/tamaño molecular depende del grado de sialización. En células TERA-1, la podocalicina forma parte de complejos multiproteicos, pero posiblemente, también forme agregados homoprotéicos.

4.11. Papel del dominio citosólico en la adhesión y migración de células CHO-PODXL_{GFP}

La detección de podocalicina en complejos multiproteicos de alto peso molecular, detectados mediante electroforesis en condiciones nativas (BN), en lisados de células CHO-PODXL_{GFP} (Figura 34), sugiere que el dominio citosólico es capaz de interactuar con proteínas de células CHO y participar en los mecanismos de respuesta celular y, por tanto, mediar en la respuesta migratoria de las líneas celulares CHO-PODXL_{GFP}. Para confirmar esta posibilidad diseñamos construcciones del plásmido pCDNA3.1 con cDNA de podocalicina en la que se reprodujo una deleción de todo dominio citosólico, esto es, a partir del aminoácido 454 hasta el aminoácido 528 (Δ yuxtamembrana-PODXL_{GFP}) o sólo del dominio DTHL (Δ DTHL-PODXL_{GFP}).

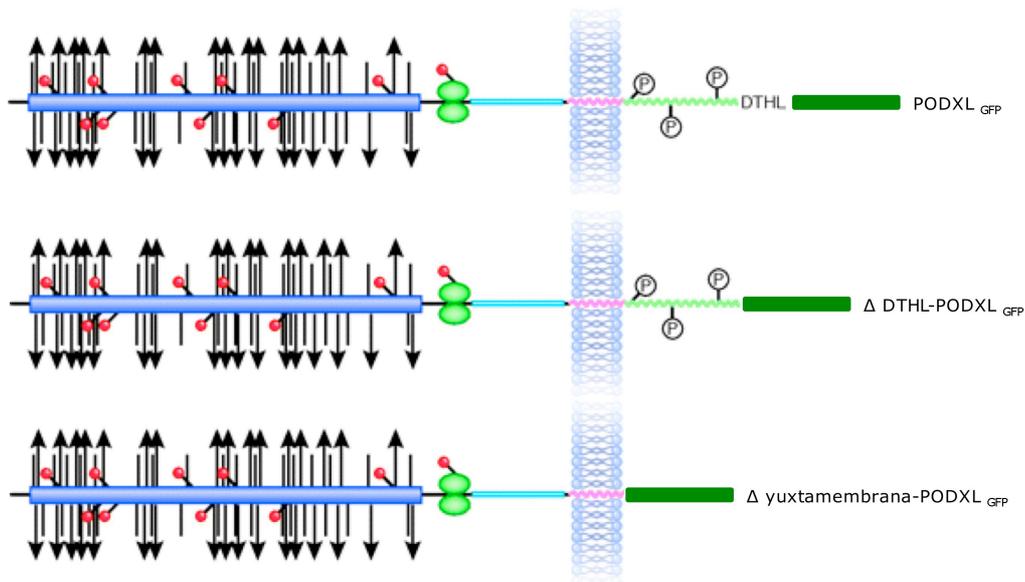


Figura 35. Esquema de las mutantes de podocalicina con deleciones en el dominio citosólico.

Código de colores:

Péptido señal: Línea negra

Dominio extracelular mucina: azul

Dominio globular que contiene cisteína: verde

Región peduncular yuxtamembrana: celeste

Líneas verticales: O-glicosilaciones

Triángulos: sitios de sialización

Círculos rojos: N-glicosilaciones

Dominio transmembranar: rosado

Cola citoplasmática: verde claro

Dominio carboxi-terminal de sitios de unión PDZ: DTHL y posibles sitios de fosforilación

Verde oscuro: proteína verde fluorescente

La Figura 35, es una representación esquemática de las dos proteínas truncadas que se expresarían como proteínas de fusión con GFP. La deleción de estos dominios se llevó a cabo amplificando por PCR el cDNA de podocalicina con los oligonucleótidos que corresponden a las secuencias de 1013-1042 para el extremo amino, incorporando el sitio de restricción Sac II y 2582-2617 para DTHL y 2375-2404 para yuxtamembrana del extremo citosólico del cDNA e incorporando el sitio de restricción para el enzima Bam H1 y eliminando el codon de terminación de podocalicina. Los productos de PCR fueron digeridos con estos enzimas y clonados en el plásmido pEGFP-N1. La posición correcta del inserto la determinamos por análisis de restricción y, finalmente, por secuenciación del cDNA. Las células CHO fueron transfectadas de forma

estable con estas construcciones. La Figura 36, muestra el análisis de Western de lisados de las construcciones que expresan podocalicina y las dos mutantes con deleciones del extremo carboxi-terminal (DTHL) o de todo el dominio citosólico. El análisis se realizó utilizando anticuerpos contra el dominio extracelular, contra el dominio citosólico y contra GFP. Los datos de la movilidad electroforética coinciden con los esperados y la deleción del dominio citosólico no es detectable con el anticuerpo contra ese dominio y sí es detectable con anti-GFP, de acuerdo con lo esperado.

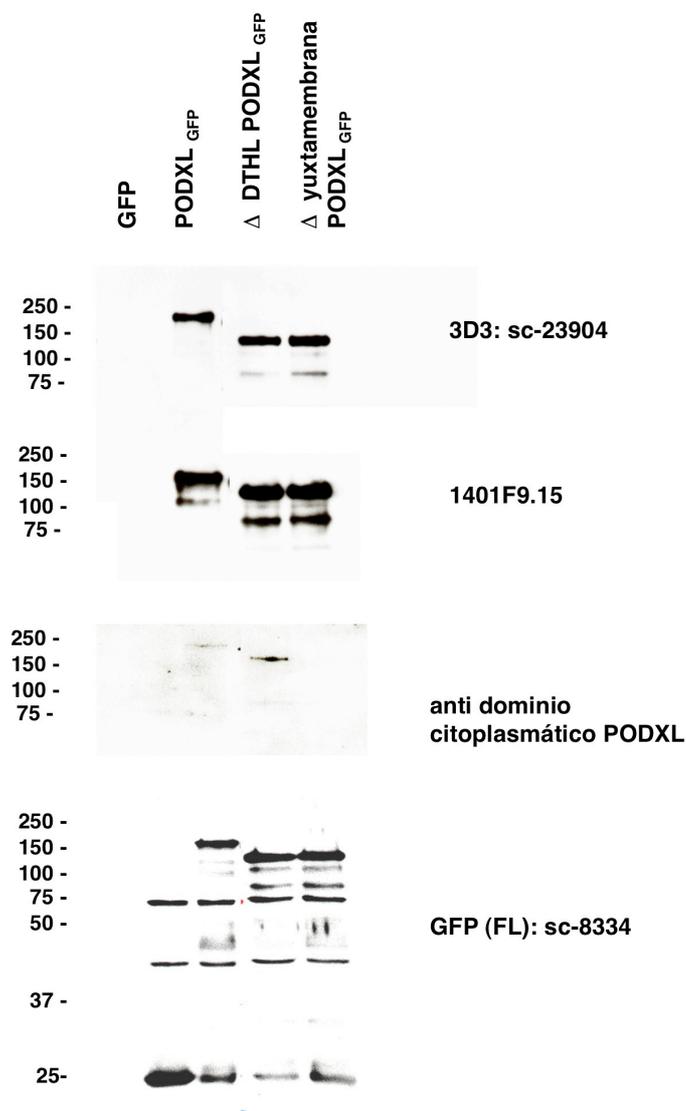


Figura 36. Análisis de Western de lisados de células CHO que expresan PODXL_{GFP} y las dos mutantes de deleción del dominio citosólico de PODXL.

El análisis de Western fue realizado como se describe en Métodos, con proteínas de los diferentes lisados celulares y los anticuerpos indicados.

4.11.1. Adhesión celular

El análisis de la capacidad adherente de las mutaciones de delección en el extremo citosólico se llevó a cabo como describimos anteriormente (Figura 24). La Figura 37, muestra un experimento representativo y la Figura 38, recoge la valoración cuantitativa del experimento representado (A) y de la media de tres experimentos más (B).

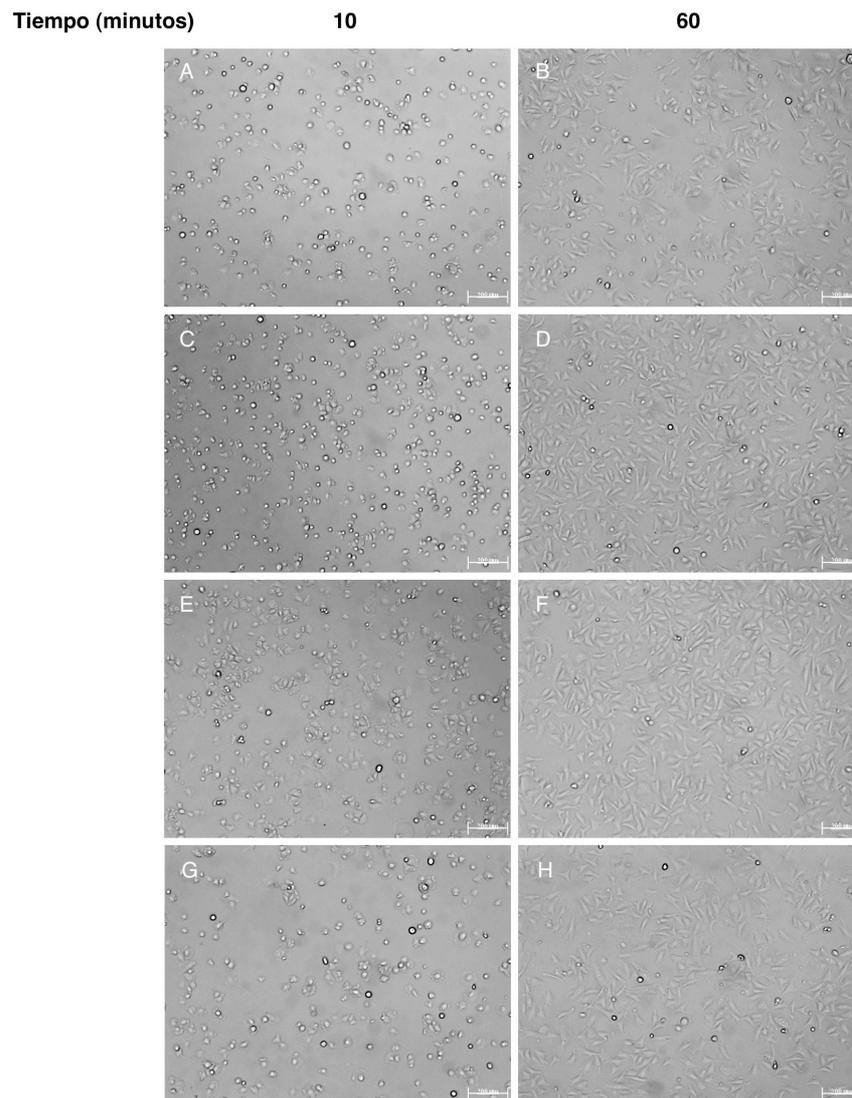


Figura 37. Capacidad de adhesión de mutantes del dominio citosólico de PODXL.

Las células, (~75.000) fueron sembradas en pocillos de 3 cm recubiertos de fibronectina. Se tomaron fotografías a 10, 20 y 60 minutos con un microscopio Olympus IX50 dotado de una cámara CCD modelo DP70. El experimento se realizó cinco veces y se muestran las fotografías de un experimento representativo. Barra inferior 200 μm . A y B. CHO_{GFP}, C y D. CHO-PODXL_{GFP}, E y F. CHO- Δ yuxtmembrana-PODXL_{GFP}, y G y H. CHO- Δ DTHL-PODXL_{GFP}.

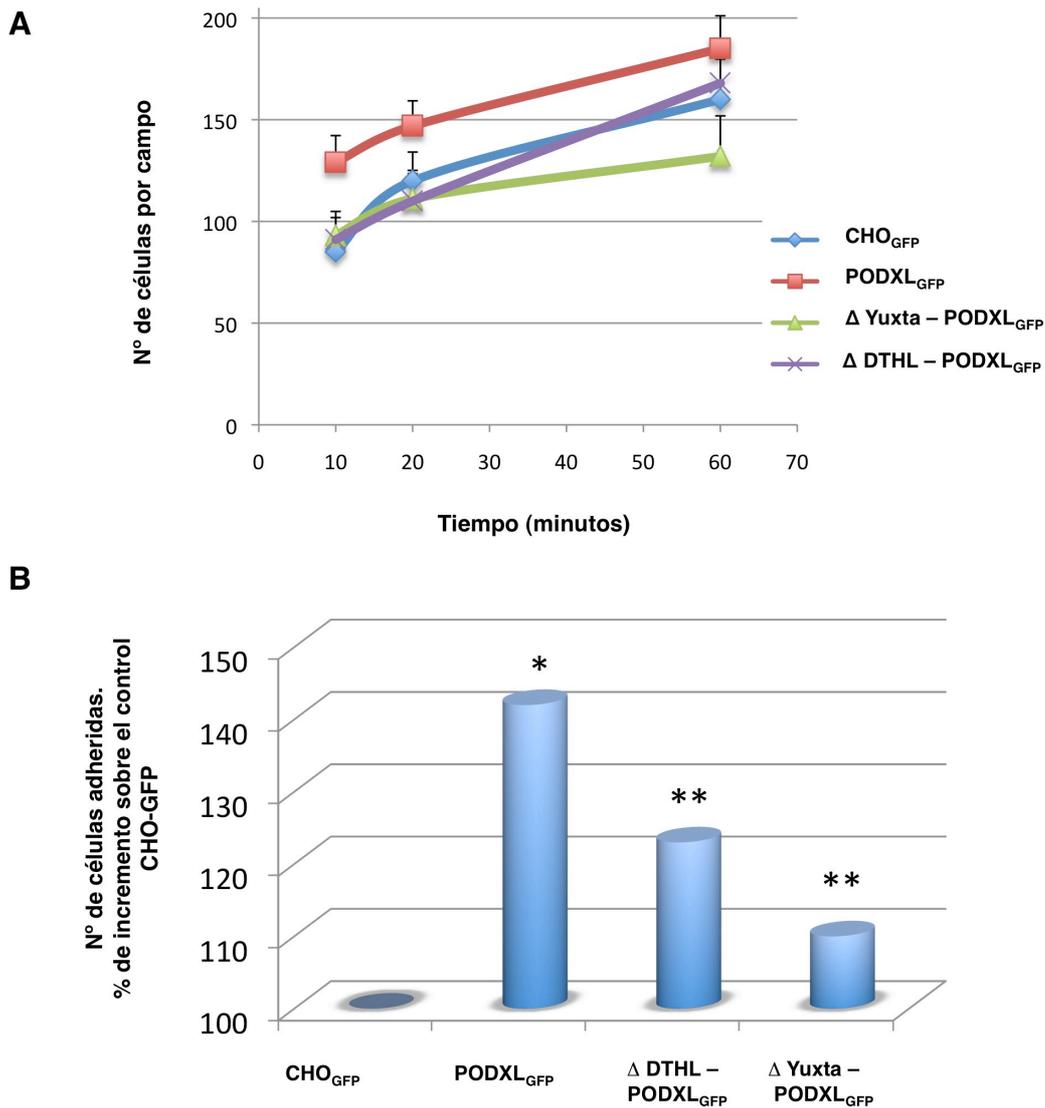


Figura 38. Valoración cuantitativa de los resultados obtenidos con los experimentos de adhesión mostrado en la Figura 37.

- A) Número de células adheridas en función del tiempo. El experimento representativo mostrado en la Figura 37.
- B) Porcentaje del incremento celular en relación a la línea celular CHO_{GFP}. Prueba T apareada P<0.05: * respecto a células que expresan GFP; ** respecto a células que expresan PODXL_{GFP}.

4.11.2. Migración celular

La capacidad migratoria de las distintas líneas celulares se analizó mediante el ensayo de oclusión de herida descrito en la Figura 39, que muestra las heridas, a tiempo 0 y después de 12 horas de incubación, en placas con fibronectina inmovilizada.

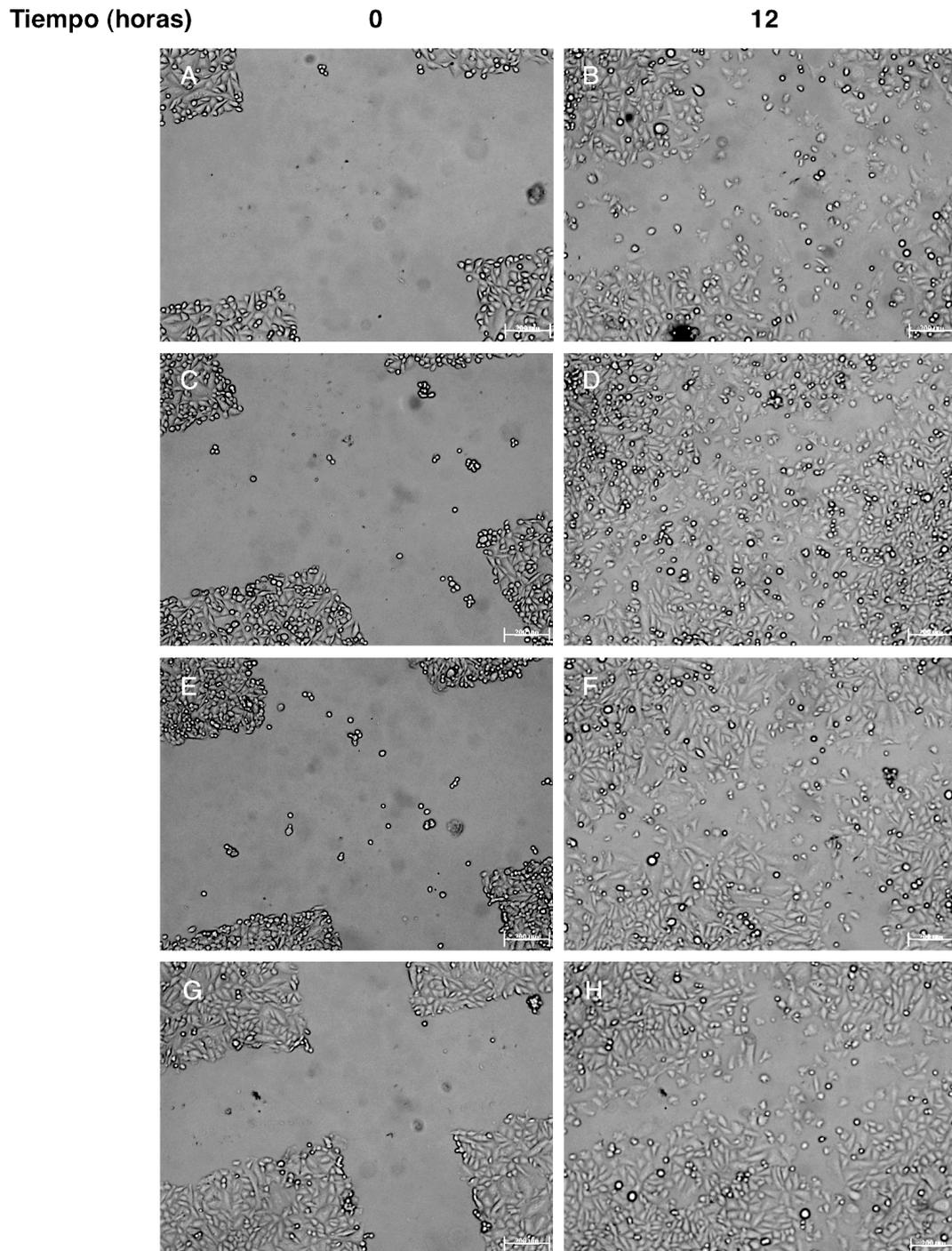


Figura 39. Ensayo de cicatrización de herida.

Las células se sembraron en pocillos de 3 cm recubiertos de fibronectina. Se tomaron fotografías a tiempos 0, 4, 8, 12 y 16 horas con una cámara digital DP70 de Olympus y un microscopio IX50 de la misma marca. Este experimento se realizó cinco veces y se muestran las fotografías representativas de los tiempos 0 y 12 horas. A y B. CHO_{GFP}, C y D. CHO-PODXL_{GFP}, E y F. CHO- Δ DTHL-PODXL_{GFP}, y G y H. CHO- Δ yuxtamembrana-PODXL_{GFP}.

La cuantificación de estos resultados se muestra en la Figura 40, en la que se puede apreciar que la delección de los cuatro aminoácidos del dominio DTHL tiene el mismo efecto que la eliminación de todo el dominio citosólico.

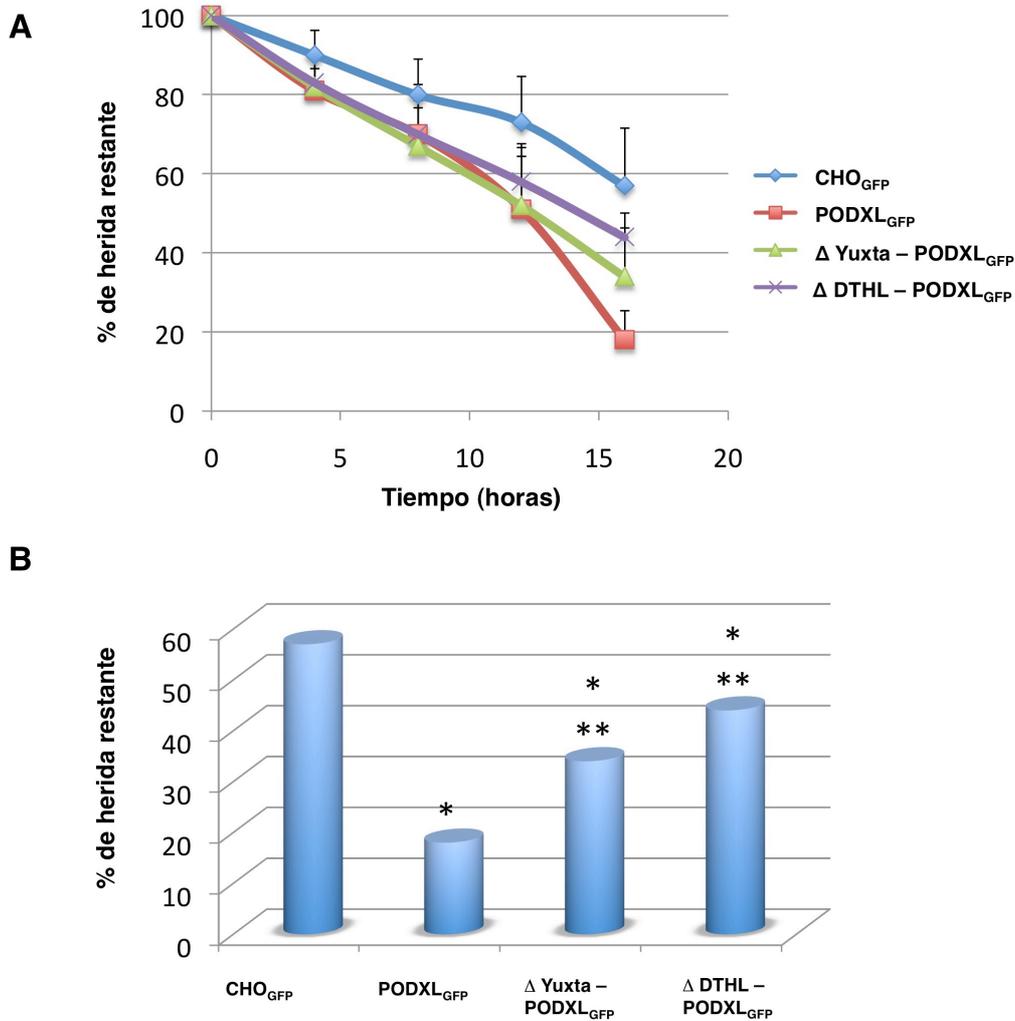


Figura 40. Valoración cuantitativa de los resultados del experimento de cicatrización de herida de la Figura 39.

- A) Velocidad de cicatrización de herida. Los resultados representan la media de 5 experimentos y las barras verticales, la desviación standard.
- B) % de herida restante a las 16 horas de incubación de los cultivos. Prueba T apareada P<0.05: * respecto a células que expresan GFP; ** respecto a células que expresan PODXL-GFP.

Esta observación sugiere que existe una interacción con proteínas intracelulares y que esta interacción participa en el control de la señalización que incrementa la capacidad migratoria celular.

4.12. Análisis morfológico *in vivo* y citométrico de células CHO expresando distintas mutaciones del dominio citosólico de podocalicina

Como controles, hemos utilizado células transfectadas con cDNA de la molécula completa de podocalicina (CHO-PODXL_{GFP}) fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) y sólo a GFP. Mediante microscopía *in vivo* ("wide field") en condiciones controladas de temperatura y de gasificación, pudimos corroborar los rasgos, anteriormente descritos, para estas células como: aspecto fibroblastoide, disposición polar del Golgi y podocalicina de aspecto granular localizada, preferentemente, en los polos de desplazamiento celular para CHO-PODXL_{GFP} y un aspecto más ubicuo y difuso para las células CHO_{GFP} (Figuras 18 y 19).

Las células con expresión de la mutante de podocalicina con delección de todo el extremo carboxi-terminal (CHO- Δ yuxtamembrana-PODXL_{GFP}) mostraron una morfología fibroblastoide, aparato de Golgi de aspecto globular y podocalicina granular escasa y de localización en los segmentos distales de los filopodios (Figura 41).

La expresión de podocalicina con delección del dominio intracelular "DTHL" (CHO-DTHL-PODXL_{GFP}) produjo células con aspecto fibroblastoide, similares a las células control, aparatos de Golgi poco prominentes y escaso número de gránulos de PODXL_{GFP} con aparente tendencia a migrar hacia los filopodios (Figura 42). Es de señalar, el hallazgo frecuente de PODXL_{GFP} acumulada en los extremos distales de los filopodios (Figura 19).

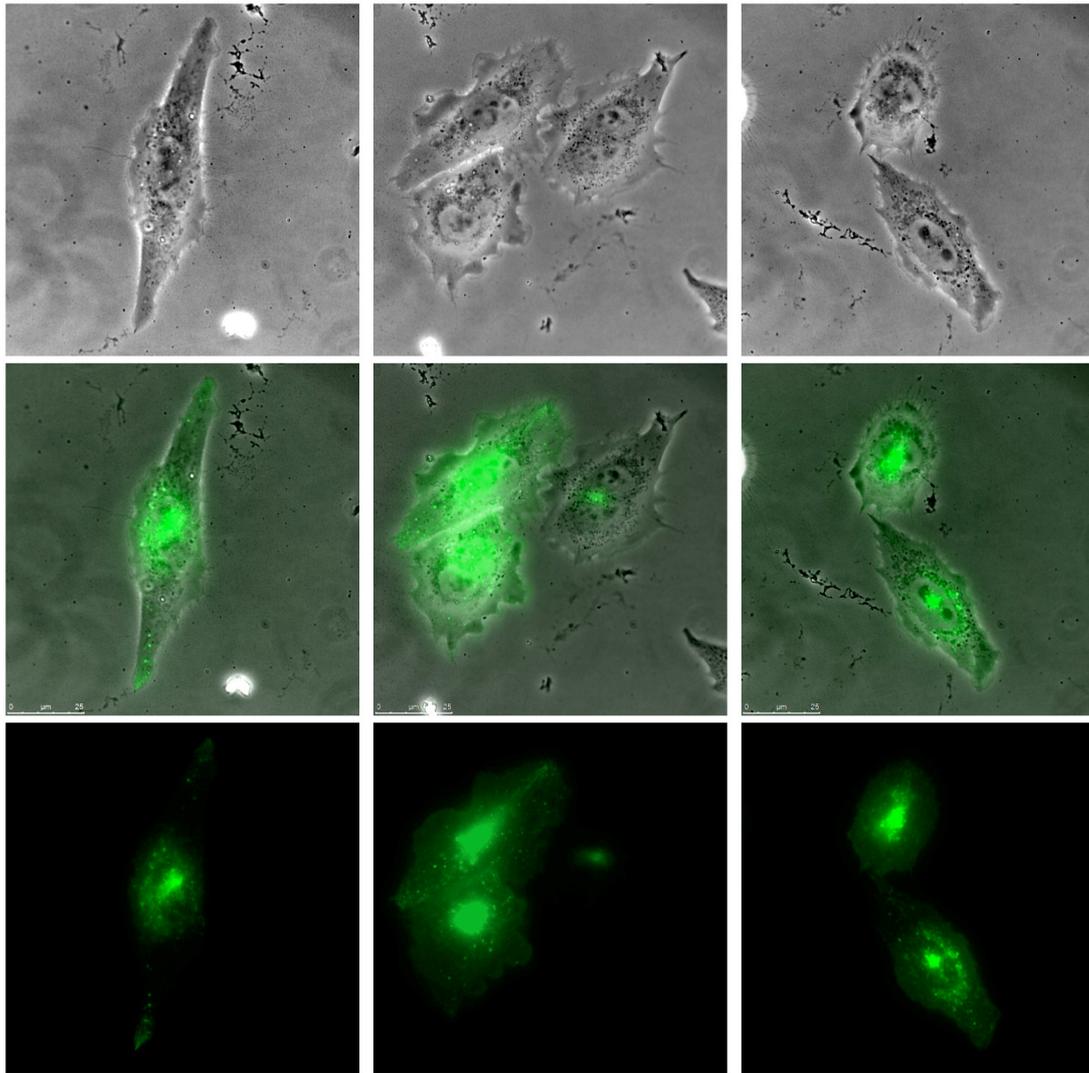


Figura 41. Microscopía *in vivo* de células CHO- Δ yuxtamembrana-PODXL_{GFP}.

Células CHO- Δ yuxtamembrana-PODXL_{GFP}, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostatzado y con ambiente gaseoso de 95%O₂ y 5%CO₂, (100x). Los paneles superiores, muestran las fotografías de microscopía de contraste de fases, los inferiores, la fluorescencia verde y los centrales, el solapamiento de ambas.

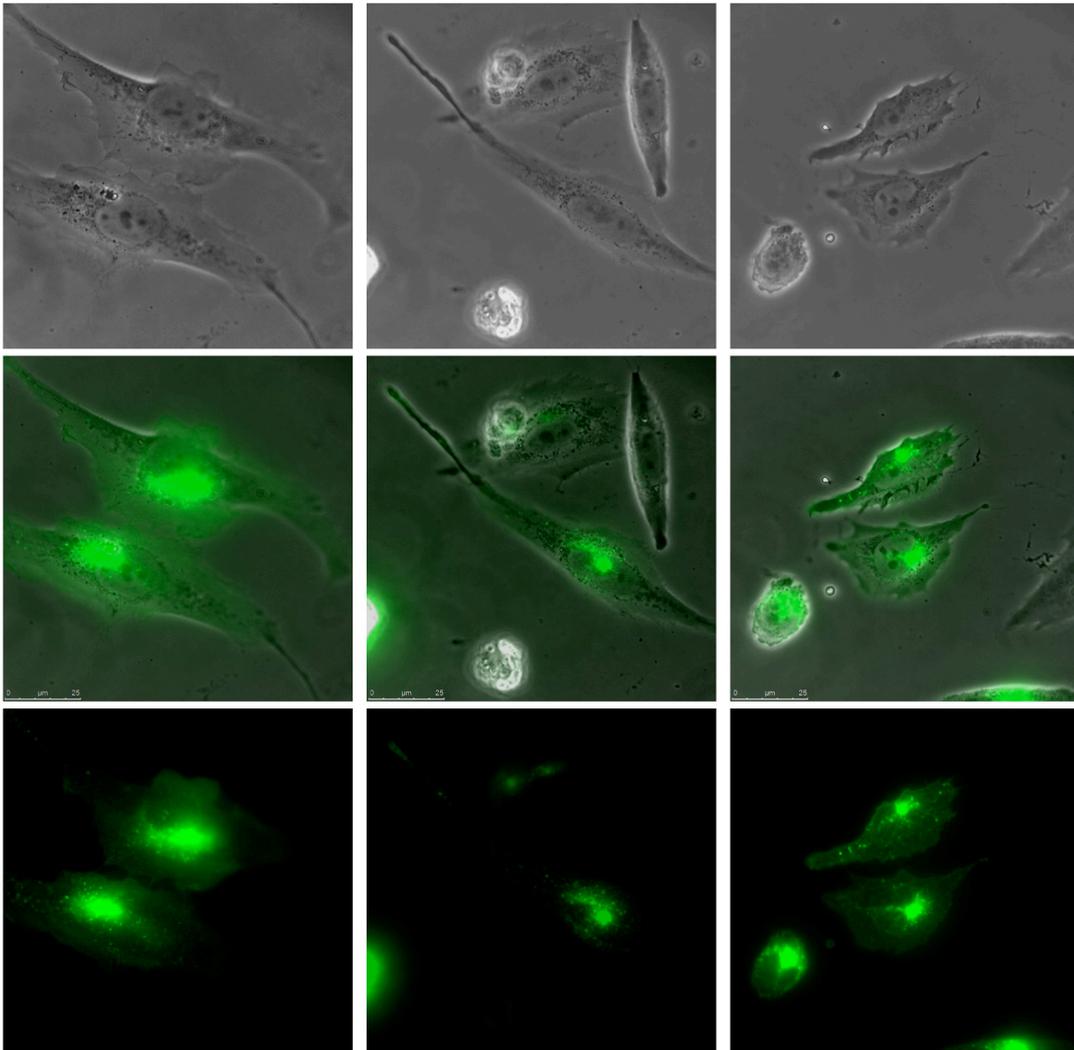


Figura 42. Microscopía *in vivo* de células CHO- Δ DTHL-PODXL_{GFP}.

Células CHO- Δ DTHL-PODXL_{GFP}, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostatzado y con ambiente gaseoso de 95%O₂ y 5%CO₂, (100x). Los paneles superiores, muestran las fotografías de microscopía de contraste de fases, los inferiores, la fluorescencia verde y los centrales, el solapamiento de ambas.

La expresión de las proteínas fluorescentes fue verificada mediante microscopía de fluorescencia *in vivo* (Figura 41 y 42) o por microscopía de fluorescencia de células adheridas a fibronectina inmovilizada (Figura 43). En ambos casos, se confirmó la presencia en forma granular de las proteínas de fusión así como su expresión en membrana plasmática. El cálculo del porcentaje de células que expresan las proteínas de fusión mediante citometría de flujo (Figura 44) mostró fluorescencia verde en ~80% de las células.

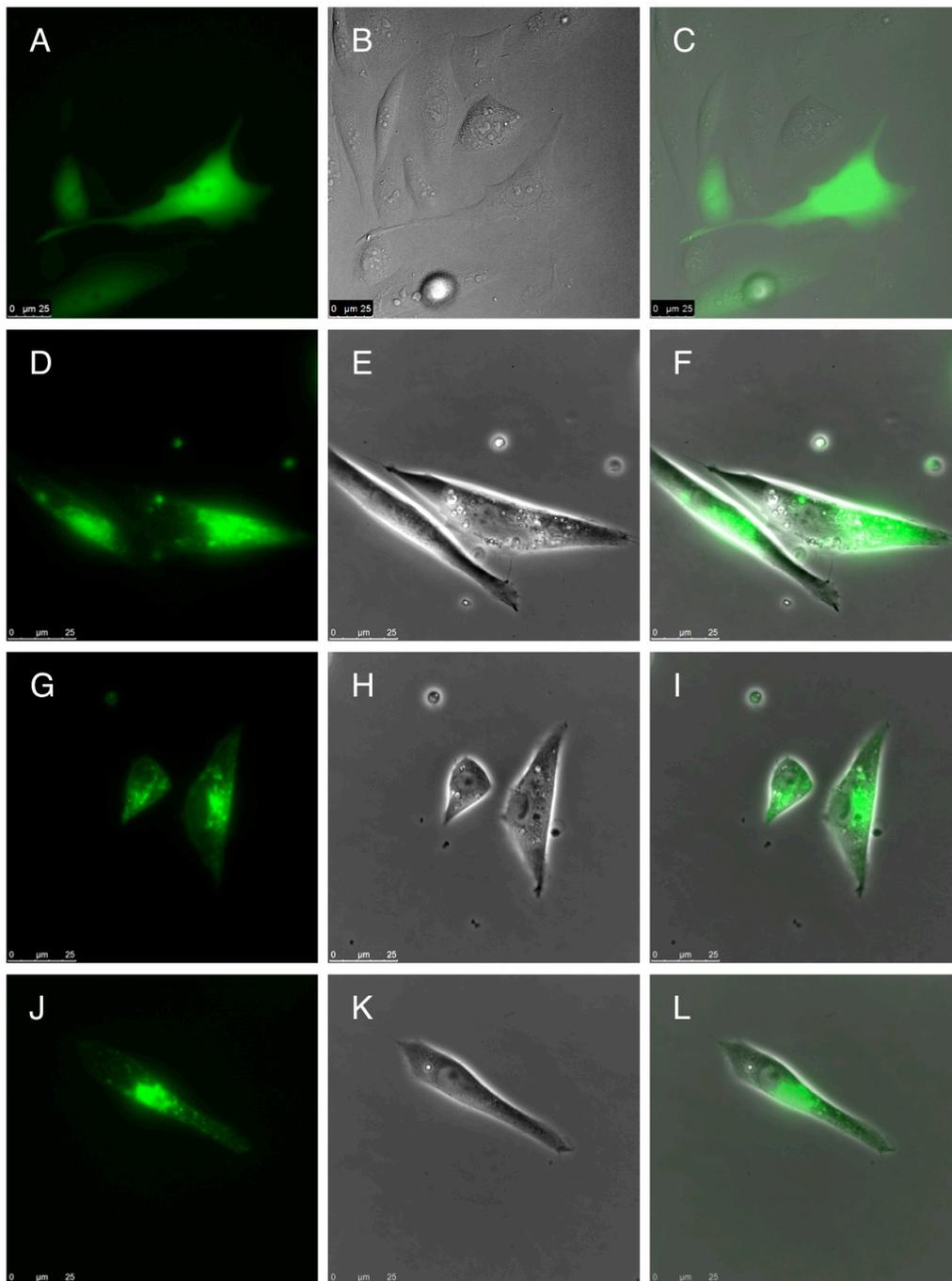


Figura 43. Microscopía de fluorescencia de células adheridas a fibronectina inmobilizada que expresan $PODXL_{GFP}$ y las mutantes de delección del dominio citosólico.

Las células fueron sembradas sobre placas recubiertas de fibronectina. Después de adherirse y extenderse fueron fijadas con paraformaldehído y analizadas por microscopía de fluorescencia. A, B y C, Control CHO_{GFP} ; D, E y F, $CHO-PODXL_{GFP}$; G, H e I, $CHO-\Delta yuxtamembrana-PODXL_{GFP}$; J, K y L, $CHO-\Delta DTHL-PODXL_{GFP}$.

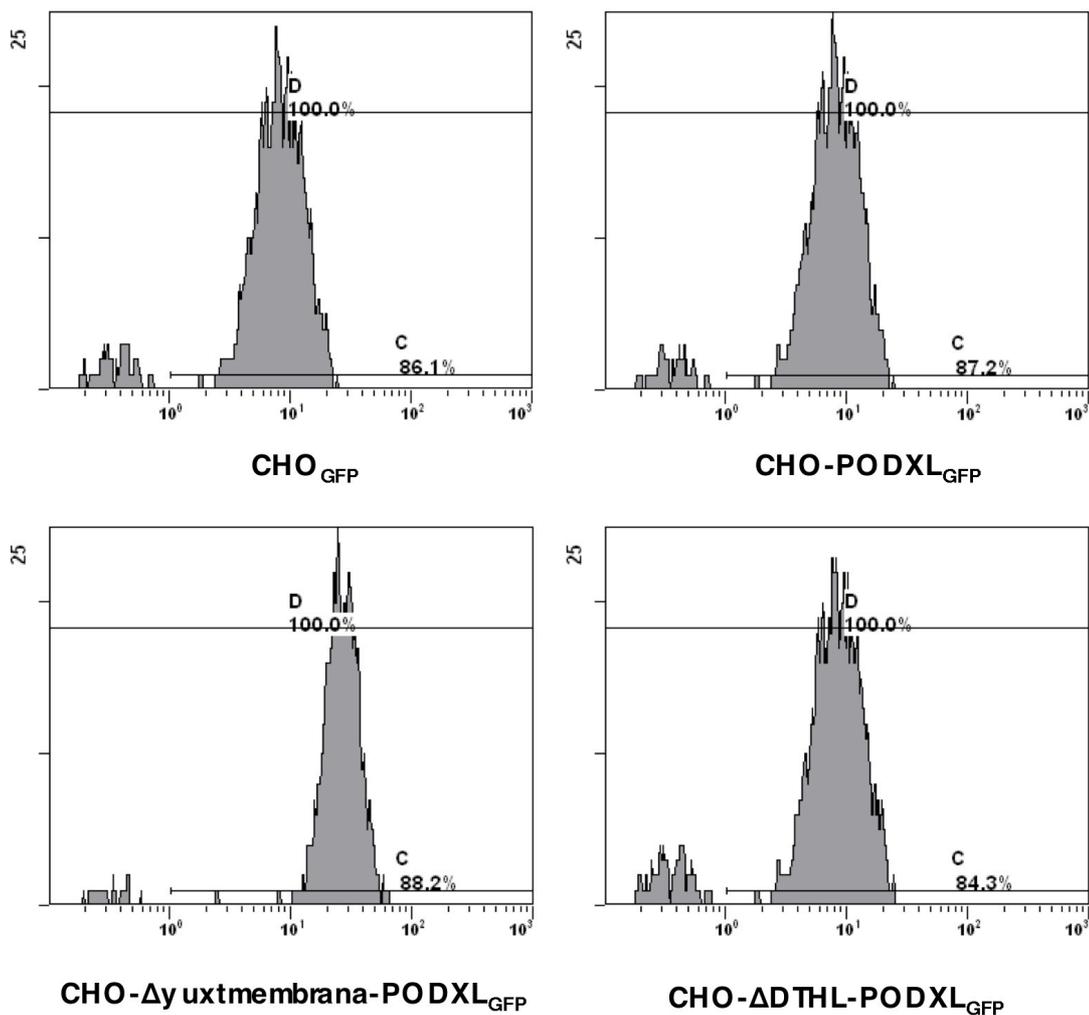


Figura 44. Análisis de citometría de flujo de CHO_{GFP}, CHO-PODXL_{GFP} y mutantes de delección CHO-Δyuxtmembrana-PODXL_{GFP}, y CHO-ΔDTHL-PODXL_{GFP}.

Las líneas celulares indicadas fueron analizadas por citometría de flujo, cómo se describe en Métodos.

4.13. Interacción de podocalicina con otras proteínas

Los resultados de los ensayos de adhesión y migración con mutantes del extremo carboxi-terminal de podocalicina indican que la delección del dominio DTHL tiene un efecto similar a la delección de todo el extremo carboxilo, lo que sugiere que la podocalicina interacciona con proteínas de señalización a través de este dominio. De acuerdo con datos obtenidos en otros tipos de células, las proteínas candidatas para estas interacciones serían las proteínas NHERF y Ezrina (Takeda 2003, Tan y

col. 2006). Para confirmar esta posibilidad, analizamos por Western la posible coimmunoprecipitación de estas proteínas con podocalicina.

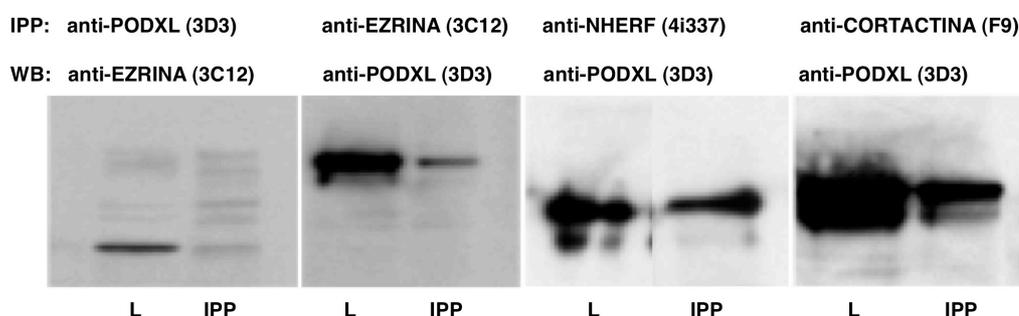


Figura 45. Análisis de Western de los inmunoprecipitados obtenidos con los anticuerpos: anti-PODXL, anti-ezrina, anti-NHERF y anti-cortactina.

El análisis de inmunoprecipitación fue realizado como se describe en Métodos, utilizando 500 µg de proteína del lisado celular y 1 µg de los anticuerpos indicados para inmunoprecipitar, posteriormente fueron analizados por Western con distintos anticuerpos.

La Figura 45, muestra los análisis de Western de las electroforesis SDS-PAGE de los inmunoprecipitados. Se pudo detectar Ezrina en los inmunoprecipitados obtenidos con anti-PODXL y podocalicina en los inmunoprecipitados obtenidos con anti-ezrina. También se pudo detectar podocalicina en inmunoprecipitados obtenidos con anti-NHERF de células CHO que expresan NHERF-1.

Es interesante señalar la posible existencia de una nueva vía de señalización. Se ha descrito recientemente que la "cortactina" interacciona con podocalicina mediando cambios morfológicos en los podocitos mediante fosforilación (Kobayashi y col. 2009). La cortactina es una proteína que se liga a actina regulando las redes de señalización que implican a la actina (Ren, Crampton y Yap, 2009). Esta proteína se localiza, característicamente, en los sitios de adhesión que forman protuberancias de la superficie celular. La Figura 45, también demuestra la presencia de podocalicina en los inmunoprecipitados obtenidos con anti-cortactina, indicando que en las células CHO-PODXL, se mantienen las mismas interacciones entre proteínas que en tejidos animales.

4.14. Liberación de podocalicina al medio extracelular de células CHO-PODXL_{GFP} y análisis microscópico *in vivo* de la segregación de podocalicina

La expresión de podocalicina como proteína de fusión con GFP nos ha permitido estudiar su tráfico intracelular mediante microscopía de fluorescencia *in vivo*, documentada en la sección 4.4. La Figura 46, muestra imágenes de las fotografías de microscopía *in vivo* en las que se aprecia la presencia de gránulos de podocalicina a lo largo de los filopodios.

La Figura 47, muestra imágenes de células en las que se aprecia la progresión de vesículas conteniendo PODXL_{GFP} a lo largo de los filopodios hasta su aparente liberación al medio extracelular.

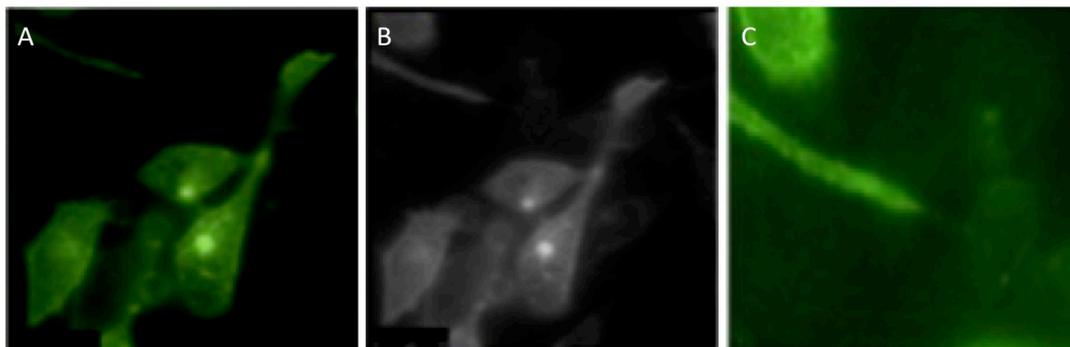


Figura 46. Morfología *in vivo* de células CHO-PODXL_{GFP}.

Células CHO-PODXL_{GFP}, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostatzado y con ambiente gaseoso de 95%O₂ y 5%CO₂, (100x). En el panel A, células a tiempos cortos de incubación en las que se aprecia un escaso contenido de podocalicina, de localización preferente en el aparato de Golgi. En el panel B, se muestra el mismo campo sin detección de fluorescencia. En el panel C, se aprecia la PODXL en forma granular progresando a lo largo de un filopodio.

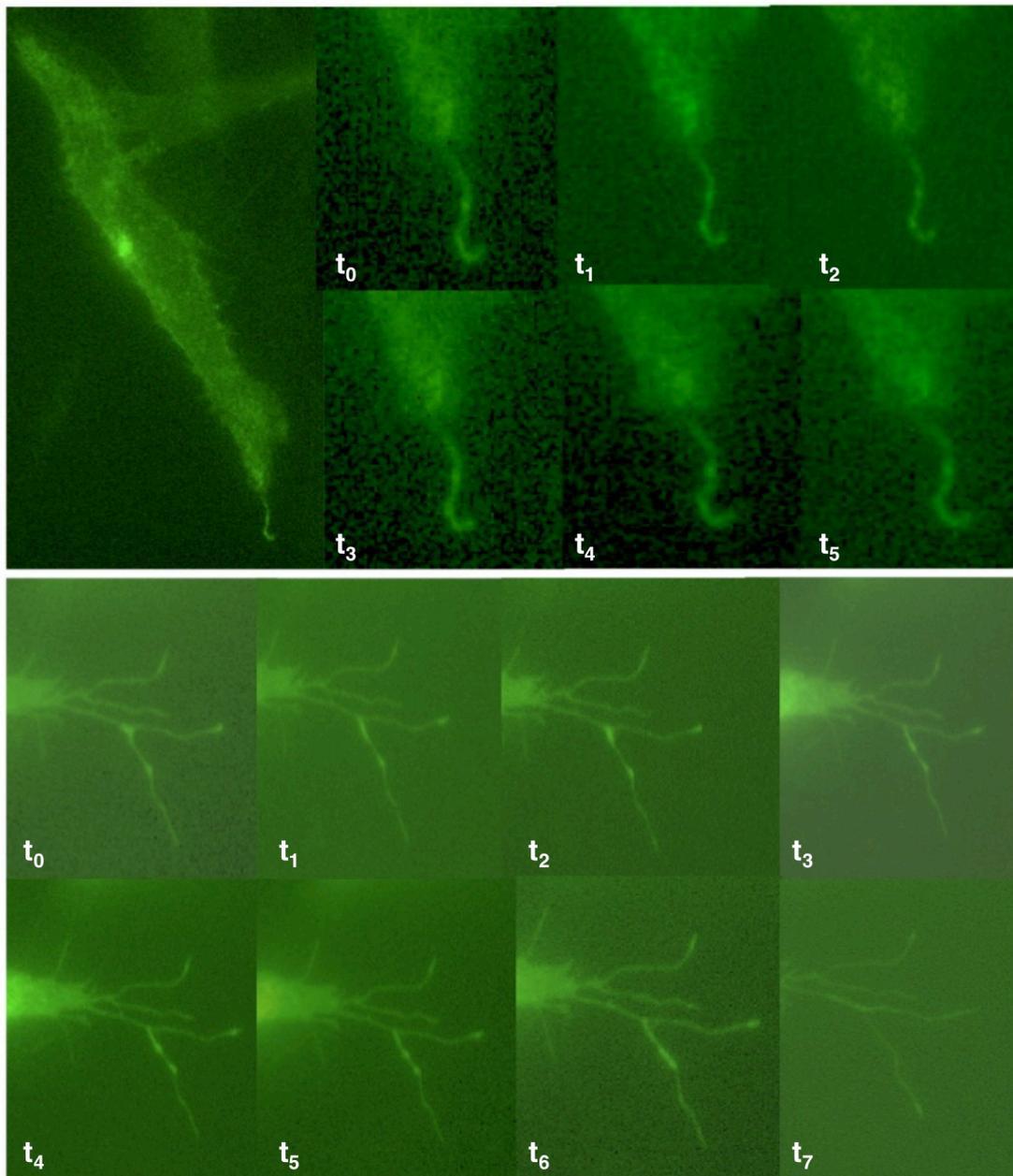


Figura 47. Progresión *in vivo* a lo largo de los filopodios de podocalicina fluorescente en células CHO- PODXL_{GFP}.

Células CHO-PODXL_{GFP}, fueron analizadas en un microscopio Leica, termostatzado y con ambiente gaseoso de 95%O₂ y 5%CO₂, (100x). En los paneles del recuadro superior izquierdo, se ve parte de la célula de la que partieron los filopodios, en los paneles de menor tamaño, se muestran imágenes cronológicas (t₀, t₁, t₂, t₃, t₄, t₅, t₆, t₇), en las que se aprecian las vesículas de podocalicina desplazándose a lo largo de un filopodio.

Las imágenes de la Figura 47, muestran la progresión de PODXL_{GFP} a lo largo de los filopodios. El análisis de algunas de estas imágenes sugiere la eliminación hacia el compartimento extracelular de vesículas

conteniendo $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$. Esta posibilidad la estudiamos mediante análisis de Western del medio de incubación utilizando anticuerpos anti-PODXL (B34D1.3) y anti-GFP. Con tal fin, utilizamos cultivos de TERA-1 y de dos líneas celulares que expresan podocalicina como proteína de fusión con GFP en el extremo carboxilo ($\text{PODXL}_{\text{GFP}}$) o en el extremo amino ($\text{GFP}_{\text{PODXL}}$). Ver esquema en la Figura 48.

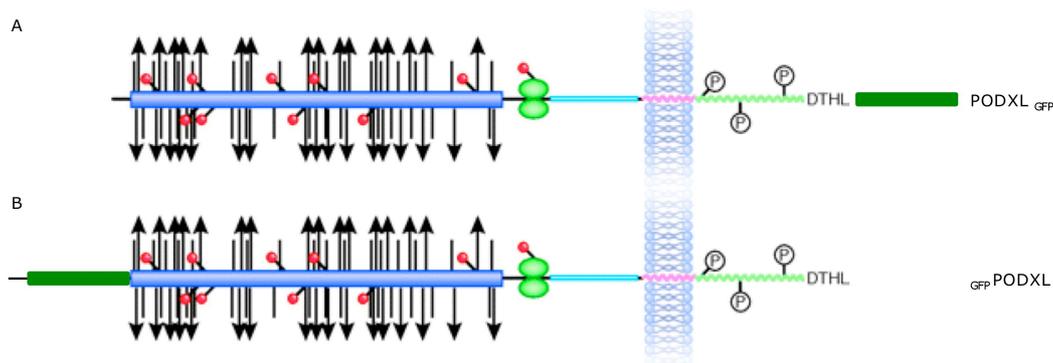


Figura 48. Esquema de las proteínas de fusión de contienen PODXL con GFP en el extremo carboxilo (A) o en el extremo amino (B).

Código de colores:

Péptido señal: Línea negra

Dominio extracelular mucina: azul

Dominio globular que contiene cisteína: verde

Región peduncular yuxtamembranar: celeste

Líneas verticales: O-glicosilaciones

Triángulos: sitios de sialización

Círculos rojos: N-glicosilaciones

Dominio transmembranar: rosado

Cola citoplasmática: verde claro

Dominio Carboxi-terminal de sitios de unión PDZ: DTHL y posibles sitios de fosforilación

Verde oscuro: proteína verde fluorescente

Para determinar la presencia de podocalicina en el medio extracelular, cultivamos las células durante 18 horas en ausencia de suero, retiramos el medio, filtramos y luego ultracentrifugamos, para posteriormente concentrar el medio a través de una columna de filtración. El análisis de Western de los lisados celulares y del medio de cultivo concentrado se realizó con el anticuerpo anti-PODXL, B34D1.3 (Figura 49).

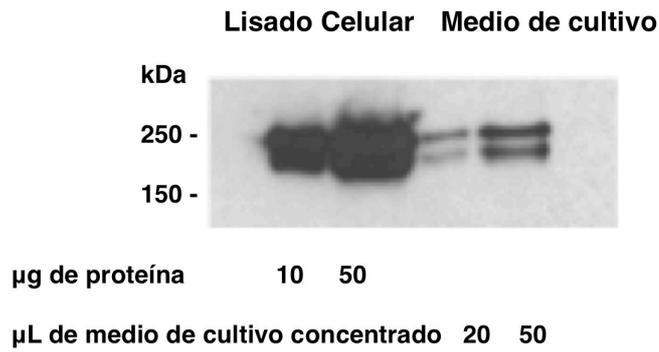


Figura 49. Presencia de PODXL en el medio extracelular.

Células CHO-PODXL_{GFP}, fueron lisadas y el medio de cultivo concentrado según se describe en Métodos. Las cantidades de proteína indicadas de lisados y medio extracelular se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y fueron analizadas por Western con anti-PODXL (B34D1.3).

Las Figuras 50 y 51 muestran la presencia de podocalicina en los espacios intra y extracelulares, con intensidades proporcionales a la cantidad de proteína analizada.

Ambas figuras, muestran el resultado de un análisis de Western utilizando como anticuerpo primario anti-PODXL (B34D1.3) y anti-GFP. Se confirma la presencia de podocalicina en los lisados de células que expresan podocalicina en forma de proteína de fusión con GFP en su extremo carboxilo (PODXL_{GFP}) como cuando la proteína de fusión contiene GFP en el extremo amino (_{GFP}PODXL).

Lisados Celulares

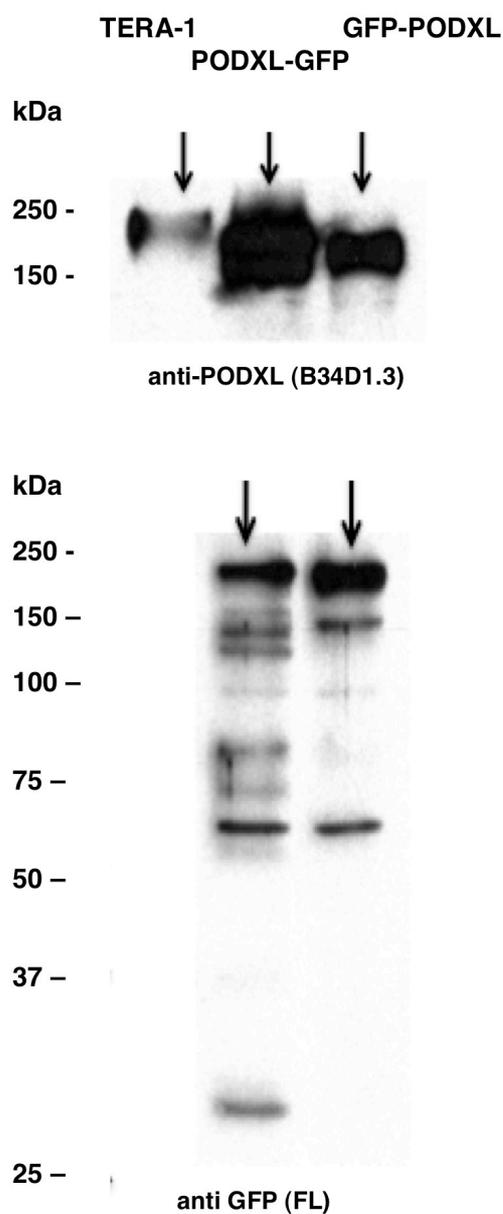


Figura 50. Detección por análisis de Western de PODXL y de GFP en lisados de células TERA-1, PODXL_{GFP} ó GFPPODXL.

Células CHO-PODXL_{GFP}, CHO-GFPPODXL y TERA-1, fueron lisadas y sometidas a análisis de electroforesis en SDS-PAGE y Western con anti-PODXL (B34D1.3) y anti-GFP (FL).

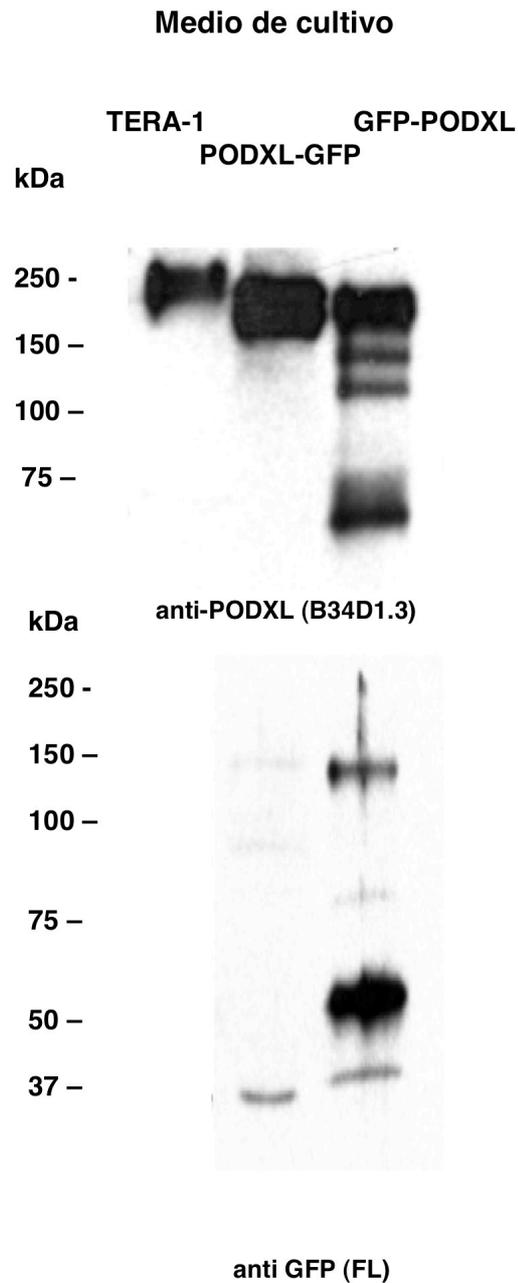


Figura 51. Detección por análisis de Western de PODXL y de GFP en el medio de cultivo de células TERA-1, $PODXL_{GFP}$ o GFP_{PODXL} .

Los medios de cultivos de células $CHO-PODXL_{GFP}$, $CHO-GFP_{PODXL}$ y TERA-1, fueron concentrados y sometidos a análisis de electroforesis en SDS-PAGE y Western con anti-PODXL (B34D1.3) y anti-GFP (FL).

En ambos casos, el peso molecular de la podocalicina detectada fue el mismo que el hallado en los lisados celulares. La podocalicina expresada por las células tumorales TERA-1 tiene un peso molecular mayor que la expresada en células CHO (Figura 50.A y 51.A). Cuando el anticuerpo utilizado es anti-GFP (Figura 50.B y 51.B) se puede observar que la línea celular PODXL_{GFP} (primer carril) expresa la proteína de fusión conteniendo GFP y otras proteínas de menor peso molecular que no se aprecian con anti-PODXL lo que sugirió que se podría tratar de productos de degradación o escisión del extremo carboxilo. Incluso se detecta una banda de 26 KDa de peso molecular que coincide con la de GFP (Tsien 1998). En lisados de células que expresan la proteína de fusión _{GFP}PODXL (Figuras 50.A y 51.A, segunda calle) esta banda de 26 kDa, de peso molecular no apareció mientras que si lo hizo una banda de aproximadamente 200 KDa, que coincide con la expresada en las células CHO-PODXL_{GFP}.

El análisis de Western de las proteínas que aparecen en el medio de cultivo utilizando anti-PODXL como anticuerpo primario (Figura 51), muestra la presencia de podocalicina, en el medio extracelular, de las tres líneas celulares estudiadas, con el mismo peso molecular que en los lisados celulares (Figura 50), detectándose bandas más ligeras sólo en el caso del medio extracelular de células CHO-_{GFP}PODXL. La observación de que en el medio de cultivo de las células CHO-PODXL_{GFP} no se detecta ninguna banda con el anticuerpo anti-GFP (Figura 50.B, primer carril) y sí se detecta una banda de, aproximadamente, 150 kDa de peso molecular en el medio de cultivo de las células CHO-_{GFP}PODXL (Figura 50.B, segundo carril) es compatible con que el proceso de secreción de podocalicina se realice por un mecanismo de escisión "*shedding*" que implica la escisión total o parcial del dominio extracelular que se liberaría al medio de cultivo mientras que el extremo carboxilo quedaría retenido en la célula.

La Figura 52, muestra que la podocalicina del medio de cultivo tanto de células CHO-PODXL_{GFP} como de células TERA-1 se encuentra en una fracción particulada, probablemente en micropartículas similares a

las descritas en los medios de cultivo de células tumorales (Dvorak y col. 1981, Thomas y col. 2009a).

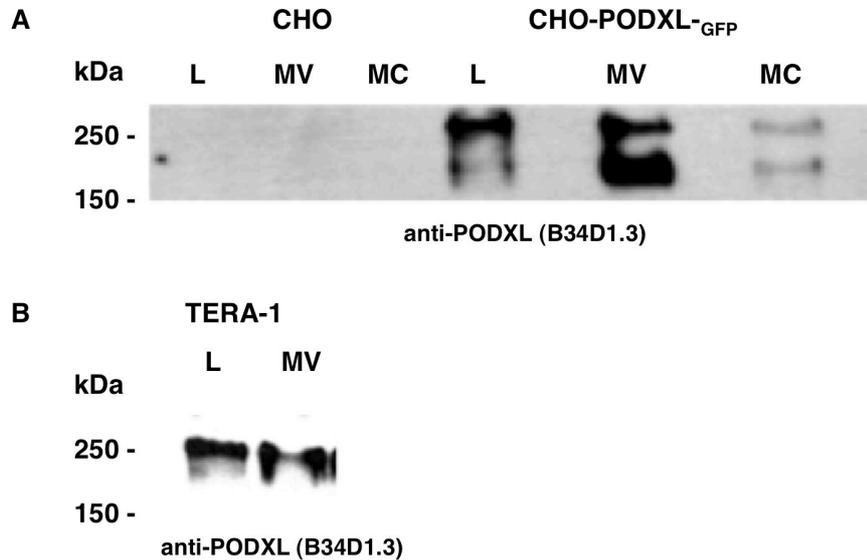


Figura 52. Detección de podocalicina en la fracción particulada del medio de cultivo de células TERA-1 y CHO-PODXL^{GFP}.

Las células fueron cultivadas en medio libre de suero durante 18 horas. La preparación de lisados de proteínas y la separación del medio de cultivo de las distintas líneas celulares se llevó a cabo como se describe en Métodos. Para el análisis de Western se utilizó el anticuerpo anti-PODXL B34D1.3.

La Figura 51, muestra que la fracción particulada contiene podocalicina de tamaño normal, detectable por los anticuerpos anti-PODXL B34D1.3 y por anti-GFP. También se confirma que el anticuerpo anti-GFP no fue capaz de detectar podocalicina en el medio de cultivo.

La Figura 51, muestra que la podocalicina del medio extracelular se encuentra principalmente en forma de microvesículas, cuando se identifica con anti-PODXL, B34D1.3. Cuando utilizamos anti-GFP, detectamos una banda cuya movilidad electroforética es similar a la de podocalicina de los lisados celulares y en microvesículas, lo que indica que la podocalicina asociada a microvesículas es una molécula de podocalicina completa, esto es, que contiene tanto el extremo amino (detectable con B34D3.1) como el dominio citosólico (conteniendo GFP). Por el contrario, la forma soluble de podocalicina no parece ser una molécula completa ya que no es detectada con anti-GFP.

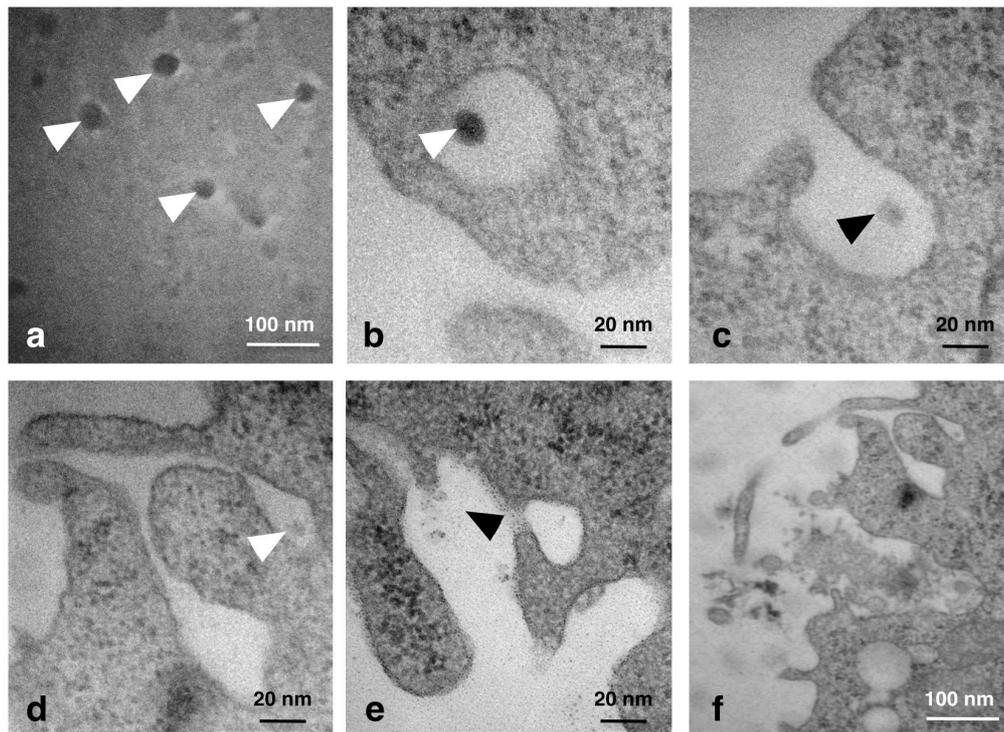


Figura 53. Microscopia electrónica de transmisión de la fracción de microvesículas (a) y células CHO-PODXL_{GFP} (b-f). Aumentos: (a y f) 100.000x; el resto 300.000x.

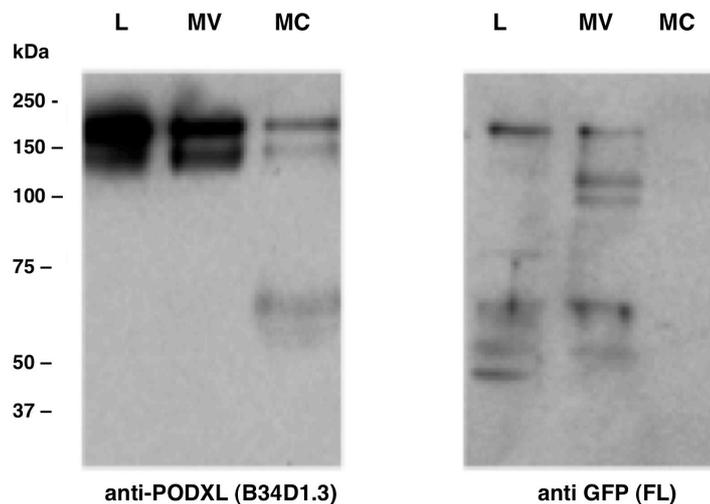


Figura 54. Detección de PODXL o GFP en lisados celulares, microvesículas (MV) y medio de cultivo (MC) de células CHO-PODXL_{GFP}.

Las células, se cultivaron en platos con medio de cultivo sin suero durante 2 horas. Se lisaron en tampón de lisis (L), el medio de cultivo se ultracentrifugó (MV) y concentró (MC), las fracciones obtenidas, se sometieron a electroforesis SDS PAGE y se analizaron por Western con anti-PODXL (B34D1.3) y con anti GFP (FL).

La Figura 55, muestra los sitios potenciales de reconocimiento de

metaloproteinasas (MMP) en la molécula de podocalicina, analizados de acuerdo con el estudio de los sitios de corte de estas proteinasas descrito por Turk y col. 2001.

MRCALALSALLLLSTPPLLSPSSPSPSPSPSQNATQTTTSSNKTAPTASSVTIMATDT
 AQQSTVPTSKANEILASVKATTLGVSSDSPGTTTTLAQQVSGPVNTTVARGGGSGNPTTIE
 SPKSTKSADTTTAVATSTATAKPNNTSSQNGAEDTTNSGGKSSHSVTTDLTSTKAEHLTPH
 PTSPLSPRQPTLTHPVATPTSSGHDHLMKISSSSSTVAIPGYTFTSPGMTTLLPSSVISQRT
 QQTSSQMPASSTAPSSQETVQPTSPATALRPTLPETMSSSPTAASTHRYPKTPSPTVA
 HESNWAKCEDLETQTQSEKQL**VLNLT**GNLTCAGGASDEKLISLICRAVKATFNPAQDKCGI
 RLASVPGSQTVVVKEITIHTKLPKDVYERLKDKWDELKEAGVSDMKLGDQGPPEEAEDR
*FSMPLIITIVCMASFLL**LLVAALY***GCCHQRLSQRKDQQLTEELQTVENGYHDNPTLEVME
 SSEMQE**KVVS**LNGELGDSWIVPLDNLTKDDLDEEEDTHL

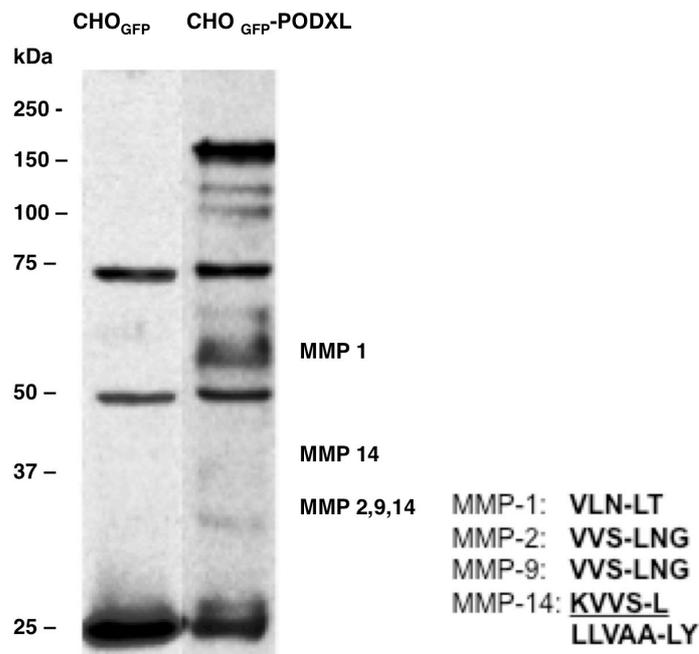


Figura 55. Sitios potenciales de corte de PODXL por metaloproteinasas.

El panel superior, muestra la secuencia de aminoácidos de PODXL. Los aminoácidos en negrita son los sitios de corte identificados y listados en el inserto. Los aminoácidos en letra cursiva muestran el dominio intramembrana.

El panel inferior, muestra el análisis de Western de lisados de células CHO_{GFP} y CHO-PODXL_{GFP} realizado con anti-GFP (FL). Las MMPs identificadas se alinean con el péptido cuya movilidad electroforética se aproxima más a los sitios de corte, teniendo en cuenta el peso molecular de GFP.

Tres de los péptidos detectados en lisados de CHO-PODXL_{GFP}

utilizando anti-GFP, tienen los pesos moleculares esperados de la proteína de fusión $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ escindida por la actividad de las MMPs 1,2,9 y 14.

El Western blot de la Figura 56, muestra el análisis de la podocalicina soluble inmunoprecipitada del medio de cultivo. La incubación de las células, durante 2 horas, con ésteres de forbol (PMA) es suficiente para que haya podocalicina soluble y detectable en el medio de cultivo. Este efecto del PMA es impedido por el inhibidor de la proteína quinasa C (PKC), estaurosporina, así como por la presencia de un inhibidor general de MMPs dependientes de Zn, Ro31-9790 y por el inhibidor de la MMP-14, confirmando la participación de las metaloproteinasas matriciales en el procesamiento de podocalicina y su salida al medio extracelular en forma soluble.

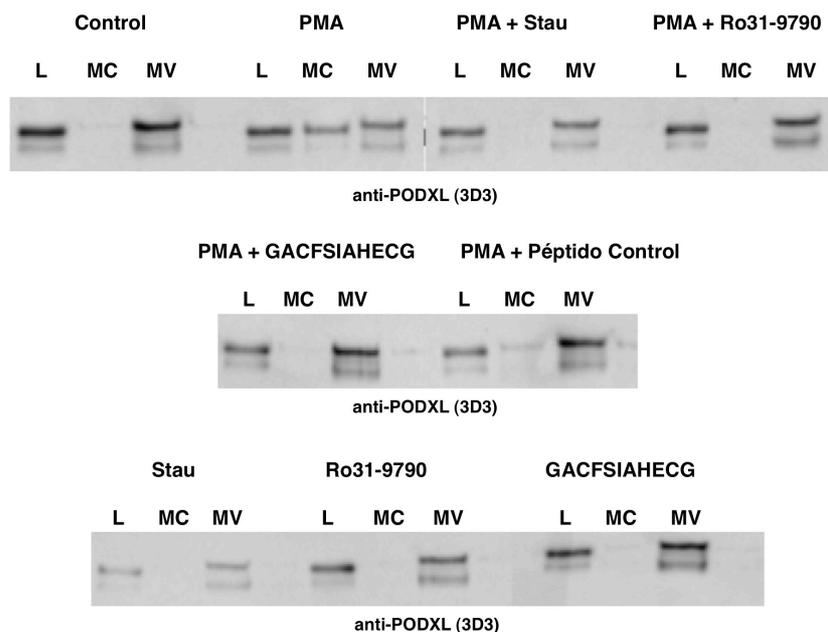


Figura 56. Efecto de ésteres de forbol (PMA), inhibidores de PKC (estaurosporina) o de metaloproteinasas matriciales sobre el aumento inducido por PMA de PODXL soluble en el medio de cultivo de células $\text{CHO-PODXL}_{\text{GFP}}$.

Las células se incubaron durante 2 horas en medio libre de suero en presencia y en ausencia de 100 nM PMA, 100 nM estaurosporina, 100 nM de "GACFSIAHECG" su péptido control, 10 nM Ro31-9790, o las combinaciones de todos ellos que se indican. Al final de la incubación, se analizó los lisados celulares (L), el medio de cultivo, se separó en dos fracciones: fracción particulada (microvesículas) (MV) y el sobrenadante libre de partículas (MC) que fue inmunoprecipitado con anti-PODXL, todos se sometieron a SDS-PAGE y se detectó por Western-blot con anti-PODXL (B34D1.3).

DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1. Correlación morfología-función en células CHO transfectadas con podocalicina o sus mutantes de delección

La transfección de los distintos tipos de cDNAs de podocalicina ligada a la proteína fluorescente verde (GFP) en células CHO produjo variaciones morfológicas celulares así como cambios, fácilmente, detectables en la distribución intracelular de la fluorescencia de $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$. A las distintas formas de podocalicina les incorporamos la secuencia líder, por lo que cabría esperar su inserción en la membrana plasmática. Efectivamente, el análisis por citometría de flujo nos ha permitido comprobar la presencia superficial de fluorescencia en todas las mutaciones analizadas.

Los estudios morfológicos nos han permitido verificar que el tráfico intracelular de la $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ recombinante es el esperable al de cualquier otra glicoproteína de membrana. En estadios tempranos, después de la transfección, la fluorescencia de $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ tiene localización perinuclear, lo que hace suponer que la proteína sufre un proceso postranscripcional de glicosilación. En estadios posteriores, la fluorescencia de $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ aparece localizada en la membrana plasmática y en el citosol en forma de pequeñas microvesículas. Estas microvesículas se localizan de forma preferente en los polos celulares de migración, en zonas de contacto celular y en las regiones distales de los filopodios. Dichas vesículas fluorescentes aparecen vinculadas a estructuras fibrilares de actina lo que hace pensar que ésta sea la forma de desplazamiento intracelular.

Es de señalar el incremento de microfilopodios en células CHO- $\text{PODXL}_{\text{GFP}}$ sobre la células CHO_{GFP} y el aumento, aparentemente desmesurado, en el caso de las células que expresan $\Delta 45\text{-PODXL}_{\text{GFP}}$. Dado que este tipo de células (CHO- $\Delta 45\text{-PODXL}_{\text{GFP}}$) mostraron un notable incremento en su capacidad de adhesión y migración, resulta atractivo pensar que los cambios morfológicos pudieran estar, de alguna forma, relacionados con el aumento de actividad funcional.

5.2. Relación estructura-función de la molécula de podocalicina

La utilización de líneas celulares con expresión de la proteína de fusión de podocalicina, o sus mutantes, con la proteína verde fluorescente (GFP) nos ha permitido demostrar que sólo la expresión en superficie de la molécula integra de podocalicina es capaz de incrementar la capacidad celular de adhesión y de migración.

Es interesante señalar que la expresión de la forma mutada CHO- Δ 45-PODXL_{GFP}, que elimina los 22 primeros aminoácidos (23 al 45) del extremo amino-terminal, esto es, comenzando a continuación del péptido señal (Figura 15), mostró capacidades tanto de adhesión y de migración superiores a las de las células que expresaban la molécula de podocalicina intacta, CHO-PODXL_{GFP}. Caben, al menos, tres posibles interpretaciones de esta observación:

- Que la N-glicosilación del extremo amino-terminal de la podocalicina dificulte la capacidad de adhesión de células CHO-PODXL_{GFP}.
- Que un dominio comprendido en este segmento de la molécula dificulte la capacidad de adhesión y migración de las células CHO-PODXL_{GFP}.
- Que la estructura secundaria de la molécula completa de podocalicina imponga restricciones que atenúen su capacidad de señalización para incrementar la adhesión o migración celulares.

La línea celular CHO- Δ 146-PODXL_{GFP} que también carece de los residuos 23 al 45, no mostró efecto potenciador de la capacidad de adhesión celular. Al contrario, las células CHO- Δ 146-PODXL_{GFP} mostraron capacidad de adhesión similar a la de las células CHO-PODXL_{GFP} (Figuras 24 y 25). Esta observación podría apoyar la tercera posibilidad, esto es, que la estructura secundaria de la mutante Δ 45-PODXL_{GFP} favoreciera el incremento de adhesión celular.

La delección de los aminoácidos 23-146 (mutante Δ 146-PODXL_{GFP}) impidió la acción estimulante de podocalicina sobre adhesión (Figura 25),

pero preservó el efecto sobre el incremento de la velocidad de migración celular (Figuras 26 y 27). Esta disociación del efecto de podocalicina sobre adhesión y migración sugiere la posibilidad de que ambos efectos dependan del control de distintos dominios de la molécula. Por otra parte, el comportamiento similar sobre migración de las células CHO- Δ 146-PODXL_{GFP} y las CHO- Δ C4-PODXL_{GFP}, sugiere que la presencia del dominio (24 aminoácidos) adyacente a la membrana plasmática es suficiente para que la podocalicina estimule la migración celular.

Nuestros resultados concuerdan con la reciente publicación de Hsu y col en la que describen que el "silenciamiento" de podocalicina en células de túbulo renales (Hsu y col. 2010) disminuye la migración celular. Estos mismos autores muestran que el "silenciamiento" de podocalicina, en células de riñón de perro, da lugar a un aumento de la capacidad de adhesión. Estas aparentes contradicciones sugieren que el comportamiento funcional de la podocalicina podría variar en función del linaje celular en el que se exprese.

El que modificaciones estructurales del ectodominio de podocalicina produzcan variaciones de actividad de esta proteína resulta interesante. La expresión de podocalicina es un marcador de diversos tumores humanos, entre los cuales están los originarios en próstata, mama, hígado, riñón, tiroides, estómago, pulmón, colon, cerebro, testículo y células sanguíneas. Además, su presencia en muchos de estos tumores se correlaciona con un fenotipo indiferenciado y agresivo, lo que ha dado lugar a que se postulara la existencia de un paralelismo entre contenido de podocalicina tumoral y su capacidad invasiva, metastásica. Por tanto, la localización de los ectodominios de podocalicina asociados al incremento de la capacidad adherente y migratoria desvelaría posibles claves para el diseño de herramientas farmacológicas que permitieran controlar la expansión de células cancerosas.

5.3. Participación de podocalicina en complejos multiproteicos de células CHO

El hecho de que la expresión de podocalicina en células CHO de

lugar a un aumento en la capacidad celular de adhesión y migración y que este aumento dependa de la integridad del ectodominio de podocalicina (Figuras 24,25,37 y 38 para adhesión y 26,27,39 y 40 para migración) implica que esta molécula es capaz de transmitir señales hacia el citoesqueleto de actina. La pregunta es: ¿cuál es el mecanismo de transmisión de esta información? Las células poseen mecanismos que permiten establecer las conexiones intermoleculares necesarias, siendo la formación de complejos multiproteicos el mecanismo más frecuente.

La detección de podocalicina mediante electroforesis "blue native" (BN) en complejos de alto peso molecular, en lisados de células CHO-PODXL_{GFP} (Figura 28), mostró su presencia en, al menos, tres complejos diferentes de, aproximadamente, 900, 800 y 300 KDa. La resolución de estos complejos mediante electroforesis SDS-PAGE nos permitió concluir que se trata de complejos multiproteicos. Esto es, no serían agregados de podocalicina. El análisis de Western (Figura 28), muestra que dos de los tres complejos (900 y 270 KDa) contienen las dos formas de podocalicina detectadas en lisados celulares. Los resultados muestran un cuarto agregado de peso molecular aproximado de 400 KDa, en el que se detecta podocalicina con mucha menos intensidad y que en este caso, solamente, correspondería a la forma de podocalicina de menor peso molecular. La existencia de complejos con una sola forma de podocalicina apoya la posibilidad de que ambas formas siguieran rutas de degradación diferentes. El análisis de lisados de células TERA-1 nos permitió detectar la presencia de podocalicina en dos complejos (800 y 300 kDa), pero solamente uno de ellos parece contener proteínas asociadas (Figura 33).

Los datos obtenidos con células CHO portadoras de mutantes de glicosilación (Figura 34), indican que la sialización tanto de podocalicina como de otras proteínas que puedan formar parte de los complejos en los que participa podocalicina, es capaz de alterar la composición de los mismos. Las variaciones en el peso molecular de los complejos en los que se detecta la presencia de podocalicina, así lo indican. Por el contrario, la deficiencia de glicosilación en las mutantes Lec1, no parece alterar la composición de los complejos en los que participa podocalicina. Estas

observaciones, además, confirman la existencia de una relación entre la presencia de podocalicina en estos complejos y las propiedades de estimulación de adhesión y migración celulares. La expresión de podocalicina en células Lec1, no alteró el peso molecular de los complejos a los que se asocia (Figura 34) y tampoco la capacidad de adhesión de las células CHO(Lec1)-PODXL_{GFP} a plaquetas (Larrucea y col., 2007 y 2008), mientras que la deficiencia en la sialización de las células Lec2 y Lec8 afecta la composición de los complejos (Figura 34) al tiempo que anula la capacidad de adhesión de las células a las plaquetas (Larrucea y col., 2007 y 2008); no obstante, no podemos descartar que la falta de sialización de otras proteínas presentes en los complejos, además de podocalicina, pudieran contribuir a esta respuesta.

5.4. Participación de la vía ubiquitina-proteasoma en el procesamiento y/o catabolismo de podocalicina

El análisis del complejo multiproteico de mayor peso molecular ha permitido disociarlo en la primera dimensión en tres complejos con distinta movilidad electroforética que contienen podocalicina (Figura 28); en una segunda dimensión, identificamos proteínas del proteasoma como posibles componentes del complejo multiproteico. Esta última observación, junto con los experimentos en los que utilizamos inhibidores del proteasoma (Figura 32), que muestran un aumento de podocalicina y de ubiquitina, sugieren la implicación del proteasoma en el mecanismo de degradación de podocalicina. Estos resultados indican que la podocalicina es capaz de ser ubiquitinada y ser sustrato del proteasoma, observación que puede ser extrapolada a otras células o tejidos que la expresan. La vía ubiquitina-proteasoma juega un papel muy importante en la regulación de muchos procesos celulares (Glickman y Ciechanover 2002) y parece estar implicada en procesos patológicos (Layfield y Mayer, 2008).

Una posibilidad interesante, al igual que ocurre con otras proteínas (Palombella y col. 1994, Maniatis 1999) incluyendo las de membrana (Hoppe y col. 2000), sería que el proteasoma no hidrolizara podocalicina hasta su destrucción total sino que diera lugar a formas truncadas con

funciones biológicas alternativas. La detección de una proteína truncada en el medio extracelular de células CHO-PODXL_{GFP} apoya esta posibilidad.

5.5. Asociación de podocalicina con proteínas intracelulares

Los resultados obtenidos con la electroforesis BN muestran la participación de podocalicina en complejos de peso molecular de ~300-400 kDa, tanto en células CHO-PODXL_{GFP} (Figura 28), como en células TERA-1 (Figura 33). Dado que la estimación estequiométrica de estos complejos indica la presencia de una sola molécula de podocalicina por complejo (Figura 28), es obvia la participación de otras proteínas celulares.

Actualmente se acepta que la podocalicina interacciona con la proteína adaptadora NHERF-2 (Factor regulador del intercambio Na⁺/H⁺-2) (Li y col. 2002, Takeda 2003, Takeda y col. 2001) en podocitos. Esta proteína, con funciones adaptadoras y de señalización, contiene dos dominios PDZ y un dominio ERM (ezrina, radixin, moesina) en su extremo carboxi-terminal (Voltz y col. 2001). NHERF-2 interacciona con una serie de proteínas de membrana a través de sus dominios PDZ, mientras que a través del dominio ERM, es capaz de vincularse al citoesqueleto mediante su interacción con los miembros de la familia ERM (Takeda y col. 2001). En podocitos renales se ha descrito la formación de un complejo PODXL-NHERF-2-ezrina que, presumiblemente, establecería la conexión de podocalicina con el citoesqueleto. Este esquema no puede ser extrapolado a nuestro modelo experimental porque asume que la carga negativa de podocalicina confiere a los podocitos propiedades antiadherentes que mantienen abiertas las rendijas de filtración de orina, mientras que, en nuestro modelo experimental, la expresión de podocalicina confiere a las células CHO propiedades de adhesión a ligandos específicos (Figura 24). Por otra parte, no hemos podido detectar NHERF-1 en inmunoprecipitados de podocalicina en lisados de células CHO-PODXL_{GFP} (resultados no mostrados). NHERF-1 es una proteína similar a NHERF-2, contiene también el dominio PDZ y su expresión es ubicua (Tan y col. 2006), mientras que NHERF-2 se expresa exclusivamente en podocitos (Furness y McNagny 2006). NHERF-1,

colocaliza con podocalicina en lisados de células de riñón canino (Meder y col. 2005, Schmieder y col. 2004, Takeda y col. 2001).

El hecho de que las células que expresan las mutantes de delección CHO- Δ yuxtmembrana-PODXL_{GFP} y CHO- Δ DTHL-PODXL_{GFP} se comporten igual (Figuras 37,37,39 y 40), tanto en los experimentos de adhesión como en los de migración sugiere que el dominio DTHL es importante para la señalización intracelular de podocalicina. De acuerdo con esta conclusión, los experimentos de inmunoprecipitación mostraron una posible interacción entre ezrina, NHERF y PODXL (Figura 45). Estas observaciones sugieren que la acción de podocalicina en las células CHO-PODXL_{GFP} sigue la misma vía de señalización a la descrita en células de riñón de perro (Takeda 2003, Tan y col.2006), aunque en ambos tipos celulares la podocalicina parezca tener efectos antagónicos.

5.6. Podocalicina extracelular

La separación de las fracciones soluble y particulada del medio extracelular de células CHO-PODXL_{GFP} y su análisis mediante Western blot, utilizando anti-PODXL o anti-GFP, permitió la detección de PODXL_{GFP} de tamaño equivalente al de la proteína completa, pero también detectamos un péptido que reacciona con anti-PODXL pero no con anti-GFP, lo que sugiere que puede ser un fragmento del ectodominio. El interés de este fragmento soluble es que se podría modular la acción de ligandos, actuando como agonistas o antagonistas en la formación de complejos de señalización (Rose-John y Heinrich 1994). En este mismo sentido, se ha descrito recientemente que el ectodominio recombinante soluble de podocalicina (PODXL Δ ₄₂₉) es capaz de actuar perturbando la función de podocalicina (Larrucea y col. 2008). Por tanto, parece razonable considerar a la podocalicina como otro ejemplo de proteína multifuncional de membrana. Se ha descrito un fragmento soluble de 2.3 kDa, que incluye parte de los dominios extracelular y transmembrana de podocalicina, en el medio extracelular de células de cáncer de colon (Ito y col. 2007). Se puede estimar que el contenido de podocalicina en microvesículas podría ser menos del $\leq 1\%$ de la podocalicina total mientras que el contenido extracelular de podocalicina soluble sería ≤ 0.3

%. Estas cifras parecen ser similares a los de otras proteínas de membrana sometidas a un proceso de escisión. La presencia de podocalicina en el medio extracelular está de acuerdo con observaciones previas que indican que un número significativo de proteínas reguladoras de membrana están sometidas a un proceso de escisión liberando un fragmento del ectodominio al medio extracelular (Arribas y Borroto 2002). Proteínas de membrana como CD40L (van Kooten y Banchereau 2000), P-selectina (Sperandio M 2005, Amit y col. 2001), receptor de la hormona de crecimiento (Amit y col. 2001), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Asakura y col. 2002) o proteínas de la familia del factor de necrosis de tumores (TNF) (van Mierlo y col. 2008), entre otros, son sintetizadas como formas transmembrana y, posteriormente, sometidos a un proceso de escisión del dominio de unión al receptor. Muchos de estos fragmentos de ectodominios actúan como agonistas o antagonistas de otros receptores de membrana.

En nuestro modelo experimental detectamos dos formas de podocalicina de distinto peso molecular. La identificación mediante espectrometría de masas de estas dos formas a partir de inmunoprecipitados, realizados con los mismos anticuerpos específicos (Tabla 1), demuestra que se trata de dos formas de una misma proteína. Es importante señalar que el análisis mediante espectrometría de masas sólo detectó la presencia de GFP en la forma de podocalicina de mayor peso molecular. Esta observación sugiere que, dado que la proteína expresada en células CHO es una proteína de fusión con GFP en el extremo carboxilo, la forma de menor peso molecular corresponda a una forma en la que la molécula de GFP, sola o con parte del extremo carboxílico de la podocalicina haya sido escindida. El hecho de que solamente la forma de mayor peso molecular sea detectable por transferencia de Western con anti-GFP o con un anticuerpo específico del dominio citosólico de podocalicina (Figura 11), apoya esta interpretación.

A diferencia de la podocalicina expresada en células CHO, las células TERA-1, originarias de un teratocarcinoma testicular humano, que expresan constitutivamente podocalicina, mostraron una sola forma de

podocalicina con un peso molecular superior al de la podocalicina recombinante expresada en células CHO (Figura 50). Lo más probable es que esta diferencia de peso molecular sea el resultado de diferencias en la modificación postraduccional que daría lugar a distintos grados de glicosilación de la proteína en ambos tipos celulares.

El dominio extracelular de, al menos, el 2% de las proteínas celulares ancladas en la membrana se desprende de la superficie celular mediante un proceso de escisión proteolítica (Arribas y Borroto, 2002). La proteólisis tiene lugar mediante enzimas que bien son secretados al espacio pericelular o están anclados en la membrana plasmática. Se desconoce en qué medida este proceso pudiera regular la adhesión celular o la transducción de señales. El fragmento soluble de podocalicina puede ser generado por la acción de metaloproteinasas, bien en la superficie celular o por metaloproteinasas microvesiculares (Distler y col, 2005). En base a los sitios de escisión de las metaloproteinasas matriciales (Turk y col. 2001) se pueden identificar tres sitios de corte potenciales en la secuencia de podocalicina (Figura 55), que podrían dar lugar a péptidos detectados en lisados celulares mediante análisis de Western utilizando anti-GFP como anticuerpo primario. Los resultados obtenidos mediante estimulación de PKC con ésteres de forbol o utilizando inhibidores específicos de PKC o de metaloproteinasas apoyan la posibilidad de que la escisión mediada por metaloproteinasas sea el principal mecanismo implicado en la generación del fragmento soluble de podocalicina.

La observación de que la vía ubiquitina-proteasoma está implicada en la degradación proteolítica de podocalicina también abre la posibilidad, como se ha discutido previamente, de que en este proceso se genere también un fragmento del ectodominio y que esta vía contribuya, también, a la aparición de un fragmento soluble de podocalicina en el medio extracelular.

La podocalicina hallada en el medio extracelular es similar a la de los lisados celulares, esto es, aparecen dos formas en el medio de cultivo de células CHO-PODXL_{GFP} y una forma de mayor peso molecular en el

medio de cultivo de células TERA-1. En ambos casos, la podocalicina extracelular se halló en microvesículas. La similitud entre ambos modelos experimentales, expresión heteróloga de podocalicina recombinante (CHO-PODXL_{GFP}) o expresión constitutiva de podocalicina nativa (TERA-1), valida la utilización de las células CHO-PODXL_{GFP} como modelo experimental. Además, la expresión heteróloga de PODXL_{GFP} nos ha permitido analizar *in vivo* el tráfico intracelular de podocalicina mediante microscopía de fluorescencia.

La presencia de podocalicina en el medio extracelular sugiere dos posibilidades:

- 1) Que la podocalicina tenga una función biológica que se perdería al sufrir la escisión total o parcial de su ectodominio, en cuyo caso se trataría de una regulación negativa.
- 2) Que la proteína extracelular tenga una función *per se*, autocrina o paracrina, en cuyo caso podría interpretarse que la secreción de la proteína constituye una regulación funcional positiva, adicional a la de la podocalicina de la membrana plasmática.

Nuestros resultados no permiten distinguir entre estas dos posibilidades. El hecho de que se observe, tanto en el medio de cultivo de células CHO-PODXL_{GFP}, como en el de las células tumorales humanas TERA-1, indica que no es consecuencia de la expresión de la proteína recombinante en un sistema heterólogo. La presencia de podocalicina en el medio de cultivo de células TERA-1, se ha descrito anteriormente (Ito et al, 2007). En líneas celulares derivadas de cáncer de colon, se ha detectado un péptido derivado de podocalicina que incluye parte del dominio extracelular y del dominio intramembrana (Ito et al, 2007), lo que indica que en condiciones patológicas existen mecanismos de escisión de dominios intramembrana de podocalicina, aún sin identificar.

En resumen, los datos morfológicos y bioquímicos apoyan la idea de que la podocalicina es secretada al medio extracelular, bien como molécula completa transportada por microvesículas o como un fragmento soluble del ectodominio. La presencia extracelular de estas dos formas de

podocalicina se debería tener en cuenta al valorar sus funciones fisiológicas.

5.7. Propiedades funcionales de la podocalicina

La expresión estable de PODXL_{GFP} en células CHO nos ha permitido demostrar, de forma inequívoca, que la presencia de esta proteína en la membrana plasmática estimula la capacidad adherente y migratoria celular. La presencia de podocalicina no sólo aumenta la adhesión a ligandos inmovilizados y la migración celular sino también el establecimiento de interacciones celulares (Larrucea y col. 2008). Por tanto, la expresión en superficie de podocalicina recombinante confiere propiedades que difieren notablemente de las anti-adherentes descritas en podocitos renales, interpretadas como consecuencia de la fuerte carga negativa de esta molécula (Furness y McNagny 2006).

La explicación de que la molécula de podocalicina confiera propiedades adherentes o antiadherentes podría residir en que niveles altos de expresión de podocalicina pudieran alterar la distribución intracelular de otras proteínas (Nielsen y McNagny 2008). En podocitos, la podocalicina tiene una localización apical donde interaccionaría con los complejos moleculares que conectan con el citoesqueleto de actina (Mundel y Shankland 2002). Es posible que la especificidad de la localización, dependiendo del nivel de expresión, diera lugar a la expansión de la zona apical (Meder y col. 2005, Nielsen y col. 2007, Yu y col. 2007) con acumulación de otras proteínas, principalmente integrinas, en otras áreas de la célula, causando el aumento de adhesión. Sin embargo, el hecho de que el efecto de podocalicina sobre adhesión sea impedido por el ectodominio de podocalicina (Larrucea y col. 2008) indica que se trata de un efecto de podocalicina *per se* y no mediado por la acumulación o redistribución de proteínas de adhesión en otras partes de la célula.

El análisis *in vivo* de las células CHO-PODXL_{GFP}, a las pocas horas de su siembra, mostró la presencia de PODXL_{GFP} en el Golgi, en la membrana plasmática y también en forma de gránulos y microvesículas

distribuidas por el citoplasma (Figura 13). La localización preferente de estas microvesículas parecen ser los puntos de contacto con otras células, las protuberancias celulares y los filopodios. En células extendidas la PODXL_{GFP} se localiza, preferentemente, en los frentes de crecimiento celular. Estas observaciones, al ser realizadas *in vivo*, excluyen la posibilidad de artefactos producidos por la fijación y el procesamiento de las preparaciones. Los filopodios actúan como sondas que buscan señales que les permitan decidir si formar adhesiones o hacia dónde se debe desplazar la célula. El control de la dirección del movimiento celular es muy importante para muchos procesos como el desarrollo, la progresión de tumores o la cicatrización de heridas, entre otros (Lauffenburger y Horwitz 1996) (Ridley y col. 2003). Las adhesiones celulares se forman mediante las integrinas y los movimientos de las fibras de actina son los responsables del agrupamiento y posicionamiento de integrinas activadas que establecerán las uniones a la matriz extracelular (Galbraith, Yamada y Galbraith, 2007). Los grupos de integrinas forman placas y adhesiones focales, conectando de esta forma el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular. La contracción de las fibras de estrés asociadas a las adhesiones focales pueden servir como punto de tracción celular (Mattila y Lappalainen 2008). Las células que expresan podocalicina tienen una mayor capacidad de adhesión y migración, lo que sugiere que debería existir una relación entre la localización de podocalicina, en los puntos de polimerización de actina, y el agrupamiento de integrinas. En apoyo de esta posibilidad está la observación previa de colocalización de podocalicina e integrinas β_1 (Larrucea y col. 2008), así como la asociación de podocalicina con el citoesqueleto de actina (Takeda 2003, Kobayashi y col. 2009), o la asociación entre la desorganización estructural de las células cuando se desacoplan podocalicina y el citoesqueleto (Takeda y col. 2001).

Nuestros resultados confirman y amplían experimentalmente la capacidad de la podocalicina para incrementar la adhesión celular. Además, hemos analizado las características bioquímicas y morfológicas de la asociación intermolecular de podocalicina con otras proteínas,

hemos estudiado mutaciones de delección para localizar los dominios que confieren dichas propiedades y las etapas de distribución y tránsito intracelular, exposición en superficie y, finalmente, secreción de podocalicina al medio extracelular.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

- 1.- La expresión de PODXL_{GFP} en células CHO incrementa la adhesión celular a ligandos inmovilizados, la migración y la capacidad de interacción celular.
- 2.- La utilización de técnicas de microscopia de fluorescencia *in vivo* mostraron que la podocalicina se localiza en el aparato de Golgi y en acúmulos intracelulares de forma microvesicular, "granular", preferentemente en el frente de migración celular.
- 3.- Detectamos dos formas de podocalicina de distinto peso molecular en lisados de células CHO transfectadas con PODXL_{GFP}, de las que sólo la de mayor peso molecular contiene GFP, lo que permite concluir que el extremo carboxilo de la podocalicina ha sufrido un procesamiento proteolítico.
- 4.- La delección de 146 aminoácidos del extremo amino-terminal de podocalicina (CHO-Δ146-PODXL_{GFP}) impidió el efecto estimulante sobre adhesión celular a fibronectina. Sin embargo, la delección de sólo 45 aminoácidos del extremo amino (CHO-Δ45-PODXL_{GFP}) aumentó significativamente la capacidad adherente celular. Por tanto, es razonable concluir que en el dominio comprendido entre los residuos 45 y 146 reside la capacidad de podocalicina de incrementar la adhesión celular a ligandos inmovilizados.
- 5.- Células CHO que expresan la mutante de delección Δ146 de podocalicina (CHO-Δ146-PODXL_{GFP}) así como la mutante que elimina aminoácidos, incluyendo las cuatro cisteínas (CHO-ΔC4-PODXL_{GFP}), mantienen la misma capacidad de estimular la migración celular que las células control PODXL_{GFP} completa, mientras que las células que expresan la mutante Δ45-PODXL_{GFP} mostraron mayor capacidad de estimular la migración celular que las que expresan la podocalicina completa.
- 6.- La disparidad en el comportamiento de adhesión y migración celular en respuesta a la modificación estructural del ectodominio de podocalicina, sugiere que ambas funciones dependen de distintas vías de señalización y limita a la región de 26 aminoácidos, comprendida entre la zona intramembrana y la rica

- en cisteínas, el dominio necesario para que la podocalicina ejerza efecto sobre migración.
- 7.- La PODXL_{GFP} expresada en células CHO se asocia a complejos multiproteicos de pesos moleculares ~880 y ~400 KDa. El complejo de mayor peso molecular contiene también proteínas del proteasoma. La inhibición de la actividad proteolítica del proteasoma da lugar a un acúmulo de podocalicina en los lisados celulares lo que confirma la implicación de la vía ubiquitina-proteasoma en el procesamiento y/o proteólisis de podocalicina.
 - 8.- El complejo proteico intracelular de podocalicina de menor peso molecular contiene una sola molécula de podocalicina, lo que implica la participación de otras proteínas celulares en la formación de dichos complejos.
 - 9.- La utilización de mutantes de delección del extremo carboxi-terminal de podocalicina a los que le falta el dominio DTHL ha puesto de manifiesto la funcionalidad en estas células de la vía de señalización ezrina/NHERF. La importancia de esta vía de señalización demuestra que los mutantes de delección del dominio DTHL ejercen el mismo efecto sobre adhesión y migración que la delección de todo el dominio citosólico de podocalicina.
 - 10.- Experimentos de coimmunoprecipitación, nos permitieron confirmar la interacción de podocalicina con ezrina y NHERF, que podrían formar parte de los complejos celulares de bajo peso molecular.
 - 11.- La podocalicina expresada en células CHO es secretada al medio extracelular donde aparece, mayoritariamente, en forma soluble. También es eliminada en forma insoluble en el interior de microvesículas.
 - 12.- La forma soluble de podocalicina detectada en el medio extracelular se origina por un mecanismo de escisión "shedding". Se postula que el procesamiento de podocalicina en el proteasoma podría también contribuir a la aparición de esta forma soluble.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- Amit, T., Z. Hochberg, M. Yogev-Falach, M. B. Youdim y R. J. Barkey (2001) Shedding of growth hormone-binding protein is inhibited by hydroxamic acid-based protease inhibitors: proposed mechanism of activation of growth hormone-binding protein secretase. *J Endocrinol*, 169, 397-407.
- Arribas, J. y A. Borroto (2002) Protein ectodomain shedding. *Chem Rev*, 102, 4627-38.
- Asakura, M., M. Kitakaze, S. Takashima, Y. Liao, F. Ishikura, T. Yoshinaka, H. Ohmoto, K. Node, K. Yoshino, H. Ishiguro, H. Asanuma, S. Sanada, Y. Matsumura, H. Takeda, S. Beppu, M. Tada, M. Hori y S. Higashiyama (2002) Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med*, 8, 35-40.
- Baumhater, S., M. S. Singer, W. Henzel, S. Hemmerich, M. Renz, S. D. Rosen y L. A. Lasky (1993) Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*, 262, 436-8.
- Bistrup, A., S. Bhakta, J. K. Lee, Y. Y. Belov, M. D. Gunn, F. R. Zuo, C. C. Huang, R. Kannagi, S. D. Rosen y S. Hemmerich (1999) Sulfotransferases of two specificities function in the reconstitution of high endothelial cell ligands for L-selectin. *J Cell Biol*, 145, 899-910.
- Brown, J., M. F. Greaves y H. V. Molgaard (1991) The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*, 3, 175-84.
- Butcher, E. C. y L. J. Picker (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272, 60-6.
- Casey, G., P. J. Neville, X. Liu, S. J. Plummer, M. S. Cicek, L. M. Krumroy, A. P. Curran, M. R. McGreevy, W. J. Catalona, E. A. Klein y J. S. Witte (2006) Podocalyxin variants and risk of prostate cancer and tumor aggressiveness. *Hum Mol Genet*, 15, 735-41.
- Caulfield, J. P., J. J. Reid y M. G. Farquhar (1976) Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. *Lab Invest*, 34, 43-59.
- Charest, P. M. y J. Roth (1985) Localization of sialic acid in kidney glomeruli: regionalization in the podocyte plasma membrane and loss in experimental nephrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 8508-12.
- Chen, X., J. Higgins, S. T. Cheung, R. Li, V. Mason, K. Montgomery, S. T. Fan, M. van de Rijn y S. So (2004) Novel endothelial cell markers in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol*, 17, 1198-210.
- Dekan, G., C. Gabel y M. G. Farquhar (1991) Sulfate contributes to the negative charge of podocalyxin, the major sialoglycoprotein of the glomerular filtration slits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5398-402.

- Doyonnas, R., D. B. Kershaw, C. Duhme, H. Merkens, S. Chelliah, T. Graf y K. M. McNagny (2001) Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J Exp Med*, 194, 13-27.
- Doyonnas, R., J. S. Nielsen, S. Chelliah, E. Drew, T. Hara, A. Miyajima y K. M. McNagny (2005) Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood*, 105, 4170-8.
- Drew, E., H. Merkens, S. Chelliah, R. Doyonnas y K. M. McNagny (2002) CD34 is a specific marker of mature murine mast cells. *Exp Hematol*, 30, 1211.
- Dvorak, H. F., S. C. Quay, N. S. Orenstein, A. M. Dvorak, P. Hahn, A. M. Bitzer y A. C. Carvalho (1981) Tumor shedding and coagulation. *Science*, 212, 923-4.
- Fackler, M. J., C. I. Civin y W. S. May (1992) Up-regulation of surface CD34 is associated with protein kinase C-mediated hyperphosphorylation of CD34. *J Biol Chem*, 267, 17540-6.
- Fackler, M. J., C. I. Civin, D. R. Sutherland, M. A. Baker y W. S. May (1990) Activated protein kinase C directly phosphorylates the CD34 antigen on hematopoietic cells. *J Biol Chem*, 265, 11056-61.
- Felschow, D. M., M. L. McVeigh, G. T. Hoehn, C. I. Civin y M. J. Fackler (2001) The adapter protein CrkL associates with CD34. *Blood*, 97, 3768-75.
- Fennie, C., J. Cheng, D. Dowbenko, P. Young y L. A. Lasky (1995) CD34⁺ endothelial cell lines derived from murine yolk sac induce the proliferation and differentiation of yolk sac CD34⁺ hematopoietic progenitors. *Blood*, 86, 4454-67.
- Fieger, C. B., C. M. Sasseti y S. D. Rosen (2003) Endoglycan, a member of the CD34 family, functions as an L-selectin ligand through modification with tyrosine sulfation and sialyl Lewis x. *J Biol Chem*, 278, 27390-8.
- Furness, S. G. y K. McNagny (2006) Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunol Res*, 34, 13-32.
- Galbraith, C. G., K. M. Yamada y J. A. Galbraith (2007) Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science*, 315, 992-5.
- Glickman, M. H. y A. Ciechanover (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82, 373-428.
- Goan, S. R., I. Junghahn, M. Wissler, M. Becker, J. Aumann, U. Just, G. Martiny-Baron, I. Fichtner y R. Henschler (2000) Donor stromal cells from human blood engraft in NOD/SCID mice. *Blood*, 96, 3971-8.
- Graf, T., K. McNagny, G. Brady y J. Frampton (1992) Chicken "erythroid" cells transformed by the Gag-Myb-Ets-encoding E26 leukemia virus are multipotent. *Cell*, 70, 201-13.
- Hara, T., Y. Nakano, M. Tanaka, K. Tamura, T. Sekiguchi, K. Minehata, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, M. Okabe, H. Kogo, Y. Mukoyama y A. Miyajima

- (1999) Identification of podocalyxin-like protein 1 as a novel cell surface marker for hemangioblasts in the murine aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity*, 11, 567-78.
- He, X. Y., V. P. Antao, D. Basila, J. C. Marx y B. R. Davis (1992) Isolation and molecular characterization of the human CD34 gene. *Blood*, 79, 2296-302.
- Healy, L., G. May, K. Gale, F. Grosveld, M. Greaves y T. Enver (1995) The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 12240-4.
- Hemmerich, S., E. C. Butcher y S. D. Rosen (1994) Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, and adhesion-blocking monoclonal antibody. *J Exp Med*, 180, 2219-26.
- Heukamp, L. C., H. P. Fischer, P. Schirmacher, X. Chen, K. Breuhahn, C. Nicolay, R. Buttner y I. Gutgemann (2006) Podocalyxin-like protein 1 expression in primary hepatic tumours and tumour-like lesions. *Histopathology*, 49, 242-7.
- Hoppe, T., K. Matuschewski, M. Rape, S. Schlenker, H. D. Ulrich y S. Jentsch (2000) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*, 102, 577-86.
- Horvat, R., A. Hovorka, G. Dekan, H. Poczewski y D. Kerjaschki (1986) Endothelial cell membranes contain podocalyxin--the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *J Cell Biol*, 102, 484-91.
- Hsu, Y. H., W. L. Lin, Y. T. Hou, Y. S. Pu, C. T. Shun, C. L. Chen, Y. Y. Wu, J. Y. Chen, T. H. Chen y T. S. Jou Podocalyxin EBP50 ezrin molecular complex enhances the metastatic potential of renal cell carcinoma through recruiting Rac1 guanine nucleotide exchange factor ARHGEF7. *Am J Pathol*, 176, 3050-61.
- Hu, M. C. y S. L. Chien (1998) The cytoplasmic domain of stem cell antigen CD34 is essential for cytoadhesion signaling but not sufficient for proliferation signaling. *Blood*, 91, 1152-62.
- Ito, T., N. Maki, O. Hazeki, K. Sasaki y M. Nekooki (2007) Extracellular and transmembrane region of a podocalyxin-like protein 1 fragment identified from colon cancer cell lines. *Cell Biol Int*, 31, 1518-24.
- Kelley, T. W., D. Huntsman, K. M. McNagny, C. D. Roskelley y E. D. Hsi (2005) Podocalyxin: a marker of blasts in acute leukemia. *Am J Clin Pathol*, 124, 134-42.
- Kerjaschki, D., D. J. Sharkey y M. G. Farquhar (1984) Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol*, 98, 1591-6.
- Kerjaschki, D., A. T. Vernillo y M. G. Farquhar (1985) Reduced sialylation of podocalyxin the major sialoprotein of the rat kidney glomerulus--in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol*, 118, 343-9.

- Kerosuo, L., E. Juvonen, R. Alitalo, M. Gylling, D. Kerjaschki y A. Miettinen (2004) Podocalyxin in human haematopoietic cells. *Br J Haematol*, 124, 809-18.
- Kershaw, D. B., S. G. Beck, B. L. Wharram, J. E. Wiggins, M. Goyal, P. E. Thomas y R. C. Wiggins (1997) Molecular cloning and characterization of human podocalyxin-like protein. Orthologous relationship to rabbit PCLP1 and rat podocalyxin. *J Biol Chem*, 272, 15708-14.
- Kessel, R. G., Kardon, R. H. (1979) Tissues and organs: a text-atlas of scanning electron microscopy. *W. H. Freeman and Company (San Francisco)* p. 233.
- Kobayashi, T., M. Notoya, T. Shinosaki y H. Kurihara (2009) Cortactin interacts with podocalyxin and mediates morphological change of podocytes through its phosphorylation. *Nephron Exp Nephrol*, 113, e89-96.
- Krause, D. S., T. Ito, M. J. Fackler, O. M. Smith, M. I. Collector, S. J. Sharkis y W. S. May (1994) Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, 84, 691-701.
- Larrucea, S., N. Butta, E. G. Arias-Salgado, S. Alonso-Martin, M. S. Ayuso y R. Parrilla (2008) Expression of podocalyxin enhances the adherence, migration, and intercellular communication of cells. *Exp Cell Res*, 314, 2004-15.
- Larrucea, S., N. Butta, R. B. Rodriguez, S. Alonso-Martin, E. G. Arias-Salgado, M. S. Ayuso y R. Parrilla (2007) Podocalyxin enhances the adherence of cells to platelets. *Cell Mol Life Sci*, 64, 2965-74.
- Lasky, L. A. (1992) Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*, 258, 964-9.
- Lauffenburger, D. A. y A. F. Horwitz (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-69.
- Layfield R, Mayer RJ. 2008. The ubiquitin proteasome system in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1782:681-682.
- Lee, D. H. y A. L. Goldberg (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, 8, 397-403.
- Lee, J. Y., Z. Qu-Petersen, B. Cao, S. Kimura, R. Jankowski, J. Cummins, A. Usas, C. Gates, P. Robbins, A. Wernig y J. Huard (2000) Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol*, 150, 1085-100.
- Li, J., Y. Li, P. D. Brophy y D. B. Kershaw (2001) Gene structure and alternative splicing of murine podocalyxin: a member of the CD34 sialomucin family. *DNA Seq*, 12, 407-12.
- Li, Y., J. Li, S. W. Straight y D. B. Kershaw (2002) PDZ domain-mediated interaction of rabbit podocalyxin and Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange regulatory factor-2. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282, F1129-39.

- Louvet-Vallee, S. (2000) ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell*, 92, 305-16.
- Majdic, O., J. Stockl, W. F. Pickl, J. Bohuslav, H. Strobl, C. Scheinecker, H. Stockinger y W. Knapp (1994) Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34. *Blood*, 83, 1226-34.
- Maniatis, T. (1999) A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev*, 13, 505-10.
- Mattila, P. K. y P. Lappalainen (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 446-54.
- McNagny, K. M., F. Lim, S. Grieser y T. Graf (1992) Cell surface proteins of chicken hematopoietic progenitors, thrombocytes and eosinophils detected by novel monoclonal antibodies. *Leukemia*, 6, 975-84.
- McNagny, K. M., I. Pettersson, F. Rossi, I. Flamme, A. Shevchenko, M. Mann y T. Graf (1997) Thrombomucin, a novel cell surface protein that defines thrombocytes and multipotent hematopoietic progenitors. *J Cell Biol*, 138, 1395-407.
- Meder, D., A. Shevchenko, K. Simons y J. Fullekrug (2005) Gp135/podocalyxin and NHERF-2 participate in the formation of a preapical domain during polarization of MDCK cells. *J Cell Biol*, 168, 303-13.
- Michael, A. F., E. Blau y R. L. Vernier (1970) Glomerular polyanion. Alteration in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest*, 23, 649-57.
- Miettinen, A., M. L. Solin, J. Reivinen, E. Juvonen, R. Vaisanen y H. Holthofer (1999) Podocalyxin in rat platelets and megakaryocytes. *Am J Pathol*, 154, 813-22.
- Mundel, P. y S. J. Shankland (2002) Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol*, 13, 3005-15.
- Murata, S., H. Yashiroda y K. Tanaka (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 104-15.
- Ney, J. T., H. Zhou, B. Sipos, R. Buttner, X. Chen, G. Kloppel y I. Gutgemann (2007) Podocalyxin-like protein 1 expression is useful to differentiate pancreatic ductal adenocarcinomas from adenocarcinomas of the biliary and gastrointestinal tracts. *Hum Pathol*, 38, 359-64.
- Nielsen, J. S., R. Doyonnas y K. M. McNagny (2002) Avian models to study the transcriptional control of hematopoietic lineage commitment and to identify lineage-specific genes. *Cells Tissues Organs*, 171, 44-63.
- Nielsen, J. S., M. L. Graves, S. Chelliah, A. W. Vogl, C. D. Roskelley y K. M. McNagny (2007) The CD34-related molecule podocalyxin is a potent inducer of microvillus formation. *PLoS ONE*, 2, e237.
- Nielsen, J. S. y K. M. McNagny (2008) Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci*, 121, 3683-92.

- Nielsen, J. S. y K. M. McNagny (2009) The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol*, 20, 1669-76.
- Ogawa, M., F. Tajima, T. Ito, T. Sato, J. H. Laver y T. Deguchi (2001) CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. Developmental changes and kinetic alterations. *Ann N Y Acad Sci*, 938, 139-45.
- Ohneda, O., C. Fennie, Z. Zheng, C. Donahue, H. La, R. Villacorta, B. Cairns y L. A. Lasky (1998) Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad-mesonephros region-derived endothelium. *Blood*, 92, 908-19.
- Paavonen, T. y R. Renkonen (1992) Selective expression of sialyl-Lewis x and Lewis a epitopes, putative ligands for L-selectin, on peripheral lymph-node high endothelial venules. *Am J Pathol*, 141, 1259-64.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg y T. Maniatis (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, 78, 773-85.
- Pan, S., R. Wang, X. Zhou, J. Corvera, M. Kloc, R. Sifers, G. E. Gallick, S. H. Lin y J. Kuang (2008) Extracellular Alix regulates integrin-mediated cell adhesions and extracellular matrix assembly. *EMBO J*, 27, 2077-90.
- Ren, G., M. S. Crampton y A. S. Yap (2009) Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66, 865-73.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons y A. R. Horwitz (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302, 1704-9.
- Rodriguez, R. B., N. Butta, S. Larrucea, S. Alonso y R. Parrilla (2006) Production and characterization of murine monoclonal antibodies against human podocalyxin. *Tissue Antigens*, 68, 407-17.
- Rose-John, S. y P. C. Heinrich (1994) Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J*, 300 (Pt 2), 281-90.
- Sarangapani, K. K., T. Yago, A. G. Klopocki, M. B. Lawrence, C. B. Fieger, S. D. Rosen, R. P. McEver y C. Zhu (2004) Low force decelerates L-selectin dissociation from P-selectin glycoprotein ligand-1 and endoglycan. *J Biol Chem*, 279, 2291-8.
- Sassetti, C., K. Tangemann, M. S. Singer, D. B. Kershaw y S. D. Rosen (1998) Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J Exp Med*, 187, 1965-75.
- Sassetti, C., A. Van Zante y S. D. Rosen (2000) Identification of endoglycan, a member of the CD34/podocalyxin family of sialomucins. *J Biol Chem*, 275, 9001-10.
- Schagger, H., W. A. Cramer y G. von Jagow (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis

- and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem*, 217, 220-30.
- Schagger, H. y G. von Jagow (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 199, 223-31.
- Schamel, W. W. (2008) Two-dimensional blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 6, Unit 6 10.
- Schmelz, K., N. Sattler, M. Wagner, M. Lubbert, B. Dorken y I. Tamm (2005) Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms. *Leukemia*, 19, 103-11.
- Schmieder, S., M. Nagai, R. A. Orlando, T. Takeda y M. G. Farquhar (2004) Podocalyxin activates RhoA and induces actin reorganization through NHERF1 and Ezrin in MDCK cells. *J Am Soc Nephrol*, 15, 2289-98.
- Schnabel, E., G. Dekan, A. Miettinen y M. G. Farquhar (1989) Biogenesis of podocalyxin--the major glomerular sialoglycoprotein--in the newborn rat kidney. *Eur J Cell Biol*, 48, 313-26.
- Schopperle, W. M., D. R. Armant y W. C. DeWolf (1992) Purification of a tumor-specific PNA-binding glycoprotein, gp200, from a human embryonal carcinoma cell line. *Arch Biochem Biophys*, 298, 538-43.
- Schopperle, W. M., D. B. Kershaw y W. C. DeWolf (2003) Human embryonal carcinoma tumor antigen, Gp200/GCTM-2, is podocalyxin. *Biochem Biophys Res Commun*, 300, 285-90.
- Seiler, M. W., H. G. Rennke, M. A. Venkatachalam y R. S. Cotran (1977) Pathogenesis of polycation-induced alterations ("fusion") of glomerular epithelium. *Lab Invest*, 36, 48-61.
- Seiler, M. W., M. A. Venkatachalam y R. S. Cotran (1975) Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science*, 189, 390-3.
- Simmons, P. J. y B. Torok-Storb (1991) CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood*, 78, 2848-53.
- Somasiri, A., J. S. Nielsen, N. Makretsov, M. L. McCoy, L. Prentice, C. B. Gilks, S. K. Chia, K. A. Gelmon, D. B. Kershaw, D. G. Huntsman, K. M. McNagny y C. D. Roskelley (2004) Overexpression of the anti-adhesin podocalyxin is an independent predictor of breast cancer progression. *Cancer Res*, 64, 5068-73.
- Sperandio M, K. L. K. (2005) The Physiology and Pathophysiology of P-selectin. *Asp. Immunobiol*, 15, 24-26.
- Stanhope-Baker, P., P. M. Kessler, W. Li, M. L. Agarwal y B. R. Williams (2004) The Wilms tumor suppressor-1 target gene podocalyxin is transcriptionally repressed by p53. *J Biol Chem*, 279, 33575-85.

- Sutherland, D. R., S. M. Watt, G. Dowden, K. Karhi, M. A. Baker, M. F. Greaves y J. E. Smart (1988) Structural and partial amino acid sequence analysis of the human hemopoietic progenitor cell antigen CD34. *Leukemia*, 2, 793-803.
- Swamy, M., S. Minguet, G. M. Siegers, B. Alarcon y W. W. Schamel (2007) A native antibody-based mobility-shift technique (NAMOS-assay) to determine the stoichiometry of multiprotein complexes. *J Immunol Methods*, 324, 74-83.
- Takeda, T. (2003) Podocyte cytoskeleton is connected to the integral membrane protein podocalyxin through Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor 2 and ezrin. *Clin Exp Nephrol*, 7, 260-9.
- Takeda, T., W. Y. Go, R. A. Orlando y M. G. Farquhar (2000) Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, 11, 3219-32.
- Takeda, T., T. McQuistan, R. A. Orlando y M. G. Farquhar (2001) Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest*, 108, 289-301.
- Tan, P. C., S. G. Furness, H. Merkens, S. Lin, M. L. McCoy, C. D. Roskelley, J. Kast y K. M. McNagny (2006) Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 is a hematopoietic ligand for a subset of the CD34 family of stem cell surface proteins. *Stem Cells*, 24, 1150-61.
- Tavian, M., L. Coulombel, D. Luton, H. S. Clemente, F. Dieterlen-Lievre y B. Peault (1996) Aorta-associated CD34⁺ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood*, 87, 67-72.
- Thomas, G. M., L. Panicot-Dubois, R. Lacroix, F. Dignat-George, D. Lombardo y C. Dubois (2009a) Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation. *J Exp Med*, 206, 1913-27.
- Thomas, S. N., R. L. Schnaar y K. Konstantopoulos (2009b) Podocalyxin-like protein is an E-/L-selectin ligand on colon carcinoma cells: comparative *in vivo* biochemical properties of selectin ligands in host and tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296, C505-13.
- Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67, 509-44.
- Turk, B. E., L. L. Huang, E. T. Piro y L. C. Cantley (2001) Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries. *Nat Biotechnol*, 19, 661-7.
- van Kooten, C. y J. Banchereau (2000) CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 67, 2-17.
- van Mierlo, G. J., H. U. Scherer, M. Hameetman, M. E. Morgan, R. Flierman, T. W. Huizinga y R. E. Toes (2008) Cutting edge: TNFR-shedding by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators. *J Immunol*, 180, 2747-51.

- Vitureira, N., K. McNagny, E. Soriano y F. Burgaya (2005) Pattern of expression of the podocalyxin gene in the mouse brain during development. *Gene Expr Patterns*, 5, 349-54.
- Voltz, J. W., E. J. Weinman y S. Shenolikar (2001) Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation. *Oncogene*, 20, 6309-14.
- Wood, H. B., G. May, L. Healy, T. Enver y G. M. Morriss-Kay (1997) CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood*, 90, 2300-11.
- Young, P. E., S. Baumhueter y L. A. Lasky (1995) The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood*, 85, 96-105.
- Yu, C. Y., J. Y. Chen, Y. Y. Lin, K. F. Shen, W. L. Lin, C. L. Chien, M. B. ter Beest y T. S. Jou (2007) A bipartite signal regulates the faithful delivery of apical domain marker podocalyxin/Gp135. *Mol Biol Cell*, 18, 1710-22.