

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

JAVIER ROBERTO JALDÍN FINCATI



Departamento de Bioquímica Clínica

Centro de investigaciones en bioquímica clínica e inmunología

CIBICI – CONICET

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina

Año 2014

**Aspectos moleculares y celulares de la interacción
de α_2 -Macroglobulina con su receptor específico
LRP1: implicancias en la migración celular**

DIRECTOR DE TESIS

Prof. Dr. Gustavo Alberto Chiabrando

COMISIÓN ASESORA

**Prof. Dr. José Luis Daniotti (miembro
propuesto por el Director)**

**Prof. Dra. Susana del Valle Genti-
Raimondi**

Prof. Dra. María Carolina Touz

EVALUADOR EXTERNO

Prof. Dr. Luis Enrique Politi

Este trabajo de tesis se financió a través de becas y subsidios provistos por las siguientes instituciones: CONICET, FONCYT, SeCyT-UNC, IUBMB y EFSD

Al amor de mi vida, Kitty

A mamá, Martha

A mi hermano, Ariel

A la memoria de papá

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar el agradecimiento a mi Director de tesis, guía y mentor, compañero y amigo, quién con su ejemplo me enseñó que a la vida hay que transcurrirla con optimismo, trabajando en pos del bien común, con humildad y sacrificio, dando sin esperar recibir. De él aprendí que ser científico y docente implican una enorme responsabilidad, la cual hay que asumir con conciencia ciudadana, bregando por contribuir activamente en la construcción de una sociedad más justa e igualitaria. Querido Flaco, deseo de corazón puedas cumplir todos tus sueños. Muchos éxitos en esta nueva etapa de tu vida profesional.

En segundo lugar, el agradecimiento a los miembros de la comisión de tesis, por sus enseñanzas y contribuciones desinteresadas. Todos y cada uno de ellos, desde su posición de prestigiosos investigadores, colaboraron para que este trabajo alcance su mejor versión, sumado esto a que se constituyeron como puntales de mi formación doctoral. También el agradecimiento al Dr. Luis Enrique Politi, quien a pesar del tiempo, la distancia y el sacrificio personal que significaba, aceptó revisar esta tesis y contribuir con su valiosa opinión y juicio crítico.

A Cecy Sánchez, por su amistad y su siempre desinteresada colaboración. Por esa “cualidad” de madre que amalgama al grupo y hace del laboratorio 8 un ambiente inmejorable para trabajar y compartir de los buenos momentos que da esta carrera. En lo estrictamente personal, gracias Cecy por haberle permitido a mi familia ser parte de la tuya. Aprovecho para agradecerles a Sole, Jose y Cande, quienes con su frescura y buena onda, siempre dieron lo mejor de sí para hacernos parte de sus vidas tal como nosotros pretendimos

hacerlas parte de las nuestras. Sigán radiantes como siempre, no pierdan su inocencia y ese don de buena gente que tan bien han asimilado.

A César, por su amistad, sus enseñanzas y por haberme recibido en el grupo con los brazos abiertos. Por sus consejos y los momentos compartidos. Por estar siempre. Gracias también a Lore y los chicos, Justi, Juancito y Jose. Les deseo lo mejor, se lo merecen.

A Danilo, por esa extraordinaria personalidad, por su amistad incondicional que trasciende tiempo y distancia. Por adentrarme en la biología celular y hacerme entender que ningún experimento es imposible, solo hay que tener imaginación y el coraje para llevarlo a cabo. Gracias a Carito por su amistad, y a la pequeña Nicoletta por haber llegado a este mundo. Ojalá la vida los llene de bendiciones y alegrías. No puedo dejar de agradecerle a la familia Ceschin, compañeros y amigos, excelentes anfitriones. Siempre con el corazón abierto de par en par.

A Pablo, por su amistad y por su laburo. Por los consejos y la charlas acerca de la vida. Por vivir muy buenos momentos y por los que seguramente nos quedan por compartir. A Vero, por su amistad, y a las pequeñas Vicky e Isabella, por existir. Gracias por tantos buenos momentos vividos y por los que vendrán. Les deseo lo mejor para ese proyecto de familia que pronto los tendrá de vuelta por acá.

A Darío, por estar siempre, por ser amigo. Tipo gaucho si los hay, gringo de campo, un poco ansioso pero lleno de energía. Labura como pocos, siempre al pié del cañón. Todos queremos a alguien como Darío en nuestro equipo y en nuestra vida. Estoy muy orgulloso de la calidad de científico en la que te has convertido. Y obviamente, no puedo dejar de agradecerle a Gise, por todos los momentos vividos, por ese sentimiento mutuo de cariño que une nuestras

familias. Chicos, les deseo lo mejor, se merecen ser muy felices. Tienen una hermosa familia, Juli y Nachito, son el mejor exponente de ello.

A Vachu, por su amistad y solidaridad. Por estar siempre, aún cuando no puede más del cansancio. Por su don de buena gente y por haberme permitido compartir tan buenos momentos. Gracias Vale, seguro la vida te tiene preparadas muchas alegrías. Éxitos en esta nueva etapa y nos vemos a la vuelta, o donde sea que el destino nos cruce.

A Ale, Maca y Gustavo (el pelado), por su compañerismo y dedicación. Por hacer que trabajo en el laboratorio sea cada día más ameno. Gracias chicos y éxitos en cada uno de sus emprendimientos.

A Vicky, por ser la heredera. Por haber aceptado que sobre sus espaldas recaiga el peso de continuar con el desarrollo de la biología celular en el laboratorio. No tengo dudas que su tesis será un éxito y que este proyecto no podría haber caído en mejores manos. Mucha suerte.

A Coty, Pauli y Belu, por su tolerancia y buena onda. Por ser excelentes personas y mejores compañeras. Éxitos en sus proyectos, sigan laburando como hasta ahora.

Al resto del laboratorio 8, Juan Carlos, Pato, Ricardo, Maxi y los que vendrán. Gracias por estar, sepan que esta camiseta hay que transpirarla.

A los vecinos de bromato, Turco, Romi, Verito, Vale y Gringa, gracias por estar cuando se los necesita. Un abrazo enorme de corazón.

A Leo Fruttero, Silvi, Jime y Javi Soria, que siempre están dispuestos a dar una mano. Gracias chicos por su amistad y buena onda. Por tantos momentos compartidos y por los que vendrán.

A Vero Mary, por todos los momentos vividos. Fuerza y muchos éxitos para lo que viene.

A Meli Cian, por su colaboración en la puesta a punto de los primeros ensayos de biología celular. Por su buena onda y predisposición. Gracias y un abrazo especial para Víctor.

A mis amigos Hernán e Iris, por todos los buenos momentos, por haber compartido tantos viajes, congresos, cursos, por estar ahí cuando hace falta. Gracias chicos.

Al resto del CIBICI y del Departamento de Bioquímica Clínica, al personal no docente, Adri, Lauri, Ale, Marta y Martín, que siempre colaboraron para que todo marche sobre rieles; a los profesores, los compañeros becarios y al personal técnico. Gracias Pili, Pauli, Cecy Sampedro y Carlos Más, por todo su conocimiento y colaboración.

A Claudio Fader, la Flaca y sus pequeños. Gracias por su amistad y por haberme abierto las puertas de su casa. Haberlos conocido es parte del legado más importante de este doctorado. Gracias chicos y éxitos en lo suyo.

A los compañeros de hospital, especialmente a Fer, Rodri, Lauri, Marina, Ruth, Belén y seguro que me olvido de alguien. No se ofendan, son parte de un hermoso momento de mi vida. Muchas gracias por ello.

Finalmente, en lo que a lo estrictamente académico se refiere, gracias a la gente de CEQUIMAP, lugar donde inicié mi carrera profesional y donde compartí excelentes momentos con grandes profesionales y mejores personas. Gracias Pelado Martín, Richard y Pablito Roqué. Mi recuerdo también a un tipazo que por esas vueltas de la vida nos dejó demasiado pronto, gracias gordo Germán, siempre estarás presente en mi memoria.

El turno de la familia... Muchas gracias a la dueña de mi corazón y a la mujer que amo con el alma. Gracias vida, por haberme elegido para que formemos nuestra familia. Estoy muy orgulloso de vos y cada día que pasa me siento el hombre más afortunado del mundo por tenerte a mi lado. Ahora vamos por nuestro próximo objetivo, tu tesis. Éste por suerte ya lo hemos alcanzado.

A mi vieja. Agradecerte mami por todo lo que me has dado me sería prácticamente imposible. Siempre incondicional, darías tu vida por nosotros tus hijos. Así fue siempre. De más está decir que esto no hubiese sido posible sin tu presencia, sin tu colaboración, sin tus enseñanzas, sin tu apoyo. Te debo todo, lo que soy y lo que seré. Espero con esta alegría recompensar en parte la enorme generosidad de tu corazón.

A mi hermano, mejor amigo y compañero. Gracias por estar siempre. Somos uno solo, como nos enseña mamá todos los días. Creo que este sentimiento se resume en no sentirnos completamente felices, si ambos no los somos. Siempre el uno pensando y viviendo por el otro. Gracias Pichón... Y gracias Naty, por hacerlo feliz y por ser parte de nuestras vidas. Por cuidarlo y protegerlo, por haber decidido embarcarse en este hermoso proyecto de formar una familia juntos. Ojalá sean siempre felices.

A mis suegros, Hebe y Chin. Gracias por aceptarme y dejarme ser parte de sus vidas. Gracias a mis cuñados Rafa y Pablo. Éxitos muchachos, en todos sus emprendimientos.

Gracias al resto de mis tíos y primos, los de siempre y los nuevos. Gracias a todos por haber contribuido con este logro. No veo las horas de poder festejar con ustedes con muchos asados y juntadas.

A la memoria de mi tío Dado y a mi tío Beto. Ellos me abrieron las puertas de su casa cuando llegué a Córdoba solo en el año 2000. Fueron mi sostén e

hicieron que la nostalgia por dejar el pago sea más llevadera. Gracias a ellos y sus familias.

A mis amigos, en especial Nacho e Iván. Gracias muchachos por darme la oportunidad de compartir con ustedes de tan maravillosos momentos. Son incondicionales, siempre están cuando los necesito. Sepan que yo siempre estaré para ustedes. Abrazo grande, el corazón agradecido’.

Finalmente, un agradecimiento enorme a Horacio, Lalito, Juani, Luciano, Juanchila, Favio y todos los demás compañeros de ruta. Gracias muchachos, ustedes también son parte de esto.

Gracias a todos los que de una u otra forma han formado parte de mi vida. Estoy convencido que los logros unipersonales no existen. Somos parte de una comunidad y no podemos abstraernos de ella.

“Más vale prender una vela, que maldecir a la oscuridad”

Javier R. Valdín Fincati

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS	i
RESUMEN	vi
SUMMARY	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La matriz extracelular.....	1
1.1.1 El origen de la multicelularidad.....	1
1.1.2 Composición y propiedades de la matriz extracelular.....	2
1.1.2.1 Proteínas estructurales de la matriz extracelular	3
1.1.2.2 Proteínas de adhesión de la matriz extracelular	3
1.1.2.3 Glicoproteínas de la matriz extracelular	3
1.1.2.4 Propiedades de la matriz extracelular	4
1.1.3 Dinámica de la matriz extracelular	5
1.1.3.1 Proteólisis de la matriz extracelular	6
1.1.3.2 Inhibidores de proteasas de la matriz extracelular: α -Macroglobulinas	11
1.2 α_2 -Macroglobulina: algo más que un mero inhibidor de proteasas	13
1.2.1 Estructura	13
1.2.2 Mecanismo de acción	15
1.2.3 Fisiología y fisiopatología	16
1.2.4 Las células de Müller como modelo experimental para el estudio de la interacción α_2 M*/LRP1	19
1.3 El receptor LRP1	20
1.3.1 La familia de genes del receptor de LDL.....	20
1.3.2 Aspectos generales de LRP1	22
1.3.3 Biosíntesis y organización estructural	24
1.3.4 LRP1 como receptor multiligando.....	25
1.3.5 LRP1 como receptor endocítico	28
1.3.6 Distribución subcelular de LRP1	31
1.4 Relación funcional de la interacción de α_2 M con LRP1	32
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo general	34
2.2 Objetivos específicos.....	34

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1 Materiales.....	35
3.1.1 Químicos	35
3.1.2 Material de laboratorio	36
3.1.3 Equipamiento	36
3.1.4 Kits y reactivos.....	37
Kits.....	37
Reactivos.....	37
3.1.5 Anticuerpos	38
3.1.6 Plásmidos	39
3.1.7 Medios, <i>buffers</i> y soluciones	40
3.1.8 Líneas celulares y cepas bacterianas.....	43
3.1.8.1 Células eucariotas.....	43
3.1.8.2 Bacterias	44
3.1.9 Software	44
3.2 Métodos.....	45
3.2.1 Métodos de biología celular.....	45
3.2.2 Métodos bioquímicos	48
3.2.3 Adquisición de imágenes de microscopía.....	53
3.2.4 Procedimientos para cuantificación de imágenes y análisis estadístico de los datos.....	53
4. RESULTADOS.....	54
4.1 Caracterización subcelular de la interacción α_2M /LRP1.....	54
4.1.1 Expresión de LRP1 en la línea de células gliales de Müller MIO-M1	54
4.1.2 Endocitosis de α_2M^* en células MIO-M1	55
4.1.2.1 Establecimiento de la ruta endocítica de α_2M^*	56
4.1.2.2 Participación de vesículas EEA1 y Rab7 positivas en la endocitosis de α_2M^*	59
4.1.2.3 Participación de los cuerpos multivesiculares en la endocitosis de α_2M^*	63
4.1.2.4 Degradación de α_2M^* en compartimentos del tipo lisosomas.....	65
4.1.2.5 Cinética de la degradación de α_2M^*	66
4.1.2.6 Conclusiones preliminares	68
4.1.3 Distribución subcelular de LRP1 en células MIO-M1	68
4.1.3.1 Distribución de LRP1 en regiones celulares ricas en clatrina o caveolina	69
4.1.3.2 Distribución de LRP1 en endosomas tempranos.....	72

4.1.3.3	Distribución de LRP1 en endosomas tardíos	76
4.1.3.4	Reciclado endocítico de LRP1	80
4.1.3.5	Conclusiones preliminares	86
4.1.4	Nivel de LRP1 en la membrana plasmática de células MIO-M1	87
4.1.4.1	Transporte intracelular de LRP1 desde compartimentos subcelulares a la membrana plasmática.....	88
4.1.4.2	Movilidad de LRP1 en ausencia y presencia de α_2M^*	92
4.1.4.3	Incremento del nivel de LRP1 en la membrana plasmática: aportes del reciclado endocítico lento y de la vía biosintética	94
4.1.4.4	Conclusiones preliminares	96
4.2	Migración celular inducida por la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$	97
4.2.1	Participación de LRP1 y MT1-MMP en la activación de proMMP-2 y en la migración celular inducida por α_2M^*	97
4.2.1.1	Participación de LRP1 en la migración celular inducida por α_2M^*	97
4.2.1.2	Participación de LRP1 y MT1-MMP en la activación de proMMP-2.....	99
4.2.1.3	Participación de MT1-MMP en la migración celular inducida por α_2M^*	102
4.2.2	Distribución subcelular de MT1-MMP.....	102
4.2.2.1	Localización subcelular del complejo MT1-MMP/LRP1	103
4.2.2.2	Efecto de α_2M^* sobre el reciclado endocítico de MT1-MMP	107
4.2.2.3	Distribución de MT1-MMP en endosomas tardíos	108
4.2.3	Relación funcional entre el transporte intracelular de MT1-MMP y la migración celular inducida por α_2M^*	110
4.2.3.1	MT1-MMP y el reciclado endocítico mediado por Rab11	111
4.2.3.2	Efecto del bloqueo del reciclado endocítico en la migración celular y la activación de proMMP-2 inducidas por α_2M^*	113
5.	DISCUSIÓN	115
5.1	Caracterización subcelular de la interacción $\alpha_2M/LRP1$	115
5.2	Migración celular inducida por la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$	120
5.3	La interacción $\alpha_2M^*/LRP1$ como reguladora de la función celular.....	125
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
7.	ADENDA.....	147
7.1	Presentaciones a congresos.....	147
7.1.2	Congresos nacionales	147
7.1.2	Congresos internacionales	149

7.2 Publicaciones.....	150
7.2.1 Publicación de resultados del presente trabajo de tesis	150
7.2.2 Otras publicaciones	150

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
Akt o PKB	<i>protein kinase B</i>
α -M	alfa-Macroglobulina
α_2 M	alfa 2-Macroglobulina
α_2 M*	forma activa de α_2 M
AMPC	adenosín monofosfato cíclico
AP2	<i>adaptor-related protein complex 2</i>
APBB1	<i>amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1</i>
apoE	apolipoproteína E
apoER2	<i>apolipoprotein E receptor 2</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
ARNm	ARN mensajero
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	componente del complemento
CAPON	<i>carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein</i>
Cbl	<i>casitas B-lineage lymphoma</i>
CM	célula de Müller
CRE	compartimento de reciclado endocítico

CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
D.O.	densidad óptica
Dab1	<i>disabled-1</i>
DIC	dominio intra-citoplasmático
EAP	exotoxina A de <i>Pseudomonas</i>
EE	<i>early endosome</i>
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EM	<i>electron microscopy</i>
FD	fluorescencia directa
FN	dominio fibronectina
GAG	Glicosaminoglicano
GDP	<i>guanosine diphosphate</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GLUP	<i>glucose/galactose transporter protein</i>
GLUT4	<i>glucose transporter type 4</i>
GPI	<i>glycosylphosphatidylinositol-anchored protein</i>
GST	<i>glutathione S-transferase</i>
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HF	hipercolesterolemia familiar
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSPG	<i>heparan sulfate proteoglycan</i>

ICAP-1	<i>integrin cytoplasmic domain-associated protein-1</i>
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IFM	intensidad de fluorescencia media
IGF	<i>insulin growth factor</i>
IL	interleuquina
ILV	<i>intraluminal vesicle</i>
IP	inmunoprecipitación
IRV	<i>insulin responsive vesicle</i>
JIP	<i>JNK-interacting protein</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LE	<i>late endosome</i>
LRP1	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MAPK/ERK	<i>mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases</i>
MC	microscopía confocal
MEC	matriz extracelular
MEGF7	<i>multiple epidermal growth factor-like domains 7</i>
MIO-M1	<i>Moorfields/Institute of Ophthalmology-Müller 1</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MP	membrana plasmática
MS	marcador subcelular
MT1-MMP	<i>membrane type 1 matrix metalloproteinase</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B</i>

	<i>cells</i>
NGF β	<i>nerve growth factor-β</i>
NMDAR	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
N-Rh-PE	<i>N-(Lissamine) rhodamine B sulfonyl dioleoyl phosphatidylethanolamine</i>
OMP25	<i>outer membrane protein 25</i>
PAI	<i>plaminogen activator inhibitor</i>
PDGF-BB	<i>platelet-derived growth factor-BB</i>
PDGFR β	<i>platelet-derived growth factor receptor β</i>
PI ₃ K	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PID1	<i>phosphotyrosine interaction domain containing 1</i>
PIP4,5	<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PKA	<i>protein kinase A</i>
PKC α - β II	<i>protein kinase C alpha-beta II</i>
proMMP	<i>pro-enzima de MMP</i>
PSA	<i>prostatic specific antigen</i>
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
PTB	<i>phosphotyrosine binding domain</i>
PZP	<i>pregnancy zone protein</i>
RAP	<i>receptor associated protein</i>
RBD	<i>region binding domain</i>
RDP	<i>retinopatía diabética proliferativa</i>
RFP	<i>red fluorescence protein</i>
ROP	<i>retinopatía del prematuro</i>

s.d.	sin datos
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SEMCAP-1	<i>M-SemF cytoplasmic domain-associated protein-1</i>
Shc	<i>src homology</i>
shRNA	<i>small harping RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
SNX17	<i>sorting nexin 17</i>
Src	<i>Sarc</i>
Tf	transferrina
TFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
TfR	receptor de transferrina
TGF β	<i>transforming growth factor-β</i>
TGN	<i>trans-Golgi network</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
uPA	<i>urokinase plasminogen activator</i>
uPAR	<i>urokinase receptor</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDLR	<i>very low density lipoprotein receptor</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>

RESUMEN

La α_2 -Macroglobulina (α_2 M) y su receptor específico LRP1 (del inglés *low density lipoprotein receptor-related protein 1*) tienen una activa participación en la remodelación de la matriz extracelular (MEC) así como también en la migración y la proliferación celular. La α_2 M, a través de su acción inhibitoria sobre un amplio espectro de proteasas, actúa como reguladora de la proteólisis extracelular. Si bien se conoce que el complejo α_2 M-proteasa (α_2 M*) se une a LRP1, es internalizado a través de un mecanismo de endocitosis mediado por clatrina y degradado en lisosomas, al presente no ha sido completamente esclarecido a qué nivel de su ruta de internalización se disocia de LRP1, así como tampoco qué tipo de reciclado endocítico sigue este receptor luego de la disociación. El estudio del transporte intracelular de α_2 M* y LRP1 es clave para el entendimiento de las diversas acciones celulares que cumple este sistema molecular, principalmente en lo que respecta a la activación de las vías de transducción de señales. Por otra parte, se conoce que la interacción α_2 M*/LRP1 regula la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMP) MMP-2 y MT1-MMP, las cuales participan activamente en los procesos migratorios y de formación de lamelipodios en células gliales de Müller retinales. No obstante, aún restan dilucidar cuáles son los mecanismos moleculares y celulares que regulan la actividad de estas MMP a nivel de la superficie celular.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo general del presente trabajo de tesis fue investigar aspectos moleculares y celulares de la interacción de α_2 M* con su receptor específico LRP1. Dentro de este marco general se pretendió dilucidar si α_2 M* cumple algún rol en la regulación del transporte intracelular de LRP1, así como también en la inducción de la migración celular. Para ello se abordaron los siguientes objetivos específicos: 1) investigar el transporte intracelular de α_2 M* y LRP1, caracterizando a) la ruta de internalización de α_2 M*, b) la distribución y localización subcelular de LRP1 en presencia de α_2 M*, y c) el reciclado endocítico y/o la exocitosis de LRP1 desde vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática; y 2) evaluar mecanismos moleculares y celulares por los que α_2 M* induce el incremento de la migración celular. De este modo, este trabajo de tesis presenta una nueva perspectiva en el estudio bioquímico y celular de la participación de α_2 M y LRP1 en el control de la proteólisis extracelular y la activación del

componente celular implicado en la remodelación de la MEC. Estos eventos tienen lugar durante la progresión de diversos procesos fisiológicos y patológicos, tales como la angiogénesis y la retinopatía isquémica proliferativa (entre otras, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía del prematuro y retinopatía asociada a anemia falciforme).

Como modelo experimental se utilizó la línea de células gliales de Müller aisladas de retinas humanas y espontáneamente inmortalizadas, MIO-M1, las cuales expresan de manera constitutiva el receptor LRP1. Mediante la realización de ensayos de microscopía confocal se caracterizó el transporte intracelular de α_2M^* y LRP1 en células MIO-M1. Se observó que α_2M^* siguió una ruta de internalización a través de endosomas de *sorting* y endosomas tardíos, la cual culminó con su degradación en lisosomas, a diferencia de lo observado para LRP1, el cual no se detectó en compartimentos de degradación. Además, luego del estímulo con α_2M^* , el nivel de LRP1 en la membrana plasmática incrementó significativamente, lo cual fue evidenciado mediante microscopía TIRF, citometría de flujo y ensayos de biotilación de proteínas de membrana plasmática seguidos de inmunoprecipitación. Cabe destacar que la expresión de una dominante negativa de la proteína motora intracelular con actividad GTPasa Rab11 (Rab11S25N-GFP), en células MIO-M1, no impidió el incremento de LRP1 en la superficie celular luego del estímulo con su ligando. Por otro lado, mediante el uso de ensayos de migración en la herida y zimografía, se demostró que α_2M^* indujo el incremento de la motilidad celular y la activación de proMMP-2 en células MIO-M1. Estos procesos fueron bloqueados cuando LRP1 y MT1-MMP se silenciaron con técnicas de siRNA y shRNA. Por otra parte, mediante el uso de microscopía confocal y procedimientos bioquímicos, se observó que α_2M^* indujo la acumulación de LRP1 y MT1-MMP en endosomas de *sorting*, seguido por el reciclado endocítico y la redistribución intracelular de MT1-MMP en las protuberancias celulares. Además, el uso de Rab11S25N-GFP inhibió el reciclado endocítico de MT1-MMP, la migración celular y la activación de proMMP-2 inducida por α_2M^* .

En conclusión, la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$ indujo la migración de células gliales de Müller por un mecanismo dependiente de Rab11, el cual involucra el transporte intracelular de MT1-MMP a la membrana plasmática.

SUMMARY

The α_2 -Macroglobulin (α_2 M) and its specific receptor, LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1) are involved in the extracellular matrix (ECM) remodeling as well as in cell migration and proliferation. The α_2 M is a broad-spectrum protease inhibitor that regulates the extracellular proteolysis. It is known that after binding to LRP1, the α_2 M-protease complex (α_2 M*) is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is degraded in lysosomes. However, it has not been clarified which is the endocytic compartment where α_2 M* and LRP1 are dissociated. Moreover, it has not been elucidated which kind of recycling pathway is followed by this receptor. The study of α_2 M* and LRP1 intracellular traffic is a key feature on the understanding of several cellular processes, specially the activation of signal transduction pathways. In addition, it is known that the α_2 M*/LRP1 interaction can regulate the matrix metalloproteinases (MMP) activity of MMP-2 and MT1-MMP, which are closely related to the cell migration and lamellipodia formation processes in retinal glial Müller cells. However, it has not been clarified which are the molecular and cellular mechanisms involved in this MMP activity at the cell surface.

Against this background, the overall aim of this thesis work was to investigate molecular and cellular aspects of the interaction between α_2 M* and LRP1 receptor. Within this general framework, it was intended to determine whether α_2 M* plays a role in regulating the intracellular transport of LRP1 as well as in the induction of cell migration. In this way, the following specific objectives were addressed: 1) to investigate the intracellular traffic of α_2 M* and LRP1, characterizing a) the internalization route of α_2 M*, b) the distribution and subcellular localization of LRP1 under α_2 M* stimulation, and c) the endocytic recycling and/or exocytosis of the LRP1 from intracellular vesicles to the plasma membrane; and 2) to assess molecular and cellular mechanisms by which α_2 M* induces cell migration. Thus, this thesis work presents a new biochemical and cellular perspective about the participation of α_2 M and LRP1 in the control of extracellular proteolysis and in the activation of cellular component involved in ECM remodeling. These events occur during the progression of several physiological and pathological processes, such as angiogenesis and ischemic proliferative retinopathy (e.g., proliferative diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity and sickle cell retinopathy).

The spontaneously immortalized human Müller cell line, MIO-M1, constitutively expressing the LRP1 receptor, was used as experimental model. Using confocal microscopy, the intracellular traffic of α_2M^* and LRP1 in MIO-M1 cells was characterized. It was observed that α_2M^* followed an internalization pathway through sorting and late endosomes, which concluded with its degradation in lysosomes. Conversely, LRP1 was not detected in compartments for degradation. Furthermore, the level of LRP1 at the cell surface was significantly increased after stimulation with α_2M^* , which was evidenced by TIRF microscopy, flow cytometry and biotinylation of plasma membrane proteins followed by immunoprecipitation assays. Notably, the expression of a Rab11-dominant negative mutant (Rab11S25N-GFP) in MIO-M1 cells could not prevent the increase of LRP1 at the cell surface after stimulation with its ligand. On the other hand, by using wound-scratch migration and zymography assays, it was demonstrated that α_2M^* induced cell migration and proMMP-2 activation in MIO-M1 cells. This induction was blocked when LRP1 and MT1-MMP were knocked down by siRNA and shRNA techniques. Using confocal microscopy and biochemical procedures it was found that α_2M^* induced LRP1 and MT1-MMP accumulation in sorting endosomes, followed by endocytic recycling and intracellular redistribution of MT1-MMP towards cellular protrusions. Moreover, Rab11S25N-GFP expression abrogated MT1-MMP recycling pathway, cell migration, and proMMP-2 activation induced by α_2M^* .

In conclusion, the $\alpha_2M^*/LRP1$ interaction induced Müller glial cell migration by a mechanism that involves MT1-MMP intracellular traffic to plasma membrane by a Rab11-dependent recycling pathway.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La matriz extracelular

1.1.1 El origen de la multicelularidad

La evolución de los organismos multicelulares a partir de una simple célula ancestral es uno de los eventos más significativos en la historia del desarrollo de la vida sobre la Tierra. Es lo que permitió la aparición de seres vivos de diversa complejidad y tamaño, los cuales adquirieron múltiples propiedades naturales para resistir a la depredación entre especies, colonizar nuevos ambientes, desarrollar tejidos especializados y capacidades biológicas de orden superior (Ozbek y col., 2010). Desde los simples sistemas bacterianos hasta las formas multicelulares más complejas presentes en animales, plantas, hongos y algas, es posible apreciar una marcada diversidad genética y fenotípica. Esto se debe a que la multicelularidad se desarrolló en repetidas ocasiones durante distintos momentos de la evolución de las especies y en ambos tipos celulares, procariota y eucariota (Rokas, 2008). Probablemente diversos factores medioambientales y genéticos son los que determinan la aparición de la mayoría de los linajes multicelulares (Lu y col., 2011; Ozbek y col., 2010; Rokas, 2008). Por su parte, el crecimiento y la diferenciación multicelular implican la participación de tres procesos celulares claves: la adhesión celular, la comunicación célula-célula y la regulación transcripcional (Rokas, 2008). Es importante destacar que estos procesos celulares no podrían llevarse a cabo sin la participación de estructuras moleculares complejas, que actúen como soporte y medio de integración de las diferentes agrupaciones multicelulares. Es el entorno extracelular el que permite que conjuntos de células inconexas se constituyan como tejidos, órganos, aparatos y sistemas. Todas estas asociaciones multicelulares solo son posibles mientras exista un medio extracelular que integre y regule las funciones celulares individuales en pos del mantenimiento de las funciones vitales de los seres vivos. En la naturaleza de los organismos multicelulares este medio está constituido por una amplia variedad de macromoléculas, las cuales conforman un complejo entramado definido como matriz extracelular (MEC).

Un gran número de enfermedades se caracterizan por presentar alteraciones en la composición y/o estructura de la MEC, las cuales van desde defectos en el desarrollo embrionario hasta severos procesos inflamatorios y el cáncer (Kim y col., 2011; Lu y col., 2011; Lu y col., 2012). Estas afecciones se caracterizan por una exacerbada alteración de la MEC como consecuencia del accionar de diversos componentes celulares y humorales. Entre los componentes celulares se pueden citar fibroblastos, monocitos-macrófagos y granulocitos-polimorfonucleares; mientras que entre los componentes humorales se encuentran interleuquinas (IL), factores de crecimiento y hormonas. Entre otros, podemos citar IL-1, IL-6, IL-8, el factor de necrosis tumoral alfa o TNF α (del inglés *tumor necrosis factor alpha*), los factores de crecimiento tipo insulina 1 y 2 o IGF-1 e IGF-2 (del inglés *insulin growth factor 1 and 2*), el factor de crecimiento básico de fibroblastos o bFGF (del inglés *basic fibroblast growth factor*) y algunas hormonas como catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) e insulina. Por su parte, otros factores de liberación local como las proteasas, y de liberación sistémica como los inhibidores de proteasas, participan activamente en la remodelación de la MEC. Durante los últimos 20 años múltiples investigaciones se han orientado al estudio de los mecanismos moleculares y celulares implicados en dicha remodelación. Es así, por ejemplo, que a partir del entendimiento de los fenómenos de modificación de la MEC se lograron dilucidar diversos factores involucrados en el desarrollo de patologías tumorales. Por este motivo se considera que el estudio de los procesos biológicos que involucran la modificación de la composición y arquitectura de la MEC, es clave para el entendimiento de las causas de una multiplicidad de patologías.

1.1.2 Composición y propiedades de la matriz extracelular

La MEC está constituida por proteínas secretadas por las propias células que constituyen la unidad tisular. Los componentes de la MEC se pueden dividir en tres grandes grupos: las proteínas estructurales, entre las que se encuentran colágeno y elastina; las proteínas de adhesión, como fibronectina y laminina; y un conjunto de glicoproteínas del tipo proteoglicanos, cuyos principales componentes son los glicosaminglicanos (GAG) (Lu y col., 2011; Ruoslahti y col., 1985).

1.1.2.1 Proteínas estructurales de la matriz extracelular

El colágeno es una familia de moléculas de al menos 29 tipos diferentes que se caracterizan por compartir una estructura común de fibrillas helicoidales formadas por tres subunidades proteicas. Son parte de la MEC colágeno tipo I, III, IV (principal componente de la membrana basal), V y el tipo XI, conteniendo GAG. Es función del colágeno ser soporte estructural y punto de anclaje para otras proteínas de la MEC. Por su parte, elastina se encuentra constituida por subunidades individuales entrecruzadas de tropoelastina y su función, la cual comparte con fibrillina, es la de brindar elasticidad a los tejidos (Kim y col., 2011).

1.1.2.2 Proteínas de adhesión de la matriz extracelular

Fibronectina es producida principalmente por fibroblastos como un dímero que puede unir colágenos y proteoglicanos de heparán sulfato o HSPG (del inglés *heparan sulfate proteoglycans*). Este componente de la MEC cumple roles en la adhesión, crecimiento, migración y proliferación celular, y participa en la cicatrización tisular y el desarrollo embrionario (Pankov y Yamada, 2002). Fibronectina posee tres dominios denominados FN I, FN II y FN III, presentes en cada molécula en múltiples copias. Los dos primeros le confieren la capacidad de unir colágeno, fibrina y otras moléculas de fibronectina, mientras que el FN III, el dominio funcional más importante, es el motivo de unión a integrinas y heparina. En lo que respecta a laminina, se encuentra principalmente en membranas basales y es el componente de la MEC que le confiere a los tejidos la tensión al estiramiento. Está constituida por tres subunidades entrecruzadas (α , β y γ), que le permiten interactuar con otras moléculas de laminina, proteoglicanos y otros componentes de la MEC (Kim y col., 2011).

1.1.2.3 Glicoproteínas de la matriz extracelular

Finalmente, los proteoglicanos, principalmente los de tipo HSPG, incluyen perlecano, agrina, colágeno tipo XI, sidecanos y glicanos. Estos GAG son secretados localmente y unen la mayoría de los componentes de la MEC a través de interacciones de tipo proteína-proteína y heparán sulfato-proteína (Kim y col., 2011).

1.1.2.4 Propiedades de la matriz extracelular

En forma conjunta, todas las macromoléculas constituyentes de la MEC se organizan en un complejo entramado fibrilar que se asemeja a una red y establecen una estrecha relación con las superficies celulares. Es por esto que cambios en su composición o arquitectura, influyen sobre la mayoría de los procesos biológicos que llevan a cabo las células, entre los que se pueden mencionar la proliferación, adhesión, migración, diferenciación y muerte celular (Lu y col., 2011; Lu y col., 2012). En la figura 1.1 puede apreciarse la comparación entre la arquitectura ultraestructural del Matrigel (A) y la del colágeno tipo I (B), utilizados comúnmente como modelos de membrana basal y MEC, respectivamente (Poincloux y col., 2009). Puede observarse que en el caso del Matrigel sus elementos constituyentes forman una entidad compacta con poros cuyos tamaños se encuentran en el orden de los nanómetros; mientras que en el caso del colágeno tipo I se puede apreciar una red de fibras más laxa con poros de hasta algunas micras de diámetro. Por lo tanto, a modo experimental, el uso de Matrigel o colágeno tipo I como soporte de cultivos celulares permite evaluar diferentes propiedades de las células a nivel de la membrana basal o de la MEC, respectivamente.

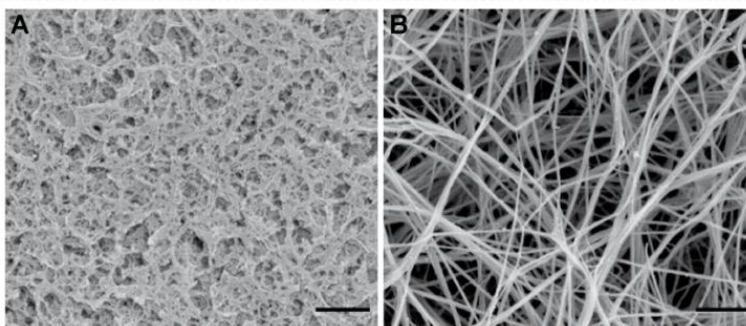


Figura 1.1. Membrana basal vs MEC. Comparación de la arquitectura ultraestructural del Matrigel (A) y el colágeno tipo I (B) utilizando microscopía electrónica de barrido o EM (del inglés *electron microscopy*). Modificado de Poincloux y colaboradores (Poincloux y col., 2009). Barra de escala: 1 μm .

Las propiedades físicas de la MEC le confieren un rol estructural y de barrera fisiológica. Tal es el caso de la membrana basal, que es un tipo de MEC que actúa principalmente como sostén de los tejidos epiteliales y promueve el intercambio selectivo de moléculas entre diferentes estructuras multicelulares. Los componentes de la MEC también actúan como punto de anclaje y medio de tracción para que los sistemas celulares migren, fenómeno que se promueve a partir de estímulos moleculares (autócrinos o parácrinos) y mecánicos (Lu y

col., 2011). En relación a los estímulos mecánicos, es importante mencionar que las células han desarrollado un complejo sistema de interacción con la MEC a partir del cual ciertas macromoléculas del citoesqueleto, como actina, se encuentran en estrecha relación con algunos de sus componentes, actuando como sensores de fuerzas mecánicas. De esta manera se establece un “diálogo” MEC-célula que permite la rápida adaptación celular a los cambios que sufre el medio circundante (Lu y col., 2011). En este sentido, las integrinas son macromoléculas claves ya que actúan como nexo entre la actina del citoesqueleto celular y los componentes de la MEC. Las integrinas son proteínas de transmembrana compuestas por la combinación dimérica entre una de las 18 subunidades α con una de las 8 subunidades β existentes, integrando así algunas de las 24 combinaciones descriptas a la fecha (Kim y col., 2011).

En relación a las propiedades bioquímicas de la MEC, es importante mencionar que la composición y organización de los elementos que la constituyen le permiten generar reservorios de macromoléculas y propiciar los estímulos celulares a partir de la formación de gradientes de concentración. Esto le confiere a la MEC un rol clave en las interacciones ligando-receptor y, por consiguiente, en la activación de diferentes vías intracelulares de transducción de señales (Lu y col., 2012).

1.1.3 Dinámica de la matriz extracelular

Los procesos de remodelación de la MEC ocurren tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Lu y col., 2011; Lu y col., 2012). Es por esto que la homeostasis de los tejidos depende del estricto equilibrio existente entre la síntesis y la degradación de los componentes moleculares de la MEC. Por su parte, en situaciones patológicas, la alteración de este balance puede generar una degradación proteolítica excesiva de la MEC, tal como ocurre en la mayoría de los procesos inflamatorios agudos y crónicos (pancreatitis aguda en estadio severo, artritis reumatoidea, enfermedades cardiovasculares, nefritis, desórdenes neurológicos y retinales proliferativos), y durante el desarrollo y metástasis de tumores. Por otra parte, la alteración de este equilibrio puede resultar en una acumulación descontrolada de componentes de la MEC, como consecuencia de un aumento en su producción o una disminución de su degradación, tal como acontece durante el desarrollo de los diferentes

tipos de fibrosis (Bissell y Radisky, 2001; Das y McGuire, 2003; Libby, 2002; Vu y Werb, 2000).

1.1.3.1 Proteólisis de la matriz extracelular

En relación a la proteólisis de la MEC, las enzimas encargadas de degradar sus componentes son las denominadas proteasas. Existen dos grandes grupos de proteasas: exopeptidasas y endopeptidasas, las cuales se clasifican de acuerdo a la región de la cadena polipeptídica donde ejercen su acción proteolítica. Las exopeptidasas actúan hidrolizando enlaces peptídicos de los aminoácidos terminales de la cadena, por lo que pueden ser de tipo aminopeptidasas o carboxipeptidasas, de acuerdo a si se trata de la región amino o carboxilo terminal del polipéptido. Las endopeptidasas escinden los enlaces peptídicos situados en el interior de la molécula proteica. En 1960, B.S. Hartley propuso clasificar las proteasas de acuerdo a su mecanismo catalítico más que por su origen, especificidad o función. Sugirió definir cuatro grupos: a) serina proteinasas, cuyo centro activo contiene un residuo serina que reacciona únicamente con compuestos órgano-fosforados, como es el caso de quimiotripsina, tripsina, elastasa, trombina, plasmina y subtilisina; b) tiol proteinasas, como papaína, ficina y bromelaína; c) ácido proteinasas, distinguidas porque actúan de forma óptima a pH ácido, como pepsina y renina; y finalmente d) metal proteinasas, que dependen de iones para activarse, como sucede con todas las exopeptidasas y con colagenasa, la única endopeptidasa dependiente de iones descrita hasta ese momento (Barrett, 1979; Hartley, 1960). La propuesta de Hartley fue considerada superadora, significó uno de los conceptos más influyentes en la temática y, a pesar de que con el paso del tiempo sufrió algunas modificaciones, aún continúa vigente. En la actualidad las proteasas pueden ser clasificadas en seis grupos: a) serina proteinasas, b) treonina proteinasas (identificadas en 1995), c) cisteína proteinasas, d) aspartato proteinasas, e) glutámico proteinasas (identificadas en 2004), y f) metaloproteinasas de matriz o MMP (del inglés *matrix metalloproteinases*). En la MEC, las principales proteasas intervinientes en la degradación de sus componentes, son las MMP y en segundo lugar las serina proteinasas (Lu y col., 2011).

Las MMP son endopeptidasas dependientes de zinc que en general se sintetizan como zimógenos en estado de latencia o pro-enzimas, cuyo dominio catalítico se encuentra unido

a un propéptido que posee un residuo cisteína conservado en coordinación con un ion Zn^{2+} (sitio activo de la enzima). La escisión proteolítica o química (por agentes mercuriales) del propéptido, genera la forma activa de estas proteasas (Brinckerhoff y Matrisian, 2002). Además, existe un grupo de proteasas relacionadas a las MMP que poseen motivos trombospondina y se conocen como ADAMTS (del inglés *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*). En humanos se describieron 19 miembros de ADAMTS que entre otras funciones tienen la de degradar los proteoglicanos de la MEC, de ahí que algunas de ellas reciben la denominación de proteoglicanasas (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, -16 y -18) (Brinckerhoff y Matrisian, 2002; Lu y col., 2011). Por su parte, entre las MMP podemos diferenciar dos grandes grupos, las secretadas y las ancladas a membrana plasmática (MP). Entre las secretadas se distinguen aquellas que carecen de dominio hemopexina, también conocidas como matrilisinas (MMP-7 y -26), las que poseen dominio hemopexina, colagenasas (MMP-1, -8, -13 y -18) y estromelisinias (MMP-3 y -10), y las que además de poseer este dominio tienen repeticiones FN II en su sitio catalítico y son capaces de degradar colágeno tipo IV y gelatina, por lo que se denominan gelatinasas (MMP-2 y -9). Por su parte, las MMP de membrana son estructuralmente similares a las colagenasas y estromelisinias, con la salvedad de que además poseen un dominio transmembrana (MMP-14, -15, -16 y -24) o un dominio tipo GPI (del inglés *glycosylphosphatidylinositol-anchored protein*) conocido también como proteína integral de membrana (MMP-17 y -25), que en ambos casos tienen como función mantenerlas ancladas a la MP (Clark, 2001).

Las MMP son potentes enzimas cuya actividad biológica, en condiciones fisiológicas, permite que la MEC mantenga su dinámica y versatilidad, lo cual regula muchos aspectos fundamentales de la biología celular (Page-McCaw y col., 2007). Uno de los más significativos es la migración celular, la cual no solo resulta esencial durante el desarrollo embrionario sino que es imprescindible para la renovación de los tejidos, la respuesta inmunológica y la reparación de las heridas. Es también clave para la progresión y metástasis de tumores (Etienne-Manneville, 2013). En este sentido, MMP-14 o MT1-MMP (del inglés *membrane type 1 matrix metalloproteinase*) ha sido identificada, en un principio como activadora de proMMP-2 en la superficie de células tumorales, y más tarde como sustrato de varias moléculas de la MEC (Brinckerhoff y Matrisian, 2002; Clark, 2001). La

acumulación de MT1-MMP en las protrusiones de membrana (también conocidas en inglés como *podosomes* o *invadopodia*), está estrechamente asociada a la degradación pericelular de la MEC, tanto en células normales como tumorales (Artym y col., 2006). En este sentido, en células tumorales, el nivel de expresión de esta proteína en la MP resulta directamente proporcional a la malignidad y capacidad de invadir tejidos de los tumores, por lo que es considerada clave en la progresión de este tipo de patologías (Poincloux y col., 2009; Sato y col., 2005; Strongin, 2010). Por su parte, la actividad de MT1-MMP a nivel de la superficie celular depende de su transporte a la MP, el cual ocurre a través de mecanismos de reciclado endocítico y de exocitosis mediados por algunas de las proteínas conocidas como Rabs (Bravo-Cordero y col., 2007; Li y col., 2008; Remacle y col., 2003; Schram y col., 2011; Wang y col., 2004).

Las proteínas Rabs constituyen la familia más numerosa de pequeñas GTPasas del tipo Ras, con más de 60 miembros identificados en humanos. Estas proteínas motoras presentan estados de activación e inactivación de acuerdo a si se encuentran unidas a GTP (del inglés *guanosine triphosphate*) o GDP (del inglés *guanosine diphosphate*), respectivamente (Hutagalung y Novick, 2011). Las Rabs regulan la formación, transporte, anclaje y fusión de vesículas transportadoras de moléculas cargo entre compartimentos subcelulares. Actúan reclutando una serie de moléculas efectoras y asociándose con proteínas del tipo SNARE (del inglés *soluble NSF attachment protein receptor*) las cuales permiten la fusión de membranas entre vesículas (Hutagalung y Novick, 2011). La asociación molecular de Rabs, efectoras de las Rabs y SNARE induce la formación de complejos proteicos específicos en cada tipo de vesícula, lo que permite la identificación de cada una de ellas y su localización intracelular (Tabla 1.1). Mediante la detección bioquímica de estas proteínas es posible caracterizar la distribución y el tipo de transporte intracelular de diversas moléculas de interés. En este sentido, se demostró que en células MDA-MB-23 de adenocarcinoma cultivadas en matrices de colágeno tipo I, en dos y tres dimensiones, MT1-MMP se traslada a la MP de las protrusiones celulares a través de un mecanismo dependiente de Rab8, directamente desde compartimentos de almacenamiento intracelulares. Por el contrario, en ausencia del estímulo del colágeno tipo I, MT1-MMP se moviliza a la MP mediante un reciclado endocítico mediado por Rab11, desde el compartimento de reciclado endocítico (CRE) (Bravo-Cordero y col., 2007). Esto demuestra que el tipo de desplazamiento de

MT1-MMP a la MP depende, en alguna medida, de la composición de la MEC. En la figura 1.2 se observa un modelo que describe estas dos rutas de transporte para MT1-MMP desde el interior celular hacia la MP (Bravo-Cordero y col., 2007). En I se muestra la exocitosis de MT1-MMP mediada por Rab8, desde compartimentos de almacenamiento intracelular hacia la MP de protrusiones celulares en contacto con colágeno tipo I; mientras que en II se aprecia el reciclado endocítico constitutivo de esta MMP, el cual es mediado por Rab11, desde el CRE o desde compartimentos de almacenamiento intracelular. Este proceso de reciclado constitutivo involucra un paso de endocitosis desde MP hacia endosomas de *sorting*, los cuales se encuentran en equilibrio con el CRE, ambos considerados endosomas tempranos o EE (del inglés *early endosomes*) (Maxfield y McGraw, 2004). Otras vías podrían involucrar el transporte de MT1-MMP desde el CRE hacia el *trans*-Golgi o TGN (del inglés *trans-Golgi network*) y de allí a los compartimentos de almacenamiento intracelular, como se muestra en III, o bien desde la MP hacia lisosomas por endocitosis, como esquematiza el paso IV. El caso de MT1-MMP resulta paradigmático para explicar la relación funcional entre la MEC y las proteasas. Es la demostración de que los componentes de la MEC son capaces de regular el transporte intracelular de las proteasas, al mismo tiempo que éstas regulan su funcionalidad y tasa de renovación.

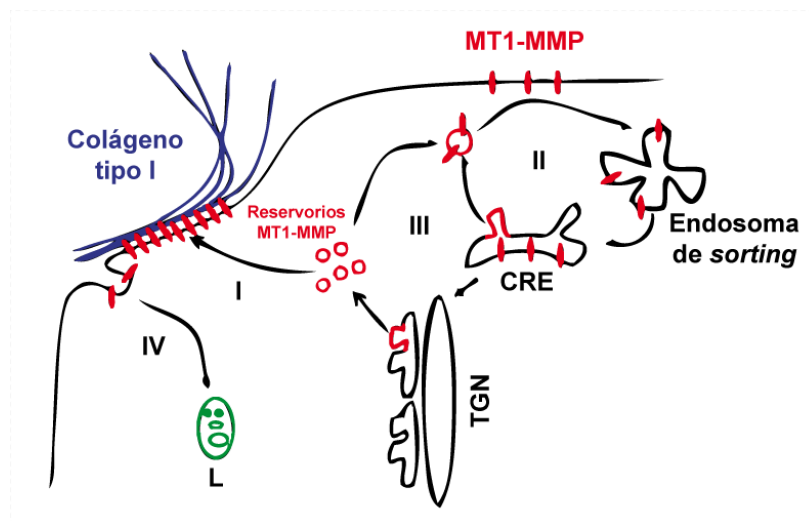


Figura 1.2. Esquema de las principales rutas de transporte exocítico y de reciclado descritas para MT1-MMP. I: exocitosis de MT1-MMP mediada por Rab8 desde reservorios intracelulares hacia la MP, II: reciclado endocítico mediado por Rab11 a través del CRE y endosomas de *sorting*, III: transporte desde el CRE al TGN y de allí a los reservorios intracelulares, IV: endocitosis de MT1-MMP y degradación en lisosomas (L). Modificado de Bravo-Cordero y colaboradores (Bravo-Cordero y col., 2007).

Proteína Rab	Localización	Vía de transporte intracelular/Función
Rab4 (A, B)	EE	Reciclado de proteínas/transporte a la MP
Rab5 (A, B, C)	MP, vesículas recubiertas de clatrina, EE	Fusión de EE
Rab6 (A, A')	Compartimento de Golgi	Transporte de endosoma a compartimento de Golgi, intra-Golgi, compartimento de Golgi a retículo endoplasmático
Rab6B	Compartimento de Golgi	Trasporte intra-Golgi preferentemente en células neuronales
Rab7A	LE, lisosomas/vacuolas, melanosomas, fagosomas	Transporte de LE a lisosomas
Rab7B	Lisosomas	Transporte de LE a lisosomas
Rab8A	Membranas celulares, vesículas, cilias primarias	Exocitosis, transporte de TGN/retículo endoplasmático a MP
Rab8B	Membranas celulares, vesículas	Exocitosis, transporte de TGN/retículo endoplasmático a MP
Rab10	Compartimento de Golgi, endosomas de <i>sorting</i> basolateral, vesículas conteniendo GLUT4	Exocitosis, transporte de TGN/retículo endoplasmático a MP
Rab11 (A, B)	Compartimento de Golgi, retículo endoplasmático, EE	Transporte de TGN/retículo endoplasmático a MP
Rab14	Compartimento de Golgi, EE, vesículas conteniendo GLUT4	Transporte de TGN/retículo endoplasmático a MP, membrana apical
Rab21	EE	Transporte de MP a EE
Rab22A	EE	Transporte de MP a EE, reciclado de proteínas a la MP

Tabla 1.1. Localización y función de algunas proteínas Rab de interés. EE: *early endosome*, MP: membrana plasmática, LE: *late endosome*; TGN: *trans-Golgi network*, GLUT4: *glucose transporter type 4*. Esta tabla está basada en la revisión de Hutagalung y Novick (Hutagalung y Novick, 2011).

Por su parte, la actividad fisiológica de las proteasas se encuentra regulada a dos niveles, el transcripcional como es el caso de MMP-9, y el proteico como sucede con MMP-2. Como se mencionó anteriormente, MMP-2 se sintetiza como forma latente (proMMP-2) y se libera al medio extracelular para ser activada a nivel de la superficie celular requiriendo la participación de MT1-MMP, la que por su parte también es producida como pro-enzima, pero a diferencia de proMMP-2, es procesada intracelularmente a su forma activa por furina (Seiki y Yana, 2003; Yana y Weiss, 2000). Además, existe otro tipo de regulación que es ejercida por inhibidores fisiológicos que se encargan de mantener un nivel adecuado de activación para estas proteasas. En la figura 1.3 se muestra un esquema en el que proMMP-2 es activada por MT1-MMP a partir de la formación de un complejo trimolecular con TIMP-2, un miembro de los inhibidores tisulares de MMP o TIMP (del inglés *tissue inhibitor of metalloproteinases*). El proceso consiste en la liberación de proMMP-2 al

medio extracelular y su captura por parte de TIMP-2, el que luego se une a MT1-MMP y da lugar a la formación del complejo trimolecular. Paso siguiente, otra molécula de MT1-MMP escinde el pro-péptido de proMMP-2, provocando la liberación de la forma activa de la enzima (Lafleur y col., 2003).

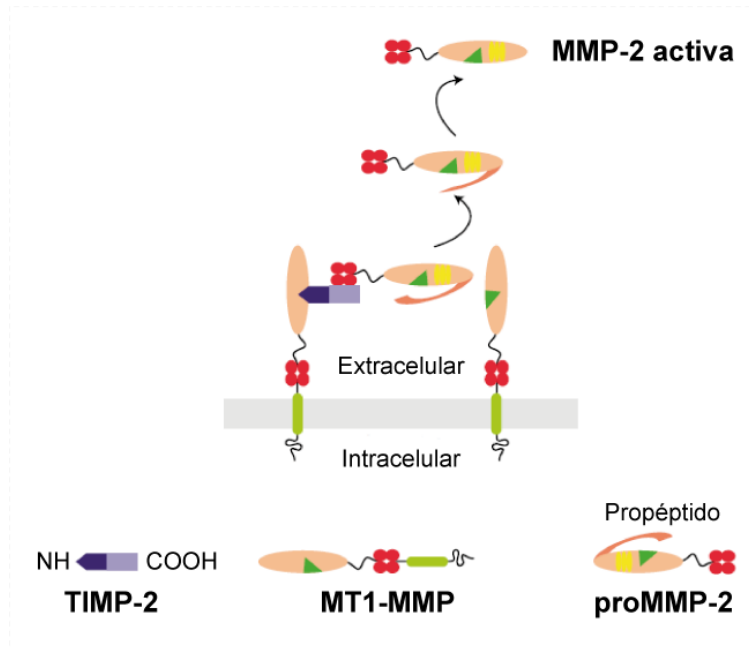


Figura 1.3. Modelo de activación de proMMP-2. Modificado de Lafleur y colaboradores (Lafleur y col., 2003).

1.1.3.2 Inhibidores de proteasas de la matriz extracelular: α -Macroglobulinas

En lo que respecta a los inhibidores de proteasas que participan en el proceso regulatorio de remodelación de la MEC, se pueden citar a los inhibidores de plasminógeno o PAI (del inglés *plaminogen activator inhibitors*), los TIMP y las α -Macroglobulinas (α -M). La función de estos inhibidores es regular la actividad de las proteasas, de forma tal que la MEC mantenga su integridad y funcionalidad. Dentro del conjunto de inhibidores, se destaca la relevancia de las α -M puesto que tienen la capacidad de inhibir a prácticamente la totalidad de las proteasas existentes (inhibidores de amplio espectro), incluyendo serina-, cisteína-, aspartato- y MMP.

En términos evolutivos, las α -M son proteínas ancestrales altamente conservadas que han sido aisladas de la hemolinfa de invertebrados, plasma de los vertebrados y albumen de huevos de aves y reptiles (Chu y Pizzo, 1994; Rehman y col., 2013). Forman parte de la

inmunidad innata y han cumplido funciones en el control de la proteólisis extracelular desde tiempos inmemoriales (Starkey y Barrett, 1982). Así lo demuestran diversos estudios que identificaron múltiples variantes de estas glicoproteínas en especies tan primitivas como los *Limulus polyphemus*, mixinos y lampreas (Quigley y Armstrong, 1983a; b; Starkey y Barrett, 1982; Travis y Salvesen, 1983). La tabla 1.2 resume algunas de las características estructurales y funcionales más importantes de las α -M caracterizadas en diferentes especies, incluida la humana.

Por su parte, las α -M humanas son una familia de glicoproteínas plasmáticas integrada por α_2 -Macroglobulina (α_2 M), los componentes del complemento C₃, C₄ y C₅, y PZP (del inglés *pregnancy zone protein*) (Armstrong y Quigley, 1999; Rehman y col., 2013). Si bien todas estas glicoproteínas participan en el control de la remodelación de la MEC, existe un amplio interés en el estudio de la α_2 M puesto que presenta ciertas características funcionales que exceden a las de un simple inhibidor de proteasas.

Nombre	Estructura cuaternaria	Peso molecular por subunidad (kDa)	Procedencia	Concentración en plasma o hemolinfa (mg/mL)	Tiol éster intracadena	Referencia
α_2M	Tetrámero	180	Humana	2 – 4	+	(Chu y Pizzo, 1994)
α_2M	Tetrámero	180	Rata	< 0,01	+	(Gehring y col., 1987; Lonberg-Holm y col., 1987a; Lonberg-Holm y col., 1987b)
α_1M	Tetrámero	160 + 40	Rata	2 – 4	+	(Geiger y col., 1987; Lonberg-Holm y col., 1987a; Lonberg-Holm y col., 1987b)
α_2M	Tetrámero	180	Rana	s.d.	+	(Feldman y Pizzo, 1985)
Ovostatina	Tetrámero	180	Pato	s.d.	+	(Nagase y col., 1986)
Ovostatina	Tetrámero	180	Pollo	> 1	–	(Nagase y Harris, 1983; Nagase y col., 1983)
PZP	Dímero	180	Humana	< 0,01	+	(Sand y col., 1985; Van Leuven y col., 1986a)
α_2M	Dímero	180	Langosta	0,6	+	(Spycher y col., 1987)
α_2M	Dímero	185	<i>L. poliphemus</i>	0,5 – 2	+	(Quigley y Armstrong, 1983b)
α_1I_3	Monómero	215	Rata y Hamster	4 – 10	+	(Gliemann y col., 1989)
<i>Murinoglobulina</i>	Monómero	180	Ratón	14,1	+	(Rehman y col., 2013)

Tabla 1.2. Características estructurales y funcionales de las α -M de algunas especies de invertebrados y vertebrados. Abreviatura s.d. (sin datos). Los signos positivos (+) indican presencia del enlace tiol éster intracadena, mientras los negativos (–) indican su ausencia. Esta tabla está basada en la revisión de Rehman y colaboradores (Rehman y col., 2013).

1.2 α_2 -Macroglobulina: algo más que un mero inhibidor de proteasas

1.2.1 Estructura

La α_2M humana es una glicoproteína plasmática de 720 kDa que contiene en su estructura entre un 8% y un 11% de carbohidratos (Rehman y col., 2013; Travis y Salvesen, 1983). En el plasma de seres humanos, su concentración es de 2–4 mg/mL (~4 μ M), lo que representa entre un 3% y un 5% del total de las proteínas séricas (60 mg/mL). Circula como un tetrámero constituido por subunidades de 180 kDa cada una, unidas en pares (homodímeros) por enlaces del tipo puentes disulfuro (un total de 13 para toda la

molécula). Estos homodímeros, a su vez, se encuentran asociados entre sí mediante interacciones no covalentes formando lo que se conoce como “dímeros de dímeros”. En lo que respecta a su composición de aminoácidos, cada subunidad está conformada por 1451 residuos. En proximidades del centro de cada subunidad, se encuentra una secuencia de 25 aminoácidos delimitada por dos prolina, con un sitio primario de clivaje de 6 residuos (Arg⁶⁸¹-Val-Gly-Phe-Tyr-Glu) y otro de 5 aminoácidos (Arg-Leu-Val-His-Val) que constituyen lo que en inglés se define como región “*bait*” (anzuelo), la cual es la única secuencia de la proteína propensa a ser escindida por casi la totalidad de las endopeptidasas existentes. Posee también un enlace interno del tipo β -cistenil- γ -glutamil tiol-éster, lábil y rápidamente escindido por calor, aminos nucleofílicos (principalmente aminos primarios) y sustancias reductoras. La α_2 M humana cuenta además con cuatro sitios de unión a su receptor o RBD (del inglés *receptor binding domain*). Son secuencias de 138 aminoácidos ubicadas en los extremos carboxilo terminales de cada subunidad (Feldman y col., 1985; Van Leuven y col., 1986b; Van Leuven y col., 1986c). Dentro de su estructura, además de las ya mencionadas regiones “*bait*”, tiol-éster y RBD, α_2 M cuenta con un sitio reactivo transglutaminasa de 20 aminoácidos y una secuencia del tipo metaloproteína que une zinc, que si bien no es necesaria para unir proteasas, si lo es para la unión y transporte de otras macromoléculas, como por ejemplo, IL-1 β (Rehman y col., 2013). La figura 1.4 es una representación esquemática de la conformación estructural de la α_2 M humana donde es posible apreciar, en cada subunidad, la distribución de las secuencias de aminoácidos previamente descritas.

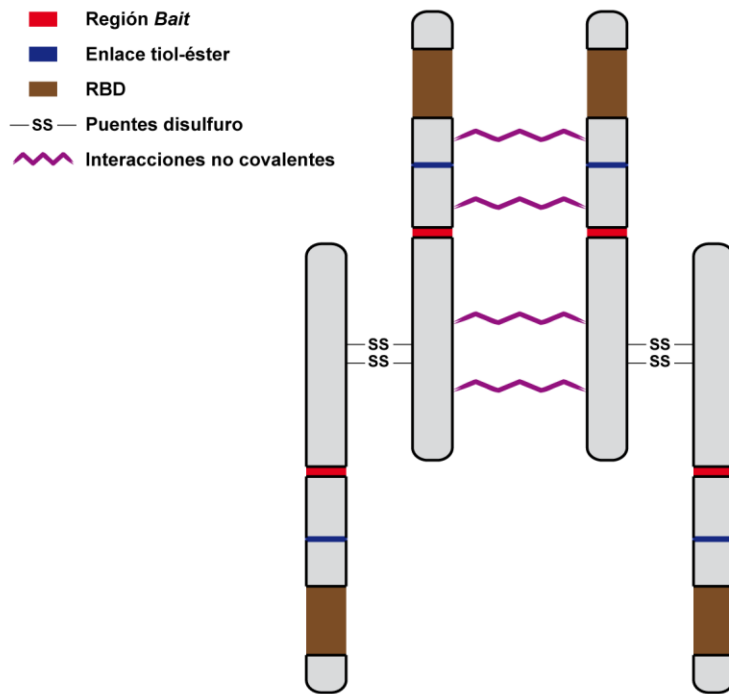


Figura 1.4. Representación esquemática de la conformación estructural de α_2M humana. En la figura se observan las cuatro subunidades de 180 kDa que conforman la α_2M . Puentes disulfuro (-SS-) permiten que las subunidades formen homodímeros que a su vez se asocian, por interacciones no covalentes (~~~~~), formando pares de dímeros.

1.2.2 Mecanismo de acción

Cuando la región *bait* de una molécula de α_2M es escindida por acción de una proteasa, se produce un cambio de conformación en la estructura cuaternaria del inhibidor. Esto promueve la captura de la enzima y la escisión del enlace tiol-éster, el cual puede unir de forma covalente a la proteasa capturada o bien interactuar con otros nucleófilos presentes. Es importante mencionar que una vez capturada, la proteasa no se inactiva sino que α_2M le impide la unión a sustratos, principalmente los de gran tamaño. En la jerga científica, este proceso se conoce con el nombre de “atrapamiento molecular” y es un mecanismo único de inhibición de proteasas, característico de α_2M (Feldman y col., 1985). El cambio de conformación de la molécula de α_2M , además del “atrapamiento molecular”, produce la exposición de los sitios RBD de sus subunidades, lo que le permite interactuar específicamente con su receptor LRP1 (del inglés *low density lipoprotein receptor-related protein 1*), promoviendo la rápida internalización del complejo por endocitosis y su degradación a nivel de lisosomas (Salzman y Maxfield, 1989; Yamashiro y col., 1984). Por

nomenclatura, se denomina α_2M "activa" o α_2M^* a la proteína con capacidad de interactuar con LRP1. Como se mencionó previamente, aminas primarias nucleofílicas, del tipo metilamina o 5-OH-triptamina (serotonina) producen, al igual que las proteasas, formas activas de α_2M (Chiabrando y col., 2002).

La figura 1.5 fue tomada del trabajo de Feldman y colaboradores del año 1985 donde se propuso el modelo de mecanismo de acción de la α_2M humana a partir de observaciones previas realizadas por diferentes grupos de investigación.

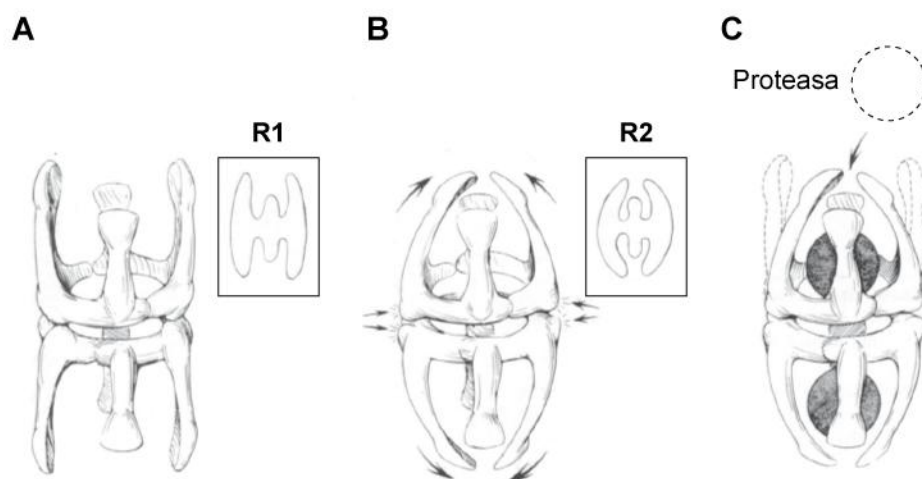


Figura 1.5. Mecanismo de “atrapamiento” molecular de α_2M humana. Representación esquemática de: (A) la forma nativa de α_2M junto a la emulación de su micrografía electrónica en el recuadro 1 (R1), (B) el cambio de conformación (flechas largas) que sufre esta glicoproteína al interactuar con proteasas (α_2M^*) junto a la emulación de su micrografía electrónica en el recuadro 2 (R2), y (C) el “atrapamiento” molecular de las proteasas. Las flechas cortas indican las posiciones postuladas como sitios de reconocimiento del receptor de α_2M , LRP1. Modificado de Feldman y colaboradores (Feldman y col., 1985).

1.2.3 Fisiología y fisiopatología

Desde un principio, la α_2M ha sido estudiada como una molécula clave en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos multicelulares y es considerada parte integral del sistema inmune innato de los seres humanos, principalmente por su participación en el control de la proteólisis extracelular como inhibidor de proteasas de amplio espectro (Hall y Roberts, 1978; Sottrup-Jensen, 1989). En condiciones fisiológicas, α_2M circula en el torrente sanguíneo en su forma nativa, actuando como “centinela” ante la eventual activación de las proteasas (Chu y col., 1994a). Durante la inflamación, α_2M regula la actividad proteolítica extracelular por inhibición de serina proteinasas y MMP, así

como también de enzimas que provienen de agentes infecciosos, tales como la cruzipaina del *Trypanosoma cruzi*, la proteinasa específica de *Trichophyton mentagrophytes* (agente causal de las dermatofitosis o tiñas) y la colagenasa de *Clostridium histolyticum* (agente causal de la gangrena gaseosa) (Ramos y col., 1997; Ramos y col., 2002; Rehman y col., 2013; Sanchez y col., 1998; Sanchez y col., 2001).

Es importante destacar que aún no se han descrito deficiencias totales para esta glicoproteína en seres humanos, lo que sugiere que α_2M cumple un rol fisiológico esencial más allá de su capacidad para inhibir proteasas (Rehman y col., 2013). En este sentido, numerosas investigaciones demostraron que α_2M actúa como proteína transportadora de moléculas no proteolíticas, entre las que se encuentran citoquinas, hormonas y factores de crecimiento. Entre las moléculas que interaccionan con α_2M podemos citar a transferrina (Tf), PSA (del inglés *prostatic specific antigen*), bFGF, PDGF-BB (del inglés *platelet-derived growth factor-BB*), TGF β (del inglés *transforming growth factor- β*), NGF β (del inglés *nerve growth factor- β*), hormona de crecimiento, VEGF (del inglés *vascular endothelial growth factor*) e IL-1 β (Mantuano y col., 2008; Rehman y col., 2013). Esta función de proteína “carrier” le confiere la capacidad de regular diversos procesos biológicos, tales como coagulación, fibrinólisis, reacciones de fase aguda y hematopoyesis. Además, le permite ser utilizada como adyuvante inmunológico en vacunas y como transportador de drogas con fines terapéuticos (Binder y col., 2001; Chu y col., 1994b).

En el sistema nervioso central, α_2M es capaz de unir y depurar de la circulación la proteína básica de mielina proveniente de la desmielinización de fibras nerviosas por traumas o injurias, contrarrestando así su alto efecto inmunogénico (Rehman y col., 2013). Por otra parte, α_2M ha sido propuesta como un bio-marcador para el pronóstico de patologías inflamatorias como pancreatitis aguda y fibrosis hepática (Bisaro de Lorenc y col., 2005; Ho y col., 2010; Rehman y col., 2013).

Durante los últimos 30 años, más de 2000 publicaciones han sido reportadas en relación a las funciones de α_2M como inhibidor de proteasas y transportadora de diversas macromoléculas. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que esta glicoproteína también es capaz de regular la síntesis de factores pro-inflamatorios y proteasas, al mismo tiempo que se constituye como un inductor exógeno para la migración, proliferación,

diferenciación y apoptosis de diversos tipos de células (Bacsikai y col., 2000; Padmasekar y col., 2007; Qiu y col., 2004). Estas funciones están estrechamente relacionadas a la capacidad que tiene α_2M^* de producir señalización intracelular a través de su interacción con LRP1 (Sauer y col., 2013; Yoon y col., 2013). Si bien *a priori* estas funciones de α_2M resultan contrapuestas a algunas de las anteriormente descritas, pueden adquirir sentido en el contexto de un proceso inflamatorio, durante el cual se produce una exacerbada remodelación de la MEC con la consecuente ruptura de barreras fisiológicas y la síntesis local de proteasas por parte de células inflamatorias. Este proceso genera la extravasación de inhibidores de proteasas desde el plasma al espacio extracelular e intersticial de los tejidos afectados y provoca un incremento considerable en la concentración de complejos de inhibidor de proteasas-proteasa, en especial α_2M -proteasa. Teniendo en cuenta que en condiciones fisiológicas no más del 1% del total de la α_2M circulante se encuentra como α_2M^* (~30 nM), el incremento de dicha concentración en tejidos donde no es habitual encontrarla, puede gatillar importantes eventos celulares a partir de su interacción con su receptor (Herz y Bock, 2002). En este sentido, resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación demostraron que una concentración de 60 nM de α_2M^* es capaz de inducir la expresión de MMP-9 y la proliferación celular a través de la activación, mediada por LRP1, de las vías MAPK/ERK (del inglés *mitogen-activated protein kinases/extracelular signal-regulated kinases*) y NF- κ B (del inglés *nuclear factor kappa chains of B cells*), en líneas celulares de macrófagos de ratón (Bonacci y col., 2007; Caceres y col., 2010). En función de estos antecedentes, resulta de gran interés el estudio de mecanismos moleculares que regulan la interacción de α_2M^* con LRP1, sobre todo teniendo en cuenta que aún se desconocen los factores que determinan que este inhibidor de enzimas proteolíticas, en determinado contexto biológico, es también capaz de promover la expresión de algunas proteasas. Esta aparente dualidad dependería del tipo celular, la concentración de α_2M^* y principalmente de la capacidad de su receptor LRP1 de regular la señalización intracelular mediante la asociación con proteínas adaptadoras y otros receptores transmembrana.

1.2.4 Las células de Müller como modelo experimental para el estudio de la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$

Durante la progresión de diversas patologías que provocan daños a nivel de la retina, tales como la retinopatía diabética proliferativa (RDP), la retinopatía del prematuro (ROP) y la retinopatía asociada a anemia falciforme, se produce en la zona de la lesión un incremento de concentración y actividad de diversas proteasas e inhibidores de proteasas, lo que desencadena una exacerbada remodelación de la MEC (Bringmann y col., 2006). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que en modelos de ratas con neovascularización inducida por isquemia, se evidencia un aumento de los niveles de α_2M y de la actividad de MMP (principalmente gelatinasas) en la retina, junto con un incremento en la expresión de LRP1 en células de Müller (CM) (Barcelona y col., 2010). Adicionalmente, se observó que en el humor vítreo de pacientes con ciertos desórdenes proliferativos de la retina, α_2M y LRP1 se incrementan significativamente (Barcelona y col., 2010; Hollborn y col., 2004; Sanchez y col., 2007). Sin embargo, las funciones de estas dos proteínas en dichas patologías aún no han sido completamente esclarecidas. Por su parte, también existe evidencia que en este tipo de desórdenes proliferativos, las CM regulan la expresión de MMP-2 y MMP-9 a partir de su interacción con TNF α (Limb y col., 2002a).

Las CM son consideradas las principales células gliales de la retina, ya que ejercen por sí solas funciones estructurales y metabólicas que, en otras regiones del sistema nervioso central, cumplen astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias (Limb y col., 2002b). Durante situaciones de estrés a nivel del tejido retinal, las CM incrementan los niveles de expresión de la proteína ácida fibrilar glial o GFAP (del inglés *glial fibrillary acidic protein*), condición que se conoce como gliosis. La hipoxia retinal isquémica, el glaucoma experimental y el desprendimiento de retina, son las mayores causas de pérdida severa de la visión y del incremento a nivel transcripcional y proteico de GFAP en CM (Kim y col., 1998; Lewis y col., 1995; Sethi y col., 2005; Wang y col., 2002; Xue y col., 2006). Es interesante mencionar que recientemente ha sido demostrado por nuestro grupo de investigación que α_2M^* vía LRP1 induce la expresión de GFAP en la línea de CM humanas espontáneamente inmortalizadas MIO-M1 (del inglés *Moorfields/Institute of Ophthalmology-Müller 1*) (Barcelona y col., 2011). En su conjunto, todos estos hallazgos son indicativos de que las CM actúan como sensores de estrés de la retina y participan en la

regulación de la remodelación de la MEC, procesos durante los cuales α_2M^* jugaría un rol preponderante.

Adicionalmente, las CM cumplirían importantes funciones en la regeneración neuronal, lo que se deduce a partir de los hallazgos que muestran que células MIO-M1 poseen características de células madre pluripotentes neuronales (Lawrence y col., 2007). Dichas cualidades llevaron a estas células a ser consideradas como potenciales agentes terapéuticos para la restauración de la función de la retina luego de injurias provocadas por diversas alteraciones patológicas o mecánicas (Bull y col., 2008; Johnson y col., 2009). Otra particularidad de las células MIO-M1 es que mantienen las características morfológicas de las CM aisladas de los tejidos primarios, sin sufrir diferenciación celular ante los sucesivos repiques durante su cultivo *in vitro*. Éste es uno de los motivos por los que la línea celular MIO-M1 es considerada un excelente modelo experimental para el estudio de los procesos biológicos que tienen lugar en la retina, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas (Limb y col., 2002b). En relación al presente trabajo de tesis, el tejido retinal es una región del organismo que, en condiciones fisiológicas, se encuentra en contacto con bajas dosis de α_2M^* , lo que resulta óptimo en la utilización de esta línea celular para el estudio de los efectos que provoca este ligando a concentraciones por encima de sus niveles normales.

1.3 El receptor LRP1

1.3.1 La familia de genes del receptor de LDL

En el año 1985 los investigadores Michel S. Brown y Joseph L. Goldstein recibieron el Premio Nobel de Medicina por sus descubrimientos en la regulación del metabolismo del colesterol mediado por la vía celular dependiente del receptor de las lipoproteínas de baja densidad o LDLR (del inglés *low density lipoprotein receptor*) (Brown y Goldstein, 1986; Goldstein y Brown, 2009). Sus investigaciones comenzaron en 1972 con el estudio de las causas de la hipercolesterolemia familiar (HF), una alteración metabólica de origen genético, caracterizada por la presencia de elevados niveles de colesterol en sangre y aumentada predisposición a sufrir enfermedad coronaria (Goldstein y Brown, 2009). A partir del estudio de la captación de lipoproteínas de baja densidad o LDL (del inglés *low density lipoproteins*) y lipoproteínas de alta densidad o HDL (del inglés *high density*

lipoproteins) por fibroblastos aislados de pacientes homocigotas con HF, Brown y Goldstein advirtieron la existencia de receptores de membrana específicos para cada tipo de lipoproteína. Esta observación llevó al descubrimiento del LDLR en 1974, cuyo gen se encuentra mutado en pacientes con HF lo que se traduce en una capacidad disminuida para depurar LDL del torrente sanguíneo (Goldstein y Brown, 1974). Estos hallazgos no solo significaron el inicio de avances trascendentales en el campo de la medicina moderna sino que produjeron un cambio paradigmático para la biología celular y molecular. Se introdujo por primera vez el concepto de la endocitosis mediada por receptores como el principal mecanismo utilizado por la célula para el transporte selectivo de macromoléculas desde la MEC hacia su interior. Además significó el primer paso para el descubrimiento de una familia de genes de receptores de superficie celular, que presentan una alta homología estructural y participan de numerosos procesos biológicos. Los miembros de esta familia están involucrados en la captación de ligandos extracelulares, en la regulación del metabolismo de lípidos y proteínas, así como también en la modulación de la actividad de proteasas de superficie celular. Algunos son capaces de generar señalización intracelular a partir de su interacción con ligandos y participan en la regulación del desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central (Herz y Bock, 2002; May y col., 2005).

La familia de genes del LDLR incluye 7 miembros que poseen una alta homología estructural: LDLR, VLDLR (del inglés *very low density lipoprotein receptor*), apoER2 (del inglés *apolipoprotein E receptor 2*), MEGF7 (del inglés *multiple epidermal growth factor-like domains 7*), LRP2 o Megalina, LRP1 y LRP1b (figura 1.6 A). Adicionalmente también se incluyen otros 3 miembros de la familia que no son homólogos desde el punto de vista estructural: LRP5, LRP6 y SorLa o LR11 (figura 1.6 B) (Herz y Bock, 2002; Herz y Strickland, 2001; Krieger y Herz, 1994; Lillis y col., 2008).

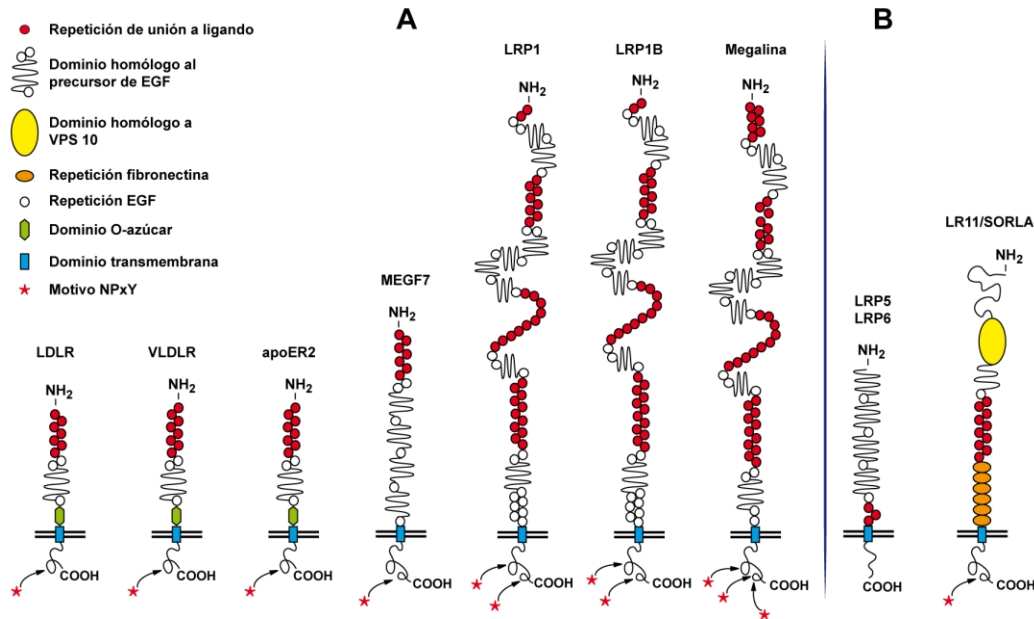


Figura 1.6. Miembros de la familia de receptores del LDLR. (A) Miembros de la familia que presentan alta homología estructural. (B) Miembros de la familia que no son homólogos al resto desde el punto de vista estructural. Modificado de Herz y colaboradores (Herz y Bock, 2002).

Dentro de esta familia de receptores, el LRP1 es considerado uno de los más importantes ya que, en mayor o menor medida, se expresa virtualmente en todos los tipos celulares (al igual que LDLR), tiene la capacidad de interactuar con otros receptores de transmembrana y una más de 40 ligandos funcionalmente no relacionados, entre los que se encuentran proteasas y complejos de inhibidores de proteasas-proteasa, factores de crecimiento, proteínas implicadas en el transporte de lípidos, virus y toxinas. Esta cualidad le permite, participar activamente en la remodelación de la MEC, en la progresión de los procesos inflamatorios, en la regulación del metabolismo de los lípidos y lipoproteínas, en el ingreso de virus y toxinas bacterianas a la célula, en la activación de enzimas lisosómicas, la transducción de señales y la transmisión nerviosa (Herz y Strickland, 2001; Lillis y col., 2008).

1.3.2 Aspectos generales de LRP1

Desde su identificación y caracterización a fines de la década de 1980, hasta la actualidad, las funciones biológicas atribuidas a LRP1 pasaron de ser las concernientes a un mero receptor endocítico o transportador intracelular de ligandos, a las de un regulador activo de importantes procesos fisiológicos y patológicos. Además, se evidenció que LRP1 es clave

para el desarrollo embrionario, proceso durante el cual cumple importantes funciones. Prueba de ello es la inviabilidad de los embriones de ratones que son sometidos a técnicas de inactivación génica del gen *lrp1*, cuyos blastocistos homocigotas no logran implantarse en el útero (Pankov y Yamada, 2002). Por su parte, estudios de delección del gen *lrp1* en tejidos específicos, revelaron la importancia de este receptor en el sistema vascular, sistema nervioso central, macrófagos y adipocitos (Lillis y col., 2008).

La versatilidad funcional de LRP1 para participar en diversos procesos biológicos se vio plasmada en el hecho de que su identificación se realizó de forma simultánea por tres grupos de investigación abocados a tópicos diferentes: 1- Joachim Herz y colaboradores, quienes en 1988 caracterizaron *“una proteína de superficie celular abundante en hígado y similar, tanto estructural como bioquímicamente, al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR)”* (Herz y col., 1988); 2- Soren Moestrup y Jorgen Gliemann, los que durante el transcurso del año 1989 purificaron el receptor de α_2 -Macroglobulina a partir de membranas de hígado de rata y lo definieron como *“una proteína de cadena simple de aproximadamente 440 kDa”* (Moestrup y Gliemann, 1989); y 3- James Ashcom y colaboradores, quienes en abril de 1990 publicaron la identificación del receptor de la α_2 -Macroglobulina humana, al que definieron como *“una glicoproteína de superficie celular de 420 kDa que reconoce la conformación activa de α_2 -Macroglobulina”* (Ashcom y col., 1990). Más tarde, estos grupos coincidieron en que se trataba de la misma proteína, por lo que en un principio se la denominó LRP1/ α_2 M Receptor. El primer término provino de su homología estructural con el LDLR y el segundo por su capacidad para unir α_2 M y depurarla de la circulación. Poco tiempo después estos mismos grupos caracterizaron funcionalmente a LRP1 como un receptor multiligando (Herz y Bock, 2002).

Tal como se mencionó anteriormente, LRP1 es un receptor que se expresa en la mayoría de los tejidos y tipos celulares. Su expresión fue descrita en neuronas y astrocitos del sistema nervioso central, células epiteliales del tracto gastrointestinal, células musculares lisas, fibroblastos, células de Leydig, células granulosas de ovario y células dendríticas intersticiales de riñón. En células derivadas de monocitos LRP1 muestra altos niveles de expresión, como es el caso de fagocitos del hígado, pulmón y tejido linfoide (Moestrup y col., 1992). En células de sangre periférica, LRP1 se expresa en monocitos pero no lo hace en granulocitos ni en linfocitos. En este sentido, resultados recientes de nuestro grupo de

investigación proponen a LRP1 como un marcador pan-monocítico, en consonancia con lo previamente publicado por otros investigadores (Ferrer y col., 2014; Moestrup y col., 1990). Es importante mencionar que LRP1 también se expresa en tejidos tumorales, tales como glioblastomas y leucemias mielomonocíticas (Bu y col., 1994; Moestrup y Hokland, 1992; Song y col., 2009).

En lo que respecta a la localización subcelular de LRP1, la mayor densidad de receptor se localiza a nivel intracelular, ocupando la región perinuclear en estructuras vesiculares y tubulares. En fibroblastos y monocitos, pudo observarse que sólo entre el 18% y el 23% del receptor se expresa a nivel de la MP (Moestrup y col., 1990).

1.3.3 Biosíntesis y organización estructural

El LRP1 es una proteína de transmembrana tipo I y heterodimérica constituida por dos subunidades, una extracelular de 515 kDa denominada subunidad α y otra de 85 kDa denominada subunidad β . A su vez, la subunidad β está conformada por un ectodominio, una porción transmembrana y un dominio intra-citoplasmático (DIC) (Herz y col., 1988). El receptor LRP1 se sintetiza como una proteína precursora de 600 kDa, la cual es escindida proteolíticamente por furina en el compartimento de Golgi (Herz y col., 1990; Willnow y col., 1996). Ambas subunidades se mantienen unidas por interacciones no covalentes y son transportadas en ese estado conformacional hasta la MP. Desde el punto de vista estructural, tal como se representa en la figura 1.7, la subunidad α de LRP1 contiene 31 repeticiones de tipo complemento ricas en cisteínas, las que se distribuyen en 4 dominios o *clusters* (I–IV), denominados dominios de unión de ligandos, donde el dominio I posee dos repeticiones, el II ocho, el III diez y finalmente el dominio IV once repeticiones. Estos dominios se encuentran delimitados por uno o más dominios homólogos al precursor de EGF (del inglés *epidermal growth factor*), los cuales consisten de dos repeticiones EGF ricas en cisteínas seguidas de una repetición YWTD y una tercera del EGF-like. Por su parte, la subunidad β de LRP1, de 100 aminoácidos, contiene motivos YxxL, di-Leucina (LL) y NPxY, además de residuos serina y treoninas, que son potenciales sitios de fosforilación y unión de proteínas adaptadoras citoplasmáticas (Lillis y col., 2008).

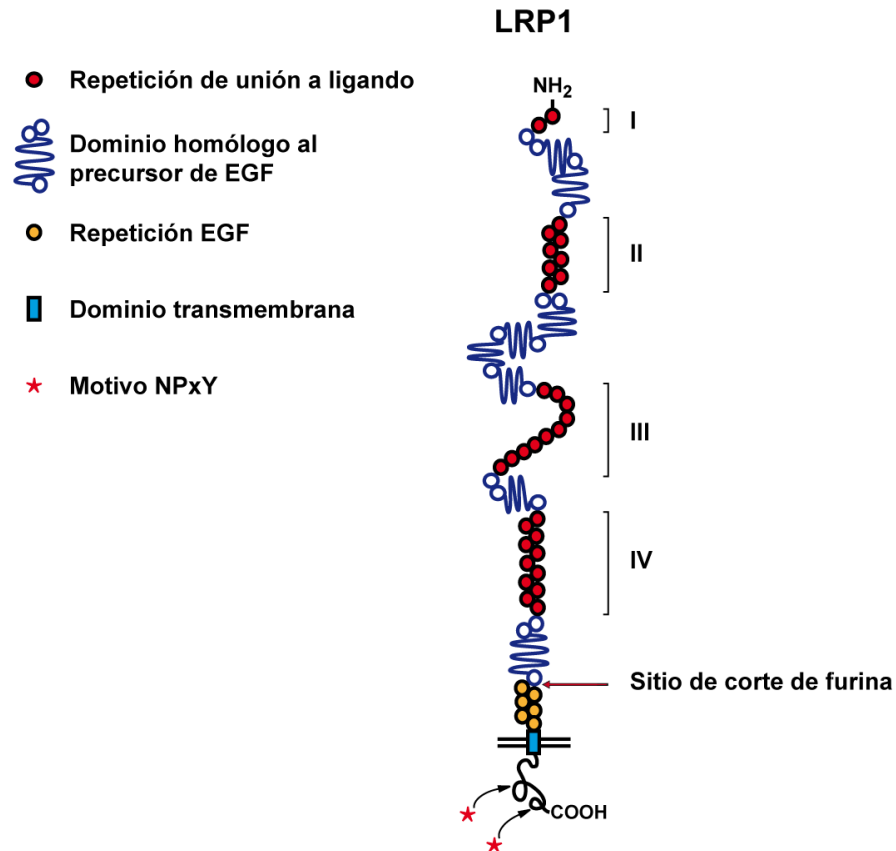


Figura 1.7. Esquema de la conformación estructural de LRP1. Los dominios I–IV representan los sitios de unión de ligandos. También se muestra el sitio de corte de furina en el compartimento de Golgi. Modificado de Herz y Strickland (Herz y Strickland, 2001).

1.3.4 LRP1 como receptor multiligando

El LRP1 es capaz de unir más de 40 ligandos funcionalmente no relacionados y promover la endocitosis y degradación en lisosomas de gran parte de ellos. De los ligandos reconocidos por LRP1, la mayoría se unen a los dominios II y IV de la subunidad α del receptor, a excepción de α_2M^* que se une a los dominios I y II (Mikhailenko y col., 2001). Es importante destacar que existe una proteína chaperona de 39 kDa residente en el retículo endoplasmático, conocida como RAP (del inglés *receptor associated protein*) que es capaz de interactuar con alta afinidad con todos los dominios de unión a ligandos de LRP1. Esta proteína cumple una función esencial durante el procesamiento post-traduccional de LRP1, ya que impide por acción alostérica la unión de otros ligandos durante el plegamiento de la proteína y su posterior exocitosis a la MP (Herz y col., 1991). La estructura primaria de RAP fue determinada en 1991 por Strickland y colaboradores

(Strickland y col., 1991) y mediante técnicas de biología molecular se generó un homólogo recombinante acoplado a GST (del inglés *glutathione S-transferase*) que puede ser utilizado de manera exógena con fines experimentales para inhibir la unión de ligandos a LRP1. En la tabla 1.3 se resumen algunos de los ligandos que interaccionan con LRP1 (Lillis y col., 2008).

Ligandos de LRP1			
<i>Proteínas involucradas en el metabolismo de los lípidos</i>			
Apolipoproteína E de lipoproteínas ricas en triglicéridos (apoE) Proteína activadora de esfingolípidos	β -VLDL	Lipoproteína lipasa	Lipasa hepática
<i>Proteasas y complejos inhibidor de proteasa-proteasa</i>			
α_2 M* y complejos α_2 M-proteasa	Complejos PZP-proteasa	Aprotinina	Complejos uPA-PAI
Complejos tPA-PAI	Trombina/Antitrombina III	Trombina/Proteasa Nexina-1	Complejos Neuroserpina-tPA
Inhibidor C1s-C1q	MMP-9	Complejos Trombospondina-2-MMP-2	Factor VIIa/TFPI
Factor Ixa	Proteína precursora amiloide (isoformas conteniendo KPI)	Pro-uPA/uPA	tPA
Complejos Trombina-PAI-1	Cofactor II	Neuroserpina	Elastasa/ α 1-anti-tripsina
Proteasa/Inhibidor de proteína C fXIa/Proteasa nexina 1	Trombina/Heparina	TFPI	fVIII/fVIIIa
<i>Proteínas de la MEC</i>			
Trombospondina 1	Trombospondina 2	Fibronectina	
<i>Proteínas intracelulares</i>			
RAP	Calreticulina	Proteína Tat de HIV	
<i>Factores de crecimiento</i>			
PDGF	Midkina	CTGF	TGF- β
<i>Otros</i>			
Lactoferrina	Ricina A	Saposina	Rhinovirus
Péptido A β (monómero)	Gentamicina	Polimicina B	Exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> (EAPs)
C3 (complemento)	Colectina (vía calreticulina)	Proteína Circumsporozoito	

Tabla 1.3. Ligandos de LRP1. uPA (del inglés *urokinase plasminogen activator*), tPA (del inglés *tissue plasminogen activator*), TFPI (del inglés *tissue factor pathway inhibitor*), CTGF (del inglés *connective tissue growth factor*). Extraído de Lillis y colaboradores (Lillis y col., 2008).

En cuanto a la subunidad β de LRP1, es importante mencionar que los motivos YxxL, LL y NPxY participan de la endocitosis del receptor, más allá de que los mecanismos moleculares involucrados en este proceso no se encuentran completamente esclarecidos (Donoso y col., 2009; Farfan y col., 2013; Herz y Strickland, 2001). De todos ellos, los motivos NPxY cobran especial interés debido a que también están presentes en otras proteínas de transmembrana como APP (del inglés *amyloid precursor protein*), β -integrinas y receptores tirosina quinasa, donde cumplen funciones adicionales a la de endocitosis al participar en la activación de la señalización intracelular (Ko y col., 2001; Lee y col., 2008). Los motivos NPxY interactúan con dominios proteicos denominados PTB (del inglés *phosphotyrosine binding domain*) presentes en diversas proteínas adaptadoras citosólicas. Estas proteínas adaptadoras, a su vez, son las encargadas de reclutar un conjunto adicional de moléculas que promueven la activación de vías de señalización intracelular (Beffert y col., 2006; Gotthardt y col., 2000). El LRP1 contiene dos motivos NPxY en el DIC de la subunidad β y, a través de ensayos de doble híbrido en levaduras, se ha demostrado que el motivo distal tiene el potencial de unir proteínas adaptadoras conteniendo dominios PTB (Gotthardt y col., 2000). Al presente, se desconoce bajo qué condiciones se promueve la interacción del DIC de LRP1 con las diferentes proteínas adaptadoras, así como tampoco se ha establecido si los diferentes ligandos de este receptor, incluida la α_2M^* , condicionan dicha interacción. No obstante, se sugiere que el mencionado motivo NPxY le confiere a LRP1 la propiedad de ser receptor de endocitosis y/o de señalización intracelular dependiendo del tipo de proteína adaptadora asociada al DIC, lo cual podría explicar la ausencia de redundancia funcional entre los ligandos que unen LRP1. En este sentido, se conoce que aunque todos los ligandos son endocitados por este receptor, no todos activan de manera redundante las mismas vías de señalización intracelular ni producen, por consiguiente, los mismos eventos celulares. Por ejemplo, α_2M^* activa vías de señalización del tipo MAPK/ERK responsables de promover síntesis de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias en macrófagos y células de Schwann; apoE activa la vía de supervivencia celular PKB (PI₃K/Akt) en neuronas; y lactoferrina activa AMPc y PKA, que regulan la producción de colágeno en fibroblastos (Bonacci y col., 2007; Caceres y col., 2010; Mantuano y col., 2011; May y col., 2005; Shi y col., 2011; Takayama y Takezawa, 2006).

En la tabla 1.4 se resumen algunas de las proteínas adaptadoras que interactúan con el DIC de la subunidad β de LRP1 así como también sus funciones.

Proteínas adaptadoras que se conoce interactúan con el DIC de la subunidad β de LRP1	
Proteína	Función
Dab1	Activación de Src, migración neuronal
Shc	Transducción de señales por proteínas tirosina quinasas
PKC α - β II	Proliferación (Bonacci y col., 2007; Caceres y col., 2010), apoptosis, diferenciación y motilidad
FE65 o APBB1	Actina, procesamiento de APP
PSD95	Acoplamiento a receptores NMDA
SEMCAP-1	Guía axonal
JIP1, JIP2	Vía MAPK
GLUP	Fagocitosis
Proteína similar a Talina	Acoplamiento a actina del citoesqueleto
OMP25	Transporte mitocondrial
CAPON	Síntesis de óxido nítrico
Proteína similar a la quinasa PIP4,5	Señalización vía inositol
ICAP-1	Señalización mediado por integrinas
Cbl	Ligasa E3, regulación negativa de proteína quinasas
PID1	Enfermedad de Alzheimer y obesidad (Caratu y col., 2007; Kajiwara y col., 2010)

Tabla 1.4. Lista de algunas proteínas adaptadoras que interactúan con el DIC de la subunidad β de LRP1. Dab1 (del inglés *disabled-1*), Src (del inglés *sarc*), Shc (del inglés *Src homology*), PKC α - β II (del inglés *protein kinase C*), FE65 o APBB1 (del inglés *Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1*), PSD95 (del inglés *postsynaptic density protein 95*), SEMCAP-1 (del inglés *M-SemF cytoplasmic domain-associated protein-1*), JIP (del inglés *JNK-interacting protein 1*), GLUP (del inglés *Glucose/galactose transporter protein*), OMP25 (del inglés *outer membrane protein 25*), CAPON (del inglés *carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein*), PIP4,5 (del inglés *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), ICAP-1 (del inglés *integrin cytoplasmic domain-associated protein-1*), Cbl (del inglés *Casitas B-lineage Lymphoma*) y PID1 (del inglés *phosphotyrosine interaction domain containing 1*). Modificado de Lillis y colaboradores (Lillis y col., 2008).

LRP1 también es capaz de asociarse con otros receptores transmembrana, tales como integrinas y receptores tirosina-quinasa. En este sentido, se han descrito interacciones de LRP1 con PDGFR β (del inglés *platelet-derived growth factor receptor β*), uPAR (del inglés *urokinase receptor*) y NMDAR (del inglés *N-methyl-D-aspartate receptor*), entre otros (Boucher y col., 2003; Gonias y col., 2011; May y col., 2004; Nakajima y col., 2013).

1.3.5 LRP1 como receptor endocítico

A partir de la interacción con sus ligandos, proteínas adaptadoras y otros receptores de transmembrana, LRP1 promueve un proceso endocítico mediado por clatrina, tal como

sucede con LDLR. No obstante, LRP1 ha sido localizado de manera transitoria en regiones de tipo *lipid rafts/caveolae* en asociación con los receptores uPAR y PDGFR β , con determinadas quinesinas y proteínas adaptadoras y en adipocitos cultivados en presencia de insulina (Boucher y col., 2002; Gonias y col., 2011; Kanai y col., 2014; Loukinova y col., 2002; Wu y Gonias, 2005; Zhang y col., 2004). Por su parte, aún no existe evidencia de que la interacción de LRP1 con alguno de sus ligandos, incluida la propia α_2M^* , pueda también inducir la relocalización celular del receptor a nivel de dominios de membrana ricos en caveolina.

En general, la unión de ligandos a receptores que endocitan vía clatrina genera un primer proceso de invaginación de la MP o *clathrin coated pit*, a partir del cual se produce el reclutamiento de la proteína AP2 (del inglés *adaptor-related protein type 2*). Luego, en estas regiones y por acción de proteínas tales como epsina y endofilina, se produce una invaginación que posteriormente da lugar a la formación de la vesícula endocítica. Posteriormente, dicha vesícula endocítica “primaria” se desprende de la MP por un proceso de fisión llevado a cabo principalmente por acción de dinamina. Paso siguiente, la vesícula se fusiona con endosomas de *sorting* preexistentes (Maxfield y McGraw, 2004). Estos endosomas son en su mayoría de naturaleza tubular, característica que les permite interactuar de forma simultánea con varias estructuras subcelulares. Su morfología les confiere la capacidad de direccionar moléculas hacia diferentes destinos dentro de la célula. Es así que pueden, por ejemplo, adquirir hidrolasas y generar una acidificación intra-lumen que provoca la disociación de algunos ligandos de sus receptores, iniciando un proceso madurativo hacia endosomas tardíos o LE (del inglés *late endosomes*) (Maxfield y McGraw, 2004). Al mismo tiempo, los endosomas de *sorting*, pueden fusionar con el CRE y transferir moléculas de su cargo para que sean devueltas a la MP (Maxfield y McGraw, 2004). También es posible que desde los endosomas de *sorting* algunas moléculas retornen directamente a la MP sin atravesar compartimentos adicionales. En resumen, los tres posibles destinos para una molécula dentro de los endosomas de *sorting* son: la MP, los LE y el CRE.

En lo que respecta a los ligandos de LRP1, si bien ingresan a la célula a través un mecanismo común, no todos tienen el mismo destino intracelular. Como se mencionó anteriormente, α_2M^* luego de su endocitosis sufre degradación a nivel de lisosomas

(Salzman y Maxfield, 1989; Yamashiro y col., 1984). No es el caso de la apolipoproteína E (apoE), la cual se acumula en endosomas de *sorting*, luego se disocia de su receptor y se ubica en endosomas que no contienen LRP1, desde donde recicla a la MP a través de partículas enriquecidas en HDL (Laatsch y col., 2012). Otro caso particular es el de la exotoxina A de *Pseudomonas* (EAP) la cual se acumula en el retículo endoplasmático y, al igual que apoE, evade la vía de degradación (Walters y Berwin, 2005). No obstante, para este último ligando se desconoce en qué tipo de endosoma se producen ambos, la disociación de LRP1 y la evasión de la vía de degradación. En forma conjunta, estas evidencias sugieren que no existen rutas endocíticas comunes para el transporte intracelular de los ligandos de LRP1, lo cual puede explicar en parte las funciones biológicas disímiles de este receptor en determinadas condiciones fisiológicas y patológicas.

En lo que respecta al reciclado de receptores desde endosomas de *sorting*, existen dos posibles rutas: la primera, denominada reciclado rápido y la segunda, reciclado lento. El reciclado rápido se produce directamente desde los endosomas de *sorting* a la MP y suele insumir unos 2 min promedio desde el ingreso del receptor al interior de la célula. En este tipo de reciclado es importante el rol que cumple la GTPasa Rab4. Por su parte, el reciclado lento se produce a través del CRE, previo paso por endosomas de *sorting* o el compartimento de Golgi (el cual mantiene un intercambio bidireccional constante de moléculas con el CRE). Este proceso le insume a la célula al menos unos 12 min desde el inicio de la endocitosis del receptor. En este tipo de reciclado juega un papel preponderante la GTPasa Rab11. Por último, es importante mencionar que, además del reciclado a través del CRE, los receptores pueden regresar a la MP desde el compartimento de Golgi sin atravesar compartimentos subcelulares intermedios. Una proteína clave en este tipo de transporte intracelular es la GTPasa Rab8, que además regula el equilibrio entre este compartimento y el retículo endoplasmático.

En relación al reciclado endocítico de LRP1 hay evidencias suficientes para suponer que existe más de una vía posible de retorno a la MP. En este sentido, se demostró en adipocitos la existencia de dos *pools* de LRP1 con diferente cinética de movimiento hacia la MP, un *pool* de reciclado rápido y otro de reciclado lento o de no reciclado, que involucran distintos compartimentos subcelulares (Habtemichael y col., 2011). A su vez, en células epiteliales polarizadas se demostró que la interacción de LRP1 con SNX17 (del inglés

sorting nexin 17), a través del motivo NPxY de la subunidad β del receptor, regula su reciclado baso-lateral desde los endosomas de *sorting* basolaterales a la MP, a diferencia de lo que sucede durante la vía biosintética donde LRP1, previo paso por el TGN, llega a la MP a través del CRE (Donoso y col., 2009; Farfan y col., 2013).

1.3.6 Distribución subcelular de LRP1

La distribución topográfica de LRP1 en relación a los tejidos donde se expresa y, dentro de ellos, la ubicación subcelular que adopta, también es clave para el desempeño de sus funciones. Por ejemplo, en hígado LRP1 actúa principalmente como un receptor depurador o “*scavenger*” de lipoproteínas (Lillis y col., 2008), mientras que en macrófagos y en CM su interacción con α_2M^* promueve, en el primer caso, la expresión del gen que codifica para MMP-9 (Bonacci y col., 2007; Caceres y col., 2010) y en el segundo caso, la expresión de la proteína GFAP (Barcelona y col., 2011).

Otro factor determinante en la actividad regulatoria de LRP1, es su nivel de expresión en los diferentes tipos celulares. En cardiomiocitos y células de músculo liso vascular o VSMC (del inglés *vascular smooth muscle cells*) de pacientes con cardiomiopatía isquémica, la expresión génica de *lrp1* se encuentra incrementada (Cal y col., 2012; Castellano y col., 2011; Llorente-Cortes y col., 2011). Por su parte, nuestro grupo de investigación demostró que en macrófagos de ratón, insulina induce una disminución significativa de LRP1, sin cambios en sus niveles de ARN mensajero (ARNm) (Ceschin y col., 2009). En relación al nivel de este receptor en la MP, ha sido reportado que insulina modula su función endocítica en adipocitos promoviendo su redistribución y el incremento de su tasa de internalización (Corvera y col., 1989; Descamps y col., 1993). Es también conocido que *in vivo* e *in vitro*, insulina estimula la translocación de LRP1 desde vesículas intracelulares a la MP en hepatocitos, lo que se correlaciona con un incremento en la captación de ligandos del receptor (Laatsch y col., 2009). Algunos aspectos de esta regulación parecen ser similares a la de la captación de glucosa en adipocitos y VSMC, la cual es mediada por la translocación de GLUT4 (del inglés *glucose transporter type 4*) desde vesículas respondedoras a insulina o IRV (del inglés *insulin-responsive vesicle*) a la MP (Rea y James, 1997). En este punto, resulta interesante destacar que LRP1 es una de las

proteínas constitutivas mayoritarias de las IRV (Bogan y Kandror, 2010; Jedrychowski y col., 2010; Kandror y Pilch, 2011).

A modo de corolario, podría decirse que la activa participación de LRP1 en diversos procesos fisiológicos y patológicos puede explicarse a partir de su capacidad de interactuar con un gran número de ligandos, promover su endocitosis y a la vez regular los procesos biológicos que devienen de esas interacciones, que resultan ser tan disímiles como la naturaleza de las moléculas que une.

1.4 Relación funcional de la interacción de α_2 M con LRP1

La α_2 M y su receptor específico LRP1 tienen una activa participación en la remodelación de la MEC, la migración y la proliferación celular, procesos claves de la inflamación. La α_2 M es capaz de regular la proteólisis extracelular, inhibiendo un amplio espectro de proteasas. Por su parte, LRP1 une los complejos α_2 M-proteasa y los depura mediante un mecanismo de endocitosis y degradación a nivel de lisosomas. Esta interacción produce una señalización intracelular que da lugar a un incremento en la proliferación y la migración del componente celular inflamatorio.

En referencia a α_2 M, si bien se conoce que su endocitosis culmina con su degradación en lisosomas (Salzman y Maxfield, 1989; Yamashiro y col., 1984), al presente se desconoce en qué tipo de endosoma se disocia de LRP1. Por este motivo, el establecimiento de la ruta endocítica de α_2 M y LRP1 podría ser clave para entender las diversas acciones celulares que cumple este ligando, principalmente en lo que respecta a la activación de vías de transducción de señales y al reciclado propiamente dicho de su receptor. A su vez, el hecho de que LRP1 sea un receptor endocítico y de señalización intracelular, sumado a su facultad de asociarse con otros receptores de transmembrana, así como también su capacidad de unir más de 40 ligandos funcionalmente no relacionados y un significativo número de proteínas adaptadoras, lo posiciona como un importante modulador de diversos procesos celulares. Probablemente la regulación de su actividad esté definida a partir del tipo y concentración de ligando que une, la ruta endocítica/de reciclado que sigue y el nivel y clase de señalización que provoca.

En CM (cultivos primarios y línea celular MIO-M1), resultados de nuestro grupo de investigación demostraron que la interacción de α_2M^* con LRP1 provoca un aumento de MT1-MMP y TIMP-2 tanto a nivel de ARNm como de proteína, con el consecuente incremento de la activación de proMMP-2. Se observó además la relocalización de estas proteínas en las protrusiones celulares y el aumento de la migración celular sobre matrices proteicas (colágeno tipo I y laminina), sin producir cambios en la tasa de proliferación celular (Barcelona, 2010). Si bien se ha demostrado fehacientemente que estos procesos celulares son inducidos por α_2M^* , aún se desconoce si son mediados por su interacción con LRP1 (Barcelona, 2010). En este sentido, se demostró que esta asociación ligando-receptor provoca la formación de una asociación molecular de MT1-MMP con LRP1, aunque aún resta dilucidar cuáles son las implicancias de esta interacción, dónde tiene lugar (a nivel celular) y cuál es su relación con el incremento en la migración celular. El establecimiento de estos mecanismos contribuirá al entendimiento de los procesos bioquímicos y celulares que promueven el desarrollo de patologías con una exacerbada remodelación de la MEC, como son las afecciones de la retina asociadas con procesos isquémicos y neurodegenerativos del tipo RDP, ROP y retinopatía asociada a anemia falciforme. Dado que las CM cumplen un rol clave a nivel metabólico y protector de la neurona, se constituyen en un excelente modelo para el estudio los procesos fisiológicos y patológicos que se producen a partir de la interacción de α_2M^* con su receptor LRP1.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue investigar aspectos moleculares y celulares de la interacción de α_2M^* con su receptor LRP1. Dentro de este marco general se pretendió dilucidar si α_2M^* cumple algún rol en la regulación del transporte intracelular de LRP1, así como también en la inducción de la migración celular. De este modo, este trabajo de tesis presenta una nueva perspectiva en el estudio bioquímico y celular de la participación de α_2M y LRP1 en el control de la proteólisis extracelular y la activación del componente celular implicado en la remodelación de la MEC, eventos que tienen lugar durante la progresión de diversos procesos fisiológicos y patológicos, tales como la angiogénesis, la inflamación, el cáncer y las afecciones isquémicas de la retina del tipo retinopatía diabética proliferativa, retinopatía del prematuro y retinopatía asociada a anemia falciforme.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Investigar el transporte intracelular de α_2M^* y LRP1, caracterizando:
 - a) la ruta de internalización de α_2M^* ,
 - b) la distribución y localización subcelular de LRP1 en presencia de α_2M^* , y
 - c) el reciclado endocítico y/o la exocitosis de LRP1 desde vesículas intracelulares hacia la MP.
- 2) Evaluar mecanismos moleculares y celulares por los que α_2M^* induce el incremento de la migración celular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Químicos

Acetato de sodio	EACA	NaCl
Acetato de Zn	EDTA ácido	NaH ₂ PO ₄
Ácido acético glacial	Etanol	NaOH
Ácido bórico	Extracto de levadura	NH ₄ Cl
Ácido nítrico	Glicerol	Ortovanadato de sodio
Ácido ortofosfórico	Glicina	Paraformaldehído
Acrilamida	GM6001	PEG 8000
Agar-agar	H ₂ SO ₄	Peróxido de hidrógeno
Agarosa	HCl	Persulfato de amonio
Albúmina sérica bovina	HEPES	PMSF
Ázida de sodio	IPTG	Ponceau S
Azul brillante de Coomassie R-250	KCl	Sacarosa
Azul de bromofenol	KH ₂ PO ₄	Saponina
β-mercaptoetanol	Leche en polvo descremada	SDS
Bicarbonato de sodio	Metanol	TEMED
CaCl ₂	Metilamina-HCl	Tripteína (Triptona)
Cloroformo	MgSO ₄	Tris
Colágeno tipo I	Mowiol 4-88	Tritón X-100
D-glucosa	N,N'-metil-bis-acrilamida	Tween 20
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Na ₂ EDTA	Urea
Ditiotritol	Na ₂ PO ₄	

3.1.2 Material de laboratorio

Cubreobjetos de vidrio Ø 12 mm	©Marienfeld-Superior
Cubreobjetos de vidrio Ø 25 mm	Assistent®
<i>Chambered coverglass</i>	Nunc™ Lab-Tek™ Thermo Scientific
Membrana de nitrocelulosa	GE Healthcare Amersham
Placa de 100/60/35 mm	Greiner BioOne
Placa <i>multiwell</i> de 6-/24- wells	Greiner Bio-One
Placa <i>multiwell</i> de 96 wells para ELISA	Greiner Bio-One
Portaobjetos de vidrio 76 x 26 mm	©Marienfeld-Superior
Scrapers	Greiner Bio-One
Tubos eppendorf 0,5/1,5 mL	Greiner Bio-One
BioMax light film ultrasensible	Kodak
Hyperfilm ECL	GE Healthcare Amersham
MagRack 6	GE Healthcare Amersham

3.1.3 Equipamiento

Citómetro de Flujo: BD FACSCanto™ II *flow cytometer* (BD Biosciences, San Jose, CA)

Microscopio confocal FV1000: Microscopio confocal invertido espectral con las siguientes líneas de láseres: 405, 458, 488, 515, 543 y 633 nm. Equipado para DIC y con cámara de incubación para experimentos de *live-cell*.

Microscopio confocal FV300: Microscopio confocal invertido de filtros con los siguientes líneas de láseres: 405, 458, 488, 515 y 543 nm. Equipado con DIC.

Microscopio de epifluorescencia: Nikon TE2000U

Microscopio TIRF Nikon: Microscopio manual de iluminación TIRF invertido. Láseres: 488, 543.

Equipamiento menor: MiniProtean III (con módulo para mini *trans blot*), centrífuga refrigerada Thermo Sorvall™, baño termostatzado Vicking SRL, estufa de cultivo, *shaker* rotacional y de balanceo.

3.1.4 Kits y reactivos

Kits

Crosslink anticuerpos	GE Healthcare Amersham
Protein labeling kits (Alexa flúor 488 y Alexa flúor 594)	Molecular Probes®
Kit para MiniPreps	©Qiagen
Kit para MidiPreps	PureLink®
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific

Reactivos

GlutaMAX™	Gibco®
DMEM High Glucose	Gibco®
DMEM High Glucose suplementado con GlutaMAX™	Gibco®
<i>Penicillin/Streptomycin</i> 10 000 U/mL	Gibco®
Cóctel de inhibidores de proteasas	Sigma-Aldrich
DQ™ BSA <i>red</i>	Molecular Probes®
EZ Link Sulfo-NHS-SS Biotina	Thermo Scientific
<i>Hoestch</i> 33258	Molecular Probes®
Lipofectamine® 2000	Invitrogen
Siport NeoFX siRNA	Invitrogen
Lysotracker <i>red</i> DND-99	Molecular Probes®
N-Rh-PE	
<i>Peroxidase-conjugated Streptavidin</i>	Thermo Scientific
Transferrina Alexa flúor 594	Molecular Probes®
Suero fetal de cabra	PAA
Trypsin 0,5% EDTA	Gibco®
HEPES	Gibco®
OPTI MEM I	Gibco®
Protein G Mag Sepharose	GE Healthcare Amersham
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare Amersham

Chelating Sepharose Fast Flow (Cod. N° 17057501) GE	GE Healthcare Amersham
Imidoacetic Acid Sepharose (Cod. N° T4510-10 mL) Sigma	Sigma
TRIZol®	Invitrogen

3.1.5 Anticuerpos

Anticuerpo primario	Aplicación/dilución	Marca comercial
Calreticulina	WB: 1/5000 IF: 1/1500	Santa Cruz
Caveolina	IF: 1/250	AbCam
Clatrina	IF: 1/250	AbCam
EEA1	IF: 1/500	AbCam
Giantina	IF: 1/1000	Covance
LRP1 α	IP: 1/100 μ g prot. tot.	Serotec
LRP1 α -PE	CF: 1/100	Serotec
LRP1 β	WB: 1/10 000 IF: 1/250	AbCam
MT1-MMP	WB: 1/1000 IF: 1/100	AbCam
Rab4	IF: 1/100	AbCam
Rab5	IF: 1/250	AbCam
Rab7	IF: 1/500	AbCam
α_2 M	WB: 1/1000	Dako
β -actina	WB: 1/2500	AbCam

Anticuerpo secundario	Dilución	Marca comercial
Goat anti-mouse Alexa flúor 488	IF: 1/800	Molecular Probes®
Goat anti-mouse Alexa flúor 594		
Goat anti-mouse Alexa flúor 647		
Goat anti-rabbit Alexa flúor 488		
Goat anti-rabbit Alexa flúor 594		
Goat anti-rabbit Alexa flúor 647		
Goat anti-mouse IgG (H+L) - HRP	WB: 1/5000	Novex®
Goat anti-rabbit IgG - HRP		

3.1.6 Plásmidos

Construcción	Procedencia
mLRP4-GFP	Ceschin DG, Chiabrande Lab.
MT1-MMP-GFP	Jian Cao, Universidad de <i>Stony Brook</i> , <i>Stony Brook, Nueva York, EE.UU.</i>
Rab11-GFP	Claudio Fader, Colombo Lab.
Rab11-RFP	Claudio Fader, Colombo Lab.
Rab11S25N-GFP	Claudio Fader, Colombo Lab.
Rab7-GFP	Claudio Fader, Colombo Lab.
shRNA-LRP1	Laatsch A, Heeren Lab.
siRNA-LRP1	Ambion (Austin, TX, EE.UU.)
siRNA-MT1-MMP	Ambion (Austin, TX, EE.UU.)
siRNA-Random	Ambion (Austin, TX, EE.UU.)
Vector GFP	Claudio Fader, Colombo Lab.
Vector RFP	Claudio Fader, Colombo Lab.

3.1.7 Medios, buffers y soluciones

Geles de poliacrilamida (electroforesis y Western blot)

<u>Buffer de corrida</u> 3,03 g Tris base 14,4 g glicina 1,0 g SDS H ₂ O c.s.p. 1000 mL	<u>Buffer de transferencia</u> 3,03 g Tris base 14,4 g glicina 200 mL metanol (20%) H ₂ O c.s.p. 1000 mL	<u>TBS 10X (cell signaling)</u> 8 g NaCl 2,4 g Tris base H ₂ O c.s.p. 1000 mL pH 7,6
<u>Resolving buffer</u> 18,5 g Tris base H ₂ O c.s.p. 100 mL pH 8,8	<u>Stacking buffer</u> 10 g Tris base H ₂ O c.s.p. 100 mL pH 6,8	<u>TBST</u> TBS 1X 0,5% Tween-20
<u>Solución de SDS 10%</u> 10 g SDS H ₂ O c.s.p. 100 mL	<u>Solución de persulfato de amonio</u> 10 g persulfato de amonio H ₂ O c.s.p. 100 mL	<u>Solución de bloqueo para Western blot</u> 5 g leche descremada TBST c.s.p. 100 mL
<u>Solución de acrilamida/bis acrilamida 30%</u> 29 g acrilamida 1 g N,N'-metil-bis-acrilamida H ₂ O c.s.p. 100 mL	<u>Solución de incubación con anticuerpo</u> 5 g albúmina sérica bovina TBS 1X c.s.p. 100 mL	<u>Sample buffer</u> 1,25 mL <i>stacking buffer</i> 2,5 mL glicerol 2 mL SDS al 10% 0,2 mL Azul de bromofenol 0,5% (v/v) H ₂ O c.s.p. 9,5 mL
<u>Solución colorante</u> 0,25 g Azul Brillante de Coomassie R-250 45,0 mL metanol 10 mL ácido acético glacial H ₂ O c.s.p. 100 mL	<u>Solución de Fijación de Geles</u> 30 mL etanol 10 mL ácido acético glacial H ₂ O c.s.p. 100 mL	<u>Solución decolorante</u> 30 mL metanol 10 mL ácido acético glacial H ₂ O c.s.p. 100 mL

Células eucariotas

<u>HBSS 10X (sin Ca & Mg)</u> 4 g KCl 0,6 g KH ₂ PO ₄ anhidro 80 g NaCl 0,48 g Na ₂ HPO ₄ anhidro 10 g D-glucosa H ₂ O c.s.p. 1000 mL pH 7,4	<u>PBS 10X</u> 80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ anhidro 2,4 g KH ₂ PO ₄ anhidro H ₂ O c.s.p. 1000 mL pH 7,4	<u>Medio de cultivo celular</u> DMEM <i>High gluocose</i> 4,5 g/L 10% SFC 50 U/mL P/S 1% Glutamax (células MIO-M1)
--	---	--

Medio para congelar células eucariotas 2X

2 mL DMSO
8 mL SFC

Medio de incubación

53 mg CaCl₂
19,53 mg MgSO₄
80 mg KCl
1360 mg NaCl
24,4 mg NaH₂PO₄
200 mg D-glucosa
440 mg bicarbonato de sodio
H₂O c.s.p. 200 mL

Medio para transfección de células eucariotas

OPTIMEM
SFC 10%

Solución de lisis no desnaturalizante

20 mM Tris-HCl
137 mM NaCl
10% de glicerol
1% Triton-X100
Na₂EDTA 2 mM
pH 8,0
1 mM PMSF
10 mM orto-vanadato de sodio
Inhibidores de proteasas

Detaching buffer

10 mM D-glucosa
3 mM Na₂EDTA
PBS 1X
pH 7,4

Solución de lisis RIPA

50 mM Tris-HCl pH 8
150 mM NaCl
1% Tritón X-100
0,5% desoxicolato de sodio
0,1% SDS
1 mM PMSF
10 mM orto-vanadato de sodio
Inhibidores de proteasas

FACS buffer

2% SFC
5 mM Na₂EDTA
0,1% ázida de sodio
En PBS 1X

Immunofluorescencia directa e indirecta

Solución fijadora (IFI y FD)

4% paraformaldehído
4% sacarosa
PBS 1X

Solución de quenching

50 mM NH₄Cl en PBS 1X

Solución de bloqueo y permeabilización para IFI 100X

20 g albúmina sérica bovina
5 g saponina
PBS 1X c.s.p. 100 mL

Solución para incubación de anticuerpos (IFI)

Solución de bloqueo y permeabilización 1X

Solución de montaje

2,4 g Mowiol 4-88
6 g glicerol
6 mL H₂O
12 mL buffer fosfato 0,2 M

Zimografía

Buffer enzima

50 mM de Tris-HCl
200 mM NaCl
5 mM de CaCl₂
pH 7,5

Bacterias

LB

10 g tripeína (triptona)
5 g extracto de levadura
10 g NaCl
H₂O c.s.p. 1000 mL
Autoclavar 20 min a 121 °C

LB low

10 g tripeína (triptona)
5 g extracto de levadura
5 g NaCl
H₂O c.s.p. 1000 mL
Autoclavar 20 min a 121 °C

LB-Agar

100 mL LB
1,5 g agar-agar
Autoclavar 20 min a 121° C

Purificación de α_2 -Macroglobulina

Solución de precipitación

125 g PEG 8000
H₂O c.s.p. 250 mL

Solución para la remoción de impurezas de la columna

9 g Urea
H₂O c.s.p. 25 mL

Buffer A

1,5 g EDTA Ácido
2,9 g NaCl
H₂O c.s.p. 100 mL
pH 7

Buffer B

0,5 g acetato de Zn
H₂O c.s.p. 100 mL
pH 6

Buffer C

2,1 g acetato de sodio
0,9 g NaCl
H₂O c.s.p. 100 mL
pH 5

Buffer D

16,4 g NaH₂PO₄
9 g Na₂HPO₄
93,5 g NaCl
H₂O c.s.p. 2000 mL
pH 6,5

Buffer E

0,53 g NaH₂PO₄
0,09 g Na₂HPO₄
2,2 g NaCl
H₂O c.s.p. 250 mL
pH 6

Buffer F

0,08 g acetato de sodio
0,88 g NaCl
H₂O c.s.p. 100 mL
pH 5

TBS para transformación de α_2 M

36,3 g Tris base
5,8 g NaCl
H₂O c.s.p. 2000 mL
pH 7,2

Solución de transformación de α_2 M

3,03 g Tris base
6,75 g Metilamina-HCl
H₂O c.s.p. 500 mL
pH 8

Gel native para α_2 -Macroglobulina

Resolving buffer

0,57 g Tris base
2 M HCl para pH 5,7
H₂Od c.s.p. 50 mL

Stacking buffer

0,33 g Tris base
2 M H₂SO₄ para pH 6,1
H₂Od c.s.p. 50 mL

Sample buffer

X mL de *stacking buffer*
8% azul de bromofenol
10% glicerol

Buffer de corrida

4,97 g Tris base
2,47 g ácido bórico
H₂Od c.s.p. 1000 mL

Purificación de GST-RAP

2xYT

16 g tripeína (triptona)
10 g extracto de levadura
5 g NaCl
H₂Od c.s.p. 1000 mL
Autoclavar 20 min a 121 °C

Binding buffer

PBS 1X

Elution buffer

50 mM Tris-HCl
10 mM glutatión reducido
pH 8

Solución de inducción

100 mM IPTG en H₂Od

3.1.8 Líneas celulares y cepas bacterianas

3.1.8.1 Células eucariotas

Línea celular MIO-M1: es una línea de células gliales de Müller aisladas de retinas humanas y espontáneamente inmortalizadas. *In vitro* crecen como una monocapa no confluyente de células adherentes, homogéneamente distribuidas en toda la superficie de la placa de cultivo. Presentan morfología bipolar, una membrana celular de aspecto rugoso y forman proyecciones citoplasmáticas. Cuando se encuentran en confluencia adquieren forma alargada y adoptan una morfología del tipo fibroblasto, aunque conservan el aspecto rugoso de la membrana. Según los autores, se considera que la línea celular MIO-M1 (del inglés *Moorfields/Institute of Ophthalmology-Müller 1*) es la primera línea de células de Müller reportada en la literatura (Limb y col., 2002b). Fueron generosamente donadas a la Dra. María Cecilia Sanchez (CIBICI-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, FCQ-UNC) por la Dra. Gloria Astrid Limb (*UCL Institute of Ophthalmology*, Reino Unido), a través de un convenio establecido por las autoridades de ambas instituciones.

Línea celular HeLa: es una línea de células aisladas de adenocarcinoma de cérvix humano. Son células adherentes de morfología epitelial. Fueron adquiridas a la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC) y son de origen ATCC.

Línea celular HT1080: es una línea de células aisladas de fibrosarcoma de tejido conectivo humano. Son células adherentes de morfología epitelial. Fueron generosamente donadas por el Dr. Francesco Blasi (IFOM, Italia) y son de origen ATCC.

3.1.8.2 Bacterias

***E. coli* BL21:** se emplearon para la purificación de la proteína recombinante GST-RAP.

***E. coli* DH5 α :** se emplearon para la purificación de plásmidos utilizados en ensayos de transfección transiente de células eucariotas.

***E. coli* TOP10:** se emplearon para la purificación de plásmidos utilizados en ensayos de transfección transiente de células eucariotas.

3.1.9 Software

Adobe Photoshop CS4

Adobe Illustrator CS4

Adobe InDesign CS4

ImageJ

Fiji

Huygens Essential

FlowJo

FluoView 4.0

NisElements Viewer

Graphpad Prism 5.0

Microsoft Office 2007

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos de biología celular

Transfecciones transientes de células MIO-M1

El día previo a la transfección se repicaron las células en medio sin antibióticos a una confluencia del 80-90%. Al día siguiente se realizaron las mezclas de reacción, considerando para cada μg de plásmido, 2 μL de Lipo2000 (relación 1:2). Para la realización de las mezclas correspondientes se siguieron las especificaciones del fabricante.

Mientras transcurrieron los tiempos de incubación de los complejos, las células se lavaron exhaustivamente con HBSS 1X. Luego se adicionó a cada *well* la cantidad necesaria de medio para transfección de células eucariotas que permitió cubrir el volumen mínimo de trabajo, según el fabricante de las placas. Finalmente se procedió a adicionar la mezcla DNA/Lipo2000 correspondiente para cada *well*.

La transfección se llevó a cabo durante 4 h y luego de dicho período de tiempo se retiró el medio de reacción y se reemplazó con medio de cultivo celular. Los ensayos se llevaron a cabo 48-72 h luego de la transfección.

Ensayo de unión-endocitosis

Células MIO-M1 sobre *coverslips* de vidrio o placas de petri de plástico fueron lavadas con PBS 1X a 4 °C (3 x 5 min) y colocadas sobre hielo para detener el transporte intracelular (esta condición de temperatura se mantuvo hasta la etapa de endocitosis). Luego fueron incubadas con diluciones a 4 °C de $\alpha_2\text{M}^*$, $\alpha_2\text{M}^*$ Alexa⁴⁸⁸ o $\alpha_2\text{M}^*$ Alexa⁵⁹⁴ (60 nM) durante 30 min. Paso siguiente se llevaron a cabo lavados con PBS 1X a 4 °C (5 x 5 min) para remover el ligando no unido. Finalmente, las células se llevaron a 37 °C y se incubaron con medio de incubación durante los tiempos requeridos por el ensayo. Una vez cumplidos dichos tiempos, para frenar la endocitosis del ligando, se colocaron nuevamente sobre hielo y se lavaron con PBS 1X a 4 °C (2 x 5 min). En el caso de los ensayos con $\alpha_2\text{M}^*$ Alexa⁴⁸⁸ y $\alpha_2\text{M}^*$ Alexa⁵⁹⁴, salvo las condiciones de control de unión de ligando, el resto se sometieron a lavados ácidos fríos (1 x 5 min) con *buffer* glicina a 4 °C para eliminar los ligandos unidos pero no endocitados luego de la etapa de internalización. Paso siguiente se neutralizaron con medio volumen de solución neutralizadora y se lavaron con PBS 1X (2 x

3 min), ambos a 4 °C, para finalmente ser fijadas o lisadas para ensayos de microscopía o WB, respectivamente.

Ensayo de endocitosis continua o estimulación con α_2M^*

Células MIO-M1 cultivadas en medio de cultivo celular, fueron lavadas con HBSS e incubadas con medio de incubación durante 30 min previo al ensayo. Paso siguiente se lavaron nuevamente con HBSS y se sometieron a las correspondientes incubaciones con α_2M^* , α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ o α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ (60 nM) en medio de incubación. Luego se procesaron para MC o WB.

Fluorescencia directa

Células MIO-M1 sobre *coverslips* de vidrio pre-adsorbidos con colágeno tipo I fueron fijadas con solución de paraformaldehído/Sacarosa 4% en PBS por 10 min y luego incubadas en solución de *quenching* por 20 min. Finalmente previos lavados con PBS (3 x 5 min en *shaker*) se montaron sobre portaobjetos de vidrio con solución de montaje. Se dejaron secar *overnight* a TA y al abrigo de la luz.

Inmunofluorescencia indirecta

Células MIO-M1 sobre *coverslips* de vidrio pre-adsorbidos con colágeno tipo I fueron fijadas con solución de paraformaldehído/Sacarosa 4% en PBS por 10 min, luego incubadas en solución de *quenching* por 20 min y permeabilizadas con solución de permeabilización y bloqueo por 25 min. Paso siguiente se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en solución de dilución de anticuerpos a 37 °C por 60 min. Luego se lavaron con solución de permeabilización y bloqueo (5 x 3 min en *shaker*) y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos. Finalmente previos lavados con PBS (3 x 5 min en *shaker*) se montaron sobre portaobjetos de vidrio con solución de montaje. Se dejaron secar *overnight* a TA y al abrigo de la luz.

Microscopía TIRF

Células MIO-M1 sobre *coverslips* de vidrio de (25 mm) previamente sometidas a ensayos de estimulación con ligandos fueron procesadas mediante IFI para LRP1 y se mantuvieron en PBS hasta su observación (no se realizó montaje). Los vidrios se dispusieron en un

accesorio especial que permitió utilizar como base el *coverslip* con las células y como medio PBS 1X.

Microscopía FRAP

Se siguieron los procedimientos detallados en (Zheng y col., 2011).

Citometría de flujo para proteínas de superficie

Células MIO-M1 sobre placas *multiwell* de 6 *wells* previamente sometidas a ensayos de estimulación con α_2M^* fueron procesadas para citometría de flujo. Brevemente, luego de los ensayos de estimulación las placas se colocaron sobre hielo y se lavaron con PBS 1X frío (5 x 3 min), de manera de detener la reacción. Luego se les realizó un lavado con *buffer* glicina (1 x 5 min) para despegar los ligando unidos al receptor. Paso siguiente se neutralizó con medio volumen de solución neutralizadora y se levantaron mediante *scraper* en 1 mL por *well* de *detaching buffer*. Se centrifugaron a 4 °C 5 min a 2500 rpm. Los pellets se lavaron con FACS *buffer* (3 x 30 s con *vortex*) y se incubaron con diluciones de los anticuerpos correspondientes durante 30 min en hielo y al abrigo de la luz. Finalmente se adquirieron en el citómetro de flujo sin fijación previa.

Citometría de flujo para determinar porcentaje de transfección

Células MIO-M1 sobre placas *multiwell* de 6 *wells* previamente sometidas a ensayos de transfección transiente de plásmidos específicos se levantaron con solución de tripsina EDTA 10X por 60 s a 37 °C y se centrifugaron 5 min a 2500 rpm. Se levantaron en FACS *buffer* y se adquirieron en el citómetro de flujo sin fijación previa.

Ensayo de migración bidimensional en la herida

Las actividades de migración celular se examinaron mediante un ensayo de *wound-scratch* de 2 dimensiones en placas *multiwell* de 6 *wells* recubiertas con colágeno tipo I (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; Sigma-Aldrich). Las células MIO-M1 (5×10^5 células/pocillo) se cultivaron durante 48 h a 37 °C en DMEM de alta glucosa conteniendo FCS al 10% y L-glutamina 2 mM con CO_2 al 5%, seguido de incubación durante la noche hasta agotamiento de suero. En cada pocillo, se realizó una lesión lineal en el centro de la monocapa de células MIO-M1 con un tip estéril de 10 μL . Esta técnica produce una herida pronunciada carente de células, de aproximadamente 35 mm de largo y 400 μm de ancho. Luego, los *wells* se enjuagaron dos

veces con medio libre de suero para eliminar los residuos de células, y se añadieron 2 mL de DMEM de alta glucosa sin rojo de fenol. Las células fueron tratadas con α_2M^* 60 nM a diferentes tiempos. Para bloquear la unión c-LRP1, las células fueron tratadas previamente con GST-RAP 400 nM durante 30 min. Luego de 24 horas post-transfección con siRNA-MT1-MMP, siRNA-LRP1 o shRNA-LRP1, las células MIO-M1 se cultivaron tal como se indicó previamente. Experimentos similares se llevaron a cabo con células MIO-M1 transfectadas con los plásmidos GFP-wt-Rab11 y GFP-Rab11S25N. La migración celular se midió siguiendo el procedimiento descrito previamente (Liang y col., 2007). Brevemente, en diferentes tiempos (0 y 12 h), se adquirieron 3 imágenes aleatorias por condición de la herida usando un dispositivo de carga acoplada (CCD) de la cámara (Nikon) en un microscopio de campo brillante (microscopio invertido Nikon TU-2000; Nikon, Tokyo, Japón) con un objetivo 10X (0,3 NA). Cada imagen representa un área promedio del equivalente de la herida de $5 \times 10^5 \pm 1 \times 10^4 \mu m^2$ registrado en tiempo 0 h. Las células que invaden esta área se contaron en tiempo 12 h, y los resultados se expresaron como células por área.

3.2.2 Métodos bioquímicos

Western blot

Extractos proteicos de células MIO-M1, HeLa y/o HT1080 (15–35 μg de proteínas totales) se diluyeron en *buffer* de muestra 5X en ausencia o presencia de DTT según se requirió de condiciones no reductoras o reductoras, respectivamente, a partir de las especificaciones de los fabricantes de los anticuerpos primarios. Las muestras sin DTT se incubaron a 65 °C durante 10 min y las muestras con DTT a 95 °C durante 5 min. Luego fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (7,5%, 10%, ó 12% de acrilamida/bis-acrilamida) en presencia de SDS (EGPA-SDS). La corrida se llevó a cabo a voltaje constante (100 V) durante al menos 120 min. Luego las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en *buffer* de transferencia durante 60 min a voltaje constante (100 V), se bloquearon con *buffer* de bloqueo para WB durante 60 min y se incubaron con una dilución del anticuerpo primario en *buffer* de incubación para WB a 4 °C *overnight* en *shaker*. Al día siguiente, previos lavados con TBS 1X se incubaron con una dilución 1:5000 de un anticuerpo secundario anti-especie conjugado con HRP durante 60 min. Paso siguiente,

previos lavados con TBS 1X se revelaron por reacción de quimioluminiscencia en placas radiográficas ultrasensibles.

Purificación de α_2M

La α_2M se purificó a partir de muestras de plasma de varones sanos de acuerdo al método descrito por Chu y Pizzo, 1994. Brevemente, el procedimiento consistió en una precipitación diferencial de proteínas con PEG 8000 al 6% y al 16%, seguido por una cromatografía de afinidad en columna (usando *Chelating Sepharose Fast Flow*). El protocolo de cromatografía consistió en los siguientes pasos: 1- preparación de la columna (limpieza con 10–30 mL de solución de urea 6 M y lavado con 300–500 mL de H₂O MilliQ ultrapura); 2- equilibrado de la columna (50 mL de *buffer A*, 150 mL de H₂O MilliQ ultrapura, 60 mL de *buffer B*, 50 mL de *buffer C* y 60 mL de *buffer D*); 3- siembra (pasaje de la muestra, 100 mL de *buffer D*, 150 mL de *buffer E*); y 4- elución con *buffer F*.

Transformación de α_2M con metilamina

La metilamina es una amina primaria nucleofílica que produce una reducción de la unión tiol-éster intracadena contenida en cada subunidad de 180 kDa de α_2M . De esta manera se produce un cambio conformacional en la molécula de α_2M similar a lo ocurrido luego de la interacción con proteasas, con la consiguiente exposición del dominio RBD (α_2M^*) (Barrett y col., 1979). Este tratamiento se llevó a cabo incubando α_2M con metilamina 200 mM en Tris-HCl 50 mM; pH 8 durante 2 h a TA. Luego la mezcla fue dializada exhaustivamente contra TBS pH 7,2 para eliminar el exceso de metilamina libre. La α_2M^* fue evaluada por ensayos de EGPA en condiciones no desnaturizantes (5% de acrilamida/bis acrilamida), (Van Leuven y col., 1981a; b) lo cual permitió diferenciar el cambio de movilidad electroforética ocurrida en la α_2M^* respecto a α_2M . Para la realización de los geles nativos se emplearon las soluciones y *buffers* previamente detalladas.

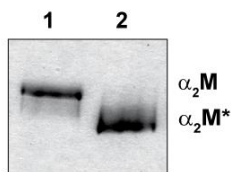


Figura 2.1. Evaluación de la actividad biológica de α_2M^* por EGPA no desnaturizante al 5%. 1) α_2M nativa, 10 μ g. 2) α_2M^* , 10 μ g. Las proteínas fueron visualizadas por tinción con azul brillante de *Coomassie R-250*.

Conjugación química de α_2M con moléculas fluorescentes

Para la conjugación química de α_2M^* con Alexa flúor 488 y Alexa flúor 594 se emplearon los kits para marcación de proteínas respectivos (Molecular Probes® *Protein Labeling Kits*), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Purificación de GST-RAP

Colonias únicas de bacterias BL21 transformadas con el plásmido pGEX que expresa la proteína recombinante GST-RAP, fueron incubadas *overnight* en medio 2xYT en presencia de ampicilina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (iniciador). Al día siguiente se inocularon 100 mL de medio 2xYT con 1 mL de iniciador y se incubó a 37 °C con agitación hasta que se alcanzó una A_{600} 0,5-2. Luego se procedió a la inducción con solución de IPTG a una concentración de 0,1-1 mM final durante 2 h. Paso siguiente se centrifugó a 7700 x g durante 10 min a 4 °C. Finalmente, las bacterias se re-suspendieron en 5 mL de PBS 1X y se lisaron en hielo por sonicación. Se agregó Tritón X-100 a una concentración final de 1% y se centrifugó a 12000 x g para eliminar *debris* producto de la lisis. Paso siguiente se procedió a purificar la proteína GST-RAP mediante la utilización de una columna *Glutathione Sepharose 4B*, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Inhibición de unión de ligandos a LRP1 con GST-RAP

Para inhibir la interacción de α_2M^* con LRP1, células MIO-M1 cultivadas en medio de cultivo celular, fueron lavadas con HBSS e incubadas con GST-RAP 400 nM en medio de incubación durante 30 min previo al ensayo. Paso siguiente se lavaron nuevamente con HBSS y se sometieron a las correspondientes incubaciones con GST-RAP 400 nM junto con α_2M^* 60 nM en medio de incubación.

Biotinilación de proteínas de superficie

Inmediatamente después de finalizados los tratamientos (incubaciones con ligandos como α_2M), las células MIO-M1 se lavaron con PBS 1X frío sobre hielo para detener la reacción. Luego se incubaron con *buffer* glicina frío durante 3 min para remover ligandos unidos al receptor, la cual se neutralizó con medio volumen de solución neutralizadora fría. Finalmente las células se lavaron con PBS 1X frío y se incubaron durante 60 min con una solución de *EZ-linked Sulfo-NHSS-SS-Biotin* 0,1 mg/mL en PBS 1X pH 8.

Inmunoprecipitación de proteínas

Células MIO-M1 se cultivaron a 37 °C durante 24 h en DMEM de alta glucosa conteniendo FCS al 10%, L-glutamina 2 mM y CO₂ al 5%. Luego, las células fueron tratadas con 60 nM α_2M^* durante diferentes tiempos, y los extractos de proteínas celulares se prepararon usando *buffer* de lisis no desnaturizante (20 mM Tris-HCl, NaCl 137 mM, 10% de glicerol, 1% Triton-X100 y EDTA 2 mM, pH 8,0) conteniendo 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Los extractos proteicos se incubaron *overnight* a 4 °C con uno de los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón: anti-MT1-MMP, anti-subunidad β del LRP1 (Clon MCA1965; AbD Serotec, Oxford, Reino Unido), o la IgG no inmune de ratón como control IP (código ab81032; Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.) (1 μ g/200 μ g de proteínas totales) unidos con 50 mM de dihidrocloruro de dimetil pimelimidato (DMP) a la proteína G de perlas magnéticas de Sepharose, según las indicaciones del fabricante (protein G Mag Sepharose; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).

RT-PCR

Para evaluar el ARNm específico de LRP1, células MIO-M1 se trataron con el reactivo TRIzol® (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) y se extrajo ARN total en un solo paso mediante el uso del kit de extracción RNeasy Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para medir el nivel de transcritos de LRP1, se utilizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando *hexaprimers* al azar. Los *primers* específicos para *lrp1* y *gadph* fueron:

lrp1 forward 5'- AGTGCTGCCCAGACACAGCTCAAGTGTG-3'

lrp1 reverse 5'-CACAATCTTGCTGTGCGACGAGCTTGGTG-3'

gadph forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

gadph reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Para la amplificación se utilizaron veintisiete ciclos (hibridación, 58 °C 60 s; extensión, 72 °C 45 s y desnaturización, 94 °C 30 s). Los productos de PCR fueron evaluados en un gel de agarosa al 2% y para su detección por fluorescencia se utilizó SYBR® *Safe DNA* (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina).

Zimografía

Para evaluar la actividad gelatinolítica de proteasas en sobrenadantes de cultivos celulares, se emplearon ensayos de zimografía en EGPA-SDS copolimerizada con gelatina al 1,5 mg/mL como sustrato (Lombard y col., 2005). Las muestras fueron diluidas en *buffer* de muestra 5X. Los geles fueron lavados durante 90 min con 2,5% (v/v) Triton X-100 y la actividad de MMP fue desarrollada a 37 °C en *buffer* enzima durante 24 h. Posteriormente los geles fueron teñidos con *Azul Brillante de Coomassie R-250* (125 mg/dL) y decolorados en solución decolorante (Murphy y Crabbe, 1995). Las zonas de lisis en la gelatina fueron evidenciadas como bandas claras en contraste con el fondo oscuro producto de la coloración.

Silenciamiento de LRP1 y MT1-MMP

Para inhibir la expresión de LRP1, células MIO-M1 fueron transfectadas transitoriamente con un siRNA, sintetizado por Ambion (Austin, TX, EE.UU.), de acuerdo con las secuencias *target* de LRP1 previamente publicadas (Llorente-Cortes y col., 2002). El siRNA-LRP1 consistió en un oligonucleótido 15-mer (5'-CGGCGGGGTCAGCAT-3') complementario a la región del ARNm de LRP1 comprendida entre los nucleótidos 466 y 481. En las transfecciones celulares se utilizó un siRNA aleatorio (Ambion AM4636) como control negativo. Además, el silenciamiento de LRP1 también se llevó a cabo con shRNA dirigido contra la región 3' no traducida del ARNm de LRP humano *wild type* (5'-GAACTCTCCCTTCCCAGAATTAGCTAATTCTGGGAAGGGAGAGTTCTT-3' pos 14.493-14.518 del ARNm endógeno humano LRP; 3'-UTR no codificante, número de acceso X13916), el cual fue proporcionado amablemente por el Dr. Alexander Laatsch (Centro Médico Universitario Hamburg-Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Para inhibir la expresión de MT1-MMP, las células MIO-M1 fueron transfectadas transitoriamente con siRNA-MT1-MMP (siRNA ID s8879, Ambion). El siRNA-MT1-MMP consistió en un oligonucleótido de 21-mer (5'-GCAACAUAUUGAAAUCACACU-3'). Los procedimientos se realizaron utilizando el agente de transfección Siport NeoFX siRNA (Ambion) para siRNA y Lipofectamine 2000 (Invitrogen) para shRNA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los casos, los experimentos se realizaron 24 h

después de la transfección. Para probar el nivel de silenciamiento de la proteína, LRP1 se evaluó mediante análisis de *Western blot* en las células transfectadas.

3.2.3 Adquisición de imágenes de microscopía

Las imágenes para análisis de colocalización se obtuvieron mediante el empleo de los microscopios de fluorescencia confocal FV300 y FV1000. Secciones ópticas simples de dobles y triples marcaciones de células MIO-M1 fueron adquiridas utilizando objetivos PLAPON 60X *Oil/1,42* NA y un muestreo o *scanning* a 8 μ s/pixel en modo secuencial por línea.

3.2.4 Procedimientos para cuantificación de imágenes y análisis estadístico de los datos

Comparación estadística de medias

En el caso de resultados derivados de dos condiciones experimentales, la comparación estadística de las medias se llevó a cabo mediante la prueba τ -*Student* para muestras independientes, mientras que en situaciones donde las condiciones experimentales fueron más de dos, se realizó análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Se graficaron las medias \pm DE o SEM. En ambos casos valores de $p < 0,05$ determinaron diferencias significativas.

Cálculo de coeficientes de colocalización de Manders

Los coeficientes de colocalización de Manders se calcularon mediante el empleo del programa informático *ImageJ* a través del *plugin JAPoC* (Bolte y Cordelieres, 2006). Al menos 20 células por condición fueron analizadas.

Las imágenes binarias de los pixeles que colocalizaron se obtuvieron a partir del empleo del *plugin Colocalization Highlighter*.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización subcelular de la interacción α_2M /LRP1

4.1.1 Expresión de LRP1 en la línea de células gliales de Müller MIO-M1

Considerando que el modelo celular seleccionado para el desarrollo experimental del presente trabajo de tesis fue la línea de células de Müller humanas espontáneamente inmortalizadas, MIO-M1, se procedió a determinar mediante ensayos de *Western blot*, el nivel de expresión de LRP1 en este tipo celular. En la figura 4.1 A se muestra que las células MIO-M1 expresaron el receptor de manera constitutiva, lo cual fue evidenciado por la detección de la banda de 85 kDa perteneciente a la subunidad β de LRP1. En la figura 4.1 B se muestra un análisis comparativo de dicha expresión con la de otras líneas celulares, tales como HeLa y HT1080, las cuales son comúnmente utilizadas para estudiar aspectos funcionales de este receptor (Llorente-Cortes y col., 2006; Selvais y col., 2011). Estos resultados permitieron determinar que el nivel de expresión constitutivo de LRP1, en células MIO-M1, fue significativamente mayor al observado en células derivadas de tumor, HeLa y HT1080. Esto, sumado a las ventajas que proporciona su naturaleza no tumoral y a su capacidad para conservar en cultivo *in vitro* los aspectos distintivos del tejido al que pertenecen, convirtió a las células MIO-M1 en un modelo experimental propicio para el estudio de la interacción de este receptor con su ligando α_2M^* , así como también para la extrapolación de la implicancia funcional de dicha interacción a nivel de la retina.

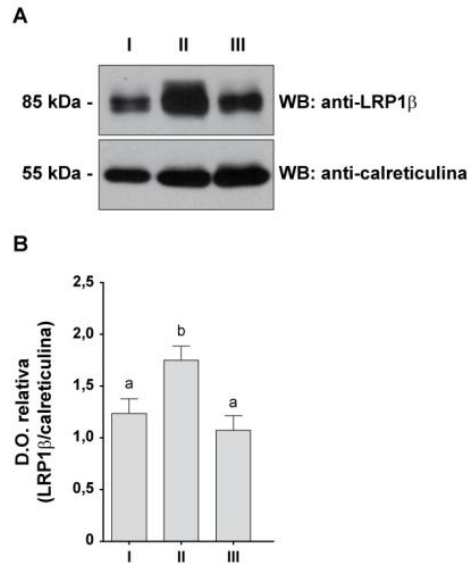


Figura 4.1. Ensayo de *Western blot* para la evaluación del nivel de expresión de LRP1 en células MIO-M1. A) Imagen radiográfica representativa de los análisis de *Western blot* (WB) de tres experimentos independientes para la inmunodetección de la subunidad β de LRP1 en las líneas celulares humanas HeLa (I), MIO-M1 (II) y HT1080 (III). Se utilizó como control de carga proteica la inmunodetección de la proteína calreticulina. B) Medias \pm DE de las densidades ópticas (D.O.) relativas (respecto a calreticulina) de las bandas correspondientes a LRP1 β para los tres tipos celulares evaluados. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.1.2 Endocitosis de α_2M^* en células MIO-M1

Con el propósito de caracterizar la ruta endocítica de α_2M^* , dicho ligando fue conjugado químicamente con dos fluoróforos: Alexa flúor 488 y Alexa flúor 594, dando lugar a dos formas fluorescentes de la proteína denominadas α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y α_2M^* Alexa⁵⁹⁴. Esto permitió evaluar su ruta de internalización en células MIO-M1, a través de ensayos de endocitosis seguidos de su detección mediante fluorescencia directa (FD). Al mismo tiempo se llevó a cabo la marcación de diferentes compartimentos subcelulares, a través de inmunofluorescencia indirecta (IFI) de proteínas específicas tales como EEA1 (del inglés *early endosome antigen 1*) y Rab7, o a través de FD de trazadores fluorescentes tales como Transferrina Alexa⁵⁹⁴ (Tf Alexa⁵⁹⁴), DQ-BSA *red* y el lípido fluorogénico N-Rh-PE (del inglés *N-(Lissamine) rhodamine B sulfonyl dioleoylphosphatidylethanolamine*). Para la observación de las muestras y la adquisición de las imágenes se utilizaron técnicas de microscopía de fluorescencia confocal (MC), las cuales se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos detallados en Materiales y métodos.

4.1.2.1 Establecimiento de la ruta endocítica de α_2M^*

Como fue previamente descrito, se conoce que α_2M^* se une a LRP1 mediante la interacción de su dominio RBD con los dominios de unión a ligandos I y II del receptor. Luego ingresa a la célula mediante un mecanismo de endocitosis mediado por clatrina y sigue una ruta de internalización que culmina con su degradación a nivel de lisosomas. Sin embargo, la secuencia de compartimentos subcelulares que ocupa este ligando en su trayecto hacia los lisosomas aún no ha sido completamente caracterizada, así como tampoco en qué tipo de endosomas tiene lugar la disociación de su receptor. Distinto es el caso de transferrina (Tf), la cual es internalizada vía clatrina por su receptor (TfR) y, a diferencia de lo que sucede con α_2M^* y LDL, entre otras, no sufre degradación a nivel de lisosomas puesto que permanece unida a su receptor y junto a él recicla a la MP (Maxfield y McGraw, 2004). Por este motivo, Tf conjugada con fluoróforos es comúnmente utilizada como trazador de la vía de endocitosis y de reciclado endocítico celular, esta última previamente descrita como la “vía de reciclado lento”. Ensayos de internalización conjunta de Tf y LDL fluorescentes en células HEP-2, permitieron diferenciar las rutas de reciclado endocítico de las rutas de endocitosis y degradación en lisosomas. Al respecto, se conoce que el ingreso de ambas proteínas a la célula se lleva a cabo compartiendo las mismas vesículas endocíticas, del tipo endosomas de *sorting* (Ghosh y col., 1994). Luego de los primeros minutos de endocitosis (~2,5 min de iniciado el proceso) se observa la salida de Tf desde los endosomas de *sorting* hacia el CRE. Desde este compartimento, el regreso de Tf a la MP se concreta en ~7 min, al mismo tiempo que los endosomas de *sorting* suspenden la recepción de nuevas moléculas de LDL y maduran hacia endosomas tardíos, proceso que demanda ~17 min (Ghosh y col., 1994).

Con el propósito de caracterizar las rutas de endocitosis y degradación de α_2M^* en comparación con las de Tf, se determinó el nivel de colocalización en función del tiempo de endocitosis de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y Tf Alexa⁵⁹⁴. Para ello se llevaron a cabo ensayos de unión-endocitosis conjunta de ambas proteínas fluorescentes durante diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min). Tal como se detalla en Materiales y métodos, la etapa de unión de ligandos a LRP1 en células MIO-M1 se llevó a cabo a 4 °C, condición de temperatura que se utiliza comúnmente para inhibir el transporte intracelular. La etapa de endocitosis se llevó a cabo a 37 °C.

En la figura 4.2 es posible apreciar que transcurridos los primeros 5 min de internalización, los endosomas que contenían α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y Tf Alexa⁵⁹⁴ eran vesículas puntuales ampliamente distribuidas en el citoplasma celular. Luego de los 10 min de endocitosis estas vesículas se relocalizaron en la región perinuclear de la célula formando estructuras tubulares compatibles con endosomas de *sorting*. En simultáneo, las vesículas que sólo contenían Tf Alexa⁵⁹⁴ se reubicaron principalmente en la región yuxtannuclear de la célula, describiendo una acumulación de alta densidad de ligando característica del CRE. A partir de los 30 min, el botón yuxtannuclear Tf Alexa⁵⁹⁴ positivo disminuyó paulatinamente su densidad, lo cual probablemente estuvo relacionado con el reciclado de Tf a la MP.

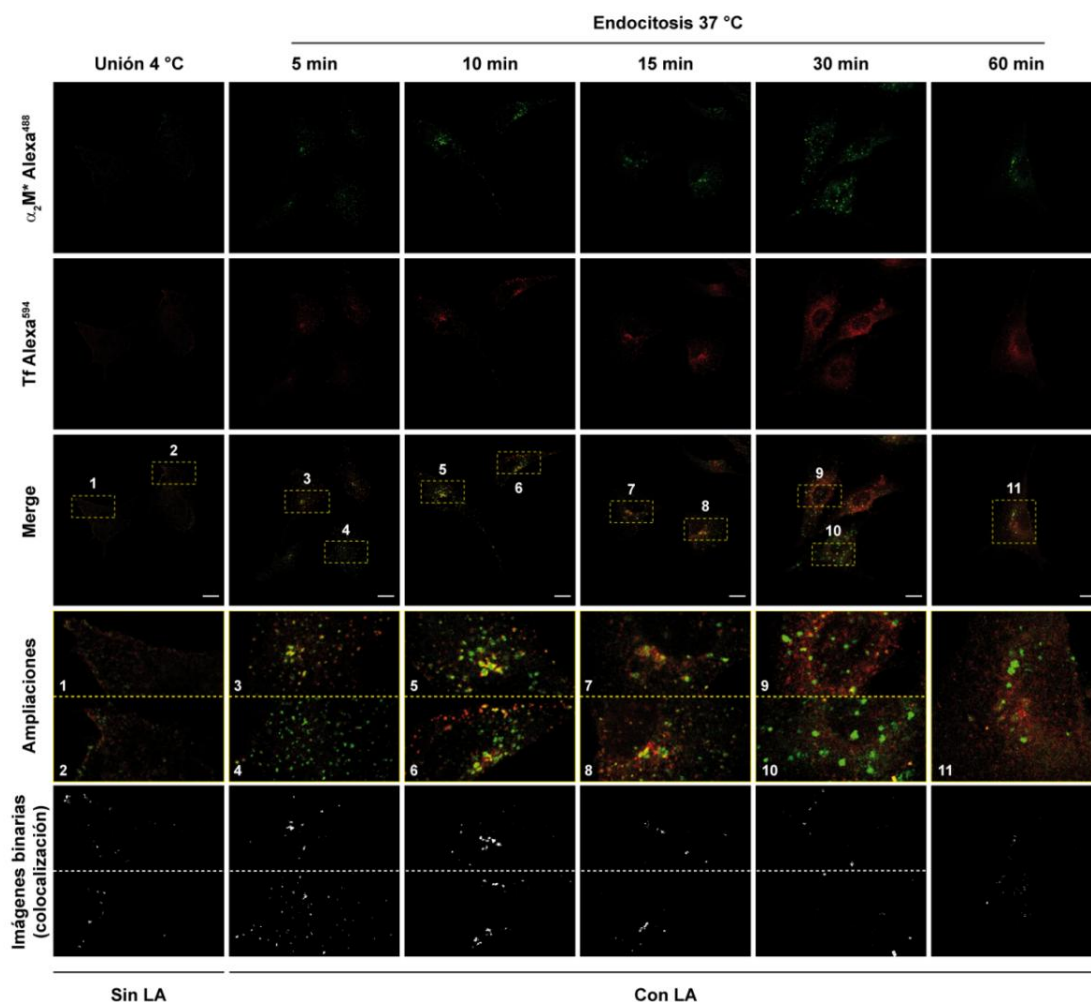


Figura 4.2. Endocitosis conjunta de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y Tf Alexa⁵⁹⁴ en células MIO-M1. Ensayo de unión-endocitosis de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y Tf Alexa⁵⁹⁴ seguido de FD y analizado por MC. Luego de la etapa de endocitosis, se realizaron lavados ácidos fríos (LA), tal como se detalla en Materiales y métodos, de manera de minimizar la señal de los ligandos unidos pero no endocitados que permanecieron en la MP luego de la incubación a 37 °C. La figura muestra la distribución subcelular de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ (primera fila), de Tf Alexa⁵⁹⁴ (segunda fila) y de la colocalización de ambas proteínas (tercera fila) en función del tiempo de endocitosis. También se observan ampliaciones (cuarta fila, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares con mayor densidad de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸, provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros 1–11), y sus correspondientes imágenes binarias (quinta fila), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de al menos 15 imágenes por condición provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 15 μ m.

Respecto a la proporción de vesículas que contenían α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y eran Tf Alexa⁵⁹⁴ positivas, durante la etapa de unión de los ligandos o *binding* (a 4 °C) fue del $14 \pm 3\%$, a los 5 min de endocitosis fue del $43 \pm 14\%$ y a los 10 min alcanzó el $50 \pm 9\%$, siendo éste el máximo nivel de colocalización observado. A los 15 min el porcentaje se redujo al $32 \pm 13\%$ y continuó disminuyendo hasta 7 ± 3 y $6 \pm 2\%$ a los 30 y 60 min, respectivamente. Es importante destacar que a los 10 min de iniciado el proceso endocítico, la proporción de

vesículas que contenían Tf Alexa⁵⁹⁴ y eran α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ positivas (relación inversa a la previamente descrita, $42 \pm 13\%$) fue menor que la observada a los 5 min de internalización ($54 \pm 10\%$), lo cual puede estar relacionado con la salida de Tf desde los endosomas de *sorting* hacia el CRE y con la maduración de los endosomas de *sorting* conteniendo α_2M^* a LE.

A partir de estos resultados se concluyó que α_2M^* y Tf compartieron la etapa temprana de endocitosis, permaneciendo en endosomas de *sorting* durante los primeros 10 min de internalización. A partir de los 15 min de endocitosis, ambas proteínas disminuyeron su nivel de colocación y se relocalizaron en compartimentos subcelulares diferentes, hecho probablemente motivado por el reciclado endocítico de Tf a la MP desde el CRE y por la maduración simultánea de los endosomas de *sorting* conteniendo α_2M^* a compartimentos subcelulares posteriores (del tipo LE).

4.1.2.2 Participación de vesículas EEA1 y Rab7 positivas en la endocitosis de α_2M^*

Con el propósito de continuar caracterizando la vía endocítica de α_2M^* en células MIO-M1 se realizaron ensayos de unión-endocitosis para α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y α_2M^* Alexa⁵⁹⁴, durante diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min), seguidos de las respectivas inmunodetecciones de EEA1 (marcador de EE) y Rab7 (marcador de LE). Las figuras 4.3 y 4.4 muestran que aún cuando α_2M^* estaba conjugada con diferentes fluoróforos, presentó el mismo patrón de distribución en relación al tiempo de internalización: los endosomas que contenían α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ o α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ fueron vesículas puntuales que se distribuyeron de manera homogénea en todo el citoplasma celular.

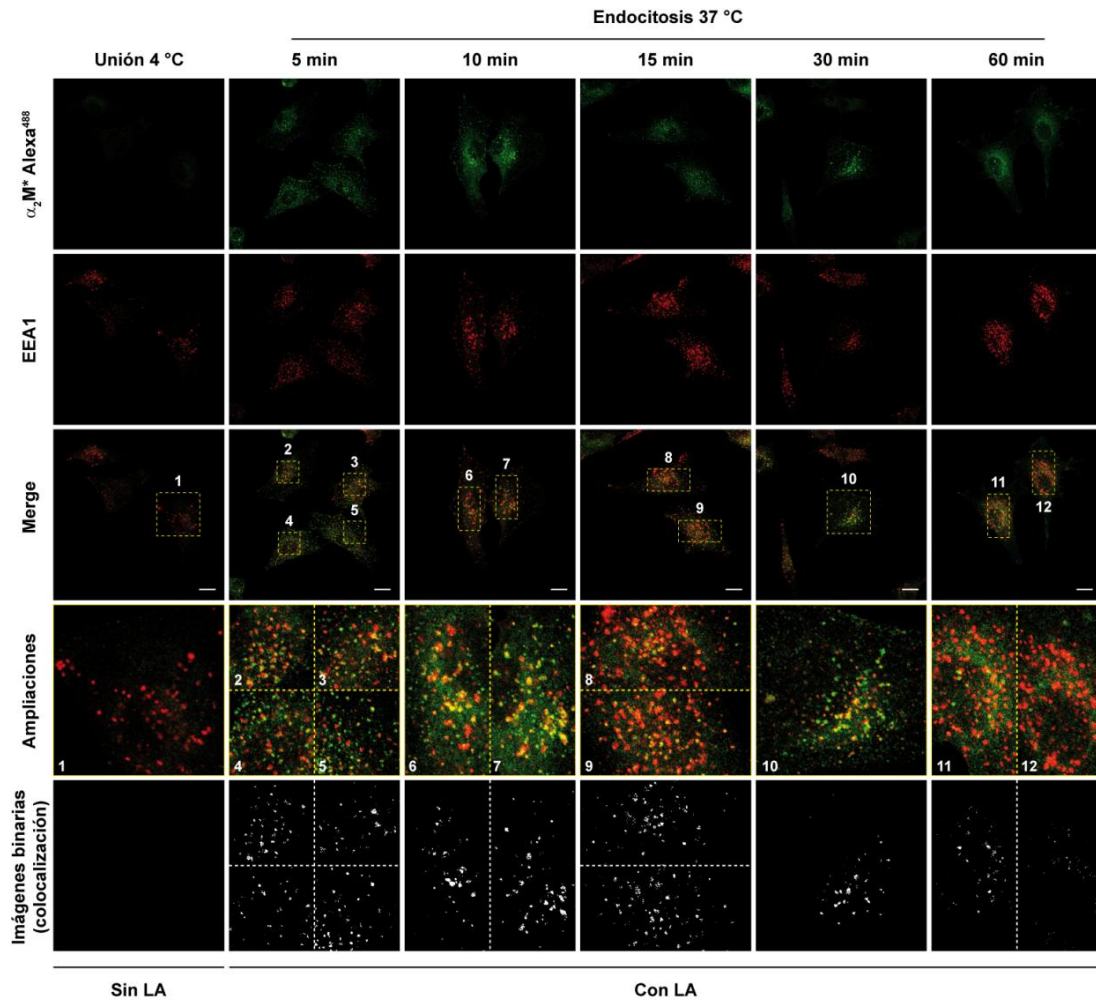


Figura 4.3. Colocalización de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ con el marcador de endosomas tempranos EEA1 en función del tiempo de endocitosis del ligando. Ensayo de unión-endocitosis de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ en células MIO-M1 seguido de FD e IFI para EEA1 y analizado por MC. Luego de la etapa de endocitosis, se realizaron lavados ácidos fríos (LA), tal como se detalla en Materiales y métodos, de manera de minimizar la señal de los ligandos unidos pero no endocitados que permanecieron en la MP luego de la incubación a 37 °C. La figura muestra la distribución subcelular de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ (primera fila), de EEA1 (segunda fila) y de la colocalización de ambas proteínas (tercera fila) en función del tiempo de endocitosis. También se observan ampliaciones (cuarta fila, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares con mayor densidad de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros 1–12), y sus correspondientes imágenes binarias (quinta fila), en las que se muestran en color blanco los píxeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de al menos 15 imágenes por condición provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 15 μ m.

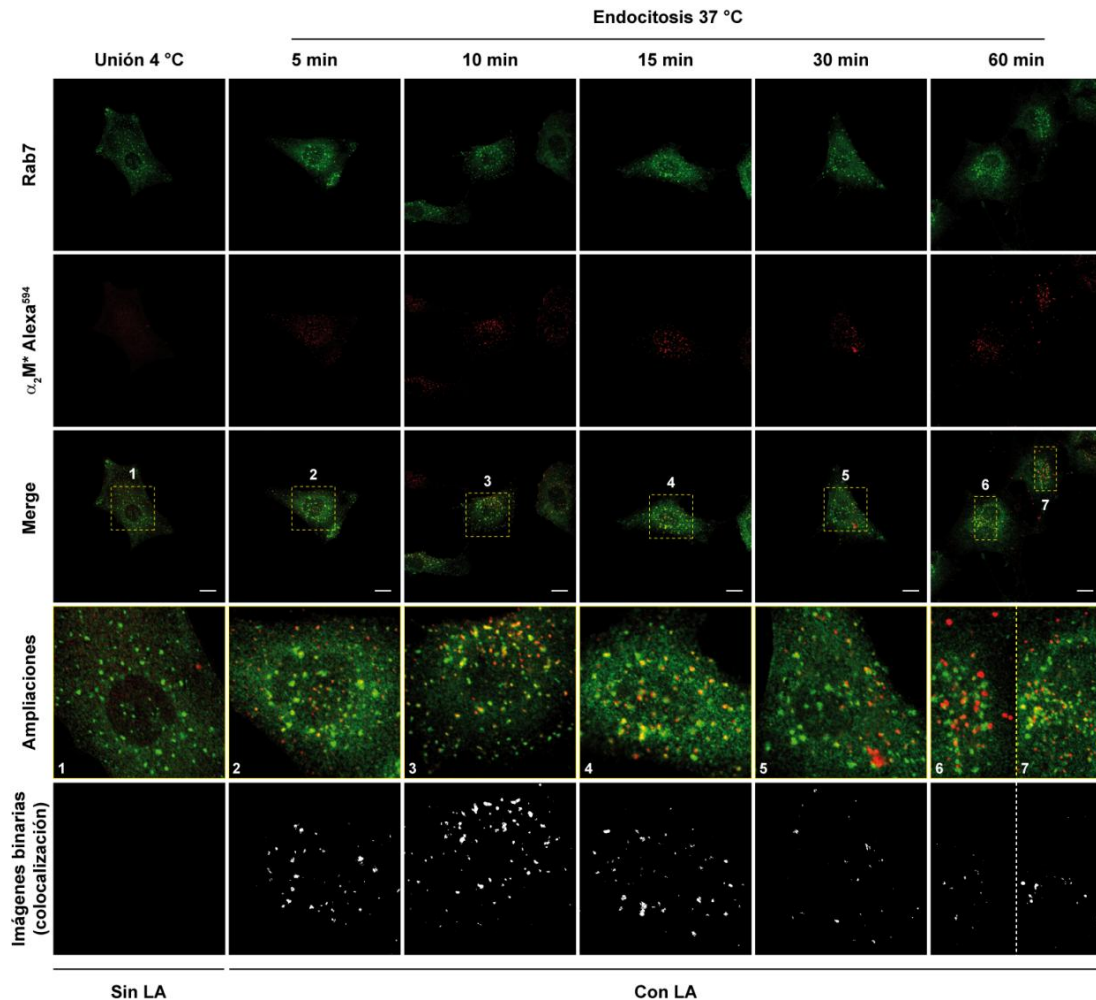


Figura 4.4. Colocalización de α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ con el marcador de endosomas tardíos Rab7 en función del tiempo de endocitosis del ligando. Ensayo de unión-endocitosis de α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ en células MIO-M1 seguido de FD e IFI para Rab7 y analizado por MC. Luego de la etapa de endocitosis, se realizaron lavados ácidos fríos (LA), tal como se detalla en Materiales y métodos, de manera de minimizar la señal de los ligandos unidos pero no endocitados que permanecieron en la MP luego de la incubación a 37 °C. La figura muestra la distribución subcelular de Rab7 (primera fila), de α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ (segunda fila) y de la colocalización de ambas proteínas (tercera fila) en función del tiempo de endocitosis. También se observan ampliaciones (cuarta fila, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares con mayor densidad de α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros 1–7) y sus correspondientes imágenes binarias (quinta fila), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de al menos 15 imágenes por condición provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 15 μ m.

En las figuras también se observa que luego de transcurridos 5 min de internalización, α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ se encontró principalmente en vesículas EEA1 positivas (figura 4.3 recuadros de 2 a 5) mientras que, al mismo tiempo de endocitosis, la proporción de α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ en vesículas Rab7 positivas fue menor (figura 4.4 recuadro 2). Esto se confirmó a partir del análisis de los coeficientes de colocalización de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y α_2M^* Alexa⁵⁹⁴

con los respectivos marcadores subcelulares en función del tiempo de endocitosis (figura 4.5). La proporción de vesículas que contenían α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y eran EEA1 positivas fue máxima ($44 \pm 12\%$) a los 5 min de endocitosis del ligando respecto a los otros tiempos analizados, mientras que la proporción de vesículas que contenían α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ y eran Rab7 positivas fue mínima a los 5 min ($16 \pm 9\%$) y máxima a los 10 min de endocitosis del ligando ($47 \pm 16\%$). A partir de este último tiempo y hasta los 60 min de endocitosis, la proporción de vesículas que contenían α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y eran EEA1 positivas siguió una misma tendencia de disminución que la observada para la proporción de vesículas que contenían α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ y eran Rab7 positivas, alcanzando los valores más bajos al final del ensayo ($18 \pm 8\%$ para α_2M^* Alexa⁴⁸⁸/EEA1 y $14 \pm 8\%$ para α_2M^* Alexa⁵⁹⁴/Rab7).

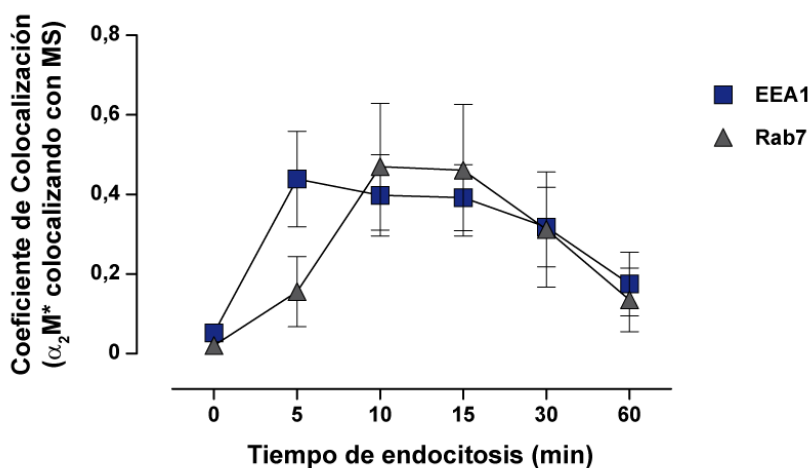


Figura 4.5. Coeficientes de colocación de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ con EEA1 y α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ con Rab7 en función del tiempo de endocitosis del ligando. Los coeficientes de colocación (coeficientes de Manders) fueron obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición provenientes de tres experimentos independientes (cuyas imágenes representativas se muestran en las figuras 4.3 y 4.4). Estos coeficientes indican la proporción de vesículas, en función del tiempo de endocitosis, que contenían α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y α_2M^* Alexa⁵⁹⁴ y eran positivas para el marcador subcelular (MS) correspondiente (EEA1 o Rab7).

A partir de estos resultados se concluyó que, en células MIO-M1, α_2M^* se enriqueció en endosomas de *sorting* hasta los 10 min de iniciado el proceso endocítico, para luego relocalizarse en regiones que posteriormente maduraron a LE. Entre los 10 y los 60 min de endocitosis, se produjo un equilibrio entre la proporción de moléculas de α_2M^* en endosomas de *sorting* que maduraron a LE, y la proporción de moléculas en LE que maduraron a compartimentos ulteriores de la ruta de degradación.

4.1.2.3 Participación de los cuerpos multivesiculares en la endocitosis de α_2M^*

En células de mamíferos los cuerpos multivesiculares (CMV) presentan características que los distinguen de los EE y los LE. Los CMV no contienen proteínas específicas de EE ni receptores de reciclado, así como tampoco poseen los lípidos y proteínas constituyentes de las membranas de los LE (Gruenberg, 2001). Además no presentan actividad de fusión homotípica ni morfologías pleiotrópicas, características distintivas de los EE y LE (Scott y col., 2014). En cierta forma podría decirse que estas vesículas son compartimentos intermedios entre los EE y los LE. Los CMV son estructuras subcelulares uniformes de unas 0,5 μm de diámetro que contienen en su interior vesículas intralumen o ILV (del inglés *intraluminal vesicles*) (Gruenberg, 2001). Estas vesículas se forman en los endosomas de *sorting* mediante un proceso que requiere de zonas ricas en clatrina en la cara citosólica de las membranas endosómicas, y de los componentes del complejo de endosomas de *sorting* requerido para el transporte o ESCRT (del inglés *endosomal sorting complex required for transport*) (Huotari y Helenius, 2011). No obstante, éste no resulta ser el único mecanismo para la formación de las ILV, ya que, al menos en células de mamíferos, otros mecanismos independientes de ESCRT participan de su formación (Woodman y Futter, 2008). Las ILV son utilizadas por los endosomas de *sorting* para un estricto proceso de segregación de su cargo, por el cual separan aquellas moléculas que son recicladas de las que prosiguen hacia una vía de degradación. Por lo general, parte del material que es internalizado por la célula sigue la vía de reciclado endocítico, mientras que otra fracción continúa por la vía de degradación. En este sentido, una vez formados, los CMV se mueven a través de microtúbulos hacia los LE con los que se fusionan para continuar madurando hacia endolisosomas y lisosomas (Gruenberg, 2001). Además existen evidencias de que los CMV son las principales vesículas que fusionan con autofagosomas (Berg y col., 1998; Gordon y Seglen, 1988). En este sentido, resultados preliminares obtenidos recientemente en nuestro laboratorio, indican que las células MIO-M1, en condiciones de estrés tales como situaciones de ayuno, responden rápidamente desencadenando procesos autofágicos, los cuales se evidencian a partir del incremento en los niveles de la proteína LC3B. Además, el estímulo con dosis patológicas de α_2M^* produce efectos similares en este sistema celular.

Con el propósito de analizar si durante su endocitosis en células MIO-M1, $\alpha_2\text{M}^*$ se localiza en CMV, se procedió al análisis de la colocalización de $\alpha_2\text{M}^*$ Alexa⁴⁸⁸ con el lípido fluorogénico N-Rh-PE, marcador de CMV. Para ello se llevó a cabo un ensayo de endocitosis continua de $\alpha_2\text{M}^*$ Alexa⁴⁸⁸ por 60 min, previa marcación de los CMV con el lípido fluorescente N-Rh-PE, tal como se detalla en Materiales y métodos. La figura 4.6 muestra que $\alpha_2\text{M}^*$ Alexa⁴⁸⁸ y N-Rh-PE (CMV) se distribuyeron en vesículas puntuales, principalmente en la región perinuclear de la célula. Por su parte, la proporción de vesículas que contenían $\alpha_2\text{M}^*$ Alexa⁴⁸⁸ y eran N-Rh-PE positivas fue del $17 \pm 2\%$, lo cual es un nivel de colocalización similar al observado para vesículas que contenían $\alpha_2\text{M}^*$ Alexa⁵⁹⁴ y eran Rab7 positivas, luego de 60 min de endocitosis del ligando (Figura 4.4 y 4.5). Es importante mencionar que en el caso previamente descrito, no se trató de una oferta continua de ligando sino de un experimento del tipo unión-endocitosis.

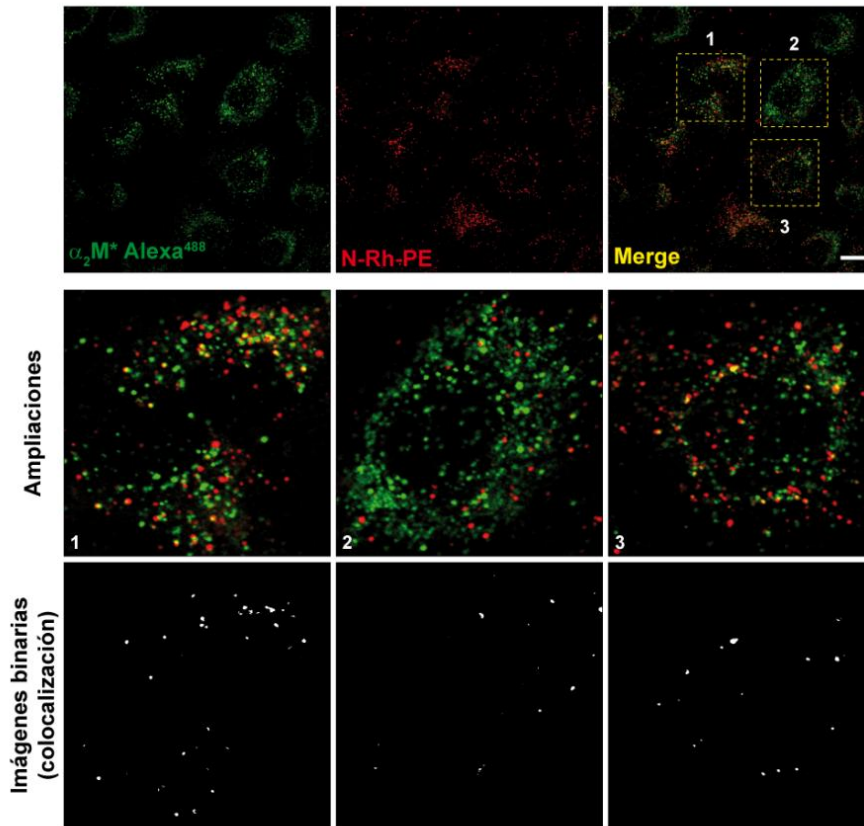


Figura 4.6. Colocalización en células MIO-M1 de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ con el marcador de CMV, N-Rh-PE. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ previa marcación de los CMV con el lípido fluorescente N-Rh-PE, seguido de FD y analizado por MC. La figura muestra, de izquierda a derecha (primera fila), la distribución de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸, de N-Rh-PE (CMV) y de la colocalización de ambos (*Merge*). También se observan ampliaciones (segunda fila, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares con mayor densidad de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ provenientes de la imagen *Merge* (recuadros 1–3) y sus correspondientes imágenes binarias (tercera fila), en las que se muestran en color blanco los píxeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 15 μm .

A partir de estos resultados se concluyó que una proporción de α_2M^* , luego de su endocitosis, se localizó en CMV. Sin embargo, esta evidencia no es suficiente para asegurar que el destino final de esas moléculas fue su degradación a nivel de lisosomas.

4.1.2.4 Degradación de α_2M^* en compartimentos del tipo lisosomas

Luego de corroborar que α_2M^* siguió una ruta de endocitosis a través de endosomas de *sorting*, CMV y/o LE, se decidió evaluar si la internalización de esta proteína culminaba en compartimentos de degradación, tales como lisosomas. Para ello se realizaron ensayos de endocitosis continua de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ por 60 min en células MIO-M1 previamente incubadas con DQ-BSA *red* (marcador de lisosomas). Este reactivo consiste en moléculas

de albúmina sérica bovina o BSA (del inglés *bovine serum albumin*) acopladas a sondas fluorescentes, que no generan señal mientras la proteína mantiene su integridad. Ante la degradación proteolítica de BSA las sondas emiten fluorescencia a 618 nm de longitud de onda (color rojo), lo que permite su utilización como marcador de vesículas del tipo lisosomas. En la figura 4.7 se observa que las vesículas que contenían α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ eran compartimentos de degradación, ya que escindieron moléculas de DQ-BSA *red*. La proporción de vesículas que contenían α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y DQ-BSA *red* degradada fue del $66 \pm 5\%$. Las características morfológicas de estos compartimentos subcelulares coincidieron con las descritas para los lisosomas secundarios, estructuras de tipo esféricas, claramente diferenciados de los LE y de los endolisosomas o lisosomas primarios (Bissig y Gruenberg, 2013; Scott y col., 2014).

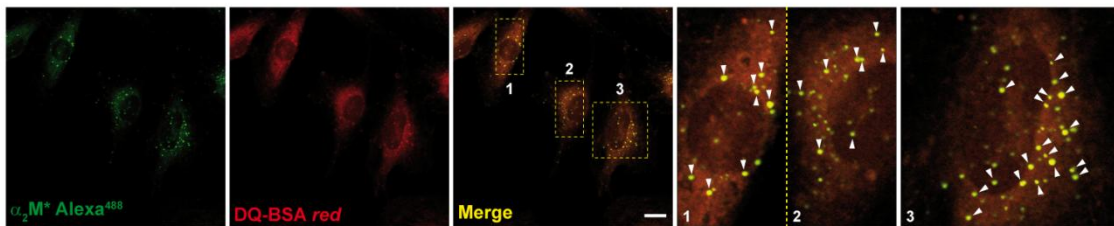


Figura 4.7. Degradación de α_2M^* en compartimentos de degradación. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ en células MIO-M1 previa incubación con DQ-BSA *red*, seguido de FD y analizado por MC. La figura muestra de izquierda a derecha, la distribución de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸, de DQ-BSA *red* y de la colocalización de ambos (*Merge*). También se observan ampliaciones (*zoom* digital 4X) de las regiones celulares con mayor densidad de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ provenientes de la imagen *Merge* (recuadros 1–3), donde se pueden apreciar vesículas que contenían α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ y eran del tipo lisosomas (puntas de flecha). Las imágenes son representativas de al menos 15 imágenes provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 15 μ m.

A partir de estos resultados se sugiere que, en células MIO-M1, α_2M^* se degradaría en compartimentos del tipo lisosomas.

4.1.2.5 Cinética de la degradación de α_2M^*

Habiendo demostrado que, en células MIO-M1, α_2M^* se localiza en compartimentos del tipo lisosomas durante la etapa final de su endocitosis, se decidió evaluar su cinética de degradación. Para ello se llevó a cabo un ensayo de unión-endocitosis del ligando por diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min), seguido de la inmunodetección de α_2M mediante ensayos de *Western blot*. En la figura 4.8 es posible apreciar que, para cada una

de las condiciones ensayadas, se detectó una banda de 180 kDa correspondiente a α_2M . Se observa que la degradación de α_2M^* se hizo evidente entre los 30 y 60 min de iniciada la endocitosis. Por su parte, la intensidad de señal para la condición de unión del ligando (U) resultó menor a la de otras condiciones (5, 10 y 15 min), situación que probablemente se debió a la pérdida de α_2M^* unida a LRP1 por efectos mecánicos propios del raspado utilizado para la cosecha de las células. También se observó que la condición de control negativo (células que no fueron incubadas con α_2M^*) mostró una intensidad de señal que corresponde a ~5% de la observada para la condición U, lo que podría indicar que las células MIO-M1 sintetizan localmente α_2M . En caso de que así fuera, se trataría de α_2M en su estado nativo, la cual si bien es reconocida por el anticuerpo utilizado para la inmunodetección, no puede ser internalizada por LRP1, por lo que su procedencia no sería de la oferta exógena de ligando realizada durante el ensayo (Shi y col., 2008). En ese hipotético caso, para la correcta interpretación de los resultados es necesario descontar la señal del CN de la del resto de las condiciones evaluadas.

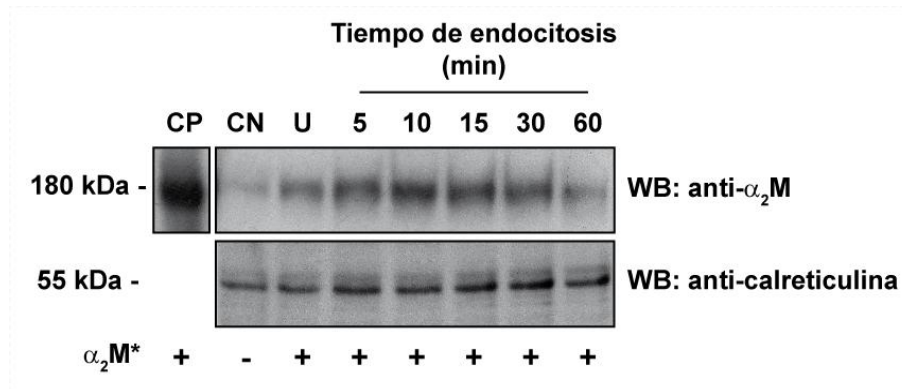


Figura 4.8. Cinética de la degradación de α_2M^* . La figura muestra una imagen radiográfica de un experimento de *Western blot* (WB) para la inmunodetección de α_2M en extractos proteicos de células MIO-M1 luego de un ensayo de unión-endocitosis del ligando. Se utilizó como control de carga proteica la inmunodetección de la proteína calreticulina. CP, control positivo de reacción del anticuerpo (10 μ g de α_2M^* pura); CN, control negativo del ensayo de unión-endocitosis (extracto proteico de células MIO-M1 que no fueron incubadas con α_2M^*); U, control de unión del ligando a 4 °C (extracto proteico de células MIO-M1 que fueron sometidas a la etapa de unión pero no a la de endocitosis de α_2M^*). Las calles de la cuarta a la octava, corresponden a los extractos proteicos de células MIO-M1 que fueron sometidas al ensayo de unión-endocitosis del ligando por 5, 10, 15, 30 y 60 min, respectivamente.

A partir de estos resultados se concluyó que la degradación de α_2M^* en células MIO-M1 tuvo lugar a partir de los 30 min de iniciada su endocitosis. Además se observó una banda tenue en condiciones de no estímulo, indicativo de que estas células sintetizan bajas dosis de α_2M . Si bien este resultado coincide con hallazgos de otros investigadores, es necesaria

la realización de experimentos adicionales para corroborarlo, lo cual excede a los objetivos planteados en el presente trabajo de tesis.

4.1.2.6 Conclusiones preliminares

Los experimentos detallados en la sección 4.1.2 permitieron caracterizar la ruta de endocitosis de α_2M^* en células MIO-M1. Se concluyó que esta glicoproteína compartió su ruta de internalización con Tf durante los primeros tiempos de endocitosis (hasta los 10 min), lo que tuvo lugar en EE del tipo endosomas de *sorting*. A partir de este tiempo, Tf abandonó los endosomas de *sorting* y recicló a la MP a través del CRE. En simultáneo, los endosomas de *sorting* que contenían α_2M^* maduraron a LE, lo que marcó su rumbo hacia vesículas del tipo lisosomas, donde a partir de los 30 min de endocitosis se hizo evidente su degradación. Lo interesante de estos resultados es que luego de la maduración de los endosomas de *sorting*, una proporción de α_2M^* se localizó en CMV lo cual podría constituir un paso intermedio entre los endosomas de *sorting* y una serie de destinos intracelulares o extracelulares que estas vesículas pueden alcanzar.

4.1.3 Distribución subcelular de LRP1 en células MIO-M1

Como se mencionó previamente, LRP1 es una proteína que se encuentra en un importante número de tejidos y células del organismo (Moestrup y col., 1992). Su expresión ha sido caracterizada en hepatocitos, fibroblastos, adipocitos, células musculares lisas, monocitos de sangre periférica, macrófagos, células del sincitiotrofoblasto, entre otros (Moestrup y col., 1990). En el año 1990, Joachim Herz y colaboradores compararon la distribución intracelular de LRP1 con la de LDLR en células NRK. Los autores concluyeron que ambos receptores presentaron un patrón de distribución similar “*indistinguible uno de otro*” con “*vesículas distribuidas en la periferia celular y en un empaquetamiento condensado cerca del núcleo, en la región del compartimento de Golgi*” (Herz y col., 1990). Este patrón es característico de LRP1 y, si bien se reproduce prácticamente en todos los sistemas celulares donde se expresa, aún no existe una descripción detallada de los compartimentos subcelulares que ocupa, así como tampoco de las modificaciones que sufre su distribución ante el estímulo con α_2M^* . Es por este motivo que se decidió caracterizar la localización subcelular de LRP1 en células MIO-M1 en ausencia y presencia de α_2M^* . Para ello se llevaron a cabo ensayos de FD y IFI analizados por MC para evaluar la colocalización de

LRP1 con una amplia variedad de marcadores de los diferentes compartimentos subcelulares, entre ellos retículo endoplasmático, EE (que incluyen endosomas de *sorting* y el CRE), LE, lisosomas y compartimento de Golgi.

4.1.3.1 Distribución de LRP1 en regiones celulares ricas en clatrina o caveolina

En gran parte de los sistemas celulares estudiados, LRP1 se ubica en regiones de membranas ricas en clatrina y utiliza la endocitosis mediada por esta vía para internalizar a la mayoría de sus ligandos (Lillis y col., 2008). Sin embargo, tal como se mencionó en la Introducción del presente trabajo de tesis, existen evidencias de que, bajo ciertas condiciones, este receptor se localiza de manera transitoria en regiones de tipo *lipid rafts/caveolae* (Boucher y col., 2002; Gonias y col., 2011; Kanai y col., 2014; Loukinova y col., 2002; Wu y Gonias, 2005; Zhang y col., 2004).

Teniendo en cuenta que en células MIO-M1 se desconoce en qué regiones de membrana se ubica LRP1 y si α_2M^* promueve una relocalización subcelular del receptor, resultó de interés el estudio de la distribución de LRP1 en regiones celulares ricas en clatrina y caveolina en condiciones de ausencia y presencia del ligando. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de endocitosis continua con α_2M^* por 30 min, seguidos de IFI para LRP1, clatrina y caveolina.

En la figura 4.9 A es posible apreciar que clatrina se distribuyó homogéneamente en el citoplasma celular con una moderada condensación de vesículas a nivel perinuclear. Las estructuras subcelulares que contenían clatrina eran principalmente vesículas puntuales. Por su parte, LRP1 mostró su distribución característica con una alta densidad de receptor en la región perinuclear, la cual coincidió con la zona de mayor proporción de vesículas clatrina positivas. En la figura 4.9 B se muestra que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran clatrina positivas fue del $45 \pm 11\%$ y luego del estímulo no evidenció cambios significativos ($41 \pm 8\%$).

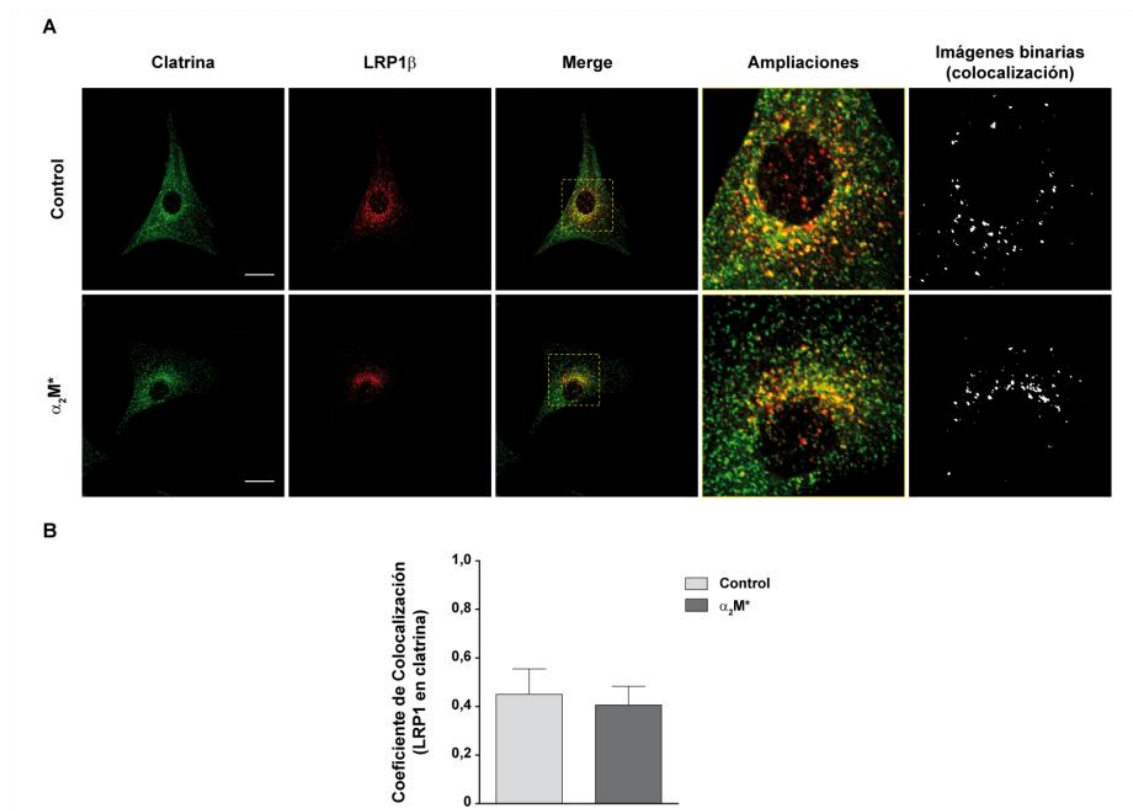


Figura 4.9. Colocalización de LRP1 con clatrina en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* , seguido de IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de clatrina (primera columna), de LRP1 (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros), y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran clatrina positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba t -Student para muestras independientes.

En la figura 4.10 es posible apreciar, a diferencia de lo observado para clatrina, que caveolina se distribuyó de manera heterogénea en el citoplasma celular. Además, LRP1, que mostró su distribución típica, no ocupó las mismas estructuras que caveolina. En la figura 4.10 B se observa que, en condiciones de ausencia de ligando, la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran caveolina positivas fue del $2 \pm 1\%$ y luego del estímulo no evidenció cambios significativos ($4 \pm 2\%$).

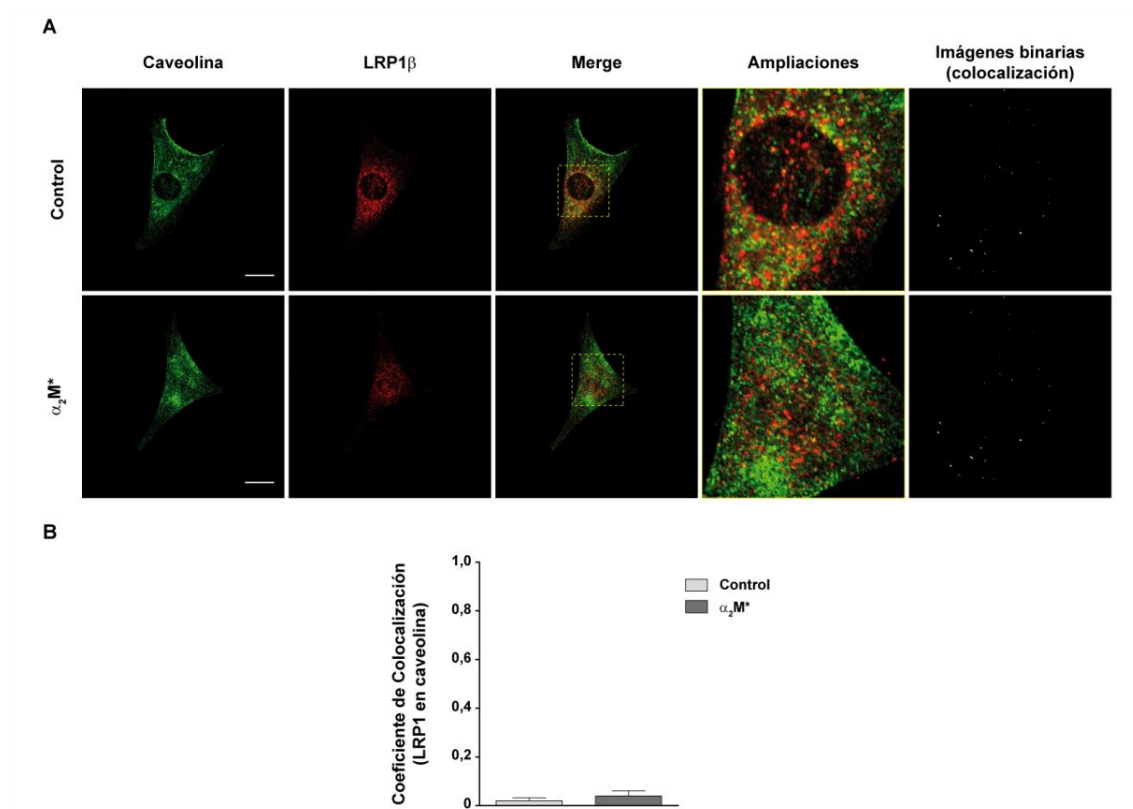


Figura 4.10. Colocalización de LRP1 con caveolina en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* , seguido de IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de caveolina (primera columna), de LRP1 (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros), y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los píxeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran caveolina positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba t -Student para muestras independientes.

A partir de los coeficientes de colocalización presentados en las figuras 4.9 y 4.10 se concluyó que la proporción de LRP1 en vesículas clatrina positivas fue significativamente mayor a la proporción de este receptor en vesículas caveolina positivas, siendo en esta última situación menor al 5%. También es importante mencionar que la presencia de α_2M^* en cultivos de MIO-M1 no produjo cambios significativos en la distribución del receptor en vesículas clatrina y caveolina positivas. Por lo tanto, se concluyó que LRP1 se localizó preferentemente en membranas subcelulares ricas en clatrina y que su ligando α_2M^* no indujo la redistribución del receptor hacia membranas ricas en caveolina. Estos datos también permitieron inferir que la endocitosis de α_2M^* en células MIO-M1 ocurrió a través

de un mecanismo mediado por clatrina, lo cual fue previamente demostrado para otros ligandos de algunos receptores de la familia de LDLR (Lillis y col., 2008).

4.1.3.2 Distribución de LRP1 en endosomas tempranos

Habiendo evidenciado que durante los primeros tiempos de su internalización en células MIO-M1, α_2M^* se encontró en EE del tipo endosomas de *sorting*, se decidió evaluar qué proporción de LRP1 se ubicó en este tipo de vesículas, tanto en ausencia como en presencia del ligando. Para ello se llevó a cabo un ensayo de endocitosis continua de α_2M^* por 30 min en células MIO-M1, seguido de IFI para LRP1 y dos marcadores de endosomas tempranos, EEA1 y Rab5.

En la figura 4.11 A es posible apreciar que la inmunodetección de EEA1 reveló vesículas homogéneamente distribuidas en el citoplasma celular que correspondieron a endosomas de *sorting*. Por su parte, LRP1 mostró su distribución característica y un alto grado de colocalización con EEA1. En la figura 4.11 B se muestra que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran EEA1 positivas fue del $44 \pm 10\%$, mientras que luego del estímulo se incrementó significativamente ($76 \pm 12\%$).

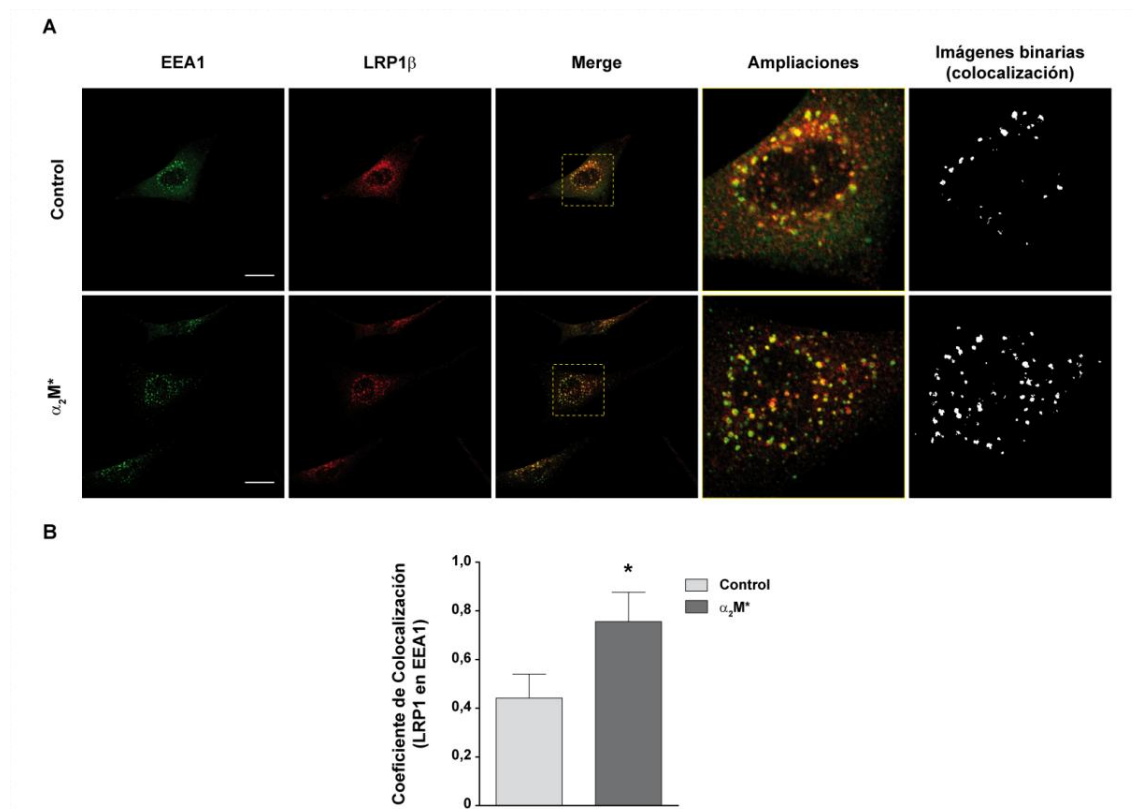


Figura 4.11. Colocalización de LRP1 con EEA1 en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* , seguido de IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de EEA1 (primera columna), de LRP1 (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros), y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran EEA1 positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba τ -Student para muestras independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por su parte, en la figura 4.12 se aprecia que, al igual que para EEA1, la inmunodetección de Rab5 reveló vesículas homogéneamente distribuidas en el citoplasma celular que correspondieron a EE del tipo endosomas de *sorting*. Por su parte, LRP1 mostró su distribución característica y un alto grado de colocalización con Rab5. En la figura 4.12 B se observa que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Rab5 positivas fue del $41 \pm 9\%$, mientras que luego del estímulo se incrementó significativamente ($63 \pm 8\%$).

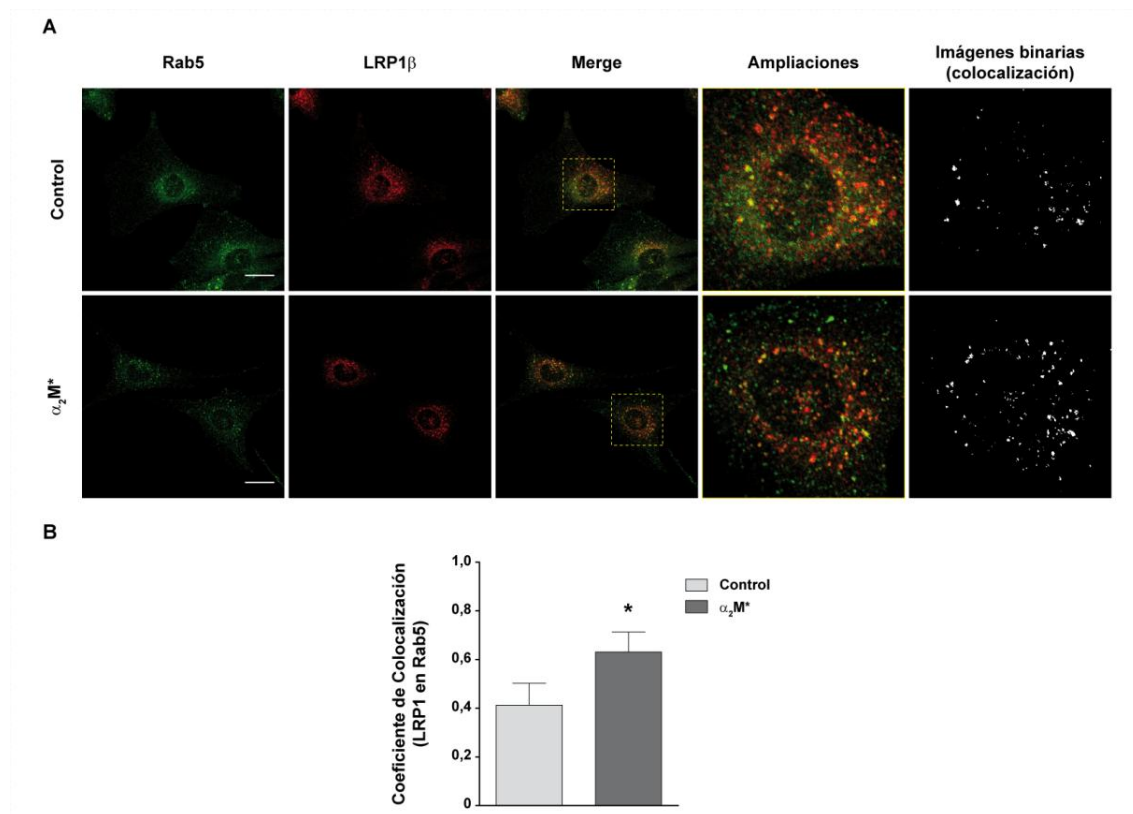


Figura 4.12. Colocalización de LRP1 con Rab5 en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* , seguido de IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de Rab5 (primera columna), de LRP1 (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros), y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Rab5 positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba τ -Student para muestras independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Habiendo observado el incremento de colocalización de LRP1 con marcadores de EE luego del estímulo con α_2M^* , resultó de interés caracterizar la progresión de dicha colocalización. Para ello se llevaron a cabo ensayos de endocitosis continua de α_2M^* en células MIO-M1 durante diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min) seguidos de IFI para LRP1 y EEA1.

En la figura 4.13 es posible apreciar que las distribuciones de EEA1 y LRP1 no se modificaron, mientras que la proporción de EE que contenían LRP1 incrementó en forma progresiva en función del tiempo de estímulo con α_2M^* .

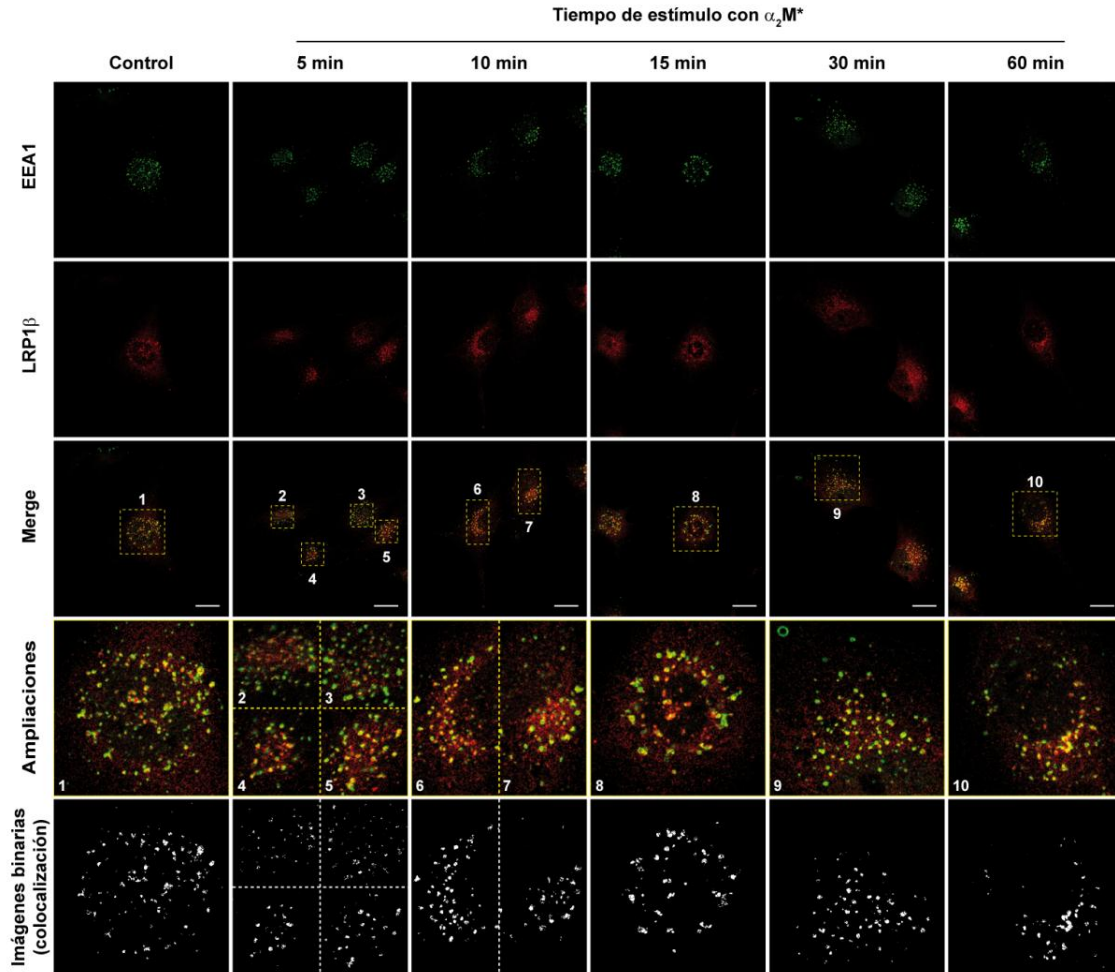


Figura 4.13. Colocalización de LRP1 con EEA1 en función del tiempo de estímulo con α_2M^* . Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* en células MIO-M1, seguido de IFI y analizado por MC. Distribución subcelular de EEA1 (primera fila), de LRP1 (segunda fila) y de la colocalización de ambas proteínas (tercera fila) en función del tiempo de estímulo con α_2M^* . También se observan ampliaciones (cuarta fila, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros 1–10), y sus correspondientes imágenes binarias (quinta fila), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μ m.

Por su parte, la figura 4.14 muestra que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran EEA1 positivas fue del $44 \pm 10\%$, mientras que a los 5, 10, 15, 30 y 60 min de estímulo fue del $46 \pm 9\%$, $52 \pm 10\%$, $63 \pm 12\%$, $76 \pm 12\%$ y $66 \pm 12\%$, respectivamente. Del análisis estadístico de las medias se concluyó que el máximo nivel de colocalización entre LRP1 y EEA1 (correspondiente a los 30 min de estímulo) difirió significativamente de los niveles observados para las

condiciones control, 5 y 10 min de estímulo y no fue estadísticamente diferente de los niveles correspondientes a 15 y 60 min de estímulo.

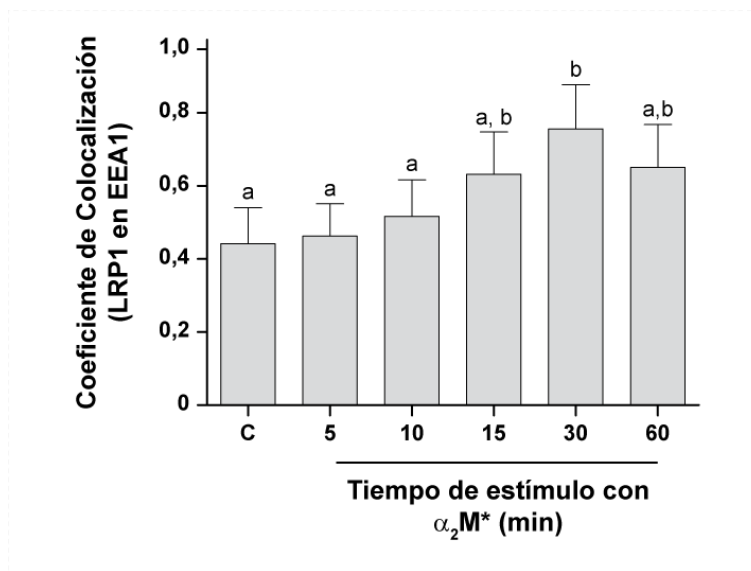


Figura 4.14. Coeficientes de colocalización de LRP1 con EEA1 en función del tiempo de estímulo con α_2M^* . Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran EEA1 positivas) en función del tiempo de estímulo con α_2M^* . Se obtuvieron a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición provenientes de tres experimentos independientes (cuyas imágenes representativas se muestran en la figura 4.13). La letra C corresponde a células sin estímulo de α_2M^* . La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A partir de estos resultados se concluyó que una proporción de LRP1 de ~40% se distribuyó en EE en células MIO-M1 en ausencia de α_2M^* . Los estímulos con ligando incrementaron la proporción de LRP1 en vesículas EEA1 positivas en función del tiempo de estímulo, alcanzando los máximos niveles a los 30 min.

4.1.3.3 Distribución de LRP1 en endosomas tardíos

Teniendo en cuenta que α_2M^* se degradó a nivel de compartimentos del tipo lisosomas, resultó de interés estudiar si LRP1, bajo condiciones de ausencia y presencia del ligando, se localizó en compartimentos de tipo LE y endolisosomas. Para ello, células MIO-M1 fueron sometidas a dos tratamientos que permitieron evaluar la presencia de LRP1 en estos compartimentos endocíticos. Para evaluar LE, las células se transfectaron transitoriamente con un plásmido que codifica para la proteína Rab7 acoplada a GFP (Rab7-GFP) y para estudiar endolisosomas, células MIO-M1 se incubaron con el marcador fluorescente de compartimentos ácidos, LysoTracker. Luego de ambos tratamientos, se llevaron a cabo

ensayos de endocitosis continua de α_2M^* por 30 min seguidos de FD e IFI analizados por MC.

En la figura 4.15 A se muestra que, en lo que respecta a la distribución subcelular de Rab7-GFP, se produjo una acumulación de vesículas en la región perinuclear, algunas de las cuales tienen forma de anillos. En relación a LRP1, aunque presentó su distribución típica, se observó un muy bajo número de las vesículas que lo contenían y que eran Rab7-GFP positivas. En la figura 4.15 B se muestra que, en condiciones de ausencia de ligando, la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Rab7-GFP positivas fue del $7 \pm 2\%$, valor que no se modificó significativamente luego del estímulo ($7 \pm 2\%$).

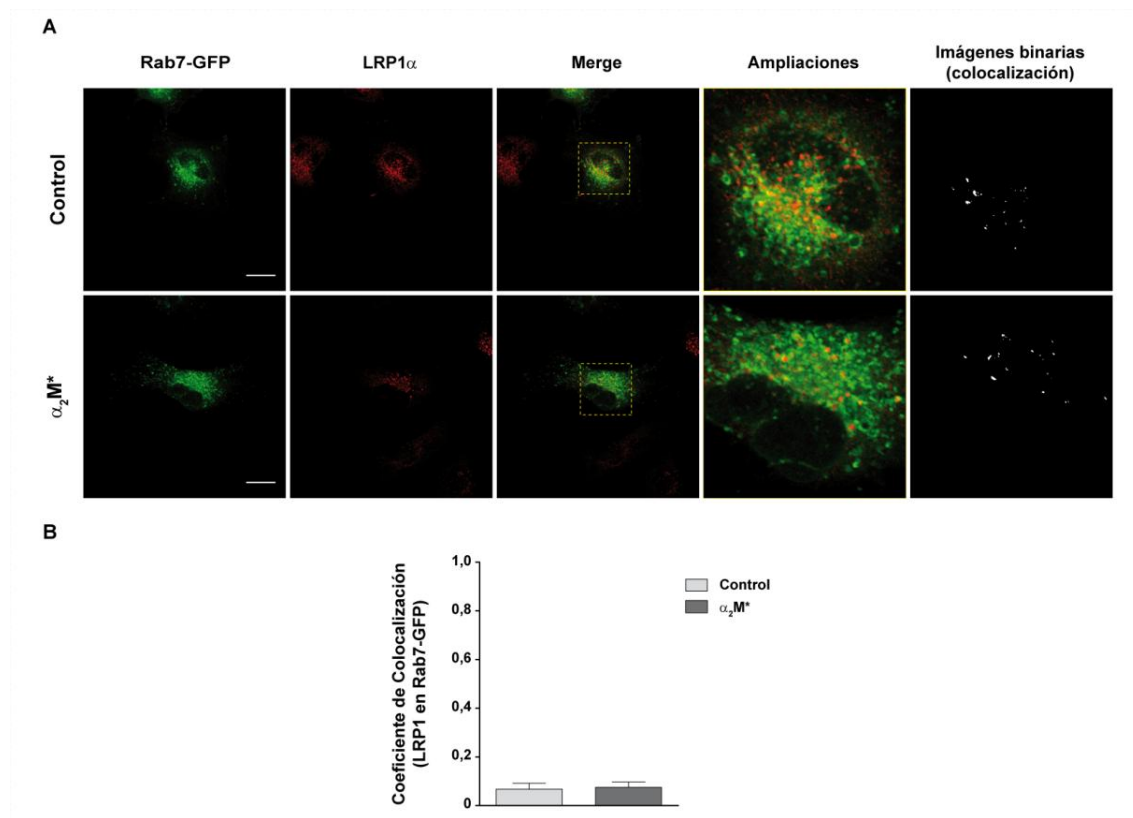


Figura 4.15. Colocalización de LRP1 con Rab7-GFP en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* , seguido de FD e IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de Rab7-GFP (primera columna), de LRP1 (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros), y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los píxeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Rab7-GFP positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes.

Por su parte, la figura 4.16 A muestra que LysoTracker exhibió un patrón de distribución perinuclear, que en ninguna de las condiciones ensayadas coincidió con las vesículas que contenían LRP1. En la figura 4.16 B se muestra que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran LysoTracker positivas fue del $2 \pm 1\%$, valor que no se modificó significativamente luego del estímulo ($5 \pm 3\%$).

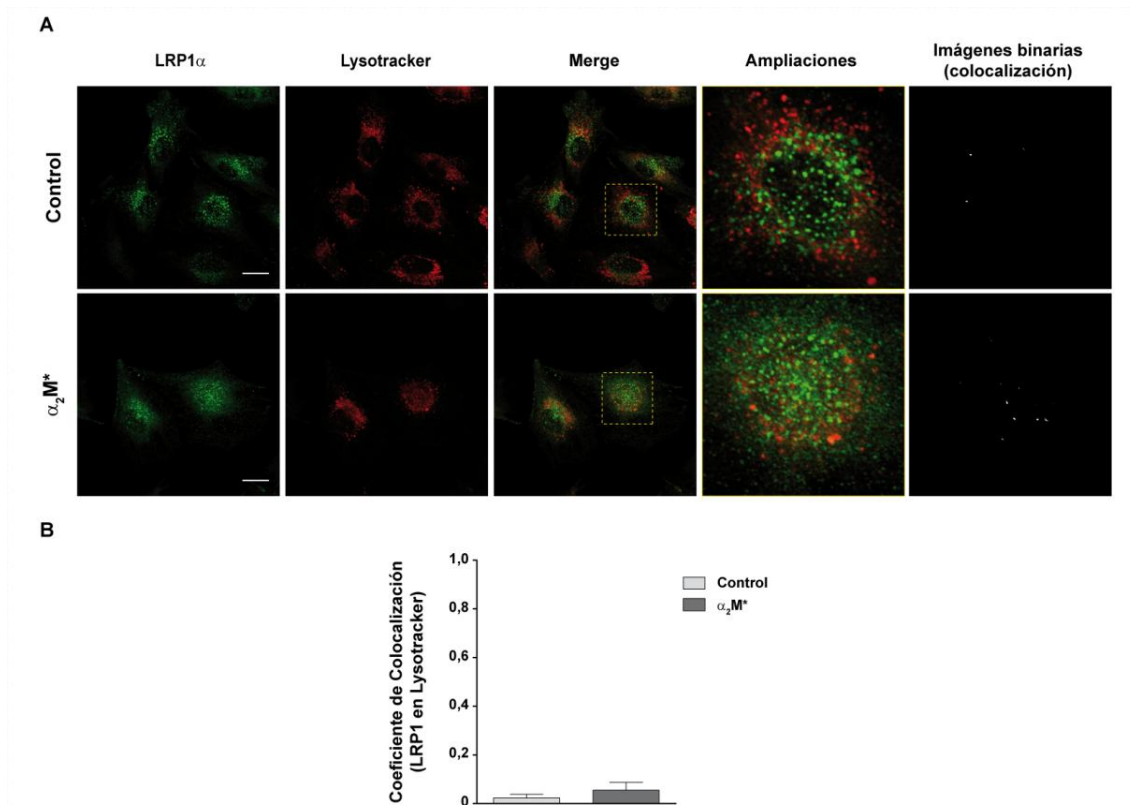


Figura 4.16. Colocalización de LRP1 con Lysotracker en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* por 30 min, seguido de FD e IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de LRP1 (primera columna), de Lysotracker (segunda columna) y de la colocalización de ambos (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros), y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Lysotracker positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba t -*Student* para muestras independientes.

A partir de estos resultados se concluyó que una baja proporción de LRP1 se localizó en LE, situación que no se modificó significativamente luego del estímulo con α_2M^* . Esto permitió inferir que el aporte de la endocitosis mediada por α_2M^* al *pool* de LRP1 en LE, no fue significativo. En este sentido, es importante mencionar que se conoce que el compartimento de Golgi se encuentra en equilibrio con LE, manteniendo un flujo bidireccional constante de moléculas cargo (Scott y col., 2014).

Por otra parte, habiendo observado que a diferencia de LRP1, α_2M^* se degradó a nivel de lisosomas previo paso por LE, se sugirió que la disociación molecular del complejo ligando/receptor tendría lugar en EE.

4.1.3.4 Reciclado endocítico de LRP1

Teniendo en cuenta las vías de reciclado endocítico conocidas para la mayoría de los receptores transmembrana, se decidió estudiar la distribución de LRP1 en estructuras subcelulares directa o indirectamente asociadas a este mecanismo de transporte intracelular. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de endocitosis continua de α_2M^* por 30 min en células MIO-M1, seguidos de FD e IFI de LRP1 y los marcadores de endosomas de *sorting*, CRE, compartimento de Golgi y retículo endoplasmático (Rab4, Rab11, giantina y calreticulina, respectivamente).

Para evaluar el posible reciclado rápido del receptor, se procedió al estudio de la colocalización de LRP1 con Rab4. En la figura 4.17 A se observa que Rab4 presentó una localización preferentemente perinuclear. Esta distribución subcelular en células MIO-M1 fue coincidente con lo observado en otras líneas celulares y respondió principalmente a que esta pequeña GTPasa no solo forma parte de endosomas de *sorting* sino también del compartimento de Golgi (Maxfield y McGraw, 2004). En la figura 4.17 B se muestra que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Rab4 positivas fue del $13 \pm 3\%$, mientras que luego del estímulo disminuyó significativamente ($6 \pm 3\%$). Estos resultados fueron indicativos de que en condiciones de ausencia de ligando, una baja proporción de LRP1 mantiene un reciclado basal mediado por Rab4, el cual disminuye significativamente luego del estímulo con α_2M^* .

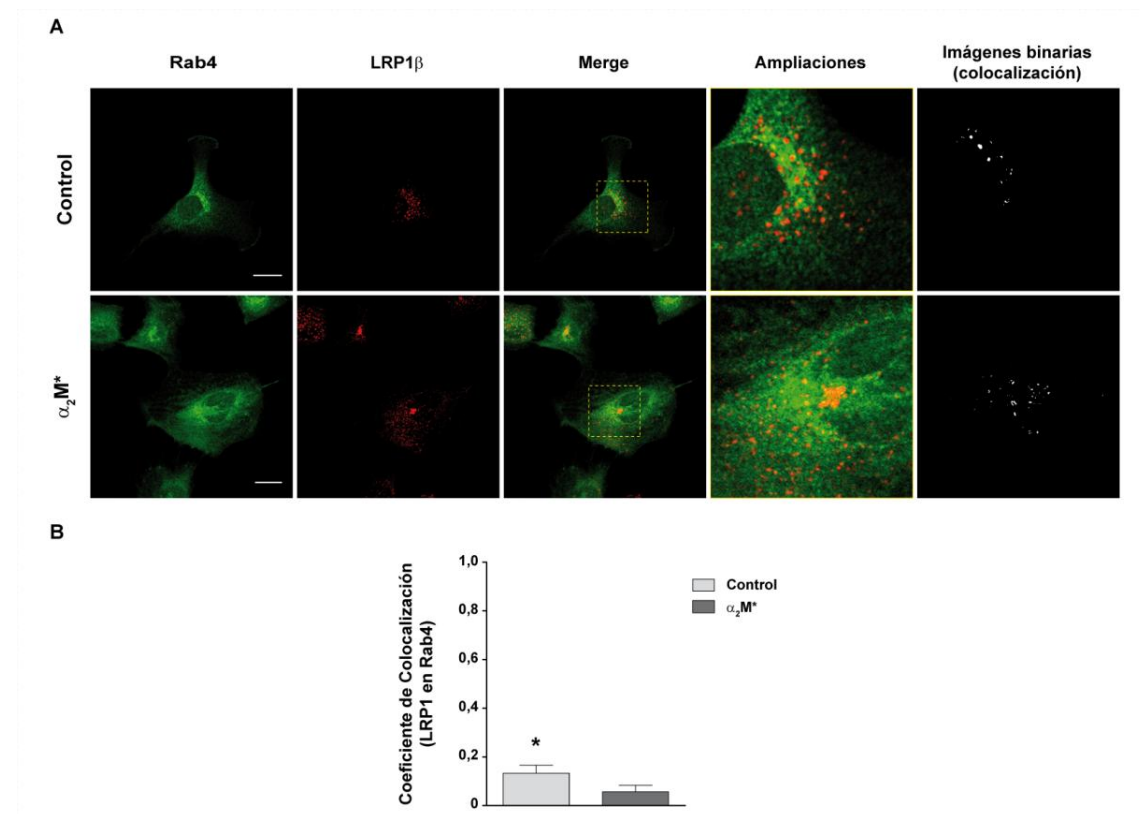


Figura 4.17. Colocalización de LRP1 con Rab4 en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* , seguido de IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de Rab4 (primera columna), de LRP1 (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los píxeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Rab4 positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba τ -Student para muestras independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Para evaluar si la disminución de la proporción de LRP1 en compartimentos de la ruta de reciclado endocítico rápido fue consecuencia de que α_2M^* promovió un reciclado endocítico lento, se procedió al estudio de la colocalización de LRP1 con Rab11. Para ello se transfectaron transitoriamente células MIO-M1 con Rab11-RFP y luego se procedió a realizar ensayos de endocitosis continua de α_2M^* . En la figura 4.18 A se observa que Rab11-RFP se localizó preferentemente en vesículas cercanas al núcleo conformando una estructura puntual de alta densidad en una región yuxtanclear, lo que caracteriza a este tipo de vesículas endocíticas (Maxfield y McGraw, 2004). En la figura 4.18 B se muestra que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían LRP1

y eran Rab11-RFP positivas fue del $17 \pm 4\%$, valor que no se modificó significativamente luego del estímulo ($22 \pm 6\%$). Estos resultados fueron indicativos de que en condiciones de ausencia de ligando, LRP1 además del reciclado rápido mediado por Rab4 mantuvo un reciclado endocítico lento mediado por Rab11, el cual no se modificó significativamente luego del estímulo con α_2M^* .

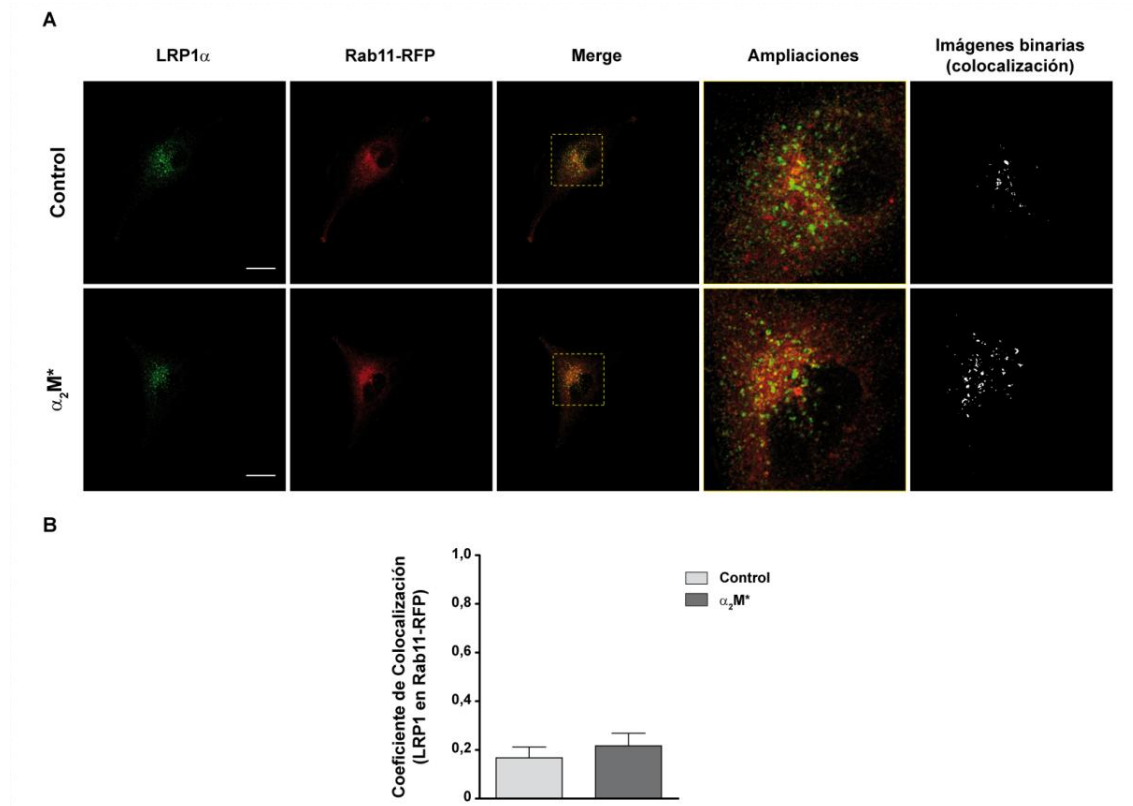


Figura 4.18. Colocalización de LRP1 con Rab11-RFP en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* , seguido de FD e IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de LRP1 (primera columna), de Rab11-RFP (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Rab11-RFP positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes.

Con el propósito de evaluar la colocalización de LRP1 con el marcador del CRE Rab11, se llevaron a cabo ensayos de endocitosis continua de α_2M^* durante diferentes tiempos (5, 10,

15, 30 y 60 min) en células MIO-M1 transfectadas transientemente con una construcción que codifica para la proteína Rab11-GFP, seguidos de FD e IFI y analizados por MC.

En la figura 4.19 es posible apreciar que las distribuciones de Rab11-GFP y LRP1 no se modificaron en función del tiempo de estímulo con α_2M^* , lo mismo que se observó para la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Rab11-GFP positivas.

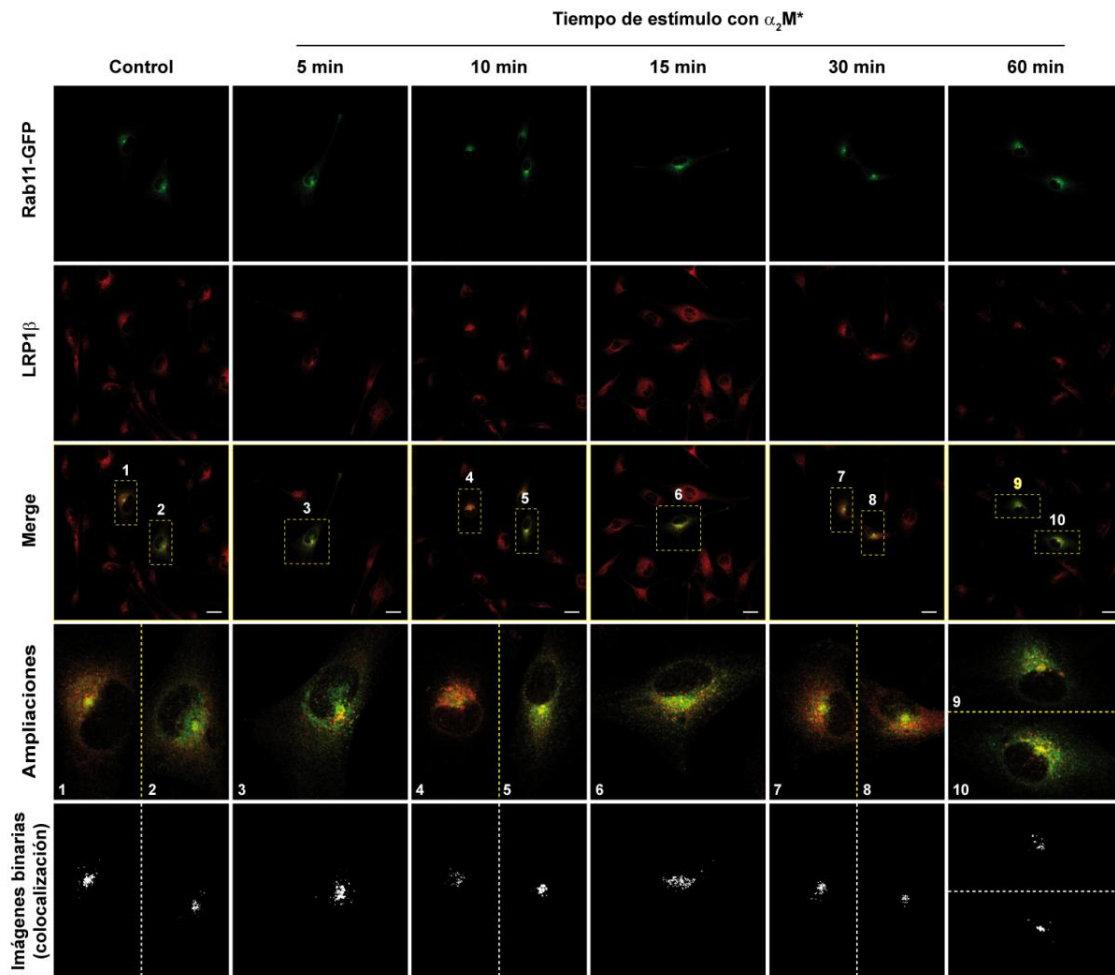


Figura 4.19. Colocalización de LRP1 con Rab11-GFP en función del tiempo de estímulo con α_2M^* . Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* en células MIO-M1, seguido de FD e IFI y analizado por MC. La figura muestra la distribución subcelular de Rab11-GFP (primera fila), de LRP1 (segunda fila) y de la colocalización de ambas proteínas (tercera fila) en función del tiempo de estímulo con α_2M^* . También se observan ampliaciones (cuarta fila, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros 1–10) y sus correspondientes imágenes binarias (quinta fila), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm .

Por su parte, la figura 4.20 muestra que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Rab11-GFP positivas fue del $18 \pm 6\%$ y luego de los 5, 10, 15, 30 y 60 min de estímulo fue del $22 \pm 7\%$, $20 \pm 9\%$, $20 \pm 8\%$, $18 \pm 7\%$ y $18 \pm 10\%$, respectivamente. Del análisis estadístico de las medias se concluyó que los niveles de colocalización entre LRP1 y Rab11-GFP no mostraron diferencias significativas entre ellos.

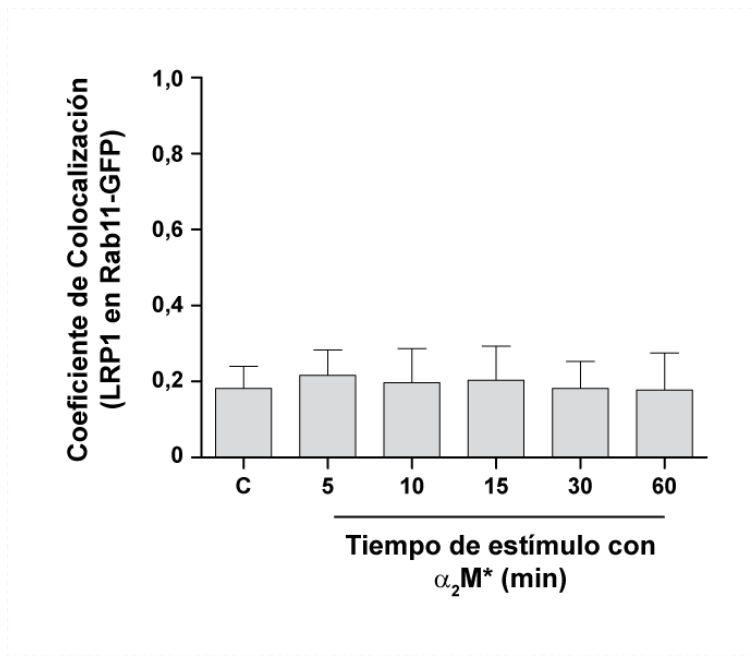


Figura 4.20. Coeficientes de colocalización de LRP1 con Rab11-GFP en función del tiempo de estímulo con α_2M^* . Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran Rab11-GFP positivas) en función del tiempo de estímulo con α_2M^* . Se obtuvieron a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición provenientes de 3 experimentos independientes (cuyas imágenes representativas se muestran en la figura 4.19). La letra C corresponde a células sin estímulo con α_2M^* . La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey.

Estos resultados sugirieron la posibilidad de que otras vías de reciclado (que no son dependientes de Rab11) juegan un papel importante en el retorno de LRP1 a la MP.

Paso siguiente, se decidió evaluar si LRP1 se encontraba en el compartimento de Golgi. Para ello se procedió al estudio de su colocalización con giantina, marcador específico de *medial-cis* Golgi. En la figura 4.21 A es posible apreciar que la marca de giantina describió la morfología estructural del compartimento de Golgi, con conexiones tubulares y cisternas perinucleares. En la figura 4.21 B se observa que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran giantina positivas fue del $7 \pm 3\%$, valor

que incrementó significativamente luego del estímulo ($18 \pm 4\%$). Estos resultados fueron indicativos de que en condiciones de estímulo con α_2M^* un importante número de moléculas de LRP1 se ubicaron en la región *medial-cis* del compartimento de Golgi, lo que podría estar relacionado con un incremento en la biosíntesis del receptor y/o el transporte retrógrado.

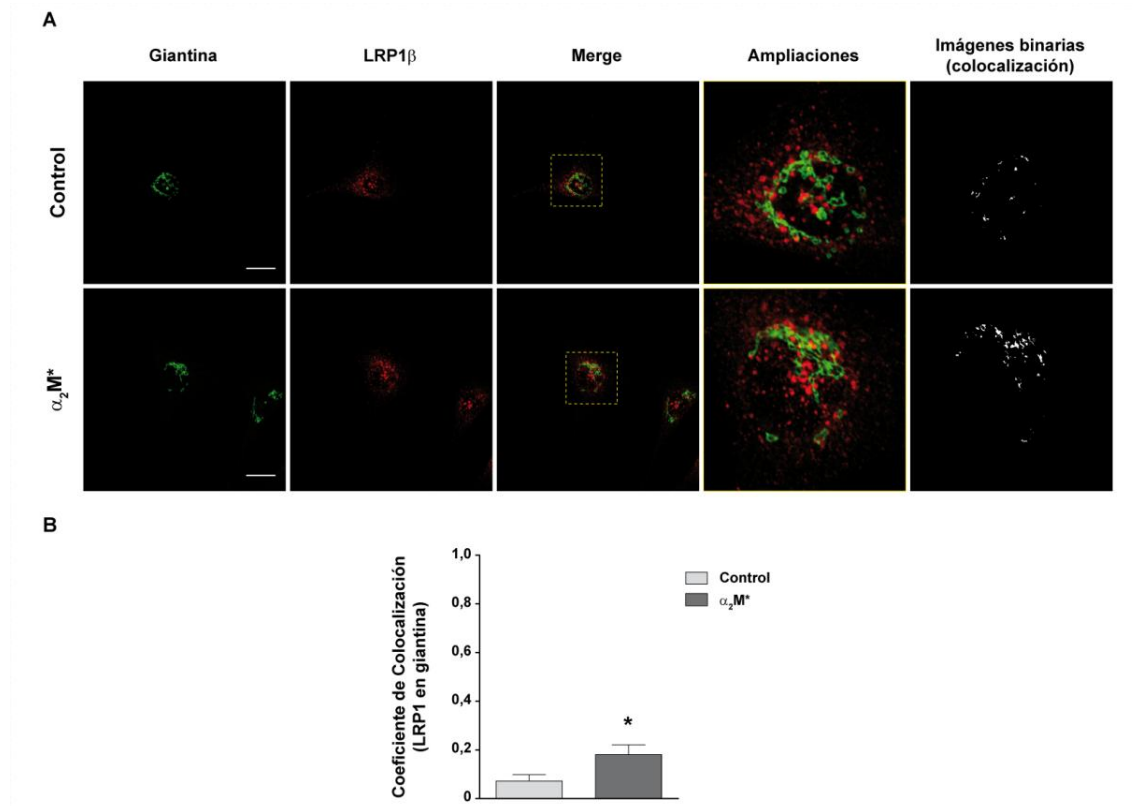


Figura 4.21. Colocalización de LRP1 con giantina en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* , seguido de IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de giantina (primera columna), de LRP1 (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran giantina positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba τ -Student para muestras independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, se decidió evaluar la colocalización de LRP1 con el marcador de retículo endoplasmático, calreticulina. La figura 4.22 A muestra que la distribución subcelular de calreticulina describió un patrón reticular en forma de red que se extendió por todo el

citoplasma celular y que no evidenció coincidencia estructural alguna con la distribución perinuclear característica del LRP1. En la figura 4.22 B se muestra que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran calreticulina positivas fue del $5 \pm 2\%$ y no evidenció cambios significativos luego del estímulo ($3 \pm 1\%$).

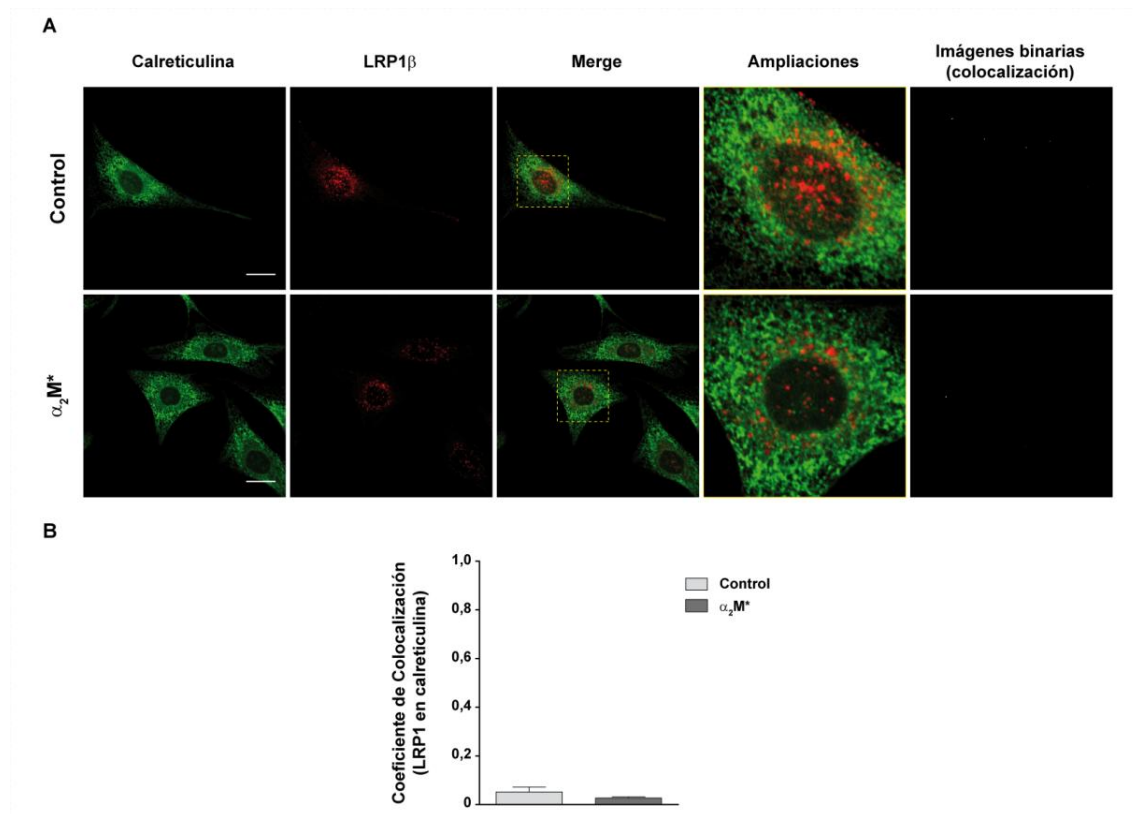


Figura 4.22. Colocalización de LRP1 con calreticulina en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* , seguido de IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de calreticulina (primera columna), de LRP1 (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran calreticulina positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba τ -*Student* para muestras independientes.

4.1.3.5 Conclusiones preliminares

Los experimentos detallados en la sección 4.1.3 permitieron caracterizar la distribución subcelular de LRP1 en células MIO-M1. En ausencia de α_2M^* , se observó que el receptor se ubicó principalmente en membranas ricas en clatrina, las cuales podrían ser parte de

vesículas de reciente formación o del compartimento de Golgi. Por su parte, la mayor densidad de LRP1 se distribuyó en vesículas endocíticas del tipo endosomas de *sorting* (EEA1, Rab5 y Rab4 positivas). Una proporción menor del receptor se localizó en vesículas del CRE, el compartimento de Golgi y los LE, mientras que no se observó LRP1 en membranas ricas en caveolina, lisosomas y el retículo endoplasmático.

En células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* se produjeron cambios significativos en los niveles del receptor en endosomas de *sorting* y en el compartimento de Golgi (aumento significativo de la colocalización de LRP1 con EEA1, Rab5 y giantina; y disminución significativa de la colocalización del receptor con Rab4). El resto de los marcadores evaluados no evidenciaron cambios significativos luego del estímulo con el ligando.

A partir de estos resultados se concluyó que LRP1, en células MIO-M1, se distribuyó principalmente en compartimentos subcelulares del tipo EE y presentó diferentes vías posibles de reciclado y/o exocitosis, entre ellas, la vía de reciclado rápido a través de vesículas Rab4 positivas (en ausencia de ligando), la vía de reciclado lento a través del CRE Rab11 positivo (en ausencia y presencia de ligando) y la vía biosintética/secretoria, que involucraría el compartimento de Golgi. Además, se demostró que, si bien LRP1 no ocupa compartimentos ácidos del tipo endolisosomas, una proporción de este receptor permanece en LE. Esto, asociado al hallazgo de que algunas moléculas de α_2M^* se ubican en CMV, podría ser indicativo de la existencia de una relación de la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$ con la vía autofágica.

4.1.4 Nivel de LRP1 en la membrana plasmática de células MIO-M1

Como se mencionó en la Introducción del presente trabajo de tesis, la mayor proporción de LRP1 en la mayoría de los sistemas celulares estudiados, se encuentra a nivel intracelular, mientras que ~30% del total se distribuye a nivel de la MP (Moestrup y col., 1990). Sin embargo, existen evidencias de que determinados factores extracelulares, como por ejemplo estímulos con insulina, provocan un incremento de los niveles de LRP1 en la MP de adipocitos y hepatocitos (Corvera y col., 1989; Descamps y col., 1993; Ko y col., 2001; Laatsch y col., 2009).

Habiendo corroborado que, luego del estímulo con α_2M^* , LRP1 modificó su localización subcelular, principalmente a nivel de endosomas de *sorting* y el compartimento de Golgi, se

procedió a investigar si α_2M^* también indujo cambios en el nivel de LRP1 en la MP. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de microscopía de TIRF, citometría de flujo (CF) y biotilación de proteínas de MP seguidas de la inmunoprecipitación (IP) de LRP1 analizada por *Western blot*. En todos los casos se determinaron los niveles de LRP1 en la superficie de células MIO-M1, en ausencia y presencia de α_2M^* . Al mismo tiempo, se buscó evaluar si *pools* intracelulares del receptor incrementaron su movilidad en función de la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$. Con este propósito se emplearon técnicas de microscopía de FRAP utilizando un vector de expresión que reproduce una porción de la molécula de LRP1, denominada mLRP4, que codifica para la cadena β completa y el dominio IV de unión a ligandos de la subunidad α del LRP1; este mini-receptor se encuentra fusionado a GFP (mLRP4-GFP) y no es capaz de unir α_2M^* .

4.1.4.1 Transporte intracelular de LRP1 desde compartimentos subcelulares a la membrana plasmática

Con el propósito de evaluar si el estímulo con α_2M^* promueve el reciclado endocítico de LRP1 y un aumento de su nivel en la MP, células MIO-M1 fueron sometidas a ensayos de estimulación con α_2M^* , RAP y con ambas proteínas juntas durante 30 min, luego fueron fijadas y procesadas para IFI y microscopía de TIRF tal como se detalla en Materiales y métodos. La figura 4.23 muestra las imágenes adquiridas mediante microscopía de epifluorescencia (Epi) y microscopía de TIRF. En las imágenes del plano Epi ($\sim 200 \mu m$) se puede apreciar la distribución de LRP1 para el total del volumen celular, la cual se mantuvo inalterada en todas las condiciones ensayadas. En las imágenes del plano TIRF ($\sim 200 nm$) se observa la distribución de LRP1 a nivel de la MP, que a diferencia de lo observado en el plano Epi, se modificó en función de las condiciones ensayadas. Las células que fueron estimuladas con α_2M^* , presentaron zonas de alta densidad de receptor (picos de los histogramas), claramente diferenciadas de aquellas zonas sin receptor o de baja densidad. Estas acumulaciones también se observaron en condiciones control y en las co-incubaciones con RAP y α_2M^* , aunque fueron menores en número, superficie e intensidad de fluorescencia.

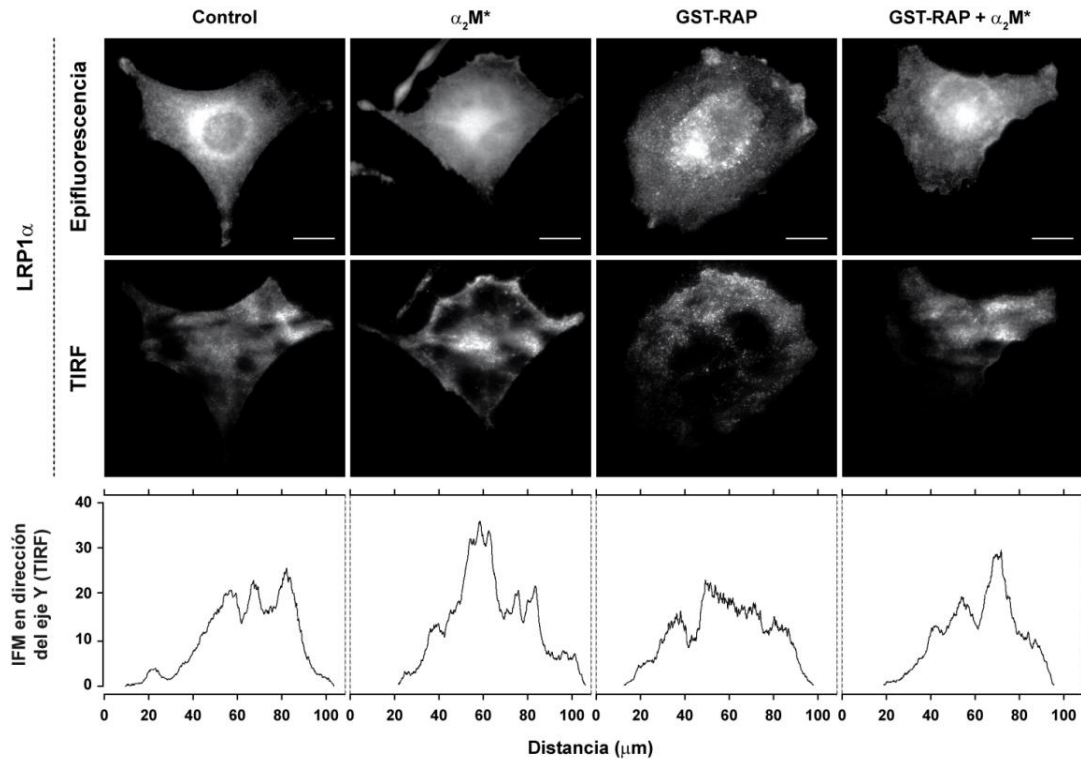


Figura 4.23. Ensayo de microscopía TIRF: Expresión de LRP1 en la MP de células MIO-M1. Ensayo de estimulación con α_2M^* , GST-RAP y con ambos ligandos juntos, seguido de IFI para LRP1 y analizado por microscopía de epifluorescencia y TIRF. En el panel superior se muestran imágenes representativas de la distribución subcelular de LRP1 obtenidas por microscopía de epifluorescencia (primera fila) y TIRF (segunda fila), para cada una de las condiciones ensayadas (de izquierda a derecha: control, α_2M^* , GST-RAP, GST-RAP + α_2M^*). La barra de escala corresponde a 20 μm . En el panel inferior se muestran los histogramas para cada condición de los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) de los píxeles en función de la distancia en μm (en dirección XY) de LRP1, provenientes de las imágenes del plano TIRF. Los picos de los histogramas coinciden con las regiones de mayor intensidad de fluorescencia de las imágenes mostradas.

En la figura 4.24 se observa que el estímulo con α_2M^* produjo un incremento significativo de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de LRP1, indicativo de un aumento en la expresión del receptor a nivel de la MP. Por su parte, la pre-incubación con GST-RAP (GST-RAP + α_2M^*) produjo la disminución del efecto producido por α_2M^* , no obstante los valores de IFM de LRP1 fueron significativamente mayores a los de las condiciones control y estímulo con GST-RAP.

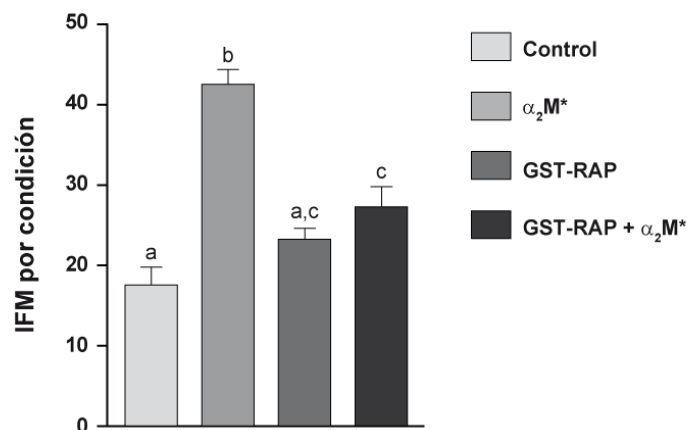


Figura 4.24. Ensayo de microscopía TIRF: comparación de los niveles de LRP en MP de células MIO-M1 bajo diferentes condiciones de estimulación. Valores de IFM \pm DE de LRP1 (en el plano TIRF), obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 19 células por condición provenientes de dos experimentos independientes (cuyas imágenes representativas se muestran en la figura 4.23). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Estos resultados permitieron inferir que luego del estímulo con α_2M^* se produjo un incremento del nivel de LRP1 en la MP, lo cual resultó de la interacción de este ligando con su receptor, ya que el bloqueo con GST-RAP, atenuó el efecto significativamente.

A fin de corroborar los resultados obtenidos, se procedió a la utilización de CF, metodología que permitió evaluar el evento en más de 30 000 células por condición. Para ello, se realizaron ensayos de estimulación con α_2M^* por diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min), seguidos de la inmunodetección de LRP1 y analizados por CF. En la figura 4.25 se puede apreciar que estímulos con α_2M^* de hasta 30 min indujeron una disminución de los niveles de IFM de LRP1 en la superficie de las células MIO-M1. Por el contrario, estímulos de 60 min produjeron un incremento significativo de los valores de IFM, lo que permitió inferir que un mayor número de moléculas del receptor se encontraban en la superficie celular. Estos resultados muestran la misma tendencia que los obtenidos por microscopía de TIRF, aunque a diferentes tiempos de estimulación con α_2M^* (30 min vs 60 min en TIRF vs CF, respectivamente). Esto podría estar asociado al principio metodológico utilizado por cada una de las técnicas para la detección de la IFM de LRP1 así como también el número de células analizadas en cada caso.

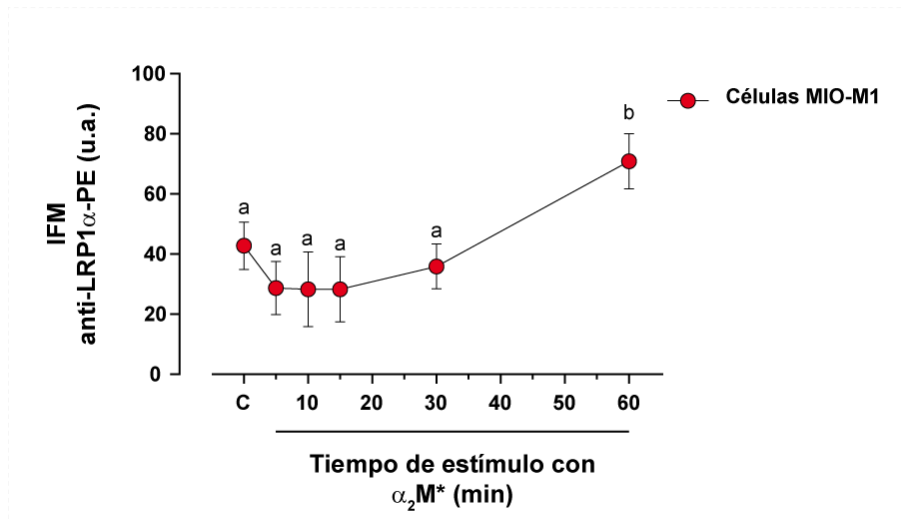


Figura 4.25. Ensayo de citometría de flujo para determinar niveles de LRP1 en la MP de células MIO-M1. Ensayo de estimulación con α_2M^* , seguido de la inmunodetección de LRP1 en la MP (marcación a 4 °C) y analizado por CF. El anticuerpo anti-LRP1 α utilizado se encuentra conjugado con ficoeritrina o PE (del inglés *phycoerythrin*). La figura muestra la IFM \pm DE de anti-LRP1 α -PE en función del tiempo de estimulación. Estos valores de IFM son una medida, en unidades arbitrarias (u.a.), del nivel de expresión de LRP1 en la MP, obtenidos a partir de determinaciones realizadas en al menos 30 000 células por condición, provenientes de 3 experimentos independientes. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). La letra C corresponde a la condición de no estímulo con α_2M^* .

Finalmente, con el objetivo de corroborar lo observado por microscopía de TIRF y por CF, se llevó a cabo un ensayo de biotilación de proteínas de la MP, seguido de IP de LRP1 y analizada por *Western blot*, en células MIO-M1 no estimuladas (control) y estimuladas con α_2M^* . En la figura 4.26 se observa que los niveles de LRP1 en la superficie de células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* durante 30 min, se incrementaron respecto a la condición control. Esto se evidenció a partir de la detección de las bandas correspondientes a las dos subunidades de LRP1, la de 515 kDa (subunidad α) y la de 85 kDa (subunidad β). Como control se muestra el *Western blot* para la inmunodetección de LRP1 β en los extractos proteicos utilizados en el ensayo de IP.

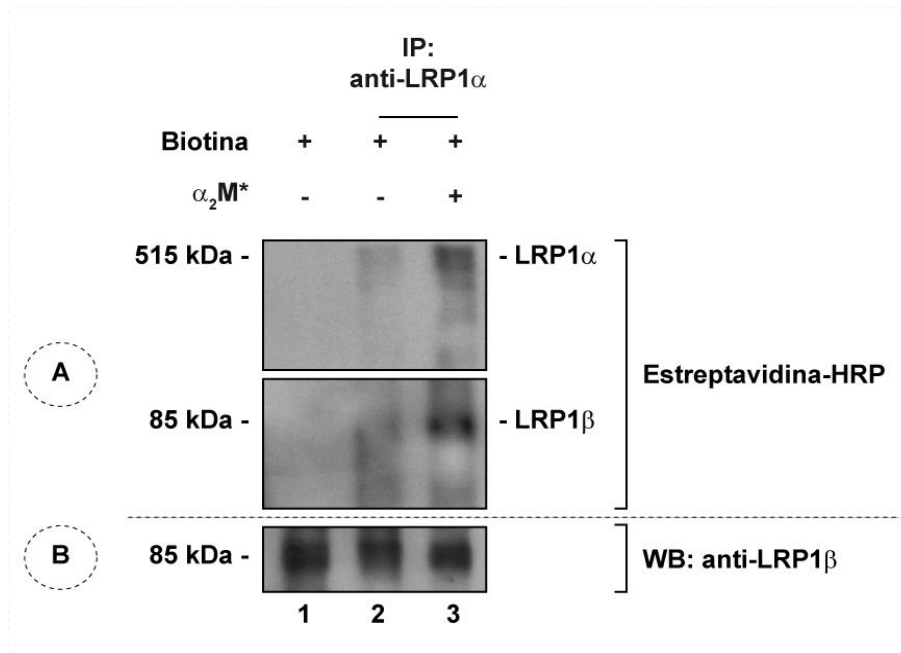


Figura 4.26. Ensayo de biotinilación de proteínas de superficie e IP para determinar los niveles de expresión de LRP1 en la MP de células MIO-M1. A) Detección quimioluminiscente de estreptavidina peroxidasa (HRP) que se une a ambas subunidades de LRP1 biotiniladas e inmunoprecipitadas (IP), provenientes de extractos proteicos luego de un ensayo de estimulación con α_2M^* . Calle 1, control negativo (CN) de IP (eluato de extracto proteico de células no estimuladas y biotiniladas, sometido a IP con un anticuerpo no específico); calle 2, control de estímulo (eluato de extracto proteico de células no estimuladas con α_2M^* y biotiniladas, sometido a IP con el anticuerpo anti-LRP1 α); calle 3, estímulo (eluato de extracto proteico de células estimuladas con α_2M^* y biotiniladas, sometido a IP con el anticuerpo anti-LRP1 α). B) Imagen radiográfica de un experimento de *Western blot* (WB) para la inmunodetección de LRP1 β en los mismos extractos proteicos utilizados en A (10% de la cantidad de proteínas totales utilizadas para la IP). Para más detalles ver Materiales y métodos.

4.1.4.2 Movilidad de LRP1 en ausencia y presencia de α_2M^*

Luego de corroborar que α_2M^* indujo el incremento del nivel LRP1 en la MP de células MIO-M1, se procedió a investigar si esto conllevaba un aumento en la movilidad intracelular del receptor. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de endocitosis continua de α_2M^* durante 30 min en células MIO-M1 transfectadas transientemente con la construcción mLRP4-GFP, seguido de microscopía de FRAP. En la figura 4.27 puede apreciarse que luego del estímulo con α_2M^* la fracción móvil de mLRP4-GFP se incrementó de un 35% (condición control, en A) a un 48% (condición con estímulo, en B). También se observa que la recuperación de la fluorescencia fue mayor en presencia de α_2M^* , aumentando de un 45% (condición control) a un 52% (condición con estímulo), mientras que el tiempo medio para alcanzar el 50% de la recuperación fue de 144,5 s en la condición control y de 135,2 s en la condición de estímulo. Estos datos son indicativos de que bajo estímulo con α_2M^* , no

solo se incrementó la fracción móvil del receptor, sino que además la velocidad de movimiento de las moléculas de mLRP4-GFP fue mayor.

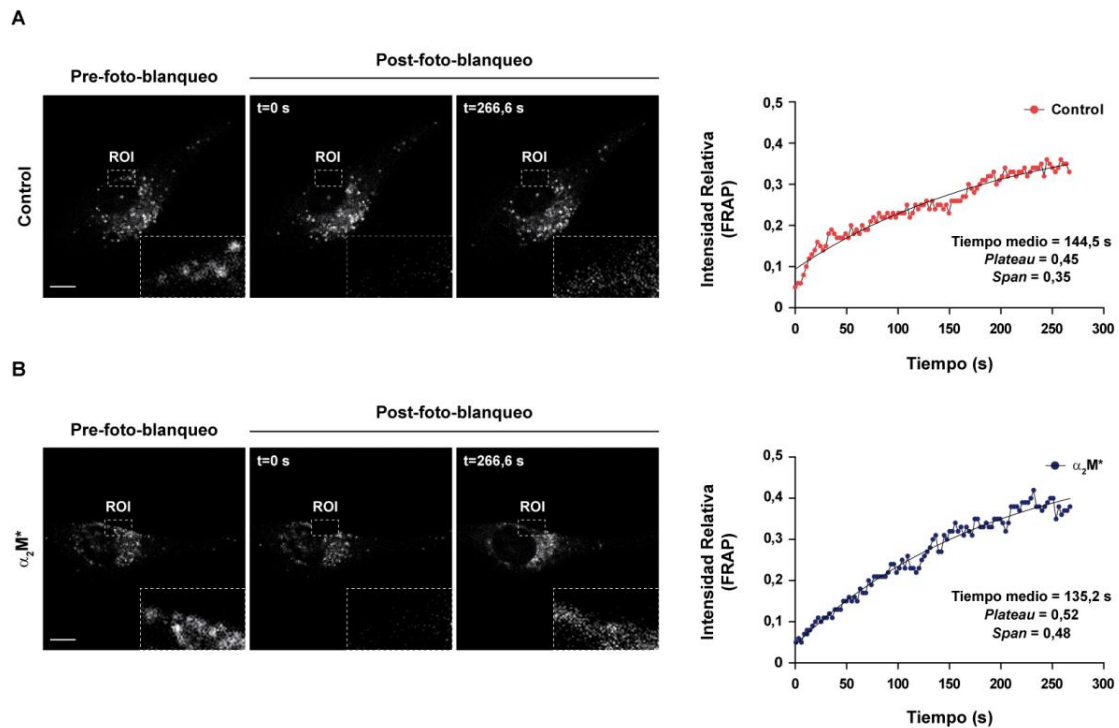


Figura 4.27. Ensayo de microscopía de FRAP: movilidad de mLRP4-GFP en células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* . Ensayo de estimulación con α_2M^* de células MIO-M1 transfectadas transientemente con la construcción mLRP4-GFP, seguido de microscopía FRAP. La figura muestra imágenes de células MIO-M1 transfectadas transientemente con mLRP4-GFP, no estimuladas (A) y estimuladas con α_2M^* (B), antes del foto-blanqueo de la región celular de interés (ROI) y luego del foto-blanqueo de dicha ROI (imágenes a tiempo 0 s y a tiempo final 266,6 s). En el extremo inferior derecho de cada imagen se muestra la correspondiente ampliación de la ROI (*zoom* digital 4X). La barra de escala corresponde a 10 μ m. Los gráficos de puntos muestran la intensidad relativa de mLRP4-GFP en función del tiempo de recuperación de la fluorescencia luego del foto-blanqueo (s) para cada condición ensayada. Del análisis estadístico de los datos se calcularon: Tiempo medio (tiempo medio en alcanzar el 50% del *Plateau*), *Plateau* (máximo nivel de recuperación de fluorescencia), *Span* (fracción móvil) y $1 - \text{Span}$ (fracción inmóvil).

Estos hallazgos resultan interesantes si se tiene en cuenta que α_2M^* solo se une a los dominios I y II del LRP1, condición que le impide interactuar con el mLRP4-GFP. Una posibilidad es que α_2M^* induzca la movilización de *pooles* de almacenamiento del receptor. Si bien esto ha sido demostrado para LRP1 en adipocitos y hepatocitos luego del estímulo con insulina, en esos sistemas celulares se ha comprobado la existencia de vesículas respondedoras a insulina (IRV), que contienen LRP1 como una de sus proteínas constitutivas mayoritarias. En este sentido, aún se desconoce si células MIO-M1 poseen este tipo de vesículas o de naturaleza similar.

4.1.4.3 Incremento del nivel de LRP1 en la membrana plasmática: aportes del reciclado endocítico lento y de la vía biosintética

Habiendo corroborado que los niveles de LRP1 en la MP y en el compartimento de Golgi de células MIO-M1 se incrementaron a partir del estímulo con α_2M^* , se decidió evaluar cuál es el aporte del reciclado endocítico lento y de la vía biosintética en este proceso.

Si bien es posible que LRP1 recicle a la MP por más de una ruta, la más común para los receptores de membrana de este tipo es la que involucra el CRE y está mediada por Rab11. Por este motivo, y habiendo observado que LRP1 se ubicó en vesículas Rab11 positivas en ausencia y presencia de α_2M^* , se decidió realizar un ensayo de estimulación con el ligando durante 30 min en células MIO-M1, no transfectadas (control) y transfectadas con un plásmido que codifica para una dominante negativa de Rab11 fusionada a GFP (Rab11S25N-GFP). Luego se realizó la biotinylación de proteínas de MP y una IP para el LRP1 analizada por *Western blot*. En la figura 4.28 se observa que tanto en las células control como en las transfectadas, el estímulo con α_2M^* indujo un incremento del nivel de LRP1 en la MP, tal como se mostró en la figura 4.26, lo que sugiere que este proceso no sería consecuencia de un reciclado del receptor mediado por Rab11.

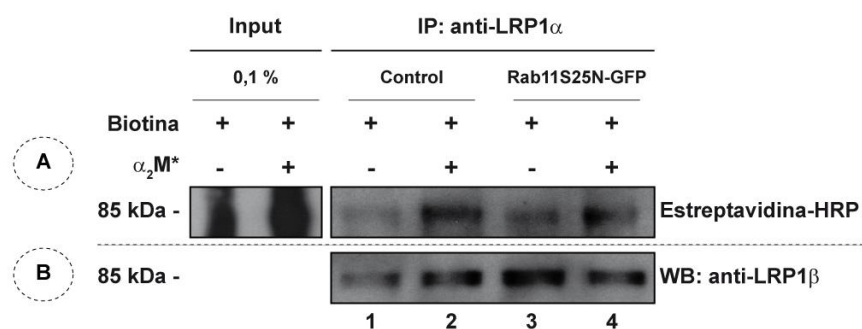


Figura 4.28. Ensayo de biotinylación de proteínas de superficie e IP para determinar los niveles de expresión de LRP1 en la MP. A) Imagen radiográfica de la detección quimioluminiscente de estreptavidina peroxidasa (HRP) que se une a la subunidad β de LRP1 biotinylada e inmunoprecipitada (IP), proveniente de extractos proteicos de células MIO-M1 no transfectadas (control) y transfectadas transientemente con Rab11S25N-GFP, luego de un ensayo de endocitosis continua de α_2M^* . Todas las calles corresponden a eluatos de extractos proteicos de células cuyas proteínas de MP fueron biotinyladas y sometidas a IP con el anticuerpo anti-LRP1 α . Calles 1 y 3, controles de estímulo de células no transfectadas y transfectadas con Rab11S25N-GFP, respectivamente; calles 2 y 4, células no transfectadas y transfectadas con Rab11S25N-GFP, respectivamente, estimuladas con α_2M^* . B) Imagen radiográfica de un experimento de *Western blot* (WB) para la inmunodetección de LRP1 β en los mismos extractos proteicos utilizados en A (10% de la cantidad de proteínas totales utilizadas para la IP). Para más detalles ver Materiales y métodos.

Paso siguiente, se evaluó si el incremento de LRP1 en la MP por efecto de α_2M^* es producto de la inducción de la biosíntesis y secreción de este receptor. Para ello, se analizó la expresión génica de *lrp1* a través de un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa o RT-PCR (del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*) en células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* . La figura 4.29 muestra que los niveles de ARN mensajero (ARNm) de LRP1 no se modificaron luego del estímulo con α_2M^* . Esto indicó que el ligando no indujo la expresión génica de *lrp1* al menos a los tiempos evaluados, sin embargo no se descarta que α_2M^* sea capaz de promover la traducción de *pooles* pre-existentes de ARNm de LRP1.

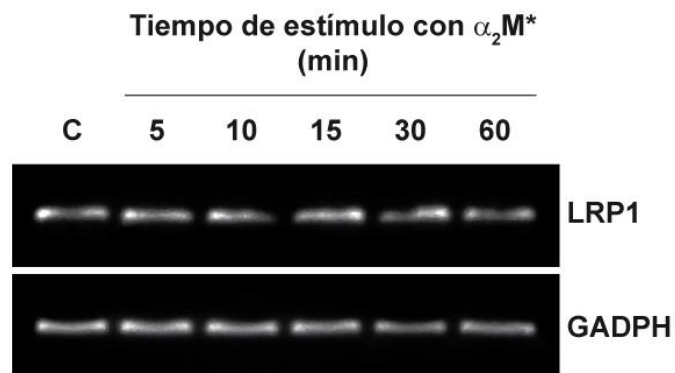


Figura 4.29. Ensayo de RT-PCR para LRP1 en células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* . La figura muestra bandas correspondientes a transcritos de LRP1 provenientes de extractos de células MIO-M1 luego de un ensayo de estimulación con α_2M^* durante diferentes períodos de tiempo. Se utilizó *SYBR green* para la detección por fluorescencia de los productos de RT-PCR. Como controles de carga se utilizaron los productos de RT-PCR de transcritos de GADPH. La primera calle corresponde al control de estímulo, C (extractos de células MIO-M1 que no fueron estimuladas con α_2M^*). Las calles de la segunda a la sexta corresponden a los extractos de células MIO-M1 que fueron estimuladas con α_2M^* durante 5, 10, 15, 30 y 60 min, respectivamente.

Del mismo modo, también se llevó a cabo un ensayo de estimulación con α_2M^* analizado por *Western blot* para evaluar el nivel proteico de LRP1 β . La figura 4.30 muestra que el estímulo con α_2M^* no indujo incrementos en la expresión de LRP1 a ninguno de los tiempos ensayados.

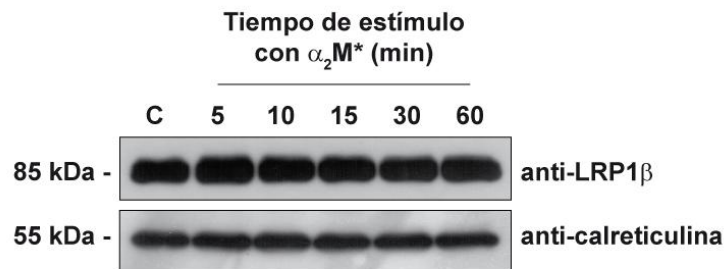


Figura 4.30. Ensayo de *Western blot* para LRP1 en células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* . Imagen radiográfica de un experimento de *Western blot* (WB) para la inmunodetección de LRP1 β en extractos proteicos de células MIO-M1 luego de un ensayo de estimulación con α_2M^* por diferentes períodos de tiempo. Se utilizó como control de carga proteica la inmunodetección de la proteína calreticulina. Letra C, corresponde al control de estímulo (extracto proteico de células MIO-M1 que no fueron estimuladas con α_2M^*); las calles de la segunda a la sexta corresponden a extractos proteicos de células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* durante 5, 10, 15, 30 y 60 min, respectivamente.

A partir de estos resultados se concluyó que α_2M^* indujo el incremento de LRP1 en la MP de células MIO-M1 por un mecanismo que no involucró el reciclado endocítico lento (vía Rab11) ni la biosíntesis del receptor.

4.1.4.4 Conclusiones preliminares

Mediante la utilización de tres técnicas experimentales diferentes se demostró que α_2M^* indujo el incremento de los niveles de LRP1 en la MP de células MIO-M1. Si bien existen evidencias de que insulina produce el mismo efecto en adipocitos y hepatocitos, a diferencia de lo observado para α_2M^* , el mecanismo por el cual tiene lugar dicho proceso no involucra la interacción directa de esta hormona con LRP1.

Por otra parte, se demostró que la fracción de moléculas móviles de LRP1 y su velocidad de movimiento se incrementaron a partir de la interacción con α_2M^* . Dado que estos resultados se obtuvieron a partir del seguimiento (mediante microscopía de FRAP) de una proteína fluorescente que no es capaz de unir α_2M^* , pero que contiene todos los motivos de LRP1 que se conoce están involucrados en el transporte de este receptor, se sugiere que el incremento en la MP involucraría la movilización de *pools* de almacenamiento intracelulares, similares a las IRV, y que el reciclado endocítico lento (vía Rab11) y la biosíntesis del receptor no estarían involucrados en dicho proceso.

4.2 Migración celular inducida por la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se demostró que las células MIO-M1, a partir del estímulo con α_2M^* , incrementan su capacidad migratoria sobre matrices proteicas (colágeno tipo I y laminina) sin modificar significativamente su tasa de proliferación celular (Barcelona, 2010). Además se evidenció en este sistema celular que α_2M^* indujo la activación extracelular de proMMP-2, el incremento de la expresión de MT1-MMP, así como también la relocalización de ambas MMP en las protrusiones celulares (Barcelona, 2010). Al mismo tiempo, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se demostró una asociación molecular entre MT1-MMP y LRP1, lo que estaría relacionado con la activación de proMMP-2 y el incremento de la migración celular mediada por α_2M^* (Barcelona, 2010). Si bien esta interacción MT1-MMP/LRP1 ha sido demostrada bioquímicamente, aún no ha sido totalmente caracterizada, por lo que se desconoce en qué región de la célula tiene lugar y cuáles son sus implicancias. En este punto es importante mencionar que existe evidencia de que la endocitosis y el transporte intracelular de LRP1 jugarían un rol clave en la regulación de la actividad de otros receptores de transmembrana, tales como PDGFR β y uPAR, los cuales ejercen importantes funciones en el control de la migración de células normales y tumorales (Boucher y col., 2003; Gonias y col., 2011).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y habiendo demostrado durante el desarrollo del presente trabajo de tesis que, en células MIO-M1, α_2M^* indujo la redistribución subcelular de LRP1 (al igual que lo observado para MT1-MMP) y el incremento de su nivel en la MP, resultó de interés investigar la participación de la interacción LRP1/MT1-MMP en la migración celular inducida por α_2M^* .

4.2.1 Participación de LRP1 y MT1-MMP en la activación de proMMP-2 y en la migración celular inducida por α_2M^*

4.2.1.1 Participación de LRP1 en la migración celular inducida por α_2M^*

Con el propósito de evaluar si la migración celular inducida por α_2M^* es mediada por la interacción con su receptor, se llevó a cabo el silenciamiento (S) del ARNm de LRP1 en células MIO-M1 mediante el uso de dos estrategias experimentales: una basada en shRNA (del

inglés *small harpin RNA*) y otra en siRNA (del inglés *small interfering RNA*). La figura 4.31 muestra los resultados de un ensayo de *Western blot* para LRP1 β , donde es posible apreciar que ambas técnicas produjeron disminuciones significativas de los niveles proteicos de LRP1 (~70% y ~80% para shRNA y siRNA, respectivamente).

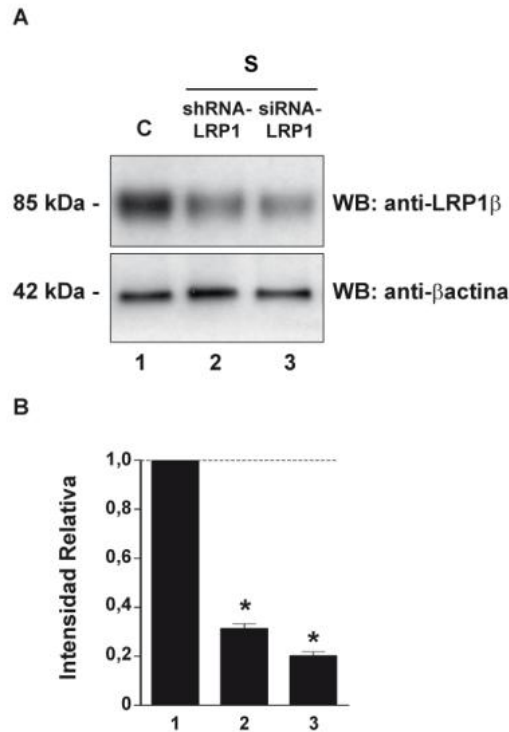


Figura 4.31. Ensayo de *Western blot* para la evaluación del nivel de expresión de LRP1 en células MIO-M1. A) Imagen radiográfica representativa de los análisis de *Western blot* (WB) de tres experimentos independientes para la inmunodetección de la subunidad β del LRP1 en células MIO-M1 no transfectadas (1) y transfectadas con shRNA-LRP1 (2) o siRNA-LRP1 (3). Se utilizó como control de carga proteica la inmunodetección de la proteína β actina. B) Medias \pm SEM de las intensidades relativas (respecto a β actina) de las bandas correspondientes a LRP1 β , para las tres condiciones experimentales evaluadas (determinadas por densitometría). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. El asterisco (*) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

Luego, se realizó un ensayo de migración bidimensional en la herida (del inglés *two-dimensional wound-scratch assay*) donde las células MIO-M1, no transfectadas (Control) y transfectadas con shRNA-LRP1 o siRNA-LRP1, se cultivaron en placas recubiertas con colágeno tipo I en ausencia y presencia de α_2 M*. La figura 4.32 muestra que el silenciamiento de LRP1, en células MIO-M1, disminuyó significativamente la migración celular inducida por α_2 M*. Por el contrario, el silenciamiento del LRP1 no afectó la migración celular inducida por FGF-2 (Romo y col., 2011). Estos resultados están

relacionados con los obtenidos para ensayos de migración en ausencia y presencia de α_2M^* luego de la preincubación con GST-RAP. Se observó que al bloquear la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$ se produjo una disminución significativa de la migración de células MIO-M1 (Barcelona, 2010). En conjunto estos resultados permitieron concluir que la migración de células MIO-M1 promovida por α_2M^* fue mediada por LRP1.

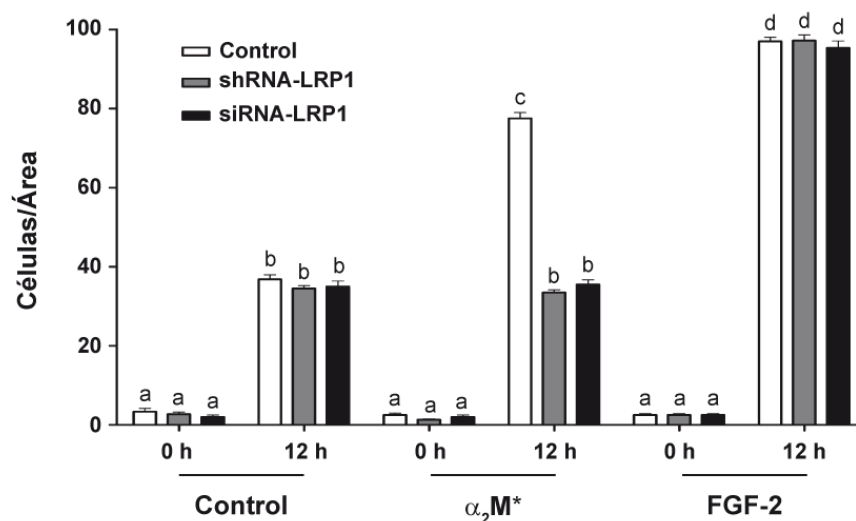


Figura 4.32. Ensayo de migración bidimensional en la herida de células MIO-M1 silenciadas para LRP1. Medias \pm SEM del número de células que invaden la zona de la herida (células/área) para células no transfectadas (control de transfección) y transfectadas con shRNA-LRP1 o siRNA-LRP1; no estimuladas (control de estimulación) y estimuladas con α_2M^* durante 12 h. Se utilizó el FGF-2 como control positivo de migración celular. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.1.2 Participación de LRP1 y MT1-MMP en la activación de proMMP-2

Las células gliales de Müller de la retina pueden regular la expresión y la actividad de MMP-2 y MMP-9, las cuales estarían implicadas en la migración celular y la remodelación de la MEC (Limb y col., 2002a). En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se observó que los sobrenadantes de cultivos de células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* , en comparación con los sobrenadantes controles, mostraron mayores niveles de la forma activa de MMP-2. En este sentido, también se evidenció que los niveles de transcripto y proteína de MT1-MMP y TIMP-2 se incrementaron luego del estímulo con α_2M^* (Barcelona, 2010). Con el objeto de determinar si LRP1 media la activación de proMMP-2 inducida por α_2M^* , se realizó un ensayo de zimografía (gel de poliacrilamida co-polimerizado con gelatina) de sobrenadantes de cultivo de células MIO-M1, control y silenciadas para LRP1, en ausencia

y presencia de α_2M^* . En la figura 4.33 se muestra que el silenciamiento de LRP1 bloqueó la activación de proMMP-2 inducida por α_2M^* en células MIO-M1 transfectadas con shRNA-LRP1 o siRNA-LRP1.

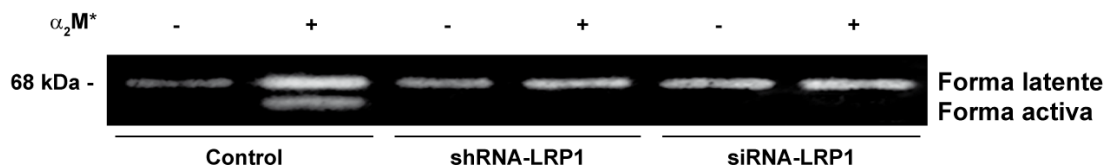


Figura 4.33. Ensayo de zimografía de sobrenadantes de células MIO-M1 silenciadas para LRP1. Las calles corresponden a sobrenadantes de células MIO-M1 no transfectadas (control) y transfectadas con shRNA-LRP1 o siRNA-LRP1; no estimuladas (-) y estimuladas (+) con α_2M^* durante 60 min. La imagen que se muestra es representativa de 3 experimentos independientes.

En el mismo sentido, y teniendo en cuenta que la activación de proMMP-2 en células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* se produce principalmente a nivel extracelular (Barcelona, 2010), se decidió evaluar si dicha activación requiere de MT1-MMP, la cual se conoce que, bajo otras condiciones experimentales, media dicho proceso a través de la formación de un complejo trimolecular con proMMP-2 y TIMP-2 en la MP (Seiki y col., 2003).

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo de silenciamiento del ARNm de MT1-MMP en células MIO-M1 mediante la transfección transiente con un siRNA específico. La figura 4.34 muestra los resultados de un ensayo de *Western blot* para MT1-MMP, donde es posible apreciar que el silenciamiento produjo una disminución significativa del nivel proteico de MT1-MMP (~70%).

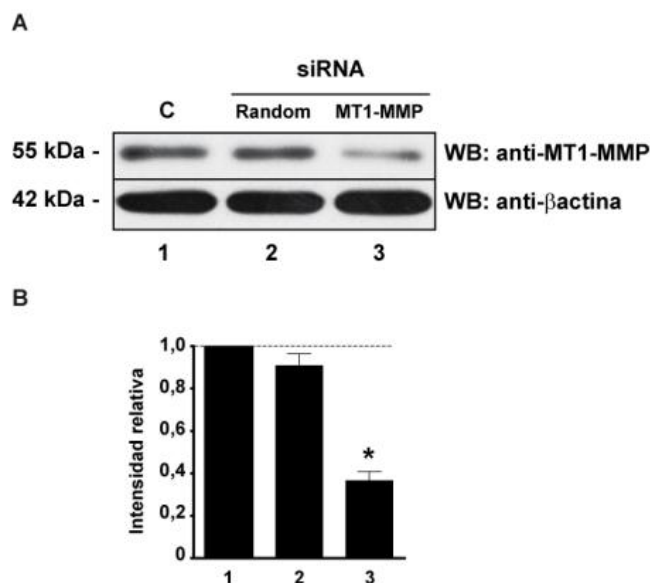


Figura 4.34. Ensayo de *Western blot* para la evaluación del nivel de expresión de MT1-MMP en células MIO-M1. A) Imagen radiográfica representativa de los análisis de *Western blot* (WB) de 3 experimentos independientes para la inmunodetección de MT1-MMP en células MIO-M1 no transfectadas (1) y transfectadas con un siRNA-Random (2) o un siRNA-MT1-MMP (3). Se utilizó como control de carga proteica la inmunodetección de la proteína β actina. B) Medias \pm SEM de las intensidades relativas (respecto a β actina) de las bandas correspondientes a MT1-MMP, para las 3 condiciones experimentales evaluadas. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. El asterisco (*) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

En segundo lugar se realizó un ensayo de zimografía de los sobrenadantes de cultivo de células MIO-M1 transfectadas con siRNA-Random o siRNA-MT1-MMP, en ausencia y presencia de α_2M^* durante 60 min. En la figura 4.35 se muestra que el silenciamiento de MT1-MMP en células MIO-M1 bloqueó la activación de proMMP-2 inducida por α_2M^* .

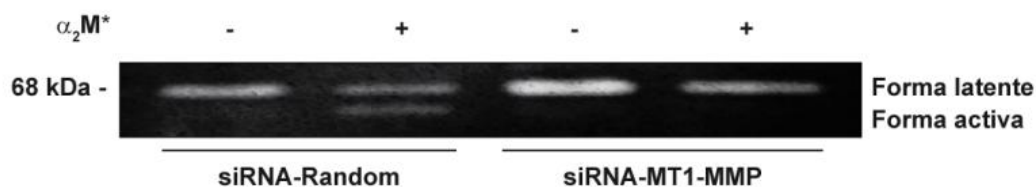


Figura 4.35. Ensayo de zimografía de sobrenadantes de células MIO-M1 silenciadas para MT1-MMP. Las calles corresponden a los sobrenadantes de células MIO-M1 transfectadas con siRNA-Random o siRNA-MT1-MMP; no estimuladas (-) y estimuladas (+) con α_2M^* . La imagen que se muestra es representativa de tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que la activación de proMMP-2 inducida por α_2M^* requeriría de LRP1 y MT1-MMP.

4.2.1.3 Participación de MT1-MMP en la migración celular inducida por α_2M^*

En base a estos últimos resultados, se decidió evaluar si la migración celular inducida por α_2M^* requiere de MT1-MMP. Para ello, se realizó un ensayo de migración bidimensional en la herida donde las células MIO-M1, control y silenciadas para MT1-MMP, se cultivaron en placas recubiertas con colágeno tipo I en ausencia y presencia de α_2M^* . La figura 4.36 muestra que el silenciamiento de MT1-MMP en células MIO-M1 disminuyó significativamente la migración celular inducida por α_2M^* . Resultó interesante que esta migración también fue inhibida por GM6001, un inhibidor de MMP, lo cual indica que la motilidad de estas células estaría mediada por MT1-MMP y por la actividad extracelular de MMP.

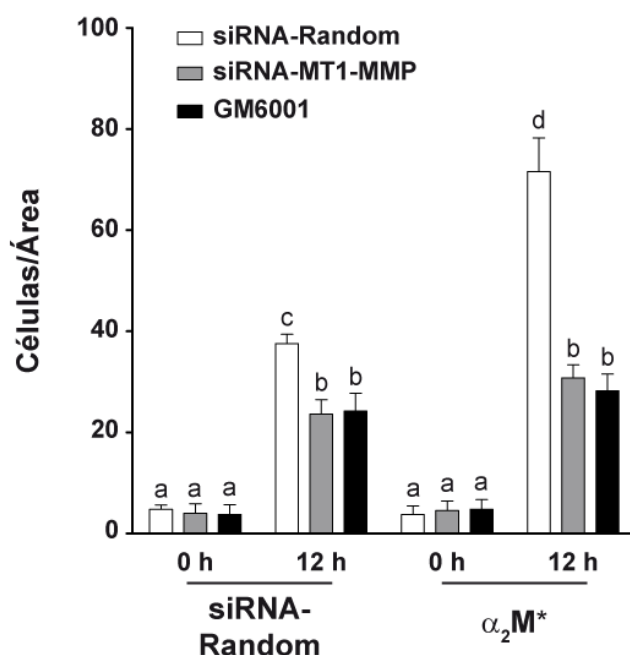


Figura 4.36. Ensayo de migración bidimensional en la herida de células MIO-M1 silenciadas para MT1-MMP y en presencia del inhibidor GM6001. Gráfico de barras de las medias \pm SEM del número de células que invaden la zona de la herida (células/área) para células transfectadas con siRNA-Random, siRNA-MT1-MMP o incubadas con GM6001; no estimuladas (control de estimulación) y estimuladas con α_2M^* durante 12 h. Los resultados que se muestran son representativos de tres experimentos independientes. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.2 Distribución subcelular de MT1-MMP

La localización subcelular y la distribución polarizada de MT1-MMP en la MP son eventos claves para la migración celular y para la activación de proMMP-2 (Frittoli y col., 2011; Strongin, 2010). En este sentido, resultados previos de nuestro grupo de investigación

demonstraron que el estímulo de células MIO-M1 con α_2M^* indujo la relocalización celular de MT1-MMP hacia las protuberancias celulares (Barcelona, 2010). Además se evidenció, mediante experimentos de IP, que MT1-MMP forma un complejo molecular con LRP1, asociación que se incrementa significativamente en presencia de α_2M^* (Barcelona, 2010). Teniendo en cuenta que α_2M^* , a través de LRP1, induce la redistribución de MT1-MMP hacia las protuberancias celulares, se evaluó la endocitosis y las vías de reciclado endocíticas de MT1-MMP en asociación con LRP1.

4.2.2.1 Localización subcelular del complejo MT1-MMP/LRP1

Para determinar la localización subcelular del complejo MT1-MMP/LRP1 se llevaron a cabo ensayos de endocitosis continua de α_2M^* durante 60 min en células MIO-M1 transfectadas o no con una construcción que codifica para la proteína MT1-MMP-GFP. Luego se procedió a realizar FD, IFI de LRP1 y MC. La figura 4.37 muestra que α_2M^* indujo un incremento significativo de la colocalización de MT1-MMP-GFP con LRP1 ($62 \pm 2\%$) en vesículas perinucleares, en comparación con células no estimuladas ($21 \pm 1\%$). Por otra parte, la colocalización de MT1-MMP-GFP y LRP1 no se evidenció en las regiones cercanas a las protuberancias celulares (recuadros 1 y 3) de células estimuladas con α_2M^* , lo que indica que ocurrió mayoritariamente a nivel perinuclear (recuadros 2 y 4).

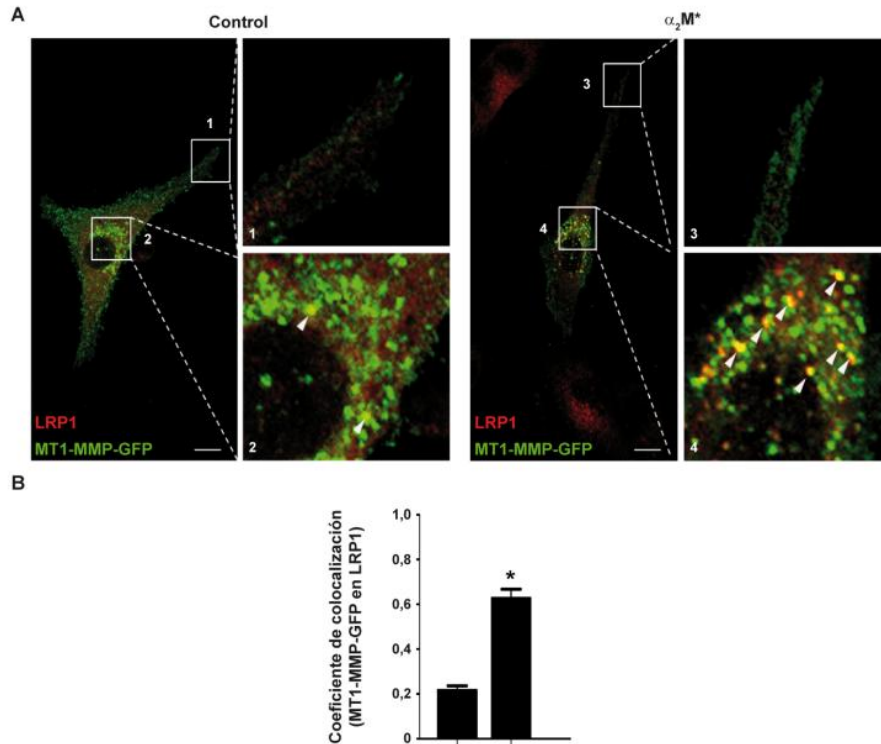


Figura 4.37. Colocalización de MT1-MMP-GFP con LRP1 en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* , seguido de FD e IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de la colocalización de MT1-MMP-GFP y LRP1, en ausencia y presencia de α_2M^* (paneles control y α_2M^* , respectivamente). También se observan ampliaciones (recuadros 1–4, *zoom* digital 4X) de las protuberancias celulares (1 y 3) y de las regiones perinucleares (2 y 4) de las células, provenientes de las imágenes combinadas. Las puntas de flecha indican vesículas que contenían ambas proteínas (colocalización). Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 15 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían MT1-MMP-GFP y eran LRP1 positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba t -Student para muestras independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Con el propósito de determinar si el aumento de los niveles de colocalización entre ambas proteínas es dependiente de la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$, se llevó a cabo un ensayo de endocitosis continua de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ en células MIO-M1 en ausencia y presencia de GST-RAP, seguido de FD, IFI de MT1-MMP y LRP1. La figura 4.38 muestra que la colocalización de MT1-MMP y LRP1 en ausencia de GST-RAP es significativamente mayor ($51 \pm 7\%$) al nivel de colocalización en presencia de esta proteína ($19 \pm 3\%$). Resultó interesante observar un importante número de vesículas que contenían α_2M^* Alexa⁴⁸⁸, MT1-MMP y LRP1 (imagen binaria, colocalización triple), lo que sugirió que la asociación molecular se produciría en EE del tipo endosomas de *sorting*.

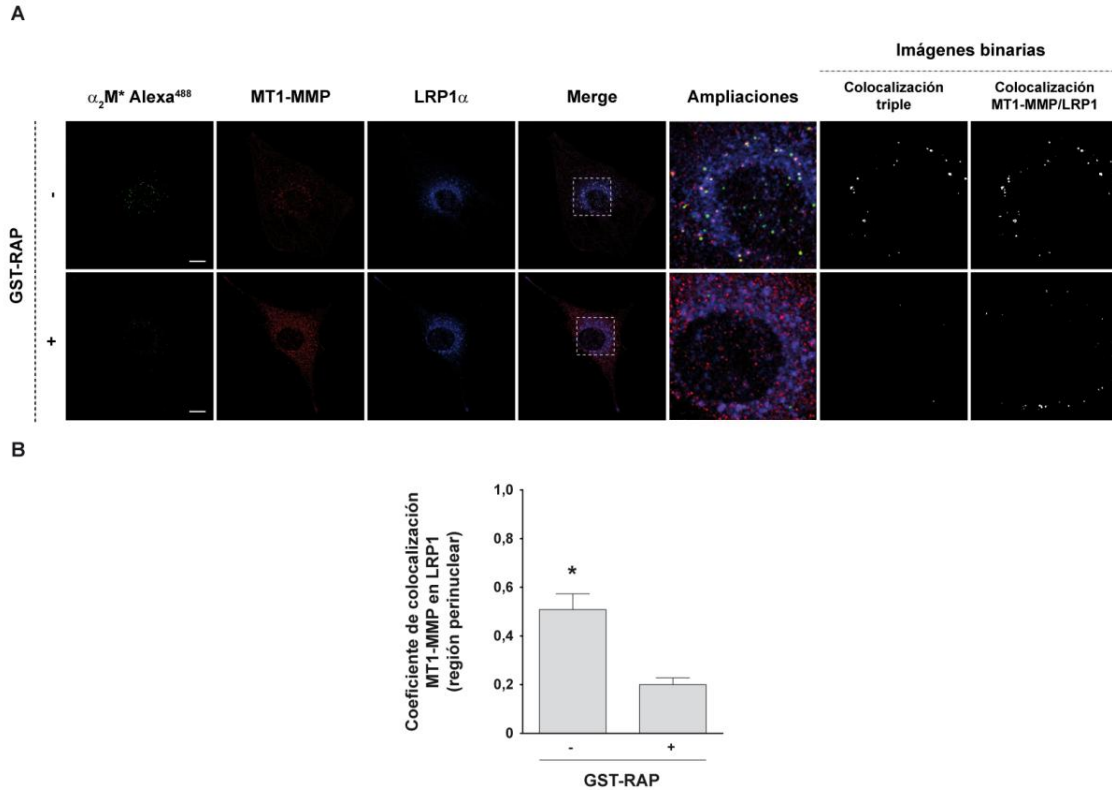


Figura 4.38. Inhibición de la colocalización de MT1-MMP con LRP1 en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ en células MIO-M1, seguido de FD e IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de α_2M^* Alexa⁴⁸⁸ (primera columna), de MT1-MMP (segunda columna), de LRP1 (tercera columna) y de la colocalización de las tres proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de GST-RAP (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (quinta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones perinucleares de las células provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros), y sus correspondientes imágenes binarias (columnas sexta y séptima), en las que se muestran en color blanco los píxeles que colocalizaron (sexta columna, colocalización triple; séptima columna, colocalización MT1-MMP/LRP1). Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 μ m. B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contienen MT1-MMP y son LRP1 positivas) en ausencia y presencia de GST-RAP, obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba τ -Student para muestras independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Con el propósito de corroborar que la asociación de MT1-MMP y LRP1 tuvo lugar en EE del tipo endosomas de *sorting*, se procedió a realizar un ensayo de endocitosis continua de α_2M^* en células MIO-M1 transfectadas con el plásmido que codifica para la proteína MT1-MMP-GFP. Luego se procedió a realizar FD, IFI de LRP1 y EEA1. La figura 4.39 muestra que el nivel de colocalización de MT1-MMP-GFP y EEA1 (vesículas que contenían MT1-MMP-GFP y eran EEA1 positivas) en células estimuladas con α_2M^* fue significativamente mayor ($50 \pm 5\%$) respecto al observado en las células no estimuladas ($15 \pm 1\%$). Del mismo modo, LRP1 también evidenció un aumento significativo de su colocalización con

vesículas EEA1 positivas ($57 \pm 1\%$) en células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* , en comparación con células no estimuladas ($30 \pm 2\%$), tal como se observó anteriormente (sección 4.1.3.2). En las imágenes *Merge* (MT1-MMP-GFP/LRP1/EEA1), así como en sus ampliaciones e imágenes binarias, es posible apreciar que el nivel de colocalización de las tres proteínas fue mayor en células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* respecto a células no estimuladas. En conjunto, estos resultados demostraron que α_2M^* promovió la acumulación de la proteína MT1-MMP en EE del tipo endosomas de *sorting* LRP1 positivos.

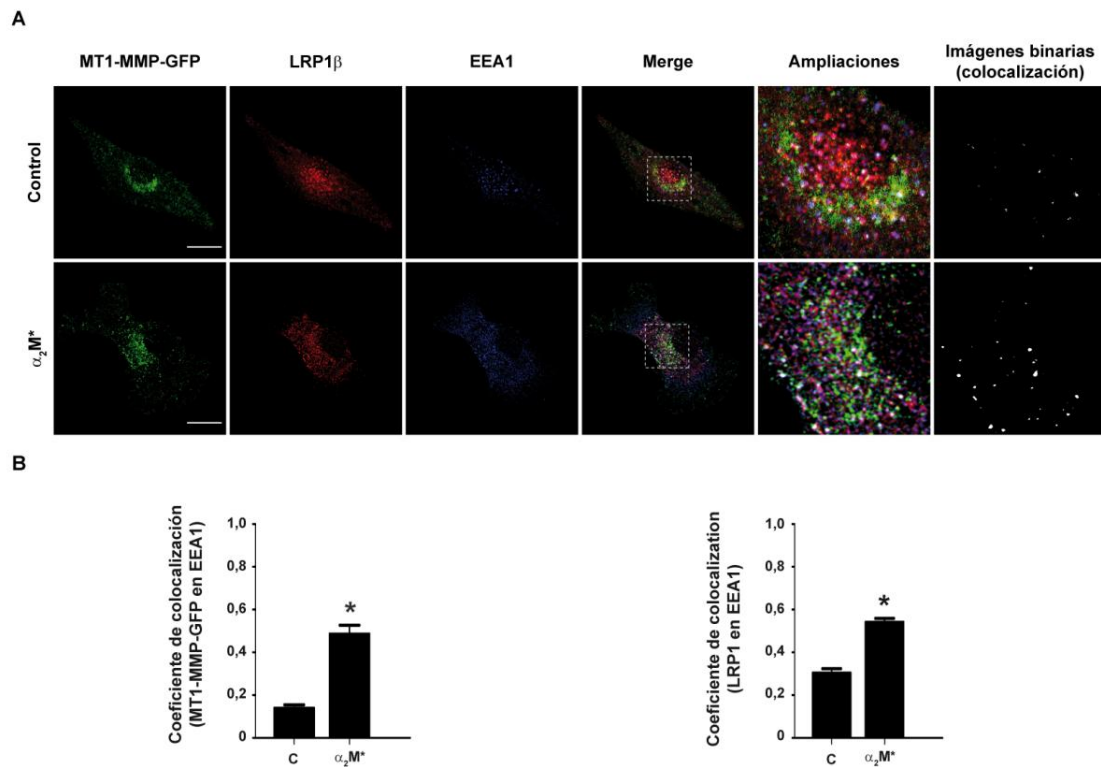


Figura 4.39. Colocalización de MT1-MMP-GFP con LRP1 en endosomas de *sorting* de células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* seguido de FD e IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de MT1-MMP-GFP (primera columna), de LRP1 (segunda columna), de EEA1 (tercera columna) y de la colocalización de las tres proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (quinta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones perinucleares de las células provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) y su correspondiente imagen binaria (sexta columna) en la que se muestra en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contienen MT1-MMP-GFP y son EEA1 positivas, a la izquierda; proporción de vesículas que contienen LRP1 y son EEA1 positivas, a la derecha) en ausencia y presencia de α_2M^* . Los coeficientes de colocalización se obtuvieron a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba τ -Student para muestras independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.2.2 Efecto de α_2M^* sobre el reciclado endocítico de MT1-MMP

La actividad de MT1-MMP a nivel de superficie celular depende de su transporte intracelular hacia la MP, que se produce a través de alguna de estas dos vías: 1) por una ruta endocítica de reciclado dependiente de Rab11; y 2) por una ruta exocítica regulada por Rab8 (Bravo-Cordero y col., 2007; Schram y col., 2011; Tang y Ng, 2009). El reciclado endocítico de MT1-MMP a la MP es consecuencia de ambos tipos de endocitosis, dependiente y no dependiente de clatrina, las cuales dirigen las moléculas de MT1-MMP hacia EE y LE antes de ser recicladas a la MP (Poincloux y col., 2009). En contraste, la ruta exocítica de MT1-MMP implica su movilización desde compartimentos de almacenamiento, la cual es inducida por el contacto célula-MEC (Bravo-Cordero y col., 2007). Se sugirió que estas dos rutas estarían implicadas en el control del transporte de MT1-MMP a la *invadopodia*, cuando las células necesitan responder de manera rápida y transitoria a factores mitogénicos solubles (Frittoli y col., 2011).

Para evaluar si α_2M^* indujo el reciclado endocítico de MT1-MMP en células MIO-M1, se determinó su nivel de colocalización con Rab11, marcador del CRE. Para ello, células MIO-M1 se co-transfectaron con MT1-MMP-GFP y Rab11-RFP. La figura 4.40 muestra que el nivel de colocalización de MT1-MMP-GFP con Rab11-RFP en células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* ($43 \pm 3\%$) fue significativamente mayor al de células no estimuladas ($25 \pm 3\%$). Resultó interesante observar que gran parte de esa colocalización se dio a nivel de las protuberancias celulares (recuadros 3 y 4) de las células MIO-M1 estimuladas con α_2M^* .

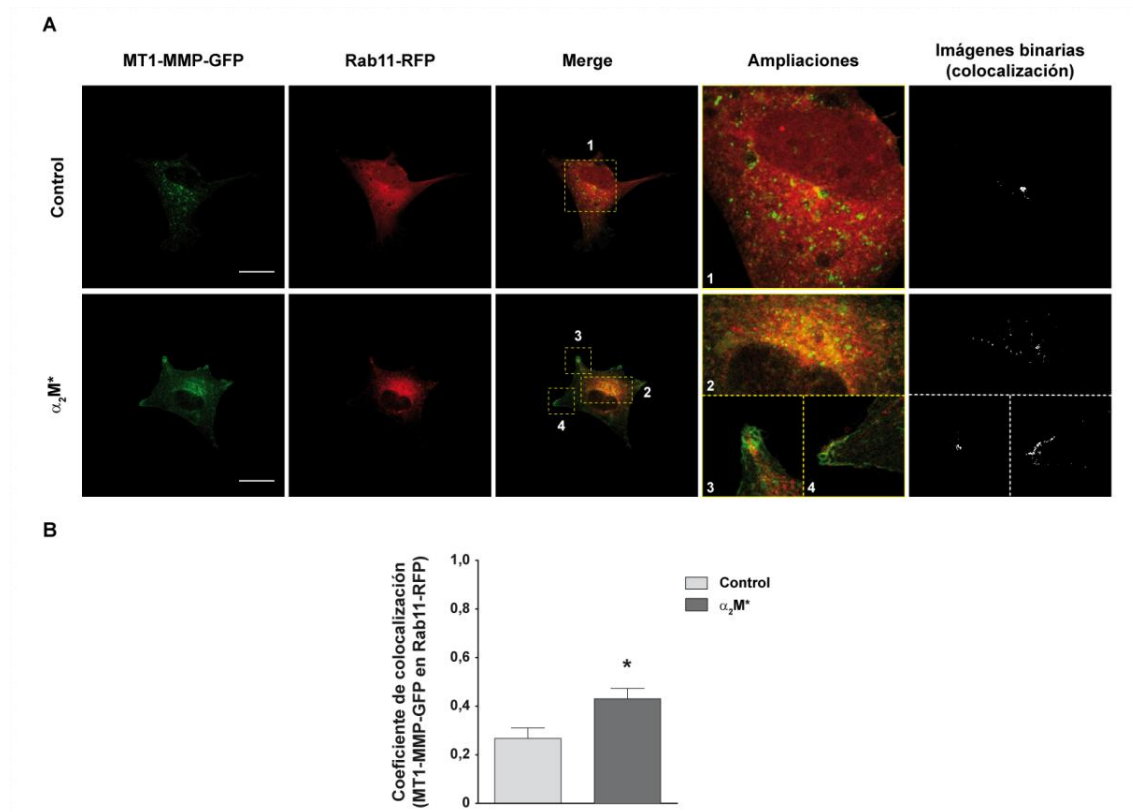


Figura 4.40. Colocalización de MT1-MMP-GFP con Rab11-RFP en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* seguido de FD y analizado por MC. A) Distribución subcelular de MT1-MMP-GFP (primera columna), de Rab11-RFP (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de MT1-MMP-GFP provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros de 1–4) y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían MT1-MMP-GFP y eran Rab11-RFP positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* . Los coeficientes de colocalización se obtuvieron a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba t -Student para muestras independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Estos resultados fueron indicativos de que α_2M^* estimuló el reciclado endocítico de MT1-MMP vía Rab11, no solo en la región perinuclear de la célula sino también en las protuberancias celulares.

4.2.2.3 Distribución de MT1-MMP en endosomas tardíos

Finalmente, con el propósito de estudiar si α_2M^* en células MIO-M1 induce la localización de MT1-MMP en compartimentos subcelulares de la vía de degradación endocítica, se determinó su nivel de colocalización con Rab7 y Lysotracker, dos marcadores específicos de LE y compartimentos ácidos del tipo endolisosomas, respectivamente. Para ello, se

llevaron a cabo ensayos de endocitosis continua de α_2M^* seguidos de FD, IFI y MC. En la figura 4.41 se muestra que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían MT1-MMP-GFP y eran Rab7 positivas fue del $9 \pm 3\%$, valor que no se modificó significativamente luego del estímulo ($8 \pm 3\%$).

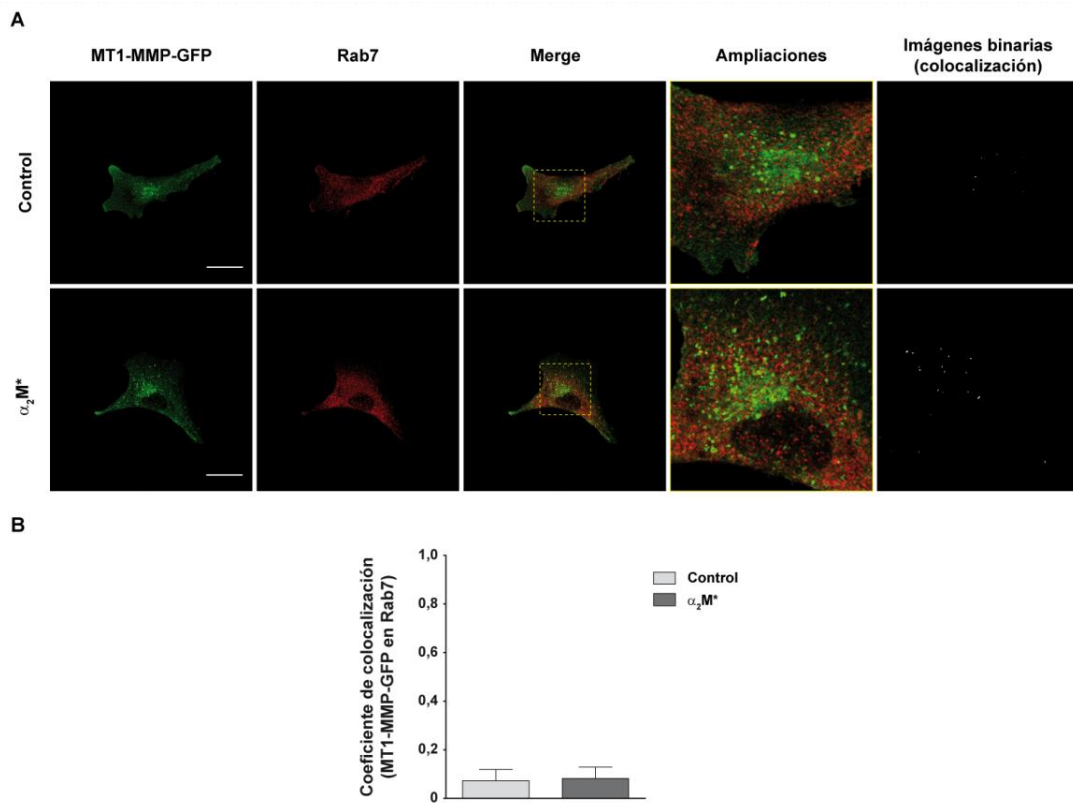


Figura 4.41. Colocalización de MT1-MMP-GFP con Rab7 en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* seguido de FD e IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de MT1-MMP-GFP (primera columna), de Rab7 (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de LRP1 provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los píxeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a $20 \mu m$. B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían MT1-MMP-GFP y eran Rab7 positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba τ -Student para muestras independientes.

Por su parte, en la figura 4.42 se muestra que en condiciones de ausencia de ligando la proporción de vesículas que contenían MT1-MMP y eran LysoTracker positivas fue del $12 \pm 1\%$ y luego del estímulo no se modificó significativamente ($13 \pm 2\%$).

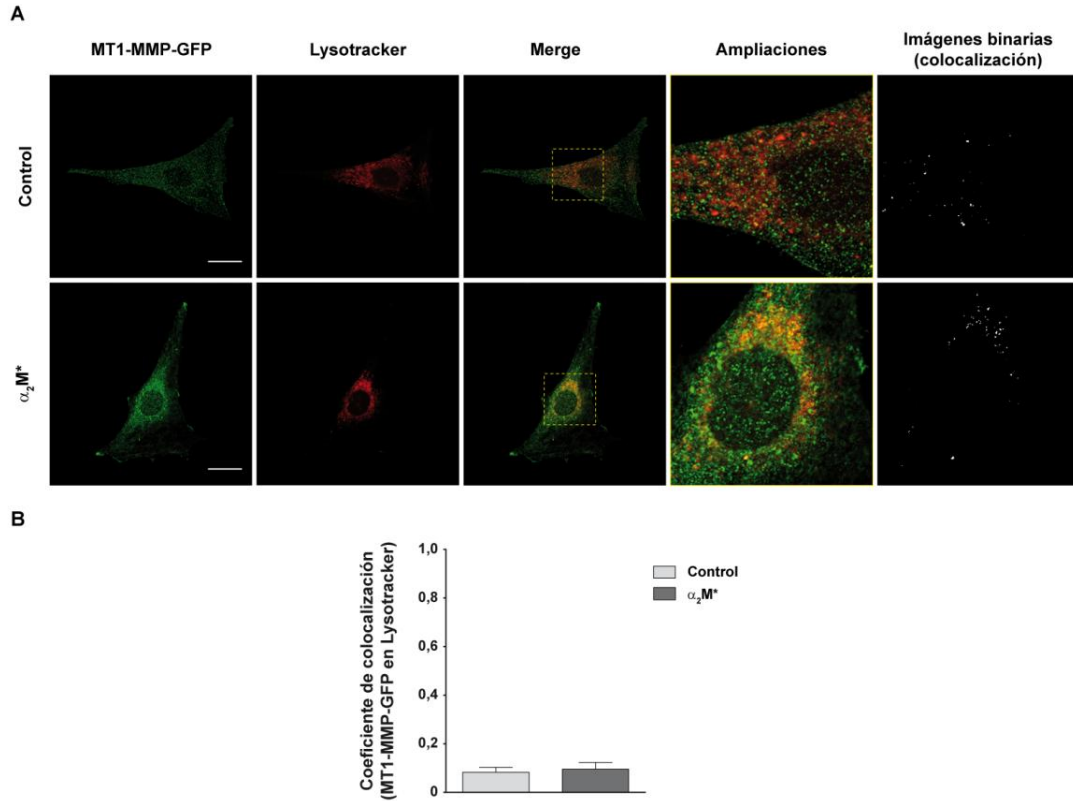


Figura 4.42. Colocalización de MT1-MMP-GFP con Lysotracker en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* seguido de FD y analizado por MC. A) Distribución subcelular de MT1-MMP-GFP (primera columna), de Lysotracker (segunda columna) y de la colocalización de ambos (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de MT1-MMP-GFP provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Medias \pm DE de los coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían MT1-MMP-GFP y eran Lysotracker positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes.

A partir de estos resultados se concluyó que el estímulo con α_2M^* en células MIO-M1 no indujo la relocalización de MT1-MMP en compartimentos de la vía de degradación.

4.2.3 Relación funcional entre el transporte intracelular de MT1-MMP y la migración celular inducida por α_2M^*

Considerando que proMMP-2 se activa principalmente a nivel de la MP y que para hacerlo requiere de la forma activa de MT1-MMP, el transporte intracelular de ambas proteasas juega un rol clave en la regulación de los procesos migratorios que las involucran. En el caso particular de la migración inducida por α_2M^* , se ha demostrado que la participación

de LRP1, la actividad incrementada de MMP y la remodelación de la MEC, son eventos claves para el desarrollo de patologías del tipo retinopatías isquémicas proliferativas (Barcelona y col., 2010; Bringmann y col., 2006; Sennlaub y col., 2002).

En este contexto y habiendo observado que el estímulo con dosis patológicas de α_2M^* (60 nM) indujo el reciclado endocítico de MT1-MMP vía Rab11 a la MP de protuberancias celulares, se decidió estudiar si este tipo de transporte intracelular es capaz de regular la migración de células de la retina, tales como las células MIO-M1.

4.2.3.1 MT1-MMP y el reciclado endocítico mediado por Rab11

Habiendo corroborado que α_2M^* indujo un incremento significativo de la proporción de moléculas de MT1-MMP en el CRE, se procedió a evaluar si el bloqueo de la vía de reciclado dependiente de Rab11 impedía el transporte intracelular de MT1-MMP a la MP. Para ello, se realizó un ensayo de estimulación con α_2M^* durante 60 min utilizando células MIO-M1, no transfectadas (NT) y transfectadas con el plásmido Rab11-GFP (que codifica para la versión *wild type* de Rab11 acoplada a GFP) o el plásmido Rab11S25N-GFP (dominante negativa de Rab11). Luego se realizó la biotinylación de proteínas de MP y una IP para MT1-MMP analizada por *Western blot*. En la figura 4.43 A se observa que tanto en células NT como en las transfectadas con Rab11-GFP, el estímulo con α_2M^* indujo el incremento del nivel de MT1-MMP en la MP. Sin embargo, en el caso de las células transfectadas con la dominante negativa de Rab11, el nivel de MT1-MMP en la MP luego del estímulo con α_2M^* no se incrementó respecto a la condición de no estímulo. En la figura 4.43 B se observan los niveles de transfección de ~65% para ambos plásmidos que expresan Rab11 (*wild type* y dominante negativa). Es importante mencionar que en los mismos experimentos, no se pudo detectar bandas biotinyladas con pesos moleculares similares a las subunidades α y β del LRP1, lo que sugiere que MT1-MMP y LRP1 no se asociarían en la MP. Si bien esto se encuentra en concordancia con los resultados mostrados en las figuras 4.37, 4.38 y 4.39, se requieren experimentos adicionales para confirmar este supuesto.

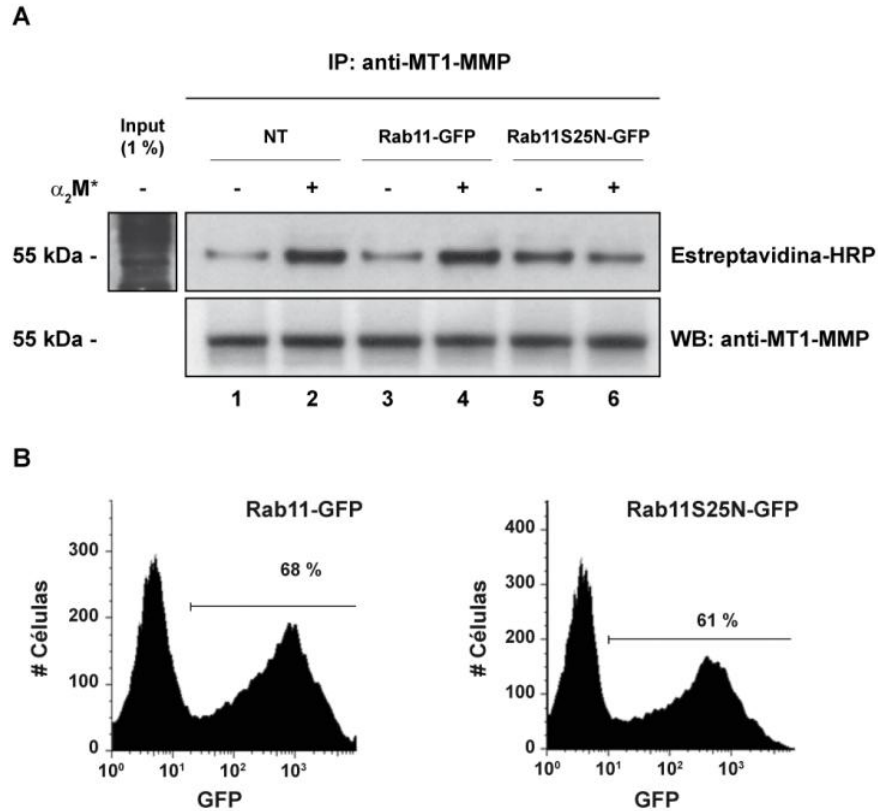


Figura 4.43. Ensayo de biotilación de proteínas de superficie e IP para determinar los niveles de expresión de MT1-MMP en la MP de células MIO-M1 no transfectadas y transfectadas con Rab11-GFP o Rab11S25N-GFP. A) Panel superior: Detección quimioluminiscente de estreptavidina peroxidasa (HRP) que se une a MT1-MMP biotilada e inmunoprecipitada (IP), proveniente de extractos proteicos de células MIO-M1 no transfectadas (NT) y transfectadas transientemente con Rab11-GFP o Rab11S25N-GFP, luego de un ensayo de endocitosis continua de α_2M^* por 60 min. Panel inferior: *Western blot* (WB) para la inmunodetección de MT1-MMP en los mismos extractos proteicos utilizados en el ensayo de biotilación (10% de la cantidad de proteínas totales utilizadas para la IP). Todas las calles corresponden a eluatos de extractos proteicos de células cuyas proteínas de MP fueron biotiladas y sometidas a IP con el anticuerpo anti-MT1-MMP. Calles 1, 3 y 5, controles de estímulo de células no transfectadas, Rab11-GFP+ y Rab11S25N-GFP+, respectivamente; calles 2, 4 y 6, células no transfectadas, Rab11-GFP+ y Rab11S25N-GFP+, respectivamente, estimuladas con α_2M^* . B) Ensayo de CF para células Rab11-GFP+ y Rab11S25N-GFP+ para determinar el porcentaje de transfección de ambas construcciones. Para más detalles ver Materiales y métodos.

Además, en la figura 4.44 se muestra que se inhibió la redistribución de MT1-MMP hacia las protuberancias celulares en células MIO-M1 transfectadas con Rab11S25N-GFP y estimuladas con α_2M^* . Resultó interesante que la presencia de la dominante negativa de Rab11 promovió un aumento significativo de la acumulación de MT1-MMP en el CRE de células estimuladas con α_2M^* ($37 \pm 3\%$) respecto a las células no estimuladas ($17 \pm 3\%$). En conjunto, estos resultados demostraron que α_2M^* indujo el transporte intracelular de MT1-MMP a la MP a través de una vía dependiente de Rab11.

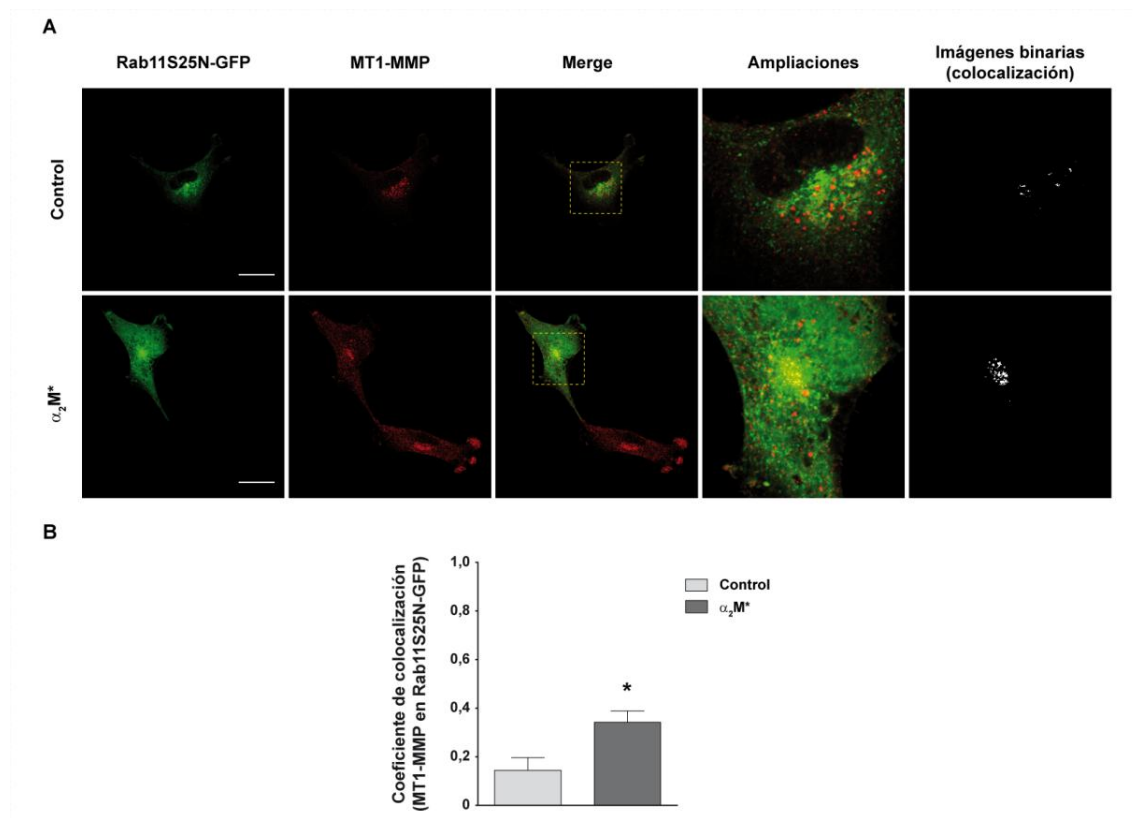


Figura 4.44. Colocalización de MT1-MMP con Rab11S25N-GFP en células MIO-M1. Ensayo de endocitosis continua de α_2M^* seguido de FD e IFI y analizado por MC. A) Distribución subcelular de Rab11S25N-GFP (primera columna), de MT1-MMP (segunda columna) y de la colocalización de ambas proteínas (*Merge*), en ausencia y presencia de α_2M^* (primera y segunda fila, respectivamente). También se observan ampliaciones (cuarta columna, *zoom* digital 4X) de las regiones celulares de mayor densidad de MT1-MMP provenientes de las imágenes *Merge* (recuadros) y sus correspondientes imágenes binarias (quinta columna), en las que se muestran en color blanco los pixeles que colocalizaron. Las imágenes son representativas de 15 imágenes por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20 μm . B) Coeficientes de colocalización (proporción de vesículas que contenían MT1-MMP y eran Rab11S25N-GFP positivas) en ausencia y presencia de α_2M^* , obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.3.2 Efecto del bloqueo del reciclado endocítico en la migración celular y la activación de proMMP-2 inducidas por α_2M^*

Por último, la migración celular y la activación de proMMP-2 inducida por α_2M^* fueron evaluadas en células MIO-M1 no transfectadas (NT) y transfectadas con Rab11-GFP o Rab11S25N-GFP. La figura 4.45 A muestra un ensayo de migración celular donde las células MIO-M1 NT y Rab11-GFP positivas estimuladas con α_2M^* presentaron un aumento significativo de la motilidad celular en comparación con las no estimuladas. Por

otro lado, α_2M^* no indujo la migración en células MIO-M1 transfectadas con Rab11S25N-GFP.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de zimografía de sobrenadantes de cultivos celulares de células MIO-M1 no transfectadas (NT) y transfectadas con Rab11-GFP o Rab11S25N-GFP. La figura 4.45 B muestra que la activación de proMMP2 inducida por α_2M^* fue suprimida en las células transfectadas con la dominante negativa de Rab11, a diferencia de lo observado en las células NT y Rab11-GFP positivas estimuladas con α_2M^* .

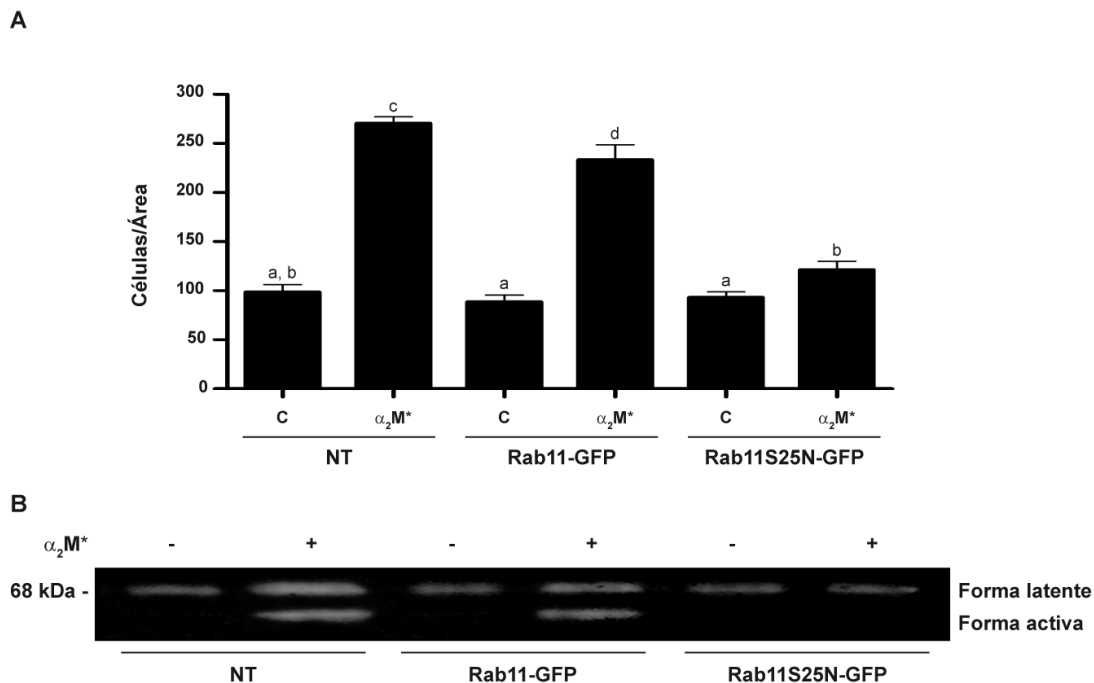


Figura 4.45. Migración celular y activación de proMMP-2 en células MIO-M1 transfectadas con Rab11S25N-GFP. A) Medias \pm SEM del número de células que invaden la zona de la herida (células/área) para células MIO-M1 no transfectadas (NT), transfectadas con Rab11-GFP y Rab11S25N-GFP, no estimuladas (C) y estimuladas con α_2M^* durante 12 h. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). B) Ensayo de zimografía de sobrenadantes de cultivo de células MIO-M1 no transfectadas (NT), transfectadas con Rab11-GFP y Rab11S25N-GFP, no estimuladas y estimuladas con α_2M^* durante 60 min. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Estos resultados demostraron que α_2M^* a través de LRP1 indujo la activación de MT1-MMP a nivel de la superficie celular mediante una vía dependiente de Rab11, que promovió la migración celular y la activación de proMMP2 en células MIO-M1.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 Caracterización subcelular de la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$

La interacción $\alpha_2M^*/LRP1$ es clave para la regulación de la remodelación de la MEC. La concentración plasmática de esta glicoproteína es de $\sim 4 \mu M$ y en condiciones fisiológicas menos del 1% ($\sim 40 \text{ nM}$) se encuentra como α_2M^* capaz de interactuar con LRP1. Durante procesos en los que se produce una exacerbada remodelación tisular, los niveles de α_2M^* se incrementan considerablemente en el sitio de la lesión, alcanzando en algunos casos concentraciones mayores a 60 nM . Tal como se mencionó previamente, hallazgos de nuestro grupo de investigación demostraron, en líneas celulares de macrófagos de ratón, que concentraciones patológicas de α_2M^* provocan una respuesta celular inmediata promoviendo la expresión de MMP-9 y la proliferación celular a través de la activación, mediada por LRP1 de las vías MAPK/ERK y NF- κB (Bonacci y col., 2007; Caceres y col., 2010). Por otra parte, nuestro grupo también demostró que en células MIO-M1 esta interacción induce un incremento en la migración celular y la activación de proMMP-2. Si bien datos preliminares de nuestro laboratorio indican que la señalización intracelular inducida por α_2M^* requiere de la activación de determinadas isoformas de la proteína quinasa C (PKC α/β II), y la participación de diversas proteínas adaptadoras del tipo ShcA y Grb2/SOS/Ras, los mecanismos moleculares que regulan esta interacción aún no han sido completamente esclarecidos. Es menos todavía lo que se conoce en relación a la asociación entre la endocitosis del complejo $\alpha_2M^*/LRP1$ y su capacidad para inducir la señalización intracelular. En este sentido, algunos indicios han sido aportados por otros grupos de investigación, quienes demostraron que la actividad de endocitosis de LRP1 puede regular, a nivel de los EE, la señalización intracelular promovida por otros receptores transmembrana, tales como PDGFR β y uPAR (Gonias y col., 2011; Muratoglu y col., 2010).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo general del presente trabajo de tesis fue investigar aspectos moleculares y celulares de la interacción de α_2M^* con su receptor LRP1. Como modelo experimental se emplearon células MIO-M1, las cuales, además de

conservar las características de los cultivos primarios de células de Müller, expresan importantes niveles de LRP1, incluso mayores a los de otras líneas celulares comúnmente utilizadas para el estudio de este receptor.

Un punto importante a tener en cuenta a la hora de estudiar la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$, es la gran versatilidad de este receptor, la cual le permite participar de una gran variedad de procesos biológicos, no solo relacionados con el control de la proteólisis extracelular y el metabolismo de los lípidos, sino también asociados al desarrollo embrionario, la transmisión nerviosa, la progresión de procesos inflamatorios, entre otros (Herz y Strickland, 2001; Lillis y col., 2008). Más allá de su expresión prácticamente ubicua, la versatilidad funcional de LRP1 subyace en la capacidad que tiene este receptor de interactuar con más de 40 ligandos funcionalmente no relacionados, de asociarse con otros receptores de transmembrana y de unir una gran variedad de proteínas adaptadoras a través de su dominio intra-citoplasmático (Lillis y col., 2008). Lo que resulta aún más interesante, es que se trata de un receptor con una gran especificidad, lo que le permite generar efectos no redundantes a pesar de interactuar con una amplia variedad de ligandos, receptores y proteínas adaptadoras. En este punto, la regulación de la actividad de LRP1 depende, además del tipo celular donde se expresa y de su naturaleza de receptor multiligando, de su distribución y dinámica dentro de la célula. Por ello, es de esperar que el transporte intracelular del receptor resulte clave para el cumplimiento de sus funciones biológicas.

La interacción de α_2M^* con LRP1 ha sido estudiada incluso desde antes de que este receptor fuera caracterizado como tal (Van Leuven y col., 1979). Sin embargo, aún se desconoce si esta asociación ligando/receptor, en todos los tejidos donde se produce, induce las mismas respuestas celulares. En el presente trabajo de tesis se demostró que en células MIO-M1 la degradación de α_2M^* es consecuencia de un proceso de maduración de vesículas que involucra secuencialmente endosomas de *sorting*, endosomas tardíos (LE) y lisosomas. La etapa clave de este proceso es la segregación de α_2M^* en regiones de endosomas de *sorting* que posteriormente maduran a compartimentos del tipo LE. Esto se deduce a partir de la observación de que Tf, a diferencia de α_2M^* , sigue la ruta de reciclado endocítico a través del compartimento de reciclado endocítico (CRE), luego de abandonar los endosomas de *sorting*. Además, el estudio de LRP1 en LE mostró que una baja

proporción de este receptor reside en este tipo de vesículas, lo que no se modifica luego del estímulo con α_2M^* . Estos resultados sugieren que la disociación de α_2M^* de su receptor es un evento que tendría lugar en los endosomas de *sorting*. Esto resulta importante en relación a la regulación de la señalización intracelular del complejo $\alpha_2M^*/LRP1$, la cual podría ocurrir tanto en la membrana plasmática (MP) como en compartimentos intracelulares. En este sentido, es probable que la señalización intracelular se produzca en vesículas endosómicas, ya que a diferencia de lo que ocurre en la MP, en dichos compartimentos aumenta la densidad molecular de todos los componentes necesarios para la interacción, activación y transducción de señales. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales que permitan corroborar esta suposición. Por su parte, hay una proporción de α_2M^* endocitada que se ubica en cuerpos multi-vesiculares (CMV), lo cual podría significar para estas moléculas del ligando, un destino intracelular diferente del resto de la α_2M^* endocitada. En células de mamíferos ha sido demostrado que las vesículas intralumen (ILV) contenidas en los CMV pueden ser el sustento de procesos biológicos tales como el reciclado endocítico, la secreción y la exocitosis mediada por exosomas. Además, existen evidencias de que los CMV son las principales vesículas que se fusionan con los autofagosomas (Berg y col., 1998; Gordon y Seglen, 1988). Esto podría estar asociado a procesos de activación de la autofagia en células MIO-M1 a partir de su incubación con α_2M^* . En este sentido, resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo muestran que dosis patológicas de α_2M^* inducen un incremento significativo del número y tamaño de vesículas LC3B positivas en el citoplasma de estas células.

La distribución subcelular de LRP1, tal como se mencionó anteriormente, resulta clave para la regulación de la actividad de este receptor. Si bien existe el patrón de distribución de LRP1 es el mismo en la mayoría de los sistemas celulares donde se expresa, existen situaciones particulares en las cuales este receptor se ubica en vesículas tejido-específicas, tales como las vesículas respondedoras a insulina (IRV). Estas vesículas se caracterizan por contener grandes cantidades del transportador de glucosa GLUT4, y ante el estímulo con insulina se movilizan rápidamente a la MP de células adiposas y musculares lisas. Esta vía secretoria estaría regulada por la pequeña GTPasa Rab10 (Chen y Lippincott-Schwartz, 2013a; b). Como fuera mencionado anteriormente, la caracterización proteómica de estas vesículas demostró que una de sus principales y más abundantes proteínas es LRP1 (Bogan

y Kandror, 2010; Jedrychowski y col., 2010; Kandror y Pilch, 2011). Sin embargo, este tipo de reservorios, que responden a estímulos extracelulares, no son comunes a todos los tipos celulares. En células MIO-M1 se observó que LRP1 se ubicó principalmente en membranas de vesículas ricas en clatrina. A este nivel LRP1 se localizó mayoritariamente en vesículas del tipo EE, ubicándose la mayor proporción de receptor en vesículas EEA1 o Rab5 positivas, y en menor medida, en el CRE Rab11 positivo. Por su parte, en el *cis-medial* Golgi y en las vesículas Rab4 y Rab7 positivas la proporción de moléculas de LRP1 fue baja comparada con la proporción de moléculas presentes en los compartimientos subcelulares previamente mencionados. No obstante, luego del estímulo con α_2M^* se produjo una relocalización del receptor que incrementó significativamente su proporción de moléculas en compartimientos EEA1, Rab5 y giantina positivos, mientras que solo disminuyó significativamente en vesículas Rab4 positivas. Esto fue indicativo de que ante el estímulo con α_2M^* se indujo una disminución significativa del reciclado rápido, vía Rab4. Además, estos hallazgos fueron indicativos de que el reciclado endocítico vía Rab11, ante el estímulo con α_2M^* , no incrementó significativamente respecto de la condición basal. Por su parte, lo más interesante resultó ser el incremento de la proporción de moléculas de LRP1 a nivel del *cis-medial* Golgi, lo que sugirió se promovería un aumento de la síntesis del receptor y/o un incremento del transporte retrógrado. Sin embargo, es necesaria la realización de nuevos experimentos para determinar los efectos de α_2M^* sobre LRP1 en este compartimento subcelular.

En la mayoría de los tejidos, la proporción de moléculas de LRP1 que se localizan en la MP en relación a las que se encuentran a nivel intracelular, es considerablemente menor (Moestrup y col., 1990). Sin embargo, ha sido demostrado que luego del estímulo postprandial de insulina, hepatocitos muestran un incremento significativo de los niveles de LRP1 en MP, lo cual se observó también en células adiposas (Corvera y col., 1989; Descamps y col., 1993; Laatsch y col., 2009). Por su parte, en células MIO-M1 se demostró que el estímulo con α_2M^* produjo un incremento significativo de los niveles de LRP1 en la MP. En este sentido, al menos tres mecanismos podrían explicar esta respuesta celular al estímulo con el ligando: 1- el reciclado endocítico, 2- la movilización de *pooles* intracelulares de almacenamiento, y 3- la síntesis *de novo*. En relación al aporte del reciclado endocítico al incremento de LRP1 en la MP, resultados de este trabajo de tesis

han demostrado que este receptor presenta un reciclado basal, producto de la combinación del reciclado mediado por Rab4 y del reciclado mediado por Rab11. Bajo condiciones de estimulación, no se produjeron cambios en el reciclado lento pero si se observó una disminución significativa en la proporción de moléculas de LRP1 que siguieron una vía rápida de reciclado endocítico. Esto podría deberse a que α_2M^* , al seguir una vía de degradación por lisosomas, arrastró a LRP1 hacia de endosomas de *sorting* donde se produciría la disociación del complejo ligando/receptor, impidiendo su reciclado inmediato a la MP. Por otra parte, el bloqueo de la vía Rab11 positiva no fue suficiente para atenuar el incremento de los niveles de receptor en la MP inducido por el estímulo con el ligando, lo que sugirió que este efecto biológico sería producto de una vía de reciclado de LRP1 independiente de Rab11.

La movilización de *pooles* de receptores almacenados en compartimentos intracelulares, ha sido corroborada para algunos sistemas celulares, donde proteínas como MT1-MMP y GLUT-4 almacenadas en estos compartimentos se movilizan a la MP ante la presencia de colágeno tipo I e insulina, respectivamente. En el caso de LRP1, este receptor es parte integral de las IRV y ante el estímulo con insulina incrementa su nivel en la MP de algunos tipos celulares. Sin embargo, a la fecha no había sido demostrado que un ligando de este receptor pudiera mediar efectos similares en líneas celulares que *a priori* no cuentan con vesículas del tipo IRV. Si bien, corroborar la existencia de estos compartimentos requiere ensayos adicionales, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis podrían significar un indicio de su existencia en células MIO-M1. En este sentido, el incremento de la movilidad de moléculas similar LRP1 sin la capacidad de unir el ligando, sugiere que el estímulo con α_2M^* movilizaría un *pool* de reserva de LRP1, por lo que el aumento en la MP no sería consecuencia del incremento en la tasa de reciclado endocítico.

Finalmente el aporte de la vía de síntesis *de novo* quedó prácticamente descartado por la ausencia de biosíntesis de nuevo receptor, evidenciada a través del estudio de los niveles de ARNm y de proteína, lo cual sugiere que el incremento de LRP1 en la MP no sería consecuencia de la secreción de nuevas moléculas del receptor. Como perspectiva para futuras investigaciones resulta de interés el bloqueo de diferentes vías de transporte hacia la MP, de manera de poder dilucidar los mecanismos moleculares y celulares que provocan el incremento de LRP1 a este nivel, por acción de α_2M^* .

5.2 Migración celular inducida por la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$

En la retina, las células gliales de Müller (CM) cumplen roles estructurales y funcionales claves, y en condiciones fisiológicas tienen una limitada capacidad para migrar y proliferar. Sin embargo, en determinadas alteraciones patológicas, las CM pueden sufrir cambios funcionales y fenotípicos adquiriendo la capacidad de migrar hacia los sitios de lesión para promover la remodelación de la retina y la repoblación celular (Bull y col., 2008; Romo y col., 2011). Aunque los mecanismos que promueven esta migración aún no han sido completamente esclarecidos, se propuso que la remodelación de MEC, producida por la MMP-2 y MMP-9, puede facilitar e inducir la migración de las CM (Limb y col., 2002a; Tackenberg y col., 2009). Además, sugirió que las CM serían capaces de volver a ingresar en el ciclo celular mediante una reprogramación de su linaje, adoptando características de células progenitoras y de células madre. Las CM pueden migrar al tejido de retina dañado y producir nuevas neuronas, proceso conocido colectivamente como trans-diferenciación (Fischer y Reh, 2001; Ooto y col., 2004). Además, α_2M se ha detectado en altos niveles en varios trastornos degenerativos de la retina, tales como glaucoma (Bai y col., 2011; Shi y col., 2008) y enfermedades isquémicas proliferativas (Barcelona y col., 2010; Sanchez y col., 2006). En estas retinas, α_2M nativa puede interactuar con proteasas activas liberadas y formar complejos α_2M -proteasa, que luego se unen a LRP1 (Chu y Pizzo, 1994). Se sabe que la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$, además de inducir la endocitosis del complejo inhibidor de proteasas-proteasa, también activa diferentes vías de señalización intracelular (Bonacci y col., 2007; Caceres y col., 2010). En este sentido, tal como se mencionó previamente, nuestro grupo demostró que α_2M^* promueve la expresión de GFAP en células MIO-M1, lo que se asoció con la activación de estas células de retina (Barcelona y col., 2011). En el presente trabajo de tesis, se demostró que la inducción de la migración celular y la activación de proMMP-2 por α_2M^* , en las células MIO-M1, es mediada por la interacción con su receptor LRP1.

Además de su función como inhibidor de proteasas, α_2M puede unirse de forma reversible a factores de crecimiento, como por ejemplo el factor de crecimiento nervioso (NGF). Estas interacciones involucran la región interna de la molécula de α_2M , pero no los sitios RBD que reconocen a LRP1 (Gonias y col., 2000; Mantuano y col., 2008). La unión de NGF a

α_2M bloqua la activación de la señalización de Akt y ERK/MAPK (Mantuano y col., 2008) y neutraliza la acción neuroprotectora inducida por esta neurotrofina (Bai y col., 2011). Por esta razón, se ha sugerido que α_2M puede tener una función neurotóxica en glaucoma a través de su capacidad para bloquear la acción neurotrófica de NGF (Mantuano y col., 2008). Interesantemente, resultados de nuestro grupo indican que α_2M^* , a través de sus sitios RBD, puede ser un factor inductor de la migración de CM, facilitando así la repoblación celular en la retina dañada. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para explicar las propiedades migratorias de α_2M^* en células gliales con diferentes patologías de retina.

Se ha informado previamente que la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$ induce proliferación celular en macrófagos (Bonacci y col., 2007), libera factores proinflamatorios en las células de Schwann (Shi y col., 2011), e inhibe el crecimiento de neuritas inducido por NGF en células PC12 (Chiabrando y col., 2002). Estudios previos de nuestro grupo demostraron que las células MIO-M1 adquirieron propiedades migratorias bajo estimulación con α_2M^* , lo que se caracteriza por la redistribución celular de MT1-MMP hacia protuberancias celulares. En este sentido, se estableció que la migración de células normales y malignas depende de la acumulación de MT1-MMP en las protuberancias de membrana, que se requiere para la degradación pericelular focal de la MEC (Artym y col., 2006). La actividad de MT1-MMP en estas protuberancias de la membrana es, en parte, dependiente del reciclado endocítico de esta proteasa activa, que podría estar mediada por una vía dependiente de Rab11 (Li y col., 2008; Remacle y col., 2003; Wang y col., 2004). Aquí se demostró que α_2M^* indujo la acumulación intracelular de MT1-MMP en endosomas tempranos y de reciclado, así como el transporte intracelular hacia la MP mediado por Rab11. Mediante el uso de una dominante negativa de Rab11 (Rab11S25N-GFP), también se observó que la migración de células MIO-M1 y la activación de proMMP-2, ambas inducidas por α_2M^* , disminuyeron significativamente, lo que indicaría que esta pequeña GTPasa juega un papel clave en el mantenimiento de la MT1-MMP activa en la superficie celular. Además, mediante un ensayo marcación con biotina de proteínas de superficie, se encontró que la Rab11S25N-GFP también inhibió el transporte de MT1-MMP hacia la MP inducida por α_2M^* . Bajo estas condiciones experimentales MT1-MMP se acumuló principalmente en el CRE, lo que indicaría que el transporte intracelular de esta proteasa

hacia la MP inducida por α_2M^* , utiliza una vía dependiente de Rab11. Otros autores demostraron que MT1-MMP podría ser dirigida hacia las protuberancias de la membrana a través de una ruta exocítica dependiente de Rab8, donde ésta mediaría la migración celular de células MDA-MB-23 de adenocarcinoma en matrices de colágeno tipo I de dos y tres dimensiones (Bravo-Cordero y col., 2007). Estos investigadores observaron que la ruta exocítica de MT1-MMP hacia la MP tenía lugar a partir de vesículas VSV-G/Rab8 positivas, pero no a partir de compartimentos Rab11 positivos en células incubadas en matrices de colágeno tipo I. Sin embargo, la vía de reciclado de MT1-MMP dependiente de Rab11 pareció estar activa cuando las mismas células se cultivaron en cubreobjetos sin colágeno tipo I (Bravo-Cordero y col., 2007). Por lo tanto, estos datos sugieren que el transporte intracelular de MT1-MMP hacia la superficie celular, y su participación en la migración celular, podrían depender de las características tumorales o no tumorales de las células, así como de la presencia de determinados factores extracelulares que inducen la migración celular, tal como el colágeno de tipo I. De manera interesante, resultados previos de nuestro grupo demostraron que la migración de las células MIO-M1 en matrices de colágeno de tipo I de dos dimensiones es significativamente mayor luego del estímulo con α_2M^* , con respecto a las células cultivadas sin estímulo. Además, resultados no publicados de nuestro laboratorio muestran que α_2M^* también promueve la migración de células MIO-M1 cuando son cultivadas en cubreobjetos sin colágeno tipo I o adsorbidos con otros componentes de la MEC, como laminina. En conjunto, estos resultados indican que colágeno tipo I *per se* no fue un factor inductor de la migración de células MIO-M1, lo que podría explicar en parte el transporte de MT1-MMP mediante una vía dependiente de Rab11 (pero no dependiente de Rab8). Por lo tanto, se concluyó que α_2M^* reguló el transporte intracelular de MT1-MMP hacia las protuberancias celulares e indujo migración celular y activación de proMMP-2 en CM a través de la ruta de reciclado dependiente de Rab11. En el futuro, sería interesante investigar si α_2M^* también puede activar la vía dependiente de Rab11 para el transporte de MT1-MMP y su efecto sobre la migración de células malignas.

Tal como se mencionó anteriormente LRP1 es un receptor endocítico y de señalización celular que puede regular las funciones celulares de otras proteínas de membrana, tales como uPAR (Gonias y col., 2011) y PDGFR β (Boucher y col., 2003). Sin embargo, aún

resta dilucidar cuáles son los mecanismos por los que LRP1 controla la actividad de MT1-MMP de la superficie celular. En el presente trabajo de tesis, se observó que una proporción de moléculas de LRP1 y MT1-MMP compartieron su localización en compartimentos intracelulares, lo cual se incrementó significativamente en las células que fueron estimuladas con α_2M^* . Por microscopía confocal se evidenció que LRP1 y MT1-MMP colocalizan principalmente en EE, lo que parece indicar que α_2M^* , además de inducir la endocitosis de LRP1, también induce la endocitosis de MT1-MMP. A partir del conocimiento de que MT1-MMP es internalizada por endocitosis dependiente y no dependiente de clatrina (Poincloux y col., 2009), y que el complejo $\alpha_2M^*/LRP1$ es internalizado sólo por endocitosis dependiente de clatrina (Herz y Strickland, 2001), se sugiere que estas proteínas de membrana serían internalizadas por diferentes vías endocíticas y se acumularían en EE. Sin embargo, aún se desconoce cuál es el mecanismo que regula la internalización de MT1-MMP inducida por α_2M^* . Se ha demostrado que la endocitosis de MT1-MMP se produce cuando el residuo Thr-567 es fosforilado por la PKC α (Williams y Coppolino, 2011). En este sentido, resulta interesante que PKC α también induce la fosforilación de serina y treonina en el dominio intracitoplasmático (DIC) de LRP1, promoviendo así la interacción con proteínas adaptadoras como Dab1 y CED-6/GULP, que modulan las funciones endocíticas y de la señalización de este receptor (Ranganathan y col., 2004). Tal como se mencionó anteriormente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$ indujo diferentes vías de señalización intracelulares, incluyendo PKC α (Caceres y col., 2010), que podría estar implicada en la fosforilación de Thr-567 de MT1-MMP, promoviendo así su endocitosis y acumulación en EE. Además, tanto LRP1 como MT1-MMP en ensayos previos, fueron inmunoprecipitados en células no estimuladas, lo que indicó que ambas proteínas estaban molecularmente asociadas, lo cual se incrementó bajo el estímulo de α_2M^* . Sin embargo, no se ha determinado si esta interacción LRP1/MT1-MMP es directa o está mediada por moléculas intermediarias o proteínas adaptadoras. En este sentido, un informe reciente ha demostrado que el dominio catalítico de MT1-MMP puede interactuar directamente con subunidad β de LRP1, promoviendo así su escisión proteolítica a nivel de la superficie celular (Lehti y col., 2009). En este caso, no se detectó colocalización entre la subunidad β de LRP1 y MT1-MMP en la MP, lo que sugiere que este tipo de interacción no se

produciría en células MIO-M1 cultivadas tanto en ausencia como en presencia de α_2M^* . Por otra parte, los DIC de la subunidad β del LRP1 y MT1-MMP pueden interactuar con varias proteínas adaptadoras (Ranganathan y col., 2004; Wickramasinghe y col., 2010). Por lo tanto, una posibilidad es que la asociación LRP1/MT1-MMP sea mediada por una proteína adaptadora común, similar a FE65, que se conoce interviene en la interacción entre LRP1 y la proteína precursora de amiloide o APP (Trommsdorff y col., 1998). Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para corroborar esta hipótesis.

Por último, en el presente trabajo de tesis, también se observó que MT1-MMP, pero no LRP1, se incrementó en el CRE Rab11 positivo bajo estimulación con α_2M^* en células MIO-M1. Estas distribuciones celulares de ambas proteínas sugieren que α_2M^* induciría el reciclado de MT1-MMP de regreso a la superficie de la célula a través de una vía de reciclado, mientras que LRP1 aparentemente se mantendría en EE. Como se mencionó previamente, MT1-MMP y LRP1 colocalizaron principalmente en EE, donde podría regularse el transporte intracelular diferencial de MT1-MMP y LRP1. Esta posibilidad podría estar avalada por estudios mencionados previamente, que informaron que LRP1 puede interactuar y regular la función del receptor de PDGF (PDGF-R β) en EE, modulando su actividad de señalización intracelular (Muratoglu y col., 2010). De la misma manera, LRP1 y MT1-MMP se acumularon en EE por inducción de α_2M^* , y luego, MT1-MMP pero no LRP1, se movilizó a los compartimentos de reciclado y desde allí a la MP a través de una vía dependiente de Rab11. En relación a la acumulación de MT1-MMP en los compartimentos de reciclado endocítico, ésta podría recibir el aporte de nuevas moléculas de MT1-MMP provenientes de la vía de síntesis *de novo*, las se sumarían a las moléculas de MT1-MMP pre-existentes provenientes de la endocitosis desde la superficie celular (Poincloux y col., 2009). Sin embargo, debido a que la redistribución de MT1-MMP a las protuberancias celulares y su transporte a la MP se produjeron en tiempos relativamente cortos (entre 30 y 60 min) luego del estímulo con α_2M^* , en el contexto del presente trabajo de tesis, resulta poco probable que ocurriera una contribución de MT1-MMP a partir de la ruta de biosíntesis. En este sentido, deben llevarse a cabo otros estudios con el fin de evaluar el efecto α_2M^* en la síntesis de nuevas moléculas de MT1-MMP y su contribución al transporte hacia la MP en células MIO-M1.

En su conjunto estos resultados sugieren que α_2M^* sería un factor extracelular que promueve la migración de células de Müller y la activación de proMMP2. Además, la interacción $\alpha_2M^*/LRP1$ provocaría una movilización rápida y localizada de MT1-MMP. Por lo tanto, esto podría tener relevancia clínica y terapéutica en el tratamiento de los trastornos de la retina, tales como las retinopatías isquémicas proliferativas.

5.3 La interacción $\alpha_2M^*/LRP1$ como reguladora de la función celular

En los procesos patológicos que desencadenan una remodelación exacerbada de la MEC, como es el caso de las retinopatías isquémicas proliferativas, α_2M extravasa la barrera hemato-retinal y llega al sitio de la lesión para iniciar la compleja tarea de recuperar la homeostasis tisular a través de la inhibición de la proteólisis extracelular. Allí interacciona con proteasas a las que inhibe a través de un singular mecanismo de “atrapamiento” molecular (Feldman y col., 1985). Inmediatamente se inicia un proceso de depuración de los complejos α_2M -proteasa mediante endocitosis y degradación en lisosomas, a través de la interacción con su receptor LRP1. El incremento paulatino de la concentración de α_2M^* en la MEC produce sobre el componente celular de la retina, una serie de efectos biológicos que incluyen desde simples procesos de activación de vías de señalización intracelular hasta complejos fenómenos migratorios, con producción y redistribución de MMP. Este es el caso de las células de Müller, las cuales en condiciones fisiológicas cumplen importantes funciones metabólicas y estructurales, manteniéndose prácticamente inalteradas y conservando su localización topográfica en el espacio retinal. La presencia de dosis elevadas de α_2M^* promueve, en estas células, la adquisición de un fenotipo migratorio el cual incluye la redistribución de MT1-MMP, TIMP-2 y MMP-2 hacia las protuberancias celulares. Además se produce un incremento de la interacción molecular de LRP1 y MT1-MMP en EE, proceso que regula el reciclado de esta MMP a la MP a través de una vía dependiente de Rab11.

Por su parte, la interacción de α_2M^* con LRP1 incrementa los niveles del receptor en la MP y su redistribución subcelular. Esta regulación del transporte de LRP1 es clave para su participación en la adhesión y migración de células normales y tumorales (Barcelona y col., 2011; Caceres y col., 2010; Song y col., 2009). Resultados preliminares de nuestro grupo

de investigación dan cuenta de que macrófagos de ratón cultivados en superficies adsorbidas con colágeno tipo I, luego del estímulo con α_2M^* promueven la asociación de LRP1 con β_1 -integrina, lo cual resultaría clave para la migración celular. Además, LRP1 presenta elevados niveles de expresión en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica (clásicos e intermedios) con un alto potencial inflamatorio y gran capacidad migratoria. Estos monocitos son los principales productores de especies reactivas del oxígeno y luego del estímulo con lipopolisacáridos inducen la expresión selectiva de IL-1 β y TNF α (Ferrer y col., 2014). En este sentido, y teniendo en cuenta que los monocitos de sangre periférica cumplen roles claves en el desarrollo y la progresión de patologías cardiovasculares, resulta de interés el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la migración de este tipo de células durante el desarrollo de la placa de ateroma.

En este contexto α_2M^* se considera un mediador clave en la remodelación de la MEC, ya que no solo ejerce una acción directa sobre las proteasas, inhibiéndolas y depurándolas del medio extracelular, sino que además regula el transporte de proteínas claves para la migración celular, tales como MT1-MMP y LRP1.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armstrong, P. B. y Quigley, J. P. (1999). "*Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system*". *Dev Comp Immunol*, **23**(4-5): 375-90.
- Artym, V. V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K. M. y Mueller, S. C. (2006). "*Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function*". *Cancer Res*, **66**(6): 3034-43.
- Ashcom, J. D., Tiller, S. E., Dickerson, K., Cravens, J. L., Argraves, W. S. y Strickland, D. K. (1990). "*The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin*". *J Cell Biol*, **110**(4): 1041-8.
- Bacsikai, B. J., Xia, M. Q., Strickland, D. K., Rebeck, G. W. y Hyman, B. T. (2000). "*The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors*". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(21): 11551-6.
- Bai, Y., Sivori, D., Woo, S. B., Neet, K. E., Lerner, S. F. y Saragovi, H. U. (2011). "*During glaucoma, alpha2-macroglobulin accumulates in aqueous humor and binds to nerve growth factor, neutralizing neuroprotection*". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**(8): 5260-5.
- Barcelona, P. F. (2010). "Estudios celulares y moleculares de la neovascularización ocular en mamíferos. Participación del sistema α_2 M/LRP1". Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba Capital, República Argentina.
- Barcelona, P. F., Luna, J. D., Chiabrando, G. A., Juarez, C. P., Bhutto, I. A., Baba, T., McLeod, D. S., Sanchez, M. C. y Luty, G. A. (2010). "*Immunohistochemical localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 and alpha(2)-Macroglobulin in retinal and choroidal tissue of proliferative retinopathies*". *Exp Eye Res*, **91**(2): 264-72.

- Barcelona, P. F., Ortiz, S. G., Chiabrando, G. A. y Sanchez, M. C. (2011). "*alpha2-Macroglobulin induces glial fibrillary acidic protein expression mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in Muller cells*". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**(2): 778-86.
- Barrett, A. J. (1979). "*Protein degradation in health and disease. Introduction: the classification of proteinases*". *Ciba Found Symp*(75): 1-13.
- Barrett, A. J., Brown, M. A. y Sayers, C. A. (1979). "*The electrophoretically 'slow' and 'fast' forms of the alpha 2-macroglobulin molecule*". *Biochem J*, **181**(2): 401-18.
- Beffert, U., Durudas, A., Weeber, E. J., Stolt, P. C., Giehl, K. M., Sweatt, J. D., Hammer, R. E. y Herz, J. (2006). "*Functional dissection of Reelin signaling by site-directed disruption of Disabled-1 adaptor binding to apolipoprotein E receptor 2: distinct roles in development and synaptic plasticity*". *J Neurosci*, **26**(7): 2041-52.
- Berg, T. O., Fengsrud, M., Stromhaug, P. E., Berg, T. y Seglen, P. O. (1998). "*Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes*". *J Biol Chem*, **273**(34): 21883-92.
- Binder, R. J., Karimeddini, D. y Srivastava, P. K. (2001). "*Adjuvanticity of alpha 2-macroglobulin, an independent ligand for the heat shock protein receptor CD91*". *J Immunol*, **166**(8): 4968-72.
- Bisaro de Lorenc, L., Ramos, A. M., Sanchez, M. C., Montenegro, R. y Chiabrando, G. A. (2005). "*Structural evaluation of plasma alpha2-macroglobulin in acute pancreatitis*". *Clin Chem Lab Med*, **43**(11): 1183-9.
- Bissell, M. J. y Radisky, D. (2001). "*Putting tumours in context*". *Nat Rev Cancer*, **1**(1): 46-54.
- Bissig, C. y Gruenberg, J. (2013). "*Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis*". *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**(10): a016816.
- Bogan, J. S. y Kandror, K. V. (2010). "*Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4*". *Curr Opin Cell Biol*, **22**(4): 506-12.
- Bolte, S. y Cordelieres, F. P. (2006). "*A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*". *J Microsc*, **224**(Pt 3): 213-32.

- Bonacci, G. R., Caceres, L. C., Sanchez, M. C. y Chiabrande, G. A. (2007). "*Activated alpha(2)-macroglobulin induces cell proliferation and mitogen-activated protein kinase activation by LRP-1 in the J774 macrophage-derived cell line*". *Arch Biochem Biophys*, **460**(1): 100-6.
- Boucher, P., Ducluzeau, P. H., Davelu, P., Andreelli, F., Vallier, P., Riou, J. P., Laville, M. y Vidal, H. (2002). "*Expression and regulation by insulin of low-density lipoprotein receptor-related protein mRNA in human skeletal muscle*". *Biochim Biophys Acta*, **1588**(3): 226-31.
- Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W. P., Anderson, R. G. y Herz, J. (2003). "*LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis*". *Science*, **300**(5617): 329-32.
- Bravo-Cordero, J. J., Marrero-Diaz, R., Megias, D., Genis, L., Garcia-Grande, A., Garcia, M. A., Arroyo, A. G. y Montoya, M. C. (2007). "*MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway*". *EMBO J*, **26**(6): 1499-510.
- Brinckerhoff, C. E. y Matrisian, L. M. (2002). "*Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince*". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**(3): 207-14.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N. y Reichenbach, A. (2006). "*Muller cells in the healthy and diseased retina*". *Prog Retin Eye Res*, **25**(4): 397-424.
- Brown, M. S. y Goldstein, J. L. (1986). "*A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*". *Science*, **232**(4746): 34-47.
- Bu, G., Maksymovitch, E. A., Geuze, H. y Schwartz, A. L. (1994). "*Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor-related protein in human glioblastoma cells*". *J Biol Chem*, **269**(47): 29874-82.
- Bull, N. D., Limb, G. A. y Martin, K. R. (2008). "*Human Muller stem cell (MIO-M1) transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration*". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **49**(8): 3449-56.
- Caceres, L. C., Bonacci, G. R., Sanchez, M. C. y Chiabrande, G. A. (2010). "*Activated alpha(2) macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF-*

- kappaB* activation in macrophage-derived cell lines". *J Cell Biochem*, **111**(3): 607-17.
- Cal, R., Castellano, J., Revuelta-Lopez, E., Aledo, R., Barriga, M., Farre, J., Vilahur, G., Nasarre, L., Hove-Madsen, L., Badimon, L. y Llorente-Cortes, V. (2012). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesteryl ester uptake and accumulation in cardiomyocytes". *Cardiovasc Res*, **94**(3): 469-79.
- Caratu, G., Allegra, D., Bimonte, M., Schiattarella, G. G., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Napolitano, M., Russo, T. y Zambrano, N. (2007). "Identification of the ligands of protein interaction domains through a functional approach". *Mol Cell Proteomics*, **6**(2): 333-45.
- Castellano, J., Aledo, R., Sendra, J., Costales, P., Juan-Babot, O., Badimon, L. y Llorente-Cortes, V. (2011). "Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1alpha in human vascular smooth muscle cells". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**(6): 1411-20.
- Ceschin, D. G., Sanchez, M. C. y Chiabrando, G. A. (2009). "Insulin induces the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) degradation by the proteasomal system in J774 macrophage-derived cells". *J Cell Biochem*, **106**(3): 372-80.
- Clark, I. M. (2001). "Matrix Metalloproteinase Protocols"
- Corvera, S., Graver, D. F. y Smith, R. M. (1989). "Insulin increases the cell surface concentration of alpha 2-macroglobulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered transit of the receptor among intracellular endocytic compartments". *J Biol Chem*, **264**(17): 10133-8.
- Chen, Y. y Lippincott-Schwartz, J. (2013a). "Insulin triggers surface-directed trafficking of sequestered GLUT4 storage vesicles marked by Rab10". *Small GTPases*, **4**(3): 193-7.
- Chen, Y. y Lippincott-Schwartz, J. (2013b). "Rab10 delivers GLUT4 storage vesicles to the plasma membrane". *Commun Integr Biol*, **6**(3): e23779.
- Chiabrando, G. A., Sanchez, M. C., Skornicka, E. L. y Koo, P. H. (2002). "Low-density lipoprotein receptor-related protein mediates in PC12 cell cultures the inhibition of

- nerve growth factor-promoted neurite outgrowth by pregnancy zone protein and alpha2-macroglobulin*". *J Neurosci Res*, **70**(1): 57-64.
- Chu, C. T., Howard, G. C., Misra, U. K. y Pizzo, S. V. (1994a). "Alpha 2-macroglobulin: a sensor for proteolysis". *Ann N Y Acad Sci*, **737**: 291-307.
- Chu, C. T., Oury, T. D., Enghild, J. J. y Pizzo, S. V. (1994b). "Adjuvant-free in vivo targeting. Antigen delivery by alpha 2-macroglobulin enhances antibody formation". *J Immunol*, **152**(4): 1538-45.
- Chu, C. T. y Pizzo, S. V. (1994). "alpha 2-Macroglobulin, complement, and biologic defense: antigens, growth factors, microbial proteases, and receptor ligation". *Lab Invest*, **71**(6): 792-812.
- Das, A. y McGuire, P. G. (2003). "Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition". *Prog Retin Eye Res*, **22**(6): 721-48.
- Descamps, O., Bilheimer, D. y Herz, J. (1993). "Insulin stimulates receptor-mediated uptake of apoE-enriched lipoproteins and activated alpha 2-macroglobulin in adipocytes". *J Biol Chem*, **268**(2): 974-81.
- Donoso, M., Cancino, J., Lee, J., van Kerkhof, P., Retamal, C., Bu, G., Gonzalez, A., Caceres, A. y Marzolo, M. P. (2009). "Polarized traffic of LRP1 involves AP1B and SNX17 operating on Y-dependent sorting motifs in different pathways". *Mol Biol Cell*, **20**(1): 481-97.
- Etienne-Manneville, S. (2013). "Microtubules in cell migration". *Annu Rev Cell Dev Biol*, **29**: 471-99.
- Farfan, P., Lee, J., Larios, J., Sotelo, P., Bu, G. y Marzolo, M. P. (2013). "A sorting nexin 17-binding domain within the LRP1 cytoplasmic tail mediates receptor recycling through the basolateral sorting endosome". *Traffic*, **14**(7): 823-38.
- Feldman, S. R., Gonias, S. L. y Pizzo, S. V. (1985). "Model of alpha 2-macroglobulin structure and function". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**(17): 5700-4.
- Feldman, S. R. y Pizzo, S. V. (1985). "Purification and characterization of frog alpha-macroglobulin: receptor recognition of an amphibian glycoprotein". *Biochemistry*, **24**(10): 2569-75.
- Ferrer, D. G., Jaldin-Fincati, J. R., Amigone, J. L., Capra, R. H., Collino, C. J., Albertini, R. A. y Chiabrando, G. A. (2014). "Standardized flow cytometry assay for

identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulations: Decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes". Cytometry A.

- Fischer, A. J. y Reh, T. A. (2001). "Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina". *Nat Neurosci*, **4**(3): 247-52.
- Frittoli, E., Palamidessi, A., Disanza, A. y Scita, G. (2011). "Secretory and endo/exocytic trafficking in invadopodia formation: the MT1-MMP paradigm". *Eur J Cell Biol*, **90**(2-3): 108-14.
- Gehring, M. R., Shiels, B. R., Northemann, W., de Bruijn, M. H., Kan, C. C., Chain, A. C., Noonan, D. J. y Fey, G. H. (1987). "Sequence of rat liver alpha 2-macroglobulin and acute phase control of its messenger RNA". *J Biol Chem*, **262**(1): 446-54.
- Geiger, T., Lamri, Y., Tran-Thi, T. A., Gauthier, F., Feldmann, G., Decker, K. y Heinrich, P. C. (1987). "Biosynthesis and regulation of rat alpha 1-inhibitor3, a negative acute-phase reactant of the macroglobulin family". *Biochem J*, **245**(2): 493-500.
- Ghosh, R. N., Gelman, D. L. y Maxfield, F. R. (1994). "Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting HEp2 cells using confocal microscopy". *J Cell Sci*, **107 (Pt 8)**: 2177-89.
- Gliemann, J., Davidsen, O. y Moestrup, S. K. (1989). "Characterization, size estimation and solubilization of alpha-macroglobulin complex receptors in liver membranes". *Biochim Biophys Acta*, **980**(3): 326-32.
- Goldstein, J. L. y Brown, M. S. (1974). "Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia". *J Biol Chem*, **249**(16): 5153-62.
- Goldstein, J. L. y Brown, M. S. (2009). "The LDL receptor". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**(4): 431-8.
- Gonias, S. L., Carmichael, A., Mettenburg, J. M., Roadcap, D. W., Irvin, W. P. y Webb, D. J. (2000). "Identical or overlapping sequences in the primary structure of human alpha(2)-macroglobulin are responsible for the binding of nerve growth factor-beta, platelet-derived growth factor-BB, and transforming growth factor-beta". *J Biol Chem*, **275**(8): 5826-31.

- Gonias, S. L., Gaultier, A. y Jo, M. (2011). "Regulation of the urokinase receptor (uPAR) by LDL receptor-related protein-1 (LRP1)". *Curr Pharm Des*, **17**(19): 1962-9.
- Gordon, P. B. y Seglen, P. O. (1988). "Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways". *Biochem Biophys Res Commun*, **151**(1): 40-7.
- Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M. F., Shelton, J., Richardson, J. A., Stockinger, W., Nimpf, J. y Herz, J. (2000). "Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction". *J Biol Chem*, **275**(33): 25616-24.
- Gruenberg, J. (2001). "The endocytic pathway: a mosaic of domains". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**(10): 721-30.
- Habtemichael, E. N., Brewer, P. D., Romenskaia, I. y Mastick, C. C. (2011). "Kinetic evidence that Glut4 follows different endocytic pathways than the receptors for transferrin and alpha2-macroglobulin". *J Biol Chem*, **286**(12): 10115-25.
- Hall, P. K. y Roberts, R. C. (1978). "Physical and chemical properties of human plasma alpha2-macroglobulin". *Biochem J*, **173**(1): 27-38.
- Hartley, B. S. (1960). "Proteolytic enzymes". *Annu Rev Biochem*, **29**: 45-72.
- Herz, J. y Bock, H. H. (2002). "Lipoprotein receptors in the nervous system". *Annu Rev Biochem*, **71**: 405-34.
- Herz, J., Goldstein, J. L., Strickland, D. K., Ho, Y. K. y Brown, M. S. (1991). "39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor". *J Biol Chem*, **266**(31): 21232-8.
- Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H. y Stanley, K. K. (1988). "Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor". *EMBO J*, **7**(13): 4119-27.
- Herz, J., Kowal, R. C., Goldstein, J. L. y Brown, M. S. (1990). "Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment". *EMBO J*, **9**(6): 1769-76.
- Herz, J. y Strickland, D. K. (2001). "LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor". *J Clin Invest*, **108**(6): 779-84.

- Ho, A. S., Cheng, C. C., Lee, S. C., Liu, M. L., Lee, J. Y., Wang, W. M. y Wang, C. C. (2010). "Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI". *J Biomed Sci*, **17**: 58.
- Hollborn, M., Krausse, C., Iandiev, I., Yafai, Y., Tenckhoff, S., Bigl, M., Schnurrbusch, U. E., Limb, G. A., Reichenbach, A., Kohen, L., Wolf, S., Wiedemann, P. y Bringmann, A. (2004). "Glial cell expression of hepatocyte growth factor in vitreoretinal proliferative disease". *Lab Invest*, **84**(8): 963-72.
- Huotari, J. y Helenius, A. (2011). "Endosome maturation". *EMBO J*, **30**(17): 3481-500.
- Hutagalung, A. H. y Novick, P. J. (2011). "Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology". *Physiol Rev*, **91**(1): 119-49.
- Jedrychowski, M. P., Gartner, C. A., Gygi, S. P., Zhou, L., Herz, J., Kandror, K. V. y Pilch, P. F. (2010). "Proteomic analysis of GLUT4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling". *J Biol Chem*, **285**(1): 104-14.
- Johnson, T. V., Bull, N. D. y Martin, K. R. (2009). "Transplantation prospects for the inner retina". *Eye (Lond)*, **23**(10): 1980-4.
- Kajiwara, Y., Franciosi, S., Takahashi, N., Krug, L., Schmeidler, J., Taddei, K., Haroutunian, V., Fried, U., Ehrlich, M., Martins, R. N., Gandy, S. y Buxbaum, J. D. (2010). "Extensive proteomic screening identifies the obesity-related NYGGF4 protein as a novel LRP1-interactor, showing reduced expression in early Alzheimer's disease". *Mol Neurodegener*, **5**: 1.
- Kanai, Y., Wang, D. y Hirokawa, N. (2014). "KIF13B enhances the endocytosis of LRP1 by recruiting LRP1 to caveolae". *J Cell Biol*, **204**(3): 395-408.
- Kandror, K. V. y Pilch, P. F. (2011). "The sugar is sIRVed: sorting Glut4 and its fellow travelers". *Traffic*, **12**(6): 665-71.
- Kim, I. B., Kim, K. Y., Joo, C. K., Lee, M. Y., Oh, S. J., Chung, J. W. y Chun, M. H. (1998). "Reaction of Muller cells after increased intraocular pressure in the rat retina". *Exp Brain Res*, **121**(4): 419-24.

- Kim, S. H., Turnbull, J. y Guimond, S. (2011). "Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor". *J Endocrinol*, **209**(2): 139-51.
- Ko, K. W., Avramoglu, R. K., McLeod, R. S., Vukmirica, J. y Yao, Z. (2001). "The insulin-stimulated cell surface presentation of low density lipoprotein receptor-related protein in 3T3-L1 adipocytes is sensitive to phosphatidylinositide 3-kinase inhibition". *Biochemistry*, **40**(3): 752-9.
- Krieger, M. y Herz, J. (1994). "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)". *Annu Rev Biochem*, **63**: 601-37.
- Laatsch, A., Merkel, M., Talmud, P. J., Grewal, T., Beisiegel, U. y Heeren, J. (2009). "Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance". *Atherosclerosis*, **204**(1): 105-11.
- Laatsch, A., Panteli, M., Sornsakrin, M., Hoffzimmer, B., Grewal, T. y Heeren, J. (2012). "Low density lipoprotein receptor-related protein 1 dependent endosomal trapping and recycling of apolipoprotein E". *PLoS One*, **7**(1): e29385.
- Lafleur, M. A., Handsley, M. M. y Edwards, D. R. (2003). "Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis". *Expert Rev Mol Med*, **5**(23): 1-39.
- Lawrence, J. M., Singhal, S., Bhatia, B., Keegan, D. J., Reh, T. A., Luthert, P. J., Khaw, P. T. y Limb, G. A. (2007). "MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics". *Stem Cells*, **25**(8): 2033-43.
- Lee, J., Retamal, C., Cuitino, L., Caruano-Yzermans, A., Shin, J. E., van Kerkhof, P., Marzolo, M. P. y Bu, G. (2008). "Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes". *J Biol Chem*, **283**(17): 11501-8.
- Lehti, K., Rose, N. F., Valavaara, S., Weiss, S. J. y Keski-Oja, J. (2009). "MT1-MMP promotes vascular smooth muscle dedifferentiation through LRP1 processing". *J Cell Sci*, **122**(Pt 1): 126-35.

- Lewis, G. P., Matsumoto, B. y Fisher, S. K. (1995). "*Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment*". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **36**(12): 2404-16.
- Li, X. Y., Ota, I., Yana, I., Sabeh, F. y Weiss, S. J. (2008). "*Molecular dissection of the structural machinery underlying the tissue-invasive activity of membrane type-1 matrix metalloproteinase*". *Mol Biol Cell*, **19**(8): 3221-33.
- Liang, C. C., Park, A. Y. y Guan, J. L. (2007). "*In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*". *Nat Protoc*, **2**(2): 329-33.
- Libby, P. (2002). "*Inflammation in atherosclerosis*". *Nature*, **420**(6917): 868-74.
- Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E. y Strickland, D. K. (2008). "*LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies*". *Physiol Rev*, **88**(3): 887-918.
- Limb, G. A., Daniels, J. T., Pleass, R., Charteris, D. G., Luthert, P. J. y Khaw, P. T. (2002a). "*Differential expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 by glial Muller cells: response to soluble and extracellular matrix-bound tumor necrosis factor-alpha*". *Am J Pathol*, **160**(5): 1847-55.
- Limb, G. A., Salt, T. E., Munro, P. M., Moss, S. E. y Khaw, P. T. (2002b). "*In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1)*". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43**(3): 864-9.
- Lombard, C., Saulnier, J. y Wallach, J. (2005). "*Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review*". *Biochimie*, **87**(3-4): 265-72.
- Lonberg-Holm, K., Reed, D. L., Roberts, R. C. y Damato-McCabe, D. (1987a). "*Three high molecular weight protease inhibitors of rat plasma. Reactions with trypsin*". *J Biol Chem*, **262**(10): 4844-53.
- Lonberg-Holm, K., Reed, D. L., Roberts, R. C., Hebert, R. R., Hillman, M. C. y Kutney, R. M. (1987b). "*Three high molecular weight protease inhibitors of rat plasma. Isolation, characterization, and acute phase changes*". *J Biol Chem*, **262**(1): 438-45.
- Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M. M., Loukinov, D., Ulery, P. G., Mikhailenko, I., Lawrence, D. A. y Strickland, D. K.

- (2002). "Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF". *J Biol Chem*, **277**(18): 15499-506.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. y Werb, Z. (2011). "Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease". *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**(12).
- Lu, P., Weaver, V. M. y Werb, Z. (2012). "The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression". *J Cell Biol*, **196**(4): 395-406.
- Llorente-Cortes, V., Casani, L., Cal, R., Llenas, A., Juan-Babot, O., Camino-Lopez, S., Sendra, J. y Badimon, L. (2011). "Cholesterol-lowering strategies reduce vascular LRP1 overexpression induced by hypercholesterolaemia". *Eur J Clin Invest*, **41**(10): 1087-97.
- Llorente-Cortes, V., Costales, P., Bernues, J., Camino-Lopez, S. y Badimon, L. (2006). "Sterol regulatory element-binding protein-2 negatively regulates low density lipoprotein receptor-related protein transcription". *J Mol Biol*, **359**(4): 950-60.
- Llorente-Cortes, V., Otero-Vinas, M. y Badimon, L. (2002). "Differential role of heparan sulfate proteoglycans on aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells and mouse embryonic fibroblasts". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**(11): 1905-11.
- Mantuano, E., Henry, K., Yamauchi, T., Hiramatsu, N., Yamauchi, K., Orita, S., Takahashi, K., Lin, J. H., Gonias, S. L. y Campana, W. M. (2011). "The unfolded protein response is a major mechanism by which LRP1 regulates Schwann cell survival after injury". *J Neurosci*, **31**(38): 13376-85.
- Mantuano, E., Mukandala, G., Li, X., Campana, W. M. y Gonias, S. L. (2008). "Molecular dissection of the human alpha2-macroglobulin subunit reveals domains with antagonistic activities in cell signaling". *J Biol Chem*, **283**(29): 19904-11.
- Maxfield, F. R. y McGraw, T. E. (2004). "Endocytic recycling". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**(2): 121-32.
- May, P., Herz, J. y Bock, H. H. (2005). "Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling". *Cell Mol Life Sci*, **62**(19-20): 2325-38.

- May, P., Rohlmann, A., Bock, H. H., Zurhove, K., Marth, J. D., Schomburg, E. D., Noebels, J. L., Beffert, U., Sweatt, J. D., Weeber, E. J. y Herz, J. (2004). "*Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice*". *Mol Cell Biol*, **24**(20): 8872-83.
- Mikhailenko, I., Battey, F. D., Migliorini, M., Ruiz, J. F., Argraves, K., Moayeri, M. y Strickland, D. K. (2001). "*Recognition of alpha 2-macroglobulin by the low density lipoprotein receptor-related protein requires the cooperation of two ligand binding cluster regions*". *J Biol Chem*, **276**(42): 39484-91.
- Moestrup, S. K. y Gliemann, J. (1989). "*Purification of the rat hepatic alpha 2-macroglobulin receptor as an approximately 440-kDa single chain protein*". *J Biol Chem*, **264**(26): 15574-7.
- Moestrup, S. K., Gliemann, J. y Pallesen, G. (1992). "*Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues*". *Cell Tissue Res*, **269**(3): 375-82.
- Moestrup, S. K. y Hokland, P. (1992). "*Surface expression of the alpha 2-macroglobulin receptor on human malignant blood cells*". *Leuk Res*, **16**(3): 227-34.
- Moestrup, S. K., Kaltoft, K., Petersen, C. M., Pedersen, S., Gliemann, J. y Christensen, E. I. (1990). "*Immunocytochemical identification of the human alpha 2-macroglobulin receptor in monocytes and fibroblasts: monoclonal antibodies define the receptor as a monocyte differentiation antigen*". *Exp Cell Res*, **190**(2): 195-203.
- Muratoglu, S. C., Mikhailenko, I., Newton, C., Migliorini, M. y Strickland, D. K. (2010). "*Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) forms a signaling complex with platelet-derived growth factor receptor-beta in endosomes and regulates activation of the MAPK pathway*". *J Biol Chem*, **285**(19): 14308-17.
- Murphy, G. y Crabbe, T. (1995). "*Gelatinases A and B*". *Methods Enzymol*, **248**: 470-84.
- Nagase, H. y Harris, E. D., Jr. (1983). "*Ovostatin: a novel proteinase inhibitor from chicken egg white. II. Mechanism of inhibition studied with collagenase and thermolysin*". *J Biol Chem*, **258**(12): 7490-8.
- Nagase, H., Harris, E. D., Jr. y Brew, K. (1986). "*Evidence for a thiol ester in duck ovostatin (ovomacroglobulin)*". *J Biol Chem*, **261**(3): 1421-6.

- Nagase, H., Harris, E. D., Jr., Woessner, J. F., Jr. y Brew, K. (1983). "*Ovostatin: a novel proteinase inhibitor from chicken egg white. I. Purification, physicochemical properties, and tissue distribution of ovostatin*". *J Biol Chem*, **258**(12): 7481-9.
- Nakajima, C., Kulik, A., Frotscher, M., Herz, J., Schafer, M., Bock, H. H. y May, P. (2013). "*Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) modulates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent intracellular signaling and NMDA-induced regulation of postsynaptic protein complexes*". *J Biol Chem*, **288**(30): 21909-23.
- Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y. y Takahashi, M. (2004). "*Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina*". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(37): 13654-9.
- Ozbek, S., Balasubramanian, P. G., Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R. P. y Adams, J. C. (2010). "*The evolution of extracellular matrix*". *Mol Biol Cell*, **21**(24): 4300-5.
- Padmasekar, M., Nandigama, R., Wartenberg, M., Schluter, K. D. y Sauer, H. (2007). "*The acute phase protein alpha2-macroglobulin induces rat ventricular cardiomyocyte hypertrophy via ERK1,2 and PI3-kinase/Akt pathways*". *Cardiovasc Res*, **75**(1): 118-28.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J. y Werb, Z. (2007). "*Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling*". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**(3): 221-33.
- Pankov, R. y Yamada, K. M. (2002). "*Fibronectin at a glance*". *J Cell Sci*, **115**(Pt 20): 3861-3.
- Poincloux, R., Lizarraga, F. y Chavrier, P. (2009). "*Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia*". *J Cell Sci*, **122**(Pt 17): 3015-24.
- Qiu, Z., Hyman, B. T. y Rebeck, G. W. (2004). "*Apolipoprotein E receptors mediate neurite outgrowth through activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase in primary neurons*". *J Biol Chem*, **279**(33): 34948-56.
- Quigley, J. P. y Armstrong, P. B. (1983a). "*An endopeptidase inhibitor found in Limulus plasma: an ancient form of alpha 2-macroglobulin*". *Ann N Y Acad Sci*, **421**: 119-24.

- Quigley, J. P. y Armstrong, P. B. (1983b). "An endopeptidase inhibitor, similar to mammalian alpha 2-macroglobulin, detected in the hemolymph of an invertebrate, *Limulus polyphemus*". *J Biol Chem*, **258**(13): 7903-6.
- Ramos, A., Remedi, M. S., Sanchez, C., Bonacci, G., Vides, M. A. y Chiabrande, G. (1997). "Inhibitory effects of human alpha 2-macroglobulin on *Trypanosoma cruzi* epimastigote proteinases". *Acta Trop*, **68**(3): 327-37.
- Ramos, A. M., Duschak, V. G., Gerez de Burgos, N. M., Barboza, M., Remedi, M. S., Vides, M. A. y Chiabrande, G. A. (2002). "*Trypanosoma cruzi*: cruzipain and membrane-bound cysteine proteinase isoform(s) interacts with human alpha(2)-macroglobulin and pregnancy zone protein". *Exp Parasitol*, **100**(2): 121-30.
- Ranganathan, S., Liu, C. X., Migliorini, M. M., Von Arnim, C. A., Peltan, I. D., Mikhailenko, I., Hyman, B. T. y Strickland, D. K. (2004). "Serine and threonine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein by protein kinase Calpha regulates endocytosis and association with adaptor molecules". *J Biol Chem*, **279**(39): 40536-44.
- Rea, S. y James, D. E. (1997). "Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles". *Diabetes*, **46**(11): 1667-77.
- Rehman, A. A., Ahsan, H. y Khan, F. H. (2013). "alpha-2-Macroglobulin: a physiological guardian". *J Cell Physiol*, **228**(8): 1665-75.
- Remacle, A., Murphy, G. y Roghi, C. (2003). "Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface". *J Cell Sci*, **116**(Pt 19): 3905-16.
- Rokas, A. (2008). "The origins of multicellularity and the early history of the genetic toolkit for animal development". *Annu Rev Genet*, **42**: 235-51.
- Romo, P., Madigan, M. C., Provis, J. M. y Cullen, K. M. (2011). "Differential effects of TGF-beta and FGF-2 on in vitro proliferation and migration of primate retinal endothelial and Muller cells". *Acta Ophthalmol*, **89**(3): e263-8.
- Ruoslahti, E., Hayman, E. G. y Pierschbacher, M. D. (1985). "Extracellular matrices and cell adhesion". *Arteriosclerosis*, **5**(6): 581-94.

- Salzman, N. H. y Maxfield, F. R. (1989). "*Fusion accessibility of endocytic compartments along the recycling and lysosomal endocytic pathways in intact cells*". *J Cell Biol*, **109**(5): 2097-104.
- Sanchez, M. C., Barcelona, P. F., Luna, J. D., Ortiz, S. G., Juarez, P. C., Riera, C. M. y Chiabrando, G. A. (2006). "*Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) expression in a rat model of oxygen-induced retinal neovascularization*". *Exp Eye Res*, **83**(6): 1378-85.
- Sanchez, M. C., Chiabrando, G. A., Guglielmone, H. A., Bonacci, G. R., Rabinovich, G. A. y Vides, M. A. (1998). "*Interaction of human tissue plasminogen activator (t-PA) with pregnancy zone protein: a comparative study with t-PA-alpha2-macroglobulin interaction*". *J Biochem*, **124**(2): 274-9.
- Sanchez, M. C., Chiabrando, G. A. y Vides, M. A. (2001). "*Pregnancy zone protein-tissue-type plasminogen activator complexes bind to low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)*". *Arch Biochem Biophys*, **389**(2): 218-22.
- Sanchez, M. C., Luna, J. D., Barcelona, P. F., Gramajo, A. L., Juarez, P. C., Riera, C. M. y Chiabrando, G. A. (2007). "*Effect of retinal laser photocoagulation on the activity of metalloproteinases and the alpha(2)-macroglobulin proteolytic state in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy*". *Exp Eye Res*, **85**(5): 644-50.
- Sand, O., Folkersen, J., Westergaard, J. G. y Sottrup-Jensen, L. (1985). "*Characterization of human pregnancy zone protein. Comparison with human alpha 2-macroglobulin*". *J Biol Chem*, **260**(29): 15723-35.
- Sato, H., Takino, T. y Miyamori, H. (2005). "*Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis*". *Cancer Sci*, **96**(4): 212-7.
- Sauer, H., Ravindran, F., Beldoch, M., Sharifpanah, F., Jedelska, J., Strehlow, B. y Wartenberg, M. (2013). "*alpha2-Macroglobulin enhances vasculogenesis/angiogenesis of mouse embryonic stem cells by stimulation of nitric oxide generation and induction of fibroblast growth factor-2 expression*". *Stem Cells Dev*, **22**(9): 1443-54.
- Scott, C. C., Vacca, F. y Gruenberg, J. (2014). "*Endosome maturation, transport and functions*". *Semin Cell Dev Biol*, **31C**: 2-10.

- Schram, K., Ganguly, R., No, E. K., Fang, X., Thong, F. S. y Sweeney, G. (2011). *"Regulation of MT1-MMP and MMP-2 by leptin in cardiac fibroblasts involves Rho/ROCK-dependent actin cytoskeletal reorganization and leads to enhanced cell migration"*. *Endocrinology*, **152**(5): 2037-47.
- Seiki, M., Koshikawa, N. y Yana, I. (2003). *"Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis"*. *Cancer Metastasis Rev*, **22**(2-3): 129-43.
- Seiki, M. y Yana, I. (2003). *"Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis"*. *Cancer Sci*, **94**(7): 569-74.
- Selvais, C., D'Auria, L., Tyteca, D., Perrot, G., Lemoine, P., Troeberg, L., Dedieu, S., Noel, A., Nagase, H., Henriot, P., Courtoy, P. J., Marbaix, E. y Emonard, H. (2011). *"Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function"*. *FASEB J*, **25**(8): 2770-81.
- Sennlaub, F., Courtois, Y. y Goureau, O. (2002). *"Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy"*. *J Neurosci*, **22**(10): 3987-93.
- Sethi, C. S., Lewis, G. P., Fisher, S. K., Leitner, W. P., Mann, D. L., Luthert, P. J. y Charteris, D. G. (2005). *"Glial remodeling and neural plasticity in human retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy"*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46**(1): 329-42.
- Shi, Y., Yamauchi, T., Gaultier, A., Takimoto, S., Campana, W. M. y Gonias, S. L. (2011). *"Regulation of cytokine expression by Schwann cells in response to alpha2-macroglobulin binding to LRP1"*. *J Neurosci Res*, **89**(4): 544-51.
- Shi, Z., Rudzinski, M., Meerovitch, K., Lebrun-Julien, F., Birman, E., Di Polo, A. y Saragovi, H. U. (2008). *"Alpha2-macroglobulin is a mediator of retinal ganglion cell death in glaucoma"*. *J Biol Chem*, **283**(43): 29156-65.
- Song, H., Li, Y., Lee, J., Schwartz, A. L. y Bu, G. (2009). *"Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9"*. *Cancer Res*, **69**(3): 879-86.

- Sottrup-Jensen, L. (1989). "Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation". *J Biol Chem*, **264**(20): 11539-42.
- Spycher, S. E., Arya, S., Isenman, D. E. y Painter, R. H. (1987). "A functional, thioester-containing alpha 2-macroglobulin homologue isolated from the hemolymph of the American lobster (*Homarus americanus*)". *J Biol Chem*, **262**(30): 14606-11.
- Starkey, P. M. y Barrett, A. J. (1982). "Evolution of alpha 2-macroglobulin. The demonstration in a variety of vertebrate species of a protein resembling human alpha 2-macroglobulin". *Biochem J*, **205**(1): 91-5.
- Strickland, D. K., Ashcom, J. D., Williams, S., Battey, F., Behre, E., McTigue, K., Battey, J. F. y Argraves, W. S. (1991). "Primary structure of alpha 2-macroglobulin receptor-associated protein. Human homologue of a Heymann nephritis antigen". *J Biol Chem*, **266**(20): 13364-9.
- Strongin, A. Y. (2010). "Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy". *Biochim Biophys Acta*, **1803**(1): 133-41.
- Tackenberg, M. A., Tucker, B. A., Swift, J. S., Jiang, C., Redenti, S., Greenberg, K. P., Flannery, J. G., Reichenbach, A. y Young, M. J. (2009). "Muller cell activation, proliferation and migration following laser injury". *Mol Vis*, **15**: 1886-96.
- Takayama, Y. y Takezawa, T. (2006). "Lactoferrin promotes collagen gel contractile activity of fibroblasts mediated by lipoprotein receptors". *Biochem Cell Biol*, **84**(3): 268-74.
- Tang, B. L. y Ng, E. L. (2009). "Rabs and cancer cell motility". *Cell Motil Cytoskeleton*, **66**(7): 365-70.
- Travis, J. y Salvesen, G. S. (1983). "Human plasma proteinase inhibitors". *Annu Rev Biochem*, **52**: 655-709.
- Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B. y Herz, J. (1998). "Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein". *J Biol Chem*, **273**(50): 33556-60.
- Van Leuven, F., Cassiman, J. J. y Van Den Berghe, H. (1979). "Demonstration of an alpha2-macroglobulin receptor in human fibroblasts, absent in tumor-derived cell lines". *J Biol Chem*, **254**(12): 5155-60.

- Van Leuven, F., Cassiman, J. J. y Van den Berghe, H. (1981a). "Functional modifications of alpha 2-macroglobulin by primary amines. I. Characterization of alpha 2 M after derivatization by methylamine and by factor XIII". *J Biol Chem*, **256**(17): 9016-22.
- Van Leuven, F., Cassiman, J. J. y Van den Berghe, H. (1981b). "Functional modifications of alpha 2-macroglobulin by primary amines. II. Inhibition of covalent binding of trypsin to alpha 2 M by methylamine and other primary amines". *J Biol Chem*, **256**(17): 9023-7.
- Van Leuven, F., Cassiman, J. J. y Van den Berghe, H. (1986a). "Human pregnancy zone protein and alpha 2-macroglobulin. High-affinity binding of complexes to the same receptor on fibroblasts and characterization by monoclonal antibodies". *J Biol Chem*, **261**(35): 16622-5.
- Van Leuven, F., Marynen, P., Cassiman, J. J. y Van den Berghe, H. (1986b). "The epitopes of two complex-specific monoclonal antibodies, related to the receptor recognition site, map to the COOH-terminal end of human alpha 2-macroglobulin". *J Biol Chem*, **261**(15): 6933-7.
- Van Leuven, F., Marynen, P., Sottrup-Jensen, L., Cassiman, J. J. y Van den Berghe, H. (1986c). "The receptor-binding domain of human alpha 2-macroglobulin. Isolation after limited proteolysis with a bacterial proteinase". *J Biol Chem*, **261**(24): 11369-73.
- Vu, T. H. y Werb, Z. (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology". *Genes Dev*, **14**(17): 2123-33.
- Walters, J. J. y Berwin, B. (2005). "Differential CD91 dependence for calreticulin and *Pseudomonas* exotoxin-A endocytosis". *Traffic*, **6**(12): 1173-82.
- Wang, X., Ma, D., Keski-Oja, J. y Pei, D. (2004). "Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network. Identification of DKV582 as a recycling signal". *J Biol Chem*, **279**(10): 9331-6.
- Wang, Y., Smith, S. B., Ogilvie, J. M., McCool, D. J. y Sarthy, V. (2002). "Ciliary neurotrophic factor induces glial fibrillary acidic protein in retinal Muller cells through the JAK/STAT signal transduction pathway". *Curr Eye Res*, **24**(4): 305-12.

- Wickramasinghe, R. D., Ko Ferrigno, P. y Roghi, C. (2010). "Peptide aptamers as new tools to modulate clathrin-mediated internalisation--inhibition of MT1-MMP internalisation". *BMC Cell Biol*, **11**: 58.
- Williams, K. C. y Coppolino, M. G. (2011). "Phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and its vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7)-dependent trafficking facilitate cell invasion and migration". *J Biol Chem*, **286**(50): 43405-16.
- Willnow, T. E., Moehring, J. M., Inocencio, N. M., Moehring, T. J. y Herz, J. (1996). "The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro". *Biochem J*, **313** (Pt 1): 71-6.
- Woodman, P. G. y Futter, C. E. (2008). "Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity". *Curr Opin Cell Biol*, **20**(4): 408-14.
- Wu, L. y Gonias, S. L. (2005). "The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts". *J Cell Biochem*, **96**(5): 1021-33.
- Xue, L. P., Lu, J., Cao, Q., Hu, S., Ding, P. y Ling, E. A. (2006). "Muller glial cells express nestin coupled with glial fibrillary acidic protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina". *Neuroscience*, **139**(2): 723-32.
- Yamashiro, D. J., Tycko, B., Fluss, S. R. y Maxfield, F. R. (1984). "Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway". *Cell*, **37**(3): 789-800.
- Yana, I. y Weiss, S. J. (2000). "Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases". *Mol Biol Cell*, **11**(7): 2387-401.
- Yoon, C., Van Niekerk, E. A., Henry, K., Ishikawa, T., Orita, S., Tuszynski, M. H. y Campana, W. M. (2013). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-dependent cell signaling promotes axonal regeneration". *J Biol Chem*, **288**(37): 26557-68.
- Zhang, H., Links, P. H., Ngsee, J. K., Tran, K., Cui, Z., Ko, K. W. y Yao, Z. (2004). "Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment". *J Biol Chem*, **279**(3): 2221-30.

Zheng, C. Y., Petralia, R. S., Wang, Y. X. y Kachar, B. (2011). "*Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of fluorescence tagged proteins in dendritic spines of cultured hippocampal neurons*". *J Vis Exp*(50).

7. ADENDA

7. ADENDA

Los resultados del presente trabajo de tesis fueron presentados en congresos nacionales e internacionales. Algunos de ellos fueron publicados y otros se encuentran en consideración para su publicación en revistas científicas con referato (*peer review*). Finalmente, es importante destacar que el autor del presente trabajo de tesis, en el marco de su formación doctoral, colaboró activamente en la generación y publicación de otros resultados del grupo de investigación.

7.1 Presentaciones a congresos

7.1.2 Congresos nacionales

2013	<i>Identificación de subpoblaciones de monocitos humanos basada en la expresión diferencial monocítica de LRP1.</i> Ferrer DG, <u>Jaldín-Fincati JR</u> , Amigone JL, Collino CJG, Albertini R y Chiabrandó GA. XVII Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba. La Falda, Córdoba Capital, Argentina. Del 08 al 10 de agosto de 2013. Póster.
2012	<i>Endocytic recycling of LRP1 in α_2M stimulated cells.</i> <u>Jaldín-Fincati JR</u> , Barcelona PF, Sánchez MC, and Chiabrandó GA. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mendoza Capital, Mendoza, Argentina. Del 29 de octubre al 01 de Noviembre de 2012. Póster.
2012	<i>LRP1 expression and function in human blood peripheral monocyte (BPM) subpopulations.</i> Ferrer DG, <u>Jaldín-Fincati JR</u> , Sánchez MC, and Chiabrandó GA. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mendoza Capital, Mendoza, Argentina. Del 29 de Octubre al 01 de noviembre de 2012. Póster.

2011

Endocytic recycling of Lrp1 in α_2M stimulated cells. Jaldín-Fincati JR, Barcelona PF, Sánchez MC, and Chiabrando GA. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. Del 30 de octubre al 02 de Noviembre de 2011. Comunicación oral.

2011

Alpha-2 macroglobulin/LRP1 induces differential macrophage migration in normoxic and hypoxic conditions. Ferrer DG, Jaldín-Fincati JR; Sánchez MC, and Chiabrando GA. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. Del 30 de octubre al 02 de Noviembre de 2011. Póster.

2011

Alpha-2 macroglobulin/LRP1 system regulates the MT1-MMP activity in retinal glial müller cells. Barcelona PF; Jaldín-Fincati JR; Chiabrando GA, and Sánchez MC. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. Del 30 de octubre al 02 de Noviembre de 2011. Comunicación oral.

2011

El sistema alfa-2 Macroglobulina/LRP1 regula la actividad de MT1-MMP en células gliales de Müller. Barcelona PF, Jaldín-Fincati JR, Chiabrando GA, and Sánchez MC. VIII Congreso Nacional de la Asociación en Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Capital Federal, Buenos Aires, Argentina. El 06 de julio de 2011. Comunicación oral.

2010

Molecular characterization of the intracellular traffic of LRP1 and α_2M /LRP1 complex. Jaldín-Fincati JR, Barcelona PF, Sánchez MC, and Chiabrando GA. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Puerto

- Madryn, Chubut, Argentina. Del 30 de Noviembre al 03 de diciembre de 2010. Póster.
- 2010** *$\alpha_2M/Lrp1$ system induces cell migration and proliferation by intracellular signaling activation.* Ferrer DG, Cáceres LC, Jaldín-Fincati JR, Sánchez MC, and Chiabrando GA. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Puerto Madryn, Chubut, Argentina. Del 30 de Noviembre al 03 de diciembre de 2010. Póster.
- 2009** *Role of LRP1 endocytosis respect to the intracellular signaling induced by its ligand α_2M .* Jaldín-Fincati JR, Sánchez MC, Cáceres LC, Barcelona PF, and Chiabrando GA. XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. Del 10 al 13 de noviembre de 2009. Póster.

7.1.2 Congresos internacionales

- 2014** *Activated alpha-2 macroglobulin regulates the MT1-MMP and LRP1 intracellular traffic toward the plasma membrane by different recycling pathways and induces cellular motility of human Müller glial cells.* Jaldín-Fincati JR, Barcelona PF, Sánchez MC and Chiabrando GA. *Current advances in membrane trafficking: Implications for polarity and diseases.* EMBO Workshop. Puerto Natales, Chile. Del 08 al 14 de septiembre de 2014. Póster.
- 2013** *Activated alpha-2 macroglobulin induces cellular migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1.* Ferrer DG, Jaldín-Fincati JR, Barcelona PF, Sánchez MC, Chiabrando GA. XXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. Del 23 al 27 de octubre de 2013. Póster.

2012

The intracellular traffic of MT1-MMP is regulated by α_2 -Macroglobulin/LRP1 system in Muller Glial cells. Barcelona PF, Jaldin-Fincati JR, Chiabrande GA, and Sánchez MC. ARVO Annual Meeting. Del 04 al 10 de mayo de 2012. Fort Lauderdale, Florida USA. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012;53: E-Abstract N° 2017. Póster.

2008

Beyond endocytosis: LRP1 function on Müller glial cell migration. Sánchez MC, Barcelona PF, Jaldín-Fincati JR, Lorenc VE, and Chiabrande GA. I IBRO/LARC Congress of Neurosciences of Latin America, the Caribbean and Iberian Peninsula, Buzios, Brazil. Del 01 al 04 de septiembre de 2008. Póster.

7.2 Publicaciones

7.2.1 Publicación de resultados del presente trabajo de tesis

Activated alpha-2 macroglobulin induces Müller glial cell migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1. Barcelona PF¹, Jaldín-Fincati JR¹, Sánchez MC², and Chiabrande GA². FASEB J. 2013 Aug;27(8):3181-97. doi: 10.1096/fj.12-221598. Epub 2013 May 2.

¹BPF y J-FJR comparten la autoría del presente trabajo.

²SMC y CGA ambos son *Corresponding Authors*.

7.2.2 Otras publicaciones

Standardized Flow Cytometry assay for identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulations: decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes. Ferrer DG¹, Jaldín-Fincati JR¹, Amigone JL, Capra RH, Collino CJG, Albertini RA and Chiabrande GA. Cytometry Part A. 2014 Jul;85(7):601-10. doi: 10.1002/cyto.a.22455. Epub 2014 Mar 17.

¹FDG y J-FJR comparten la autoría del presente trabajo.