

Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid

**CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MIEMBROS  
DE LA FAMILIA *MAL* DE PROTEÍNAS**

**TESIS DOCTORAL**

Memoria Presentada por Juan Francisco Aranda Gómez para optar al grado  
de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Febrero de 2008

## SUMMARY

Cell polarity is characterized by morphological and functional cell asymmetry that allows the segregation of protein machinery in membrane domains. Cell polarity can be constitutive, i.e. in the epithelium, or transient, as during migration. There are two main mechanisms that contribute to establish cell polarity. First, cell membranes have the ability to form domains of specific lipid composition that selectively cluster proteins in order to regulate signalling processes. These domains are heterogeneous and are commonly known as membrane or lipid rafts. Second, the underlying cytoskeleton contributes also to protein segregation by interacting directly with transmembrane proteins and/or modifying the distribution of membrane rafts.

Membrane rafts and the actin cytoskeleton act co-ordinately during processes that require polarization, namely cell motility, but the underlying mechanism regulating this coordination is poorly understood. This is partly because of the fact that the protein machinery that regulates the function of membrane rafts is almost unknown. Amongst the proteins candidates to constitute the scaffold of membrane rafts are the MAL family proteins. MAL and MAL2 have been characterized as raft components of the apical machinery of transport in epithelial cells and transcytotic transport in hepatic cells, respectively.

The work presented here is focused on a new member of the MAL family called myeloid-associated differentiation marker protein (MYADM/bigMAL1). This protein is also an integral component of membrane rafts. In contrast to MAL and MAL2, bigMAL1 is ubiquitously expressed and initial data shows that bigMAL1 localizes to actin-rich structures in cell-to-cell junctions in confluent epithelial monolayers and to lamellipodium-like structures in migrating cells, suggesting a role during general processes of polarization that are not restricted to specialized cell types. Functional analysis using a siRNA-based approach suggests that: 1) bigMAL1 regulates cell morphology and polarization and migration in various cell types and 2) bigMAL1 functionally interacts with components that regulate the actin cytoskeleton such as RhoGTPases Rac and Rho, because of their activation state are affected in the absence of bigMAL1. Therefore, bigMAL1 is a good candidate to link membrane rafts and the actin cytoskeleton during cell motility.

Finally, bigMAL1 is highly expressed in endothelial cells. Endothelial cells regulate the homeostasis of blood vessels and, in particular, play a very important role in promoting the transmigration of leucocytes from the bloodstream towards inflammatory foci. The family of proteins Ezrin Radixin Moesin (ERM) are connectors between the endothelial transmembrane surface receptors that regulate leucocyte transmigration and the actin cytoskeleton. ERMs are activated by phosphorylation of threonine in its C-terminal domain by ROCK. The absence of bigMAL1 upregulates the activity of the Rho GTPase RhoA that subsequently activates the kinase ROCK. Reduction of bigMAL1 in endothelial cells also increases phosphorylation of ERM probably due to the effect of active RhoA on ROCK. As a consequence, the ERM associated surface receptor ICAM-1, which mediates leucocyte transmigration also appears augmented. ICAM-1 mediates the firm adhesion of leucocytes to the endothelium by interacting with beta2 integrins. In conclusion, bigMAL1 plays a general role regulating Rho GTPases in different cell types. In endothelial cells, where bigMAL1 is abundant this regulation has an effect of the activation of the ERM proteins that regulate the dynamics of important adhesion surface receptors such as ICAM-1 on the plasma membrane.

<b><u>INDICE</u></b>	i
<b><u>SUMMARY</u></b>	iv
<b><u>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</u></b>	
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>(1-24)</b>
<b>1.- Las balsas lipídicas o “rafts” celulares son microdominios de membrana</b>	<b>2</b>
1.1- Composición y estructura de las balsas lipídicas	3
1.2- Heterogeneidad y Métodos de estudio de las balsas lipídicas	4
<b>2.- Funciones de la compartimentalización de las membranas. El papel de los “rafts”</b>	<b>5</b>
2.1- Polaridad celular	5
2.1.1- Polaridad estable en células epiteliales y hepáticas	5
2.1.2- Polaridad y señalización en células del sistema inmune	7
2.1.3- Polaridad transitoria en la migración celular	8
2.2- La familia de Rho-GTPasas como reguladores centrales del citoesqueleto de actina	10
<b>3.- Mecanismos moleculares de la organización de microdominios de membrana</b>	<b>12</b>
3.1- Proteínas de cubierta	12
3.2- Proteínas que organizan microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y glicosfingolípidos	13
3.3- Citoesqueleto de actina y conectores	14
3.4- Las proteínas Ezrina/Radixina/Moesina como interconectores entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina	15
<b>4.-Proteínas que organizan microdominios de membrana</b>	<b>16</b>
4.1- La familia de las caveolinas y las caveolas	17
4.2- Las Flotilinas y Reticulones /Nogos	18
4.3- La familia MAL y el origen del dominio MARVEL	19
4.3.1- El gen MAL y su expresión	19
4.3.2- La familia MAL de proteolípidos	20
4.3.3- El dominio MARVEL	21
<b>5.-El endotelio como modelo celular para el estudio de Inflamación y Angiogénesis</b>	<b>23</b>
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<b>25</b>
<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b>(26-38)</b>
<b>1.- Materiales</b>	<b>27</b>
1.1- Anticuerpos	27
1.2- Reactivos	28
<b>2.- Métodos</b>	<b>28</b>
2.1- Líneas celulares, cultivos primarios y condiciones de cultivo	28
2.2- Construcciones de ADN y Oligonucleótidos	29
2.3- Transfecciones de ADN y generación de clones transfectantes estables	30
2.4- Microscopía de Fluorescencia convencional y confocal	32

2.5- Inmunotransferencia	32
2.6- Aislamiento de fracciones de membrana insolubles en detergentes	33
2.7- Preparación y obtención de anticuerpos	34
2.7.1- Preparación y obtención del anticuerpo monoclonal anti-bigMAL1	34
2.7.2- Preparación y obtención del anticuerpo policlonal anti-bigMAL2 humano	35
2.8- Videomicroscopía	35
2.9- Ensayos de actividad GTPasa	37
2.10- Ensayos de adhesión celular	37
2.11- Ensayos de permeabilidad celular	38
2.12- Aislamiento de ARN total y análisis por Northern blot	38
2.13- RT-PCR y Southern blot con oligonucleótidos	38
2.14- Transfecciones de siRNA. Generación del plásmido pSUPER-shRNA bigMAL1/GFP	39

## **RESULTADOS** **(41-82)**

<b>1.- Identificación de nuevos miembros de la familia MAL</b>	41
<b>2.- Caracterización de la subfamilia bigMAL</b>	42
<b>3.- Organización genómica y cromosómica de la subfamilia bigMAL humana</b>	45
<b>4.- Expresión de bigMAL1 en diferentes tejidos y líneas celulares</b>	48
4.1- Clonación del cDNA de MYADM (bigMAL1)	48
4.2- Análisis de la expresión de MYADM (bigMAL1) por Northern blot	48
4.3- Análisis de la expresión de la subfamilia bigMAL1 por RT-PCR	49
<b>5.- Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a bigMAL1 humano</b>	50
<b>6.- La proteína bigMAL1 endógena está presente en los microdominios de membrana</b>	52
<b>7.- La proteína bigMAL1 es ubicua y oligomeriza</b>	53
<b>8.- Distribución subcelular de bigMAL1</b>	54
<b>9.- Obtención y caracterización de un anticuerpo policlonal frente a bigMAL2 humano</b>	55
9.1- La proteína bigMAL2 está asociada a los microdominios de membrana	55
9.2- La proteína bigMAL2 se encuentra en vesículas intracelulares que colocalizan con marcadores lisosomales	57
<b>10.- Eliminación selectiva de la proteína bigMAL1 mediante RNAi</b>	60
<b>11.- la proteína bigMAL1 en HepG2</b>	61
<b>12.- Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre los microdominios de membrana en células HeLa.</b>	64
<b>13.- Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre la fosforilación de la caveolina</b>	65
<b>14.- Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre la morfología celular. Cálculo del Factor Elíptico (F.E.)</b>	66

<b>15.- Generación y caracterización de clones suprimidos establemente en la expresión de bigMAL1.</b>	69
<b>16.- Dinámica bigMAL1</b>	74
<b>17.- La proteína bigMAL1 en células primarias de endotelio HUVECs</b>	76
<b>18.- El crosslinking de ICAM-1 o VCAM-1 con anticuerpo provoca su inclusión en rafts en células HUVECs</b>	77
<b>19.- Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre la expresión de ICAM-1 y la adhesión de leucocitos a la monocapa</b>	78
<b>20.- Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre la adhesión de leucocitos a la monocapa de células HUVECs</b>	79
<b>21.- Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre la fosforilación de las ERMs</b>	79
<b>22.- Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre la permeabilidad en células HUVECs</b>	80
<b>23.- Efecto del tratamiento con TNF-<math>\alpha</math> en la expresión de bigMAL1 en células HUVECs</b>	82
<b>24.- Relación entre ICAM-1, ERM y bigMAL1</b>	82
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>(85-89)</b>
<b>1.-La subfamilia bigMAL</b>	86
1.1- Identificación de la subfamilia bigMAL, dentro de la familia MAL	86
1.2- Caracterización y expresión de la subfamilia bigMAL humana	87
1.3- Las proteínas bigMAL1 y bigMAL2 son componentes constitutivos de los “rafts” celulares y residen en compartimentos celulares distintos	88
<b>2.- La proteína bigMAL1 es necesaria para el mantenimiento de la morfología celular</b>	89
<b>3.- La disminución de los niveles de bigMAL1 afecta a la migración celular</b>	90
<b>4.- Efecto de la eliminación sobre los “rafts” celulares</b>	90
<b>5.- La proteína bigMAL1 no está implicada en la biogénesis ni en la funcionalidad del canalículo biliar en HepG2</b>	92
<b>6.- BigMAL1 y regulación de la expresión de receptores de membrana en endotelio</b>	93
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>96</b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>98</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>AJ</b>	<i>Adherens junction</i> . Uniones adherentes
<b>ADN/DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APC</b>	<i>Antigen Presenting Cell</i> . Célula presentadora de antígeno
<b>APN</b>	<i>Aminopeptidase N</i> . Aminopeptidasa N
<b>ARN/RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARP 2/3</b>	<i>Actin-related proteins 2/3</i> . Complejo 2 y 3 de proteínas relacionadas con actina
<b>BCR</b>	<i>B Cell Receptor</i> . Receptor para el antígeno de la célula B
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> . Herramienta para la búsqueda de alineamientos locales
<b>c-SMAC</b>	<i>central-SMAC</i> . SMAC central
<b>CKLF</b>	<i>Chemoquine like factor</i> . Factor relacionado con las quimioquinas
<b>COPI/COPII</b>	<i>Coatomer protein</i> . Complejo de proteínas del Coatómero
<b>DRM</b>	<i>Detergent resistant membrana</i> . Membranas resistentes a detergentes
<b>DPP-IV</b>	<i>DiPeptidilPeptidase IV</i> . Dipeptidil peptidasa IV
<b>ENA</b>	<i>Enabled protein</i>
<b>EBP50</b>	<i>Ezrin Binding Protein 50</i> . Proteína de unión a ezrina
<b>EEA-1</b>	<i>Early Endosome Antigen</i> . Antígeno de endosomas tempranos
<b>ERM</b>	<i>Ezrin/Radixin/Moesin</i> . Ezrina/Radixina/Moesina
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i> . Quinasa regulada por señales extracelulares
<b>EST</b>	<i>Expressed Sequence Tags</i> . Fragmentos de secuencias transcritas
<b>FcεRI</b>	Receptor de la fracción Fc de la Inmunoglobulina E
<b>FAK</b>	<i>Focal Adhesion Kinase</i> . Quinasa de adhesión focal
<b>FERM</b>	<i>Four point one, Ezrin, Radixin and Moesin</i> . Dominio proteico que caracteriza a la superfamilia de proteínas ERM y proteína 4.1
<b>F.E.</b>	Factor Elíptico
<b>FN</b>	Fibronectina
<b>FRET</b>	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> . Técnica de fluorescencia por transferencia de energía de resonancia
<b>GAP</b>	<i>GTPases activating proteins</i> . Proteínas activadoras de la hidrólisis de GTP.
<b>GEF</b>	<i>Guanosin nucleotide exchange factor</i> . Factores de intercambio de nucleótidos de guanosina
<b>GDI</b>	<i>GDP-dissociation inhibitor</i> . Proteínas que inhiben el intercambio de GDP por GTP
<b>GDP</b>	<i>Guanosin Di-Phosphate</i> . Guanosin difosfato
<b>GTP</b>	<i>Guanosin Tri-Phosphate</i> . Guanosin trifosfato
<b>GEMs</b>	<i>Glycolipid-Enriched Membranas</i> . Membranas enriquecidas en glicolípidos
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i> . Proteína verde fluorescente
<b>GPI</b>	<i>GlycosylPhosphatidylInositol</i> . Glicosil fosfatidil-inositol
<b>HA</b>	<i>HemAgglutinin</i> . Hemaglutinina
<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> . Factor de crecimiento Hepático
<b>HUVECs</b>	<i>Human Umbilical Vascular Endothelial Cells</i> . Células endoteliales de cordón umbilical
<b>IL-1</b>	<i>Interleukin-1</i> . Interleuquina 1
<b>IFN-γ</b>	<i>Interferon-γ</i> . Interferon-γ

<b>ICAM-1</b>	<i>InterCellular adhesion Molecule 1</i> . Molécula de adhesión intercelular-1
<b>ICAM-3</b>	<i>InterCellular adhesion Molecule 3</i> . Molécula de adhesión intercelular-3
<b>Ins(1,4,5)P<sub>3</sub></b>	<i>Inositol 1,4,5-triphosphate</i> . Inositol 1,4,5- trifosfato
<b>JAM-1</b>	<i>Junctional Adhesion Molecule-1</i> . Molécula de adhesión de las uniones celulares
<b>Kb</b>	<i>Kilobase</i> . Kilobase
<b>KDa</b>	<i>Kilodalton</i> . Kilodalton
<b>KLH</b>	<i>KeyHole Limpet Hemocyanin</i> . Hemocianina de molusco
<b>LFA-1</b>	<i>Leucocyte Function Antigen-1</i> . Antígeno asociado a la función de los linfocitos T-1
<b>MARVEL</b>	<i>MAL and Related proteins for VEsicle trafficking and membrane Link</i> . Dominio proteico implicado en la aposición y unión de membranas relacionado con las proteínas MAL
<b>MYADM</b>	<i>Myeloid associated differentiation Marker</i> . Marcador asociado a diferenciación mieloide
<b>MDCK</b>	<i>Madin-Darby kidney cells</i> . Células epiteliales renales caninas
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> . Complejo principal de histocompatibilidad
<b>MTOC</b>	<i>MicroTubule Organizing Center</i> . Centro organizador de microtúbulos
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>p75NTR</b>	<i>p75 NeuroTrophin Receptor</i> . Receptor de neurotrofina p75
<b>PBLs</b>	<i>Peripheral Blood Lymphocytes</i> . Linfocitos de sangre periférica
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i> . Fosfatidil-inositol 3 quinasa
<b>PKC</b>	<i>Protein Kinase C</i> . Proteína quinasa C
<b>PLC-<math>\gamma</math>1</b>	<i>PhosphoLipase C-<math>\gamma</math>1</i> . Fosfolipasa C- $\gamma$ 1 específica del fosfatidil-inositol
<b>p-SMAC</b>	<i>peripheral-SMAC</i> . SMAC periférico
<b>PtdIns(4,5)P<sub>2</sub></b>	<i>Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate</i> . Fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato
<b>PAG-1</b>	<i>Phosphoprotein associated to Glicosphigolipid domains</i> . Fosfoproteína asociada a microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos
<b>PECAM-1</b>	<i>Platelet-Endothelial cell adhesion molecule</i> . Molécula de Adhesión celular de plaquetas y endotelio
<b>pIgR</b> polimérica	<i>Polymeric Immunoglobulin Receptor</i> . Receptor para la inmunoglobulina
<b>PrP</b>	<i>Prion Protein</i> . Proteína celular del prión
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and TENSin homologue</i> . Homólogo de fosfatasa y tensina
<b>ROCK</b>	<i>Rho-kinase</i> . Quinasa de Rho
<b>RT-PCR</b>	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
<b>SAC</b>	<i>Subapical Compartment</i> . Compartimento subapical
<b>SNARE</b>	<i>soluble NSF attachment receptor</i> . Receptor de unión sensible al factor N-ethylmaleimide soluble
<b>SPFH</b>	<i>Stomatin/Prohibitin/Flotilin/Hllk/c</i> . Dominio proteico presente en la estomatina, prohibitivas y Flotilinas
<b>siRNA</b>	<i>Short Interferente Ribonucleic Acid</i> . Acido ribonucleico interferente pequeño
<b>shRNA</b>	<i>Short Hairpin Ribonucleic Acid</i> . Acido ribonucleico interferente pequeño en horquilla

<b>TGN</b>	<i>Trans-Golgi Network</i> . Red del trans-Golgi
<b>TJ</b>	<i>Tight Junctions</i> . Uniones estrechas
<b>TCR</b>	<i>T Cell Receptor</i> . Receptor para el antígeno de la célula T
<b>TfR</b>	<i>Transferrin Receptor</i> . Receptor de transferrina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumoral Necrosis Factor</i> . Factor de necrosis Tumoral
<b>TX-100</b>	<i>Triton X-100</i> . Tritón X-100
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> . Molécula de adhesión de células vasculares
<b>WASP</b>	<i>Wiscott-Aldrich Syndrome Protein</i> . Proteína del síndrome de Wiscott-Aldrich
<b>WIP</b>	<i>WASP interacting protein</i> . Proteína que interacciona WASP
<b>ZO-1</b>	<i>Zonula Occludens-1 protein</i> .

Términos en inglés:

**Knock out (KO)** Inactivación total o parcial de un gen llevada a cabo mediante técnicas de ADN recombinante

**Western blot** Transferencia de proteínas a membrana y detección mediante anticuerpos

**Northern Blot** Transferencia de RNA a membrana e hibridación con sonda marcada

**Southern Blot** Transferencia de DNA a membrana e hibridación con sonda marcada

**RNAi** Disminución de los niveles de una proteína mediante la tecnología basada en la interferencia de la traducción con oligonucleótidos de RNA pequeños



# Introducción

La idea de que las membranas celulares son mezclas homogéneas de proteínas y lípidos ha sufrido una transformación extraordinaria en la última década y actualmente su heterogeneidad lateral está ampliamente aceptada como un requerimiento para su funcionalidad. La compartimentalización de las membranas tanto estructural como funcional depende no sólo de la propia composición lipídica sino también de su contenido de proteínas capaces de organizar los lípidos. La combinación de proteínas y lípidos dentro de las membranas hace posible la existencia de regiones submicroscópicas con características fisicoquímicas y composición diferentes. De esta forma se originan microdominios de membrana en los que se concentran o segregan, según su afinidad, determinados tipos de lípidos y proteínas. Estos microdominios pueden desempeñar distintas funciones celulares como por ejemplo el tráfico intracelular de membranas en las rutas exocíticas y endocíticas, la formación de uniones celulares o el desarrollo de subdominios polarizados en la célula necesario durante la migración, la organogénesis y la angiogénesis.

### **1. Las balsas lipídicas o “rafts” celulares son microdominios de membrana**

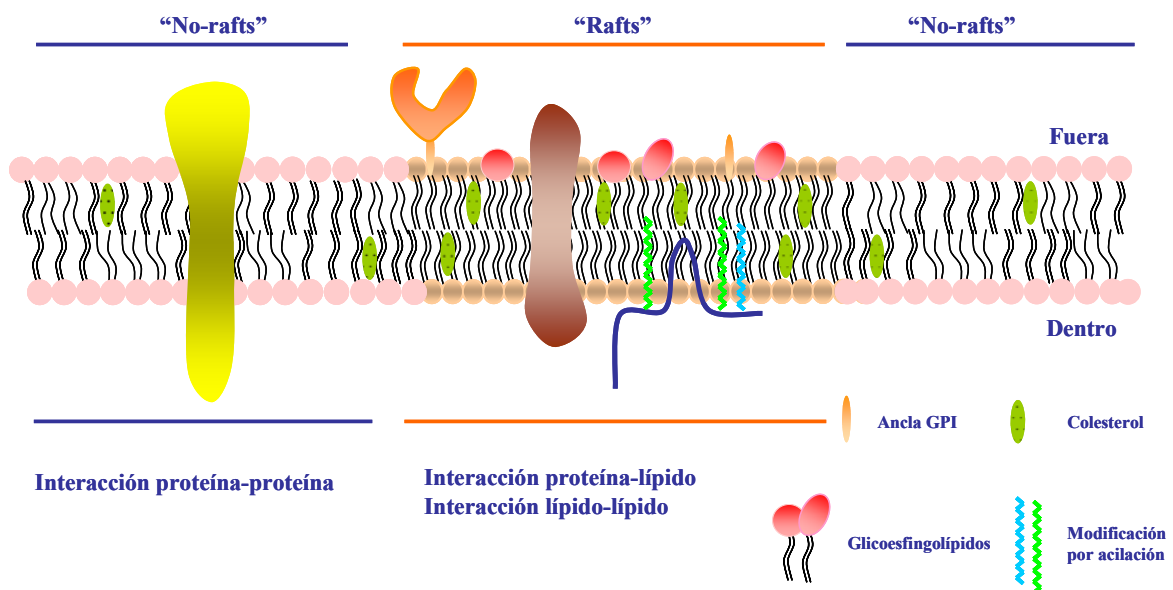
El origen de la hipótesis de la existencia de los microdominios de membrana o balsas lipídicas (“rafts”) (Simons and Ikonen, 1997) como dominios funcionales se basa en observaciones previas en la membrana apical de células epiteliales donde existe un enriquecimiento en determinados tipos de lípidos, como glicosfingolípidos y colesterol (Simons and van Meer, 1988). Existe controversia sobre el tamaño, organización y composición proteica de las balsas lipídicas e incluso sobre su misma existencia. Una de las definiciones más recientes tiene en cuenta la propia variabilidad de las balsas lipídicas, y por eso se han denominado como dominios de membrana de pequeño tamaño (10-200 nm), enriquecidos en esteroides y esfingolípidos, muy dinámicos y heterogéneos en su composición proteica y cuya función es la de compartimentalizar las membranas para distintos procesos celulares (Keystone Simposio 2006).

#### **1.1 Composición y estructura de las balsas lipídicas**

La especie lipídica más abundante en las membranas biológicas son los glicerolípidos, de los cuales los más abundantes son los fosfolípidos, cuyas cadenas de ácidos grasos insaturados hacen que la mayoría de las membranas se encuentren en un estado de máxima fluidez o también denominado estado de líquido-cristal o desordenado. Otro tipo de lípidos menos abundantes son los glicolípidos, dentro de los

cuales los glicosfingolípidos, con sus cadenas de ácidos grasos largas y saturadas, se pueden disponer de manera más organizada que los fosfolípidos en la membrana, produciéndose el empaquetamiento lateral que favorece un estado de mínima fluidez o estado de líquido-gel u ordenado. La compactación entre los glicosfingolípidos podría aumentar además por el establecimiento de puentes de hidrógeno entre sus cabezas azucaradas y por la presencia de moléculas de colesterol. Este lípido, perteneciente al grupo de los esteroides, se intercalaría entre las cadenas de ácidos grasos y favorecería la rigidez y la separación entre los estados líquido y gel de la membrana al establecer enlaces de “Van der Waals” con las cadenas saturadas de los esfingolípidos y por puentes de hidrógeno entre su grupo  $3\beta$ -hidroxilo y la ceramida(Sankaram and Thompson, 1990).

En consecuencia, la presencia de los glicosfingolípidos y colesterol favorecen la rigidez de estos dominios de membrana, y esto haría que sean un entorno favorable para la asociación de ciertas proteínas de membrana y darían lugar a la formación de microdominios de membrana dispersos dentro de la bicapa de las membranas a los que se les denomina balsas lipídicas o “rafts” (**figura 1**). Las proteínas que se asocian a las balsas lipídicas son de 3 tipos: proteínas modificadas por grupos glicosil-fosfatidilinositol (GPI)(Hooper, 1999) que se intercalarían en la mitad exoplásmica de la bicapa lipídica de la membrana; proteínas unidas covalentemente a grupos mirístico y palmítico, que se unirían a la mitad citoplásmica de la bicapa lipídica(Liang et al., 2001), y por último determinadas proteínas con dominios transmembrana hidrofóbicos susceptibles de atravesar de un lado a otro la membrana(Scheiffele et al., 1997). Sin embargo, no todas las proteínas de membrana se asocian a estas balsas lipídicas, de hecho la mayoría están excluidas (Melkonian et al., 1999).



**Figura 1. Modelo de la estructura y composición de los “rafts”.** Los “rafts” son microdominios de membrana con una alta concentración de esfingolípidos (cabezas rojas) y colesterol (en verde) que se encuentran flotando en un ambiente rico en fosfolípidos (en rosa). Los lípidos que constituyen los “rafts” presentan cadenas de ácidos grasos largas y saturadas (zona central), mientras que los lípidos excluidos de los microdominios son más cortos y presentan insaturaciones (zonas laterales del esquema). El reclutamiento de las proteínas de membrana en las regiones de ésta ricas en fosfolípidos tiene lugar a través de interacciones proteína-proteína. Sin embargo, las proteínas incluidas en los “rafts” lo hacen a través de interacciones de los lípidos de estos con el dominio transmembrana de proteínas integrales (interacción lípido-proteína), o a través del motivo lipídico de proteínas ancladas a la membrana por ciertos lípidos (Glicosil-fosfatidil inositol, mirístico o palmítico) (interacción lípido-lípido). Las proteínas excluidas de los “rafts” se muestran en color amarillo, las proteínas integrales de membrana que acceden a “rafts” en color marrón, las proteínas ancladas por grupos GPI en la cara externa de la membrana en color naranja y por último, las proteínas aciladas y orientadas en la cara citosólica, en color azul.

## 1.2 Heterogeneidad y Métodos de estudio de las balsas lipídicas

Los microdominios de membrana pueden variar en su composición y propiedades, dependiendo del tipo celular y del ambiente externo. La adhesión celular mediada por integrinas es uno de los factores que contribuye a la ordenación y el empaquetamiento de estos microdominios en la membrana (Gaus et al., 2006). El tamaño de éstos también contribuye a la estabilización ya que los microdominios de membrana de pequeño tamaño pueden asociarse y ensamblarse en plataformas de mayor tamaño por medio de interacciones lípido-lípido y lípido-proteína (**figura 1**) debido a que son muy dinámicos (Pralle et al., 2000), de hecho se ha propuesto que la funcionalidad de los “rafts” depende en parte de esta asociación (Friedrichson and Kurzchalia, 1998). A este agrupamiento contribuye el hecho de que los microdominios de la cara exoplásmica pueden favorecer el empaquetamiento y la ordenación de los microdominios en la cara citoplásmica (Gri et al., 2004). Las balsas lipídicas no sólo se encuentran en la membrana plasmática, sino que también se han detectado en membranas intracelulares,

tanto en compartimentos exocíticos como endocíticos (Dupree et al., 1993; Gagescu et al., 2000; Millan et al., 1999; Puertollano et al., 2001). Debido a su tamaño reducido, su detección está por debajo del poder de resolución de las técnicas microscópicas convencionales aplicadas hasta el momento. Mediante técnicas de fluorescencia por transferencia de energía de resonancia (FRET) se han visualizado los microdominios de membrana ricos en proteínas ancladas por GPI (Varma and Mayor, 1998). Uno de los métodos para estudiar la composición de las balsas lipídicas es la extracción de membranas insolubles en detergentes no iónicos (Tritón X-100) a bajas temperaturas (DRMs o GEMs). También existe controversia sobre si estas membranas derivan o no de los “rafts” celulares debido a uso de estos detergentes (Brown and Rose, 1992; Munro, 2003) aunque también se ha demostrado que se pueden aislar microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos con protocolos que no incluyen la utilización de detergentes (Smart et al., 1995).

## **2. Funciones de la compartimentalización de las membranas. El papel de los “rafts”**

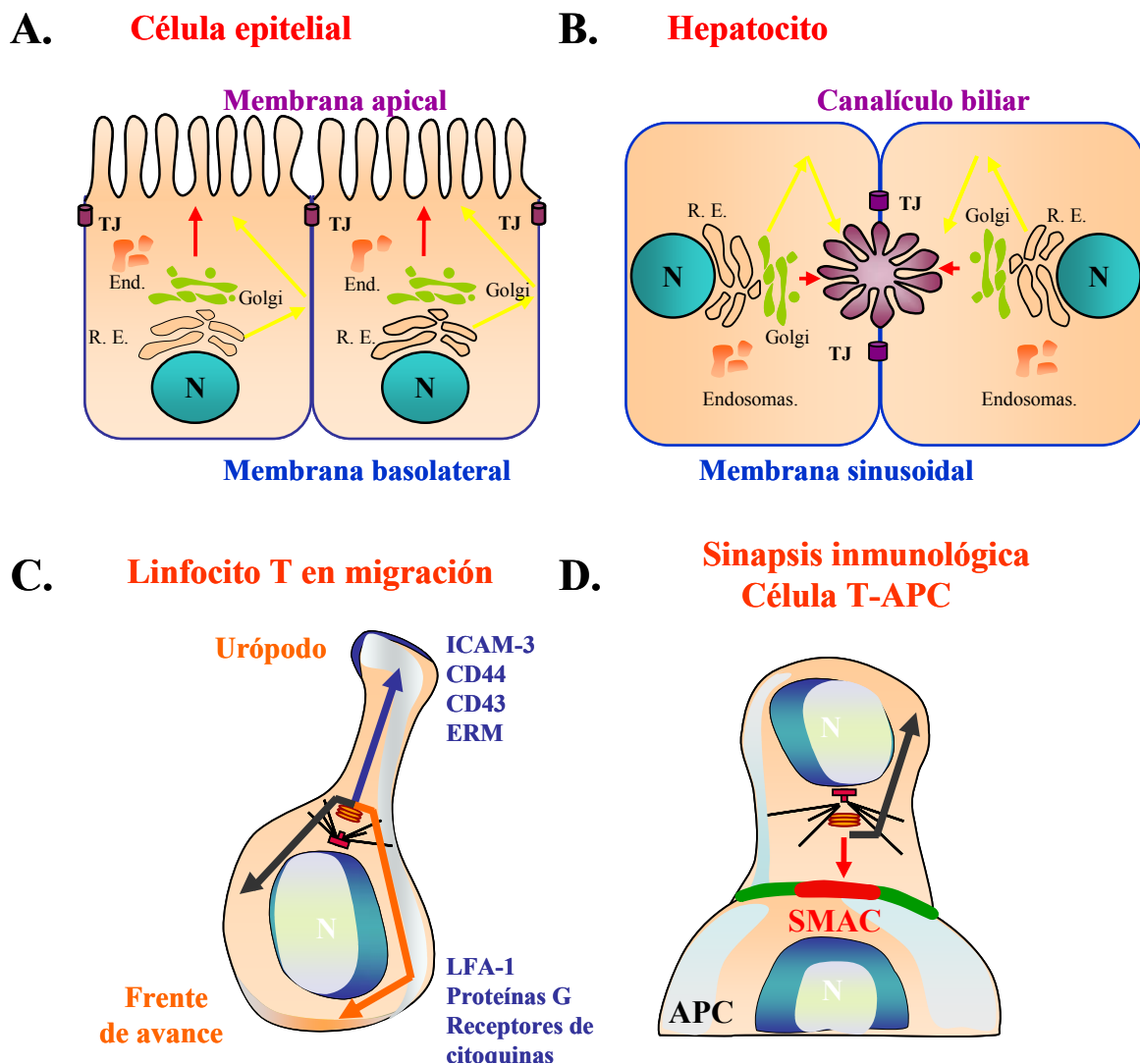
La compartimentalización de las membranas en microdominios especializados posibilita que se puedan llevar a cabo funciones celulares diferentes en puntos concretos de las membranas. Actualmente uno de los objetivos de la biología celular es comprender como las células ensamblan y mantienen estos dominios así como la forma en la que integran las rutas de señalización y el tráfico de membranas para tal fin.

### **2.1 Polaridad celular**

La asimetría espacial o polaridad es una propiedad fundamental de la mayoría de las células eucariotas, y puede ser un fenómeno transitorio (linfocito o fibroblasto en migración) o una característica permanente (célula epitelial) (**figura 2**). La adquisición de polaridad celular es un mecanismo complejo por el que la célula establece y mantiene dominios en la membrana plasmática diferenciados funcionalmente y separados físicamente. Esta organización espacial y la composición diferente de estos dominios facilitan procesos celulares fundamentales y tan diversos como la diferenciación, la interacción célula-célula, la secreción de moléculas, la función tisular, la inmunidad celular, la migración celular, el desarrollo y la morfogénesis.

### 2.1.1 Polaridad estable en células epiteliales y hepáticas

Los epitelios constituyen una capa celular altamente organizada con funciones muy especializadas de secreción, absorción, transporte de iones y de barrera protectora. Para ejercer su función las células epiteliales y hepáticas diferencian su membrana plasmática en un subdominio apical que es el que está en contacto con el lumen o el exterior celular y otro basolateral por el que se une a las células vecinas y a la matriz extracelular. Ambos subdominios son diferentes en composición y función {Simons,



**Figura 2. Esquema de los diferentes tipos de polaridad celular.** A. y B. La célula epitelial y el hepatocito como modelos constitutivamente polarizados. Esquema que muestra dos células epiteliales y dos hepatocitos unidas entre sí y en las que se pueden distinguir los dos subdominios de membrana separados por las uniones estrechas (TJ), el dominio apical (negro) y el dominio basolateral (azul). También aparecen representadas la ruta directa apical desde el aparato de Golgi (flecha roja) y la ruta transcitótica (flechas amarillas). C. Linfocito polarizado en proceso de migración, atraído por un gradiente quimiotáctico, para su extravasación hacia un foco inflamatorio. D. Sinapsis Inmunológica entre un linfocito polarizado y una célula presentadora de antígeno.

1985 #111}. Esta composición se mantiene gracias a la existencia de uniones estrechas que evitan la difusión de proteínas y lípidos de la membrana apical a la basolateral y viceversa (Balda and Matter, 1998; Rodriguez-Boulan and Nelson, 1989) (**figura 2**).

El dominio apical es muy rico en glicoesfingolípidos, que poseen mayor estabilidad y compactación (Simons and van Meer, 1988). Este subdominio, tanto en células epiteliales como hepáticas, suele plegarse dando lugar a la aparición de microvellosidades mantenidas por una red de proteínas estructurales conectadas por el citoesqueleto de actina y presenta numerosas enzimas, transportadores, receptores y maquinaria de transducción de señales (Mellman et al., 1995; Wozniak et al., 1997).

La membrana basolateral está enriquecida en fosfolípidos siendo el más abundante de ellos la fosfatidil-colina. Este subdominio es el encargado de capturar los nutrientes de la circulación y está en contacto con las células vecinas y el tejido conectivo subyacente (Rodriguez-Boulan and Nelson, 1989). Su composición es similar a la membrana de una célula no polarizada y realiza funciones de carácter constitutivo, aunque están presentes los receptores de adhesión como las integrinas o la E-cadherina. La polarización de estos tipos celulares se establece por el transporte diferencial de las moléculas hacia la membrana apical o basolateral. El lugar celular en el que se produce principalmente la separación de estas rutas no está establecido definitivamente, pudiendo tener lugar en el retículo endoplásmico (Muniz et al., 2001), en la red del trans-Golgi (TGN) (Dupree et al., 1993) o en la red endosomal como se ha propuesto en hepatocitos y células intestinales (Matter and Mellman, 1994)(**figura 2**).

Partiendo de la observación en células epiteliales polarizadas MDCK de que la membrana apical está enriquecida en glicoesfingolípidos y colesterol (Simons and van Meer, 1988) y de que parecía existir un cotransporte de glicolípidos y proteínas a la membrana apical (Skibbens et al., 1989), Simons y Wandinger-Ness propusieron un modelo de transporte apical basado en las balsas lipídicas (Wandinger-Ness et al., 1990). En él, se postulaba que el transporte apical se basa fundamentalmente en las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína que tienen lugar en los microdominios de membrana ricos en glicoesfingolípidos y colesterol (**figura 1**).

### **2. 1. 2 Polaridad y señalización en células del sistema inmune.**

Las células del sistema inmune como los linfocitos T adquieren una morfología polarizada cuando llevan a cabo ciertas funciones, como la migración o la interacción con una célula presentadora, proceso denominado Sinapsis Inmunológica, SI (Sanchez-

Madrid and del Pozo, 1999) (**figura 2**). Durante la migración el linfocito T presenta dos polos, el frente de avance, cuyo papel general es la adhesión al sustrato, aunque también es una zona muy sensible al antígeno y a las citoquinas quimiotácticas (Negulescu et al., 1996; Nieto et al., 1997). En el urópodo están concentradas moléculas que intervienen en la adhesión intercelular (Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999). El hecho de que la proteína apical HA sea transportada selectivamente en “rafts” al urópodo sugiere un paralelismo con el transporte apical de células epiteliales (Millan et al., 2002).

Además del TCR, otros receptores “multicadena” (formado por varias subunidades) pertenecientes a los linfocitos B (BCR), y el receptor de alta afinidad para la IgE en basófilos y mastocitos (FcεRI), utilizan los “rafts” para procesos de señalización celular. Durante la activación de los linfocitos T se produce el reclutamiento a microdominios de membrana enriquecidos en colesterol de muchas proteínas implicadas en este proceso. Lck, CD3, PLC- $\gamma$  y PKC- $\theta$  entre otras se incluyen en las balsas lipídicas tras la estimulación del linfocito T (Cherukuri et al., 2001; Langlet et al., 2000). La integridad de los “rafts” también es necesaria para la unión eficiente del TCR a la molécula MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase I de la célula presentadora de antígeno (Drake and Braciale, 2001).

### **2.1.3 Polaridad transitoria en la migración celular.**

Una célula en migración se polariza, proceso que implica rutas reguladoras muy complejas que integran de manera espacial y temporal todos los componentes necesarios para el movimiento celular. Aunque muchas de las características generales de la migración se pueden observar en la mayoría de los tipos celulares, los detalles pueden ser muy diferentes dependiendo no sólo del tipo celular, sino también del ambiente y del proceso celular en el que tiene lugar la migración. Conceptualmente podemos hablar del ciclo de la migración (Ridley et al., 2003) para describir todo el proceso de la siguiente manera: A) inicio de la polarización, B) formación de protrusiones y C) retracción (**figura 3**).

#### A. inicio de la polarización

La GTPasa Cdc42 junto con el complejo PAR y aPKC están implicadas en las fases iniciales de la generación de polaridad (Etienne-Manneville, 2004; Rodriguez-Pena et al., 2002; Srinivasan et al., 2003). Como resultado de la activación de este complejo se produce el tráfico dirigido de vesículas hacia el frente de avance así como la

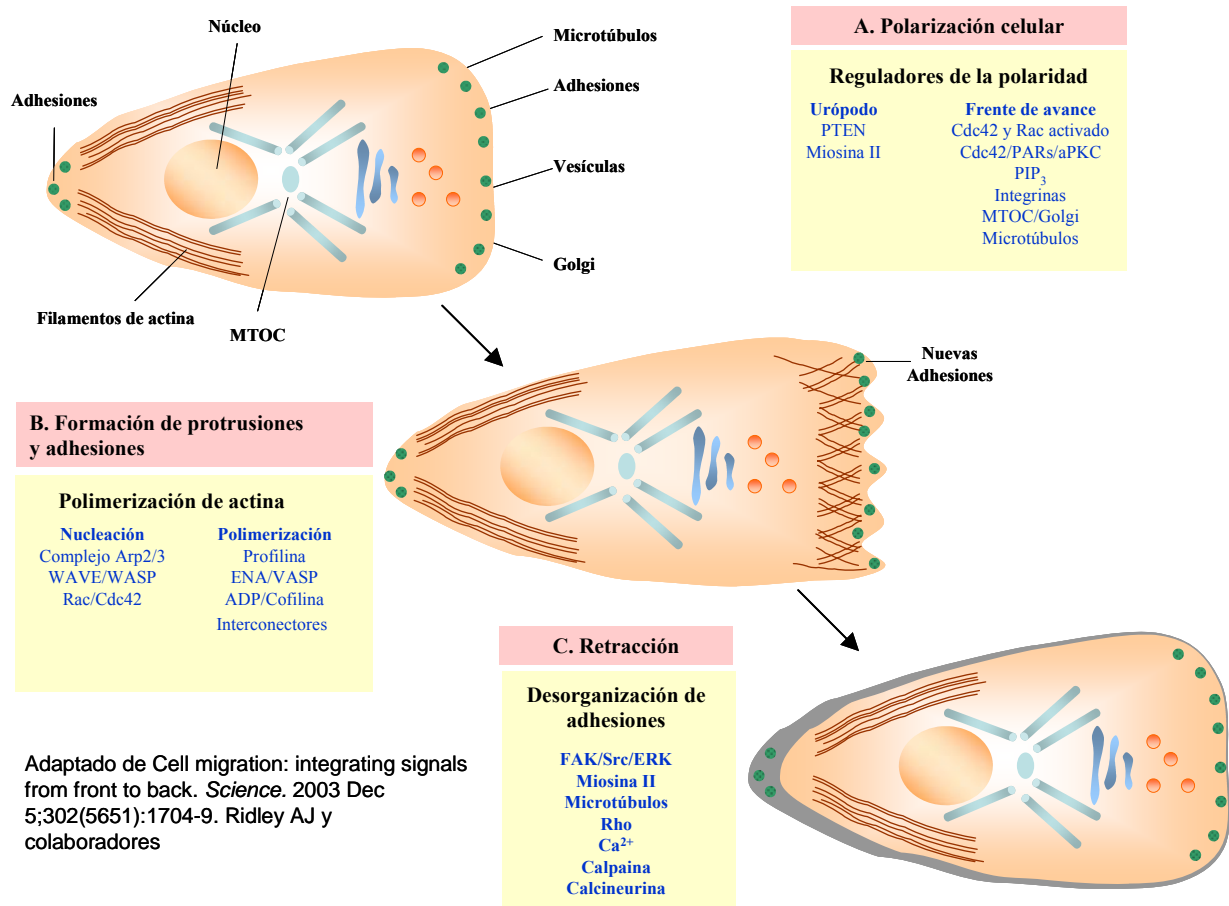


organización de microtúbulos, la localización del MTOC (en algunas células) y del aparato de Golgi delante del núcleo. En respuesta a un estímulo quimiotáctico, a factores de crecimiento o a la señalización por proteínas de la matriz extracelular, se produce la acumulación de PIP<sub>3</sub> en el frente de avance a través de la acción localizada de la PI3K que reside en esta zona y de PTEN, una fosfatasa de PIP<sub>3</sub> que se localiza en la membrana plasmática de los márgenes y de la zona trasera de las células (Janetopoulos et al., 2004; Wang et al., 2002). PTEN y miosina II están implicadas en restringir la emisión de protrusiones de membrana sólo hacia el frente de avance.

### B. formación de protrusiones

Las proteínas N-WASP y WAVE se encargan de la emisión de protrusiones y son efectores entre otros, de Cdc42 y Rac respectivamente. Estas GTPasas regulan la formación de ramificaciones de actina por la acción que ejercen sobre el complejo Arp2/3. Esto conduce a la formación de lamelipodios en el caso de Rac y filopodios en el caso de Cdc42. El diseño supramolecular de estas estructuras permite a la célula ejercer distintos tipos de funciones en relación con la migración, ya que mediante los lamelipodios puede alargarse aumentando ampliamente la longitud de la membrana plasmática (Pollard, 2003). En cambio los filopodios, con su organización en pequeños haces paralelos de actina que se emiten desde la membrana plasmática, sirven a la célula como sensores para explorar el ambiente celular exterior.

La polimerización de actina necesaria para formar los lamelipodios y filopodios está regulada por proteínas que controlan la disponibilidad de monómeros activados de actina (como la profilina) y por proteínas que desramifican y depolimerizan actina (ADF/cofilina) (Welch and Mullins, 2002). Las adhesiones focales que contribuyen a la estabilización de los filamentos de actina, requieren de la activación de las integrinas, que son reclutadas a las estructuras nacientes de las adhesiones (Geiger et al., 2001). En este proceso también intervienen proteínas como la Talina, PKC, Rap1 y PI3K, todas ellas reguladas por la acción de Rac.



Adaptado de Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9. Ridley AJ y colaboradores

**Figura 3. Esquema del ciclo de la migración. A. Polarización celular B. Formación de protrusiones y adhesiones y C. Retracción**

### C. retracción

Este proceso está mediado por proteínas que participan en diversas rutas de señalización y que incluyen Src/FAK/ERK/Rho/miosinaII/Calcio/calcineurina y Calpaina, que en conjunto regulan el desensamblaje de las adhesiones en la zona lateral y trasera de la célula opuesta al frente de avance (Small and Kaverina, 2003; Webb et al., 2002).

## **2. 2 la familia de Rho-GTPasas como reguladores centrales del citoesqueleto de actina**

La familia de Rho GTPasas está compuesta por proteínas monoméricas con un tamaño medio aproximado de 20 kDa que están representadas en la especie humana por al menos 23 miembros de las cuales Rac, Cdc42 y Rho son las que mejor han sido caracterizadas. Las Rho GTPasas regulan la dinámica de actina y microtúbulos, la adhesión celular, la morfología celular así como la formación de lamelipodios y

filopodios, y por lo tanto cualquier proceso que requiera motilidad (Ridley, 2001) (**figura 4**). La mayoría de las Rho GTPasas ciclan entre un estado o conformación activa unida a nucleótidos de guanosina trifosfato (GTP) y un estado inactivo unido a guanosina difosfato (GDP) (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Su actividad está regulada por 3 tipos de proteínas:

- 1) Los factores de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF, *Guanosin nucleotide Exchange Factor*) que activan las Rho-GTPasas.
- 2) Proteínas GAPs (*GTPase-Activating Protein*) que activan la hidrólisis del GTP lo que se traduce en su inactivación.
- 3) Proteínas reguladores denominadas GDI (*GDP-dissociation inhibitor*) que inhiben el intercambio de GDP por GTP, manteniendo a la GTPasa en estado inactivo.

Las Rho GTPasas se unen y regulan a un amplio rango de efectores como quinasas, enzimas ancladas a la membrana plasmática y activadores del complejo Arp2/3. De todas las RhoGTPasas, Rac1 está implicada en la formación de lamelipodios mientras que Cdc42 y Rho G estimulan la extensión de filopodios. La activación de RhoA promueve la formación de fibras de estrés y el ensamblaje/desensamblaje de las adhesiones focales. Las Rho GTPasas actúan normalmente en la membrana plasmática, donde pueden anclarse debido a que están modificadas postraduccionalmente por prenilación. En algunos tipos celulares se ha descrito que Rac1 y Rho se localizan en rafts y/o caveolas (Gingras et al., 1998; Kawamura et al., 2003; Michaely et al., 1999). Los principales efectores de Rac y Cdc42 que median la polimerización de actina son la familia de activadores del complejo Arp2/3, WASP y WAVE, que a su vez pueden regular la actividad de Rac y Cdc42 por unión a proteínas GEF y GAP (Hussain et al., 2001; Soderling et al., 2002).

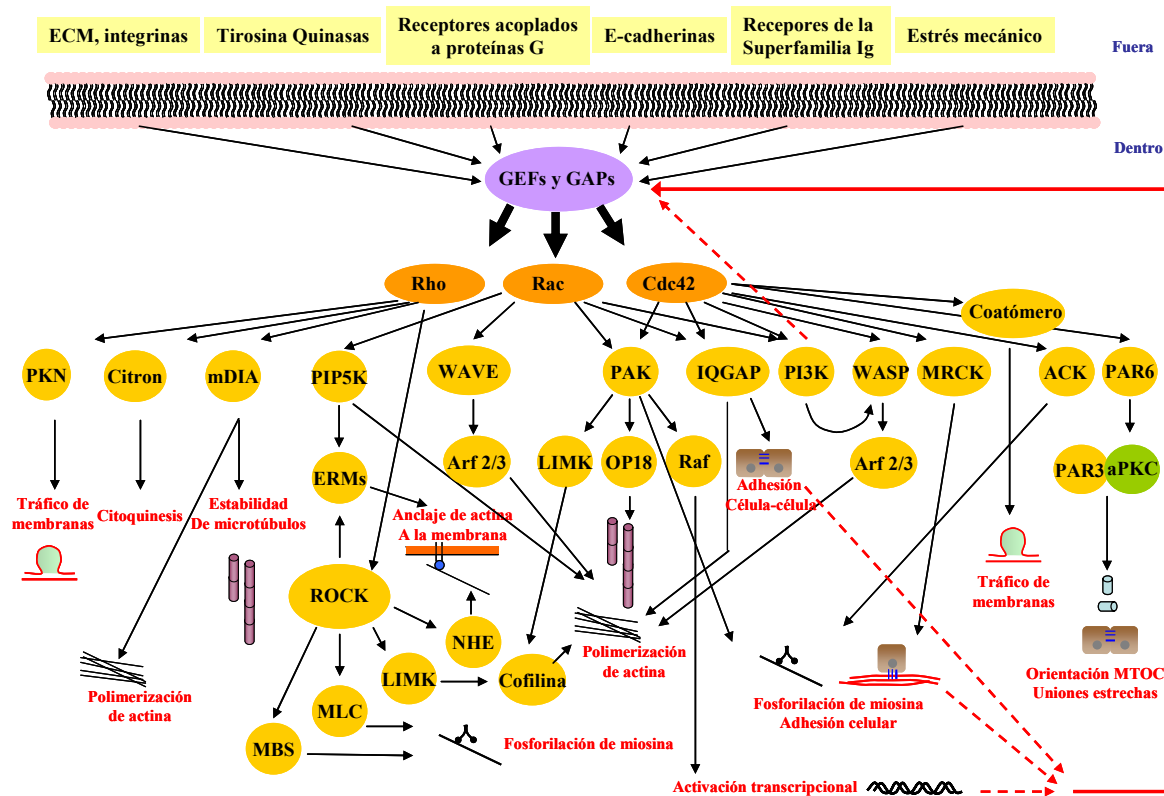


Figura 4. Esquema de la regulación de las GTPasas de la familia Rho por medio de GEFs y GAPs y efectos sobre Adhesión, migración, polarización etc, a través de sus efectores.

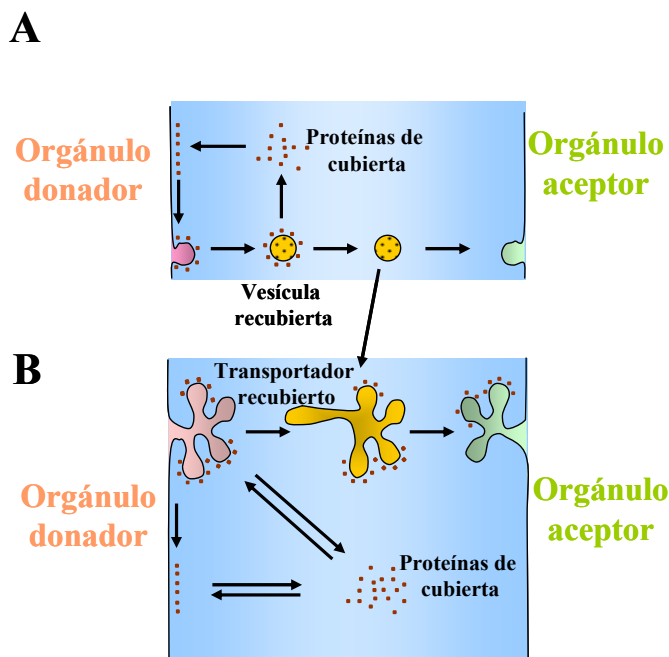
### 3. Mecanismos moleculares de la organización de microdominios de membrana

Como ya se ha dicho, la compartimentalización de las membranas dentro de una célula es un requisito para que se puedan llevar cabo diversas funciones simultáneamente y necesita de una maquinaria proteica para su organización. Las proteínas llamadas “scaffold” o andamios celulares, son las encargadas de ensamblar y organizar estos microdominios de membrana, que dependiendo de su composición, propiedades y asociación o no a la membrana, se clasifican en varios tipos.

#### 3.1 Proteínas de cubierta

A este grupo pertenecen los complejos de clatrina-adaptadores y las proteínas COPI y COPII. Ambos son ejemplos clásicos de proteínas de cubierta vesicular implicadas en el tráfico de membranas que se produce en las rutas endocíticas y exocíticas. Aunque difieren en su composición y el lugar en donde actúan, estas proteínas presentan características comunes en el proceso de ensamblaje e inducción de la vesiculación. Ambas son solubles en el citoplasma y por acción de proteínas G específicas son reclutadas a la membranas donde funcionan concentrando ligandos en las membranas que actúan como donadoras y junto a varias proteínas accesorias de la membrana

generan la curvatura necesaria para formar una vesícula. Una vez formada, las proteínas de cubiertas se disocian de la vesícula y permanecen en el citosol preparadas para un nuevo ciclo de vesiculación (**figura 5**). Para asegurar el destino correcto de estas vesículas, las proteínas SNAREs con ayuda de RabGTPasas específicas, aseguran la fusión con la membrana aceptora. Todo este proceso está finamente regulado, ya que es necesario coordinar todos los eventos individuales de la vesiculación para adecuarlos a las necesidades fisiológicas de una forma continua.



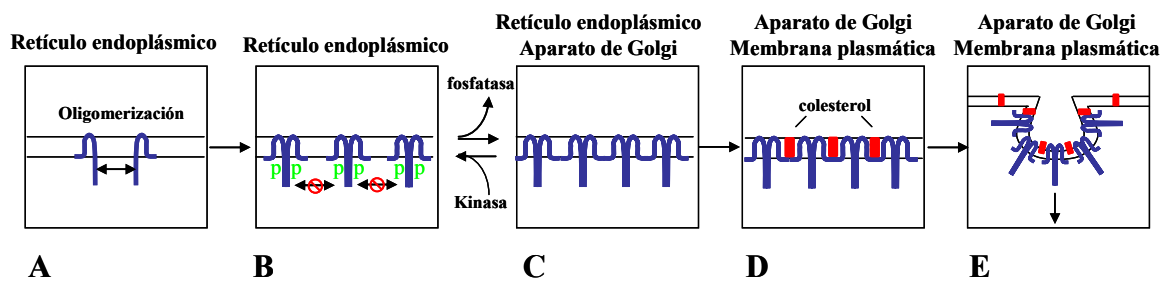
**Figura 5. Esquema de la generación de transportadores de cubierta.** **A.** Formación de una vesícula pequeña recubierta. Las proteínas de cubierta son reclutadas desde el citosol a las membranas donadoras, donde se produce la curvatura necesaria para dar lugar a la vesícula esférica naciente que se desprende de esta membrana. Las proteínas de cubierta se disocian de esta vesícula y permanecen en el citosol. Finalmente la vesícula desnuda se fusiona con la membrana del orgánulo aceptor. **B.** Formación de un gran transportador vesicular. El transportador se desprende del dominio de membrana con cubiertas y se transloca entre la red de microtúbulos. La formación de estos transportadores probablemente requiera de un mecanismo de escisión distinto del de las vesículas pequeñas. Los grandes transportadores también se pueden formar por la fusión de pequeñas vesículas recubiertas como se indica por la flecha que une los paneles A y B.

Adaptado de Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 May;4(5):409-14. Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J.

### 3.2 Proteínas que organizan microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y glicosfingolípidos.

En este caso, la estructura o modificaciones lipídicas de la proteína que actúa como “scaffold”, hace que ésta se localice permanentemente dentro de las membranas donde puede formar grandes oligómeros que aumentan la afinidad por ciertos lípidos creándose microdominios lipídicos. La estructura lípido-proteína de estos microdominios puede ser considerada como un “scaffold” que organiza a los ligandos, aunque también la afinidad de éstos por un determinado tipo de proteínas o lípidos puede darle forma a los microdominios de membrana (**figura 6**). Proteínas que

organizan microdominios de membrana de este tipo son la familia de las caveolinas, dentro de las cuales la caveolina 1 es la principal proteína de cubierta de las caveolas. Otras proteínas con características bioquímicas similares son las Flotilinas, Reticulones/Nogos, Annexinas y proteínas con dominios MARVEL, todas ellas asociadas a microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos.



Adaptado de A new paradigm for membrane-organizing and -shaping scaffolds. *FEBS Lett.* 580:5559-64. Bauer, M., and L. Pelkmans. 2006

**Figura 6. Modelo hipotético de ensamblaje de proteínas de cubierta que organizan microdominios de membrana ricos en glicoesfingolípidos y colesterol.** A. Oligomerización en el retículo endoplásmico. B. Eventos de posibles fosforilaciones que pueden modificar el estado de oligomerización de la proteína. C y D. Los oligómeros fosforilados son transportados al aparato de Golgi donde se desfosforilan, lo que eventualmente puede provocar la polimerización y un aumento en la afinidad por el colesterol y los glicoesfingolípidos presentes en la membrana. Esto conduce al ensamblaje de las proteínas en la cubierta rica en los lípidos descritos anteriormente. E. Producción de vesículas recubiertas enriquecidas en microdominios.

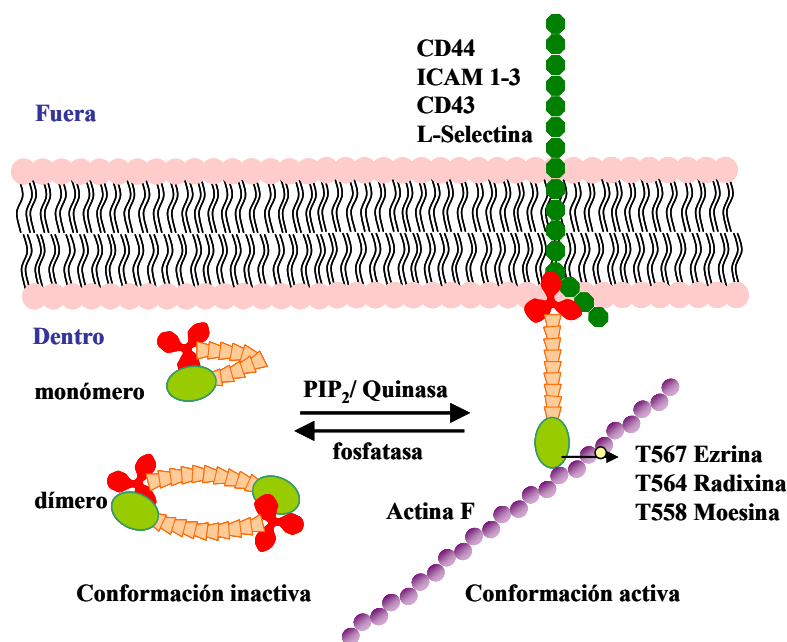
### 3.3 Citoesqueleto de actina y conectores

Una propiedad fundamental de muchas proteínas residentes en la membrana plasmática es su asociación con el citoesqueleto de actina cortical, lo que determina la morfología celular, la adhesión, la motilidad y los procesos de tráfico de membranas. Se ha postulado que la asociación de muchas de estas proteínas para formar microdominios de membrana estaría regulada por el citoesqueleto de actina como consecuencia de la integración de rutas de señalización en las que participan las Rho-GTPasas. Se ha descrito que muchas de las proteínas que regulan la organización de actina se asocian directamente a las balsas lipídicas, como ERMs, CD28, Talina y Vinculina aunque esta asociación podría darse mediante otras proteínas adaptadoras que conectan los “rafts” con la actina. La filamina A en linfocitos T durante la formación de la sinapsis inmunológica interconecta el citoesqueleto de actina con los microdominios de membrana a través de CD28, manteniendo de forma sostenida la activación del TCR y permitiendo el reclutamiento de proteínas a la sinapsis inmunológica por medio del citoesqueleto de actina. También se ha descrito que la filamina A interacciona con otras proteínas de “rafts” como caveolina 1.

### 3.4 Las proteínas Ezrina/Radixina/Moesina como interconectores entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina.

Las proteínas Ezrina/Radixina/Moesina (ERMs) son componentes cruciales que interconectan la membrana plasmática con el citoesqueleto de actina e intervienen en varias rutas de señalización celular. Inicialmente descritas por separado, las ERM son proteínas ampliamente distribuidas que regulan la estructura y función de dominios específicos en la corteza celular, siendo componentes de los microvilli presentes en la células epiteliales, endoteliales y sensoriales. Las ERM pertenecen a la superfamilia de proteínas con dominios FERM (*Four point one*, *Ezrin*, *Radixin*, *Moesin*), el cual está presente en el extremo N-terminal de todas ellas. Este dominio es el responsable de la interacción con moléculas de la membrana plasmática y posee al menos tres secuencias consenso de unión a fosfoinosítidos. Las ERM contienen también otros dos dominios, uno central denominado  $\alpha$ -helicoidal y otro dominio de unión a actina en la región C-terminal. Se ha detectado que las ERM pueden existir en dos conformaciones, una inactiva o cerrada en la que sus dominios N y C terminal están interaccionando ya sea en forma de monómeros o dímeros, y una forma activa o abierta en la que el dominio de unión a actina y el dominio FERM quedan expuestos para que se produzca la interacción con la actina y la región citoplasmática de proteínas de la membrana, respectivamente (**figura 7**). Para que las ERM se activen es necesario, entre otros factores, la fosforilación de un residuo de treonina conservado (T558 en la moesina, T567 en la ezrina, T564 en la radixina) presente en el dominio C terminal. Esta fosforilación se cree que estabiliza la conformación abierta de las ERM evitando la interacción entre los dominios N y C terminal que dan lugar a la forma autoinhibida (**figura 7**). Se han identificado varias quinasas como por ejemplo, PKC $\alpha$ , PKC $\theta$  y ROCK que es el principal efector de Rho, que pueden fosforilar “*in vitro*” a la moesina y a la ezrina, pero esto no se ha demostrado “*in vivo*”. Del mismo modo las fosfatasa implicadas en la defosforilación *in vivo* de las ERM son desconocidas, aunque se han sugerido como candidatas la fosfatasa de la miosina y la proteína fosfatasa 2C (Ivetic and Ridley, 2004). Los niveles de fosfoinosítidos, en especial fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) también regulan la actividad de las ERM. Este lípido presente en la cara citoplásmica de la membrana actúa, o bien estabilizando la forma fosforilada en el extremo C terminal o favoreciendo el cambio conformacional de los monómeros a la

forma abierta y activa (**figura 7**). Se han descrito muchas proteínas que pueden asociarse a las ERM como los receptores de adhesión ICAM 1-3(Oh et al., 2007), CD44, L-Selectina y CD43, presentes en leucocitos y células endoteliales. La interacción de las ERM con estos receptores transmembrana también está estabilizada por PIP<sub>2</sub> (Heiska et al., 1998). Las ERM también interaccionan con otras proteínas por medio de adaptadores como EBP50, proteína implicada en la unión del citoesqueleto de actina a los rafts lipídicos en células T. Se ha descrito que en estado estacionario, los



**Figura 7.** Esquema del mecanismo de activación de las ERM. Se ha descrito que las ERM poseen dos conformaciones, una inactiva o cerrada y otra activa o abierta.

“rafts” están dispersos por la membrana en estas células y se pueden unir al citoesqueleto por medio la ezrina fosforilada en el residuo T567, que en la conformación activa está asociada con PAG1 (fosfoproteína asociada a microdominios ricos en glicosfingolípidos y colesterol). La defosforilación de la ezrina resulta en un

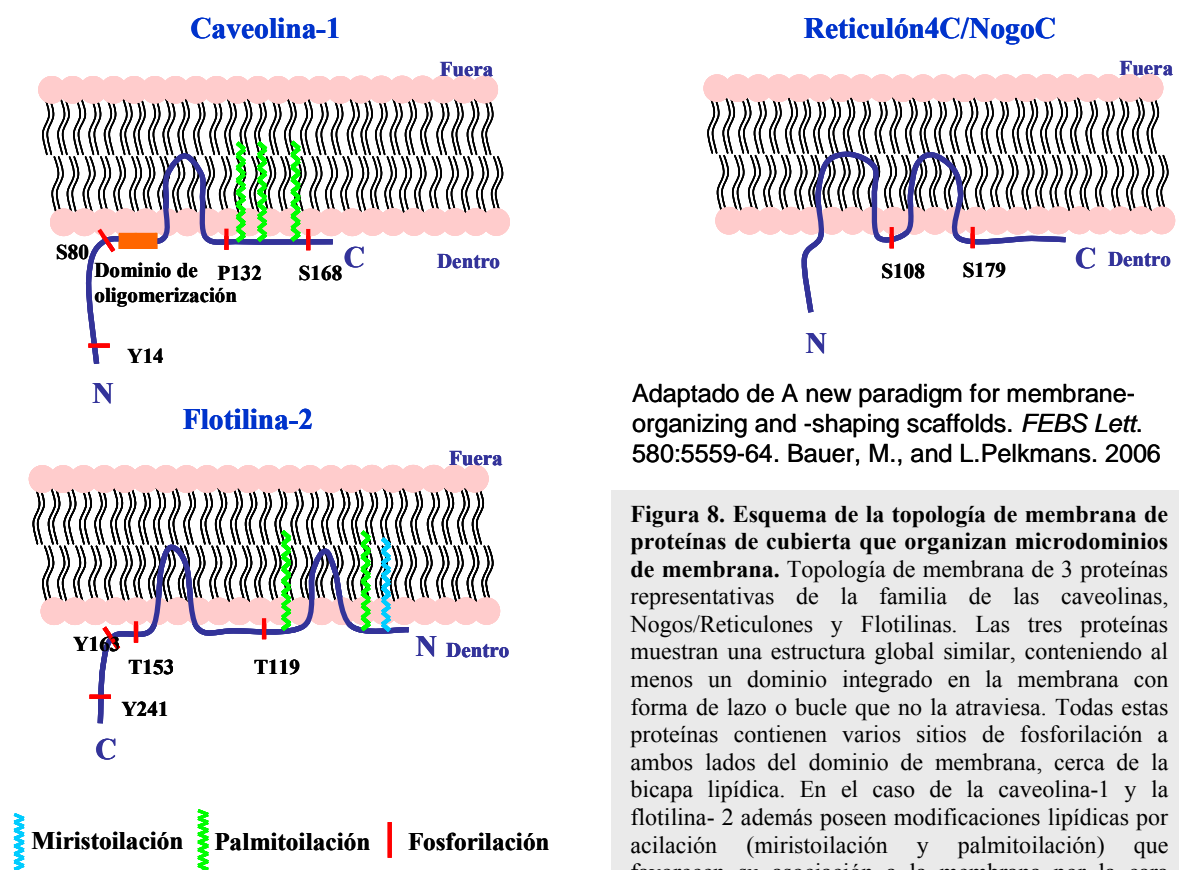
cambio conformacional que desacopla a la actina de la membrana plasmática permitiendo a los rafts que se asocien y agregen.



#### 4. Proteínas que organizan microdominios de membrana

##### 4.1 La familia de las caveolinas y las caveolas

Las caveolinas son una familia de proteínas integrales de membrana, de 21-24 kDa, residentes en “rafts” que está formada por tres miembros, la caveolina-1 (Kurzchalia et al., 1992) con dos isoformas llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ , la caveolina-2 y la caveolina-3 (Tang et al., 1996). Las caveolinas poseen una estructura secundaria que consiste en un dominio N-terminal hidrofílico, un segmento de membrana de 33 aminoácidos que, si bien no atraviesa la membrana, se inserta en esta a modo de horquilla y otro dominio C-terminal hidrofílico (**figura 8**). Ambos dominios, el carboxilo y el amino, son intracelulares. La caveolina-1 y 3 forman homooligómeros. La caveolina-2 dimeriza o forma heterooligómeros con la caveolina-1. Caveolina-1 y 2 tienen un patrón amplio de expresión, mientras que la caveolina-3 es exclusiva de tejido muscular.



Adaptado de A new paradigm for membrane-organizing and -shaping scaffolds. *FEBS Lett.* 580:5559-64. Bauer, M., and L.Pelkmans. 2006

**Figura 8. Esquema de la topología de membrana de proteínas de cubierta que organizan microdominios de membrana.** Topología de membrana de 3 proteínas representativas de la familia de las caveolinas, Nogos/Reticulones y Flotilinas. Las tres proteínas muestran una estructura global similar, conteniendo al menos un dominio integrado en la membrana con forma de lazo o bucle que no la atraviesa. Todas estas proteínas contienen varios sitios de fosforilación a ambos lados del dominio de membrana, cerca de la bicapa lipídica. En el caso de la caveolina-1 y la flotilina-2 además poseen modificaciones lipídicas por acilación (miristoilación y palmitoilación) que favorecen su asociación a la membrana por la cara interna.

De los tres miembros de esta familia, la primera identificada y más estudiada es la caveolina-1. Estudios diferentes han puesto de manifiesto un papel para la caveolina-1

en el tráfico intracelular de colesterol (Murata et al., 1995) y ácidos grasos (Fielding et al., 1997; Trigatti et al., 1999). Los ensayos de coimmunoprecipitación han demostrado que la caveolina-1 es capaz de unirse con una gran variedad de proteínas integrales y periféricas de membrana. Implicadas en la de transducción de señal (**figura 8**) mediante una región denominada “Scaffolding domain” (Smart et al., 1999).

Caveolina 1 es necesaria para la formación de caveolas, que son invaginaciones específicas de la membrana desprovistas de cubierta de clatrina. Se ha propuesto que la caveolina-1 oligomeriza para promover la invaginación de las caveolas y forma la cubierta (Lisanti et al., 1993). Las caveolas poseen un contenido elevado en glicolípidos y colesterol, y son insolubles en gran medida en Tritón X-100 a 4°C, por lo que se las considera una especialización de los “rafts” celulares.

Las caveolas se encuentran en muchos tipos celulares y son muy abundantes en fibroblastos, adipocitos, células endoteliales, células epiteliales y células de músculo liso. Por el contrario, están ausentes en linfocitos T, células formadoras de mielina o neuronas. Se ha demostrado que en ratones “knock out” (KO) para el gen de la caveolina-1, no se forman caveolas pero muchas proteínas entre ellas las ancladas por GPI se expresan en niveles normales y siguen estando asociadas a “rafts” aunque no son transportadas a la membrana plasmática, sino que permanecen retenidas en el aparato de Golgi. El transporte de proteínas de la familia *Src* también se ve afectado de la misma forma que las proteínas GPI en el KO del gen de caveolina-1 (Sotgia et al., 2002).

Todos estos estudios muestran que la caveolina-1 es una proteína multifuncional y se propone como un componente de la maquinaria que opera en los “rafts” ya que es capaz de dirigir la organización de estos microdominios en vesículas tipo caveolas, y forma el soporte en el cual muchos tipos de moléculas de señalización pueden ensamblarse para generar un complejo de señalización dentro de los límites de las caveolas.

#### **4.2 Flotilinas y reticulones /Nogos**

Estas dos grupos de proteínas comparten similitudes estructurales y en algunos casos funcionales que las hacen candidatas para desempeñar funciones como maquinaria proteica de “rafts”. Las flotilinas son proteínas muy conservadas entre diversas especies que en humanos está representada por dos proteínas, flotilina-1 y flotilina-2 con un peso molecular de 47 kD (Langhorst et al., 2006; Langhorst et al., 2005) y poseen sus extremos N y C en el citoplasma. En el extremo C-terminal

presentan un dominio con repeticiones de la secuencia Glu-Ala que está implicado en la asociación coil-coiled. Al igual que todos los miembros de la superfamilia SPFH a la que pertenecen pueden oligomerizar (Neumann-Giesen et al., 2004; Tavernarakis et al., 1999). Las flotilinas también poseen un dominio transmembrana hidrofóbico embebido completamente en la membrana como ocurre también en las caveolinas y los Reticulones/Nogos y poseen modificaciones lipídicas por palmitoilación y miristoilación que favorecen su anclaje a la membrana (**figura 8**). Aunque su localización es preferentemente en la membrana, las flotilinas también pueden residir en la región pericentrosomal, lisosomal, endosomas de reciclaje y en cuerpos lipídicos (Gagescu et al., 2000; Liu et al., 2004).

Se ha descrito que las flotilinas se encuentran asociadas a microdominios de membrana, pero muchos autores sostienen que éstos son diferentes a los de la caveolina, por lo que no aparecen en las caveolas (Lang et al., 1998; Souto et al., 2003). Las funciones de las flotilinas aún no se conocen con claridad. Han sido implicadas en procesos de transducción de la señal, tráfico vesicular, migración (Rajalingam et al., 2005), curvatura y formación de microdominios de membrana y reorganización del citoesqueleto (Neumann-Giesen et al., 2004). También se ha detectado que interactúan con una enorme variedad de proteínas ancladas por GPI como la proteína priónica celular (PrP<sup>c</sup>) y Thy-1 así como Transportadores ABC (Pimpinelli et al., 2005).

### **4.3 La familia MAL y el origen del dominio MARVEL**

#### El gen MAL y su expresión

El gen *MAL* fue identificado durante una búsqueda de genes que se expresaran de forma diferencial a lo largo del desarrollo del linfocito T humano (Alonso and Weissman, 1987). El patrón de expresión de la proteína MAL está restringido sólo a determinados tipos celulares altamente diferenciados lo que hizo suponer su participación en funciones específicas de aquellos tejidos en los que aparece. MAL se expresa, además de en linfocitos T maduros (Millan et al., 1997), en células de riñón de perro MDCK (Millan et al., 1997), oligodendrocitos y células de Schwann, que son responsables de la formación de la mielina (Kim et al., 1995), así como también en células epiteliales específicas.

MAL es una pequeña proteína integral de membrana, no glicosilada, de 17 kD, cuyo perfil de hidrofobicidad según el algoritmo de Kyte y Doolittle predice 4

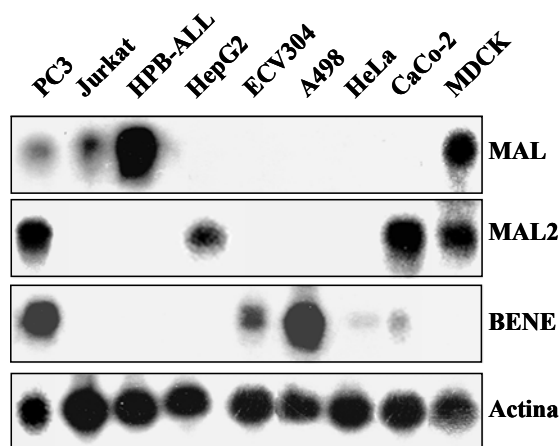
segmentos transmembrana. La característica bioquímica más destacada de la proteína MAL es su elevado contenido en aminoácidos hidrofóbicos, lo que hace que se pueda extraer con disolventes orgánicos como el butanol. Esta propiedad que comparte con los lípidos, hace que sea englobada dentro del grupo de los proteolípidos. Dentro de éstos, aparece representada la subunidad C de la bomba de protones V-ATPasa y otras proteínas relacionadas. La característica distintiva de MAL con respecto a otros proteolípidos, es que se encuentra confinada exclusivamente en los microdominios de membrana ricos en glicolípidos y colesterol (Martin-Belmonte et al., 1998; Millan and Alonso, 1998; Perez et al., 1997). Varias observaciones sugerían su participación en la ruta de tráfico apical de proteínas mediada por “rafts” propuesta en el modelo de Wardinger-Ness (Wandinger-Ness et al., 1990): Dichas observaciones son, en primer lugar la aparición de vesículas repartidas por el citoplasma, inducidas *de novo* tras la sobreexpresión de MAL en células de insecto (Puertollano et al., 1997), la comprobación de que MAL cicla entre la membrana plasmática, los endosomas y en menor medida la TGN (Puertollano et al., 1999) donde se localiza subcelularmente. Y por último, la demostración del papel directo, mediante la eliminación selectiva de la proteína endógena, que MAL desempeña en el transporte de proteínas integrales, ancladas por GPI o secretadas a la membrana apical (Martin-Belmonte et al., 2001; Martin-Belmonte et al., 2000; Puertollano et al., 1999).

En conjunto estas evidencias constituyen la base para considerar a la proteína MAL como el primer componente encontrado de la maquinaria de transporte apical polarizado en células epiteliales. La proteína MAL parece estabilizar la presencia de HA en las balsas lipídicas (Puertollano et al., 1999) y, posiblemente, promueva la vesiculación de membranas mediante la unión de proteínas de cubierta (Puertollano et al., 2001). MAL también es esencial para la ruta especializada de endocitosis apical dependiente de clatrina (Martin-Belmonte et al., 2003).

### La familia MAL de proteolípidos

MAL es el miembro fundador de la denominada familia MAL de proteolípidos, que inicialmente constaba de 4 miembros: MAL, BENE, MAL2 y plasmolipina (PLP) (Perez et al., 1997). Estas 4 proteínas tienen un tamaño semejante y comparten una estructura secundaria consistente en 4 dominios transmembrana con una elevada composición de aminoácidos hidrofóbicos. Al igual que MAL, el patrón de expresión de estos 4 proteolípidos es muy complejo y está también restringido a determinados tipos

celulares especializados. Así por ejemplo, BENE se expresa en endotelio, riñón y próstata y MAL2 en hígado, intestino, epitelio y en próstata (**figura 9**). La plasmolipina sólo se expresa asociada a las membranas de células del sistema nervioso (Cochary et al., 1990; Shea et al., 1986). El papel de BENE ha sido estudiado en células derivadas de endotelio ECV304 en la que aparece como un elemento de la maquinaria de los “rafts”. BENE interacciona con caveolina-1 y ha sido implicada en el metabolismo del colesterol (de Marco et al., 2001).



**Figura 9. Análisis por Northern Blot de la expresión de los miembros de la familia MAL.** 5 µg de RNA total aislado de las líneas celulares que se muestran fueron hibridadas con 3 sondas de ADN correspondientes a los genes MAL, MAL2 y BENE. Como control se hibridó la misma membrana con una sonda de β-actina

MAL2 es una proteína de 19 kDa que se puede glicosilar, adquiriendo un peso molecular aparente comprendido entre 30-40 kDa. La distribución subcelular de MAL2 estudiada por microscopía confocal mediante su detección con anticuerpos específicos la localiza mayoritariamente en un compartimento subapical (SAC) y un acumulo perinuclear. El SAC equivalente al endosoma apical de reciclaje (ARE) de células epiteliales y actuaría como una estación intermedia en el tráfico de moléculas durante la transcitosis. MAL2 ha sido identificada como un miembro de la maquinaria proteica de “rafts” que interviene en el transporte transcitótico en células HepG2, siendo necesaria para el transporte al canalículo biliar de moléculas como el receptor de la inmunoglobulina polimérica (pIgR), ya que en ausencia de MAL2, pIgR no puede alcanzar la superficie apical del canalículo biliar desde la membrana basolateral, quedando dispersa por el citoplasma (de Marco et al., 2002; de Marco et al., 2006).

### El dominio MARVEL

El análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de la familia MAL con otras como las Girinas, las Fisinas y la Ocludina, muestra una similitud de secuencia estadísticamente significativa en sus cuatro regiones transmembrana, definiendo un nuevo dominio conservado entre diferentes familias de proteínas presentes en diversas especies animales. Este dominio se ha encontrado también en otras proteínas transmembrana menos caracterizadas como A4P y CKLF2 (*Chemokine Like factor 2*). Las proteínas con este nuevo dominio denominado MARVEL (*MAL and Related proteins for VE*sicle trafficking and membrane *L*ink) (Sanchez-Pulido et al., 2002) poseen una topología llamada “forma M” consistente en cuatro hélices transmembrana compuesta de aminoácidos hidrofóbicos y con los extremos N y C terminales citoplásmicos (**tabla 1**). La presencia del dominio MARVEL en *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, sugiere para este dominio un origen próximo a la aparición de los animales. La mayoría de las proteínas con dominios MARVEL se encuentran asociadas a microdominios especializados de membrana y su función puede estar relacionada con eventos en los que se produce la aposición y tráfico de membranas ricas en colesterol (familia MAL), la biogénesis de vesículas (Girinas y Fisinas) o en la regulación de las uniones estrechas entre células (Ocludina). Recientemente se ha purificado y cristalizado la sinaptofisina 1 que contiene un dominio MARVEL, perteneciente a la familia de las fisinas (Arthur and Stowell, 2007). El estudio de modelos reconstruidos en 3D revela que su estructura hexamérica es muy semejante a la de las conexinas que forman poros en la membranas entre dos células en consonancia con la función propuesta para el dominio MARVEL. Más relevante y también respaldando la función de este dominio, single bars, una proteína con dominio MARVEL, expresada en *Drosophila*, ha sido implicada en el proceso de la fusión celular que tiene lugar durante la miogénesis (Estrada et al., 2007).

### **5. El endotelio como modelo celular para el estudio de la inflamación y de la angiogénesis.**

El endotelio constituye la capa celular que recubre todos los vasos y capilares sanguíneos del sistema circulatorio, por lo que participa en los procesos de vasculogénesis, angiogénesis, homeostasis del sistema circulatorio y la respuesta inflamatoria. Al igual que los epitelios y otras células especializadas, las células endoteliales se encuentran polarizadas ya que están en contacto con dos ambientes

diferentes, por un lado con el torrente sanguíneo muy cambiante y por otro con los tejidos que son irrigados. En consecuencia sus membranas están especializadas tanto estructural como funcionalmente de manera semejante a las células epiteliales expresando moléculas de adhesión y receptores de forma selectiva en las superficies

GRUPO	MIEMBROS	ORGANIZACIÓN DOMINIOS	TAMAÑO	TOPOLOGÍA
1. Familia MAL de proteínas	MAL		153 Aa	
	MALlike (BENE)		176 Aa	
	MAL2			
	MYADM (BigMAL1)		323 Aa	
	SimMYADM (BigMAL2)		303 Aa	
	MYADMlike (BigMAL3)		245 Aa	
	PLP		182 Aa	
	PLP2		152 Aa	
2. Familia de proteínas con dominios MARVEL	MARVELD1		173 Aa	
	MARVELD2		558 Aa	
	MARVELD3		410 Aa	
3. Proteínas CKLF-like	CKLF		152 Aa	
4. Sinaptogirinas	SYNGR1		224-234 Aa	
	SYNGR2			
	SYNGR3			
	SYNGR4			
5. Sinaptoporinas	SYNPR		265 Aa	
6. Sinaptofisinas	SYP		259 Aa	
	SYPL1			
7. Ocludina	OCLN		522 Aa	
8. Familia de proteínas CKLF-like con dominios MARVEL transmembrana	CMTM1		156-248 Aa	
	CMTM2			
	CMTM3			
	CMTM4			
	CMTM5			
	CMTM6			
	CMTM7			
	CMTM8			

**Tabla 1. Proteínas con dominios MARVEL.** El dominio MARVEL ha sido identificado en al menos 28 proteínas humanas pertenecientes a 8 familias distintas. En todas estas proteínas se puede observar una topología con 4 dominios transmembrana y con los extremos N y C citoplásmicos.

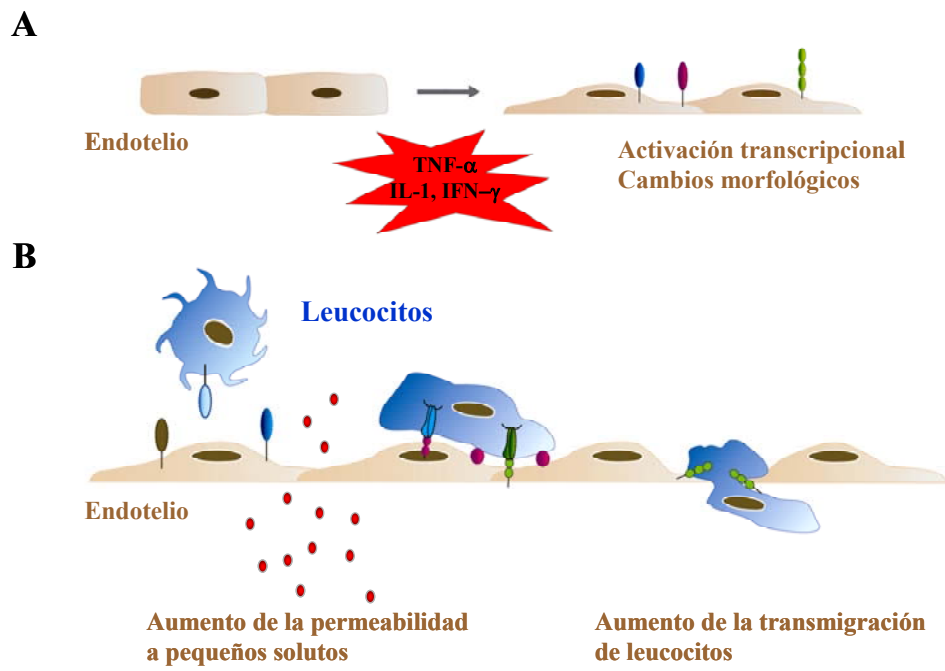
apical y basolateral. Las uniones intercelulares de las células endoteliales son más dinámicas que las epiteliales ya que median no sólo las uniones célula-célula sino que también permiten la trans migración endotelial de células del torrente sanguíneo (**figura 10**). El endotelio ejerce funciones homeostáticas como la vascularización de los tejidos, permitiendo la entrada y salida de todos los nutrientes, hormonas, etc, a los distintos órganos. Durante la angiogénesis, proceso en el que se produce la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, las células endoteliales se activan a inician la migración degradando la matriz extracelular basal por medio de metaloproteasas. La angiogénesis es por tanto un requerimiento absoluto del crecimiento tumoral y la metastasis. Otro de los procesos específicos en los que

participan de forma activa las células endoteliales es la extravasación de células del sistema inmune hacia los tejidos durante la inflamación. Este proceso denominado migración transendotelial o diapedesis, está restringido a las regiones específicas del tejido vascular donde se produce la expresión de determinados receptores, como los capilares que rodean el foco de inflamación o el endotelio especializado presente en los órganos linfoides secundarios.

En respuesta a estímulos proinflamatorios (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1) se induce la expresión de receptores en la superficie del endotelio como ICAM-1 (*Intercellular Adhesión Molecule*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesión Molecule*), etc. Estos estímulos inician el proceso de transmigración celular que ocurre en varias etapas. En primer lugar, glicoproteínas de membrana de los leucocitos, como L-Selectina interactúan con otras de la superficie del endotelio, como E y P-Selectina, pero también VCAM-1, quedando retenidos en la superficie del endotelio. Este contacto inicial permite que los leucocitos reconozcan quimioquinas de la superficie del endotelio que provoca la activación de las integrinas y como consecuencia el anclaje firme de los leucocitos a los receptores endoteliales de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Por último para que se complete la transmigración también es necesaria la interacción con otros receptores transmembrana presentes en las uniones adherentes como PECAM-1, JAM y CD99. Se ha descrito que los “rafts” pueden participar en la agrupación de estos receptores y de hecho, tanto E-Selectina como ICAM-1 se localizan en microdominios de membrana tras el entrecruzamiento con anticuerpos específicos (Tilghman and Hoover, 2002). Además se ha demostrado que determinadas proteínas presentes en las balsas lipídicas de células endoteliales como la caveolina-1, que forma las caveolas, está implicada en la transmigración de leucocitos en células primarias de endotelio de cordón umbilical, HUVECs (Millan et al., 2006).

Los leucocitos pueden seguir dos rutas de transmigración a través del endotelio, una entre las uniones celulares de las células endoteliales o migración paracelular, y otra directamente a través de las células endoteliales, denominada migración transcelular. En estas dos rutas participan las Rho GTPasas modelando el endotelio mediante sus efectos sobre el citoesqueleto de actina y las uniones adherentes (Millan and Ridley, 2005).





**Figura 10. Figura esquemática del funcionamiento del endotelio A.** Cambios de las células endoteliales en respuesta a estímulos proinflamatorios **B.** Esquema de la trans migración de leucocitos a través del endotelio

## **OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

Recientemente se ha demostrado que los miembros de la familia MAL de proteínas, como MAL y MAL2, actúan como elementos de la maquinaria proteica en procesos de tráfico polarizado de proteínas mediados por microdominios de membrana. El patrón de expresión de estas proteínas es muy complejo y está restringido a líneas celulares y tejidos altamente diferenciados donde actúan en funciones específicas. La descripción de un nuevo dominio proteico denominado MARVEL, presente en las proteínas de la familia MAL, ha permitido identificar nuevos miembros inéditos de esta familia, por lo que nos planteamos la hipótesis de que alguno de éstos tuviera un patrón amplio de expresión y pudiese actuar también como maquinaria en procesos mediados por microdominios de membranas en funciones más constitutivas. Para comprobar esta hipótesis, nos fijamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar y caracterizar nuevos miembros de la familia MAL con dominios MARVEL y con expresión constitutiva, analizando su expresión, sus características bioquímicas como la asociación a microdominios de membrana y su distribución subcelular.
2. Investigar el papel de una nueva proteína de la familia MAL, denominada bigMAL1 en relación con el mantenimiento de la morfología celular y la motilidad en células no polarizadas.
3. Analizar la función de bigMAL1 en un modelo de células primarias derivadas de endotelio, HUVECs, haciendo énfasis en su implicación en la expresión de receptores de membrana.

# **Materiales y métodos**

## 1. Materiales

### 1.1. Anticuerpos

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales de ratón 6D9 (anti-MAL humano) y 9D1 (anti-MAL2 humano) fueron generados en nuestro laboratorio (de Marco et al., 2002; Millan and Alonso, 1998). Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales de ratón L5.1 (anti-TfR, IgG1), 9E10 (anti-myc, IgG1), 12CA5 (anti-HA, IgG2b) fueron adquiridos en la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). El anticuerpo monoclonal de ratón MEM43/5 (anti-CD59, IgG2a) fue cedido amablemente por el Dr. V. Horejsi (Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic). El anticuerpo policlonal anti-transferrina humana fue adquirido a Dako. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-claudina-1, anti-occludina y anti-ZO-1 fueron de Zymed Laboratorios Inc. (San Francisco, CA). Los anticuerpos monoclonales anti-giantina (IgG1) (marcador del Golgi), E-Cadherina (IgG2a) (marcador de uniones adherentes) y anti-EEA1 (IgG1) (marcador de endosomas tempranos) proceden de Transduction Laboratories (Lexington, KY). Los anticuerpos monoclonales de ratón DM1A (anti- $\alpha$ -tubulina, IgG1), AC-40 (anti-actina) y 58K (marcador de Golgi) se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD63 (IgG1) procedió de la casa comercial DSHB. Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-ICAM-1 (IgG1) utilizado en técnicas de inmunofluorescencia y los anticuerpos anti-VCAM-1 (IgG1), anti-EEA-1(IgG1), antiGM130 (IgG1) y anti-PY14cav-1(IgG1) se adquirieron a la casa comercial BD Bioscience. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-ERM (anti-ezrina, radixina y moesina), anti-pERM (anti-fosfo-ezrina T567/fosfo-radixina T564/fosfo-moesina T558), anti-paxilina y anti-fosfo-paxilina utilizados en técnicas de inmunofluorescencia e inmunotransferencia proceden de Cell Signalling (Beberly, MA). Los anticuerpos policlonales anti caveolina-1, anti-ERK-1 y anti-ICAM-1 se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos secundarios para inmunotransferencias conjugados con peroxidasa fueron adquiridos en Pierce (Rockford, IL). Los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos Alexa utilizados en inmunofluorescencias se obtuvieron de Molecular Probes (Eugene, OR). La Faloidina acoplada a los fluoróforos Alexa 488 ó

594 utilizada para detectar los microfilamentos de actina y el anticuerpo policlonal anti-GFP se compraron a Invitrogen.

## **1.2. Reactivos**

La holo-transferrina humana y la fibronectina procedieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El medio de montaje Fluoromont fue adquirido a Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, AL). Las membranas Immobilon-P se adquirieron a Millipore (Bedford, MA). Los marcadores preteñidos para electroforesis en geles de poliacrilamida fueron adquiridos en Bio-Rad. Los antibióticos geneticina y puromicina fueron de Gibco-Life Technologies.

## **2. Métodos**

### **Líneas celulares, cultivos primarios y condiciones de cultivo**

Jurkat (línea celular linfoblástico T humana)

HepG2 (línea epitelial de hígado humano)

MDCK (línea epitelial de riñón de perro)

COS-7 (línea epitelial de riñón de mono)

Caco-2 (línea epitelial de colon humano)

PC-3 (línea epitelial de próstata humana)

DU145 (línea epitelial de próstata humana)

HeLa (línea de adenocarcinoma epitelial humano)

HUVECs (células primarias endoteliales de cordón umbilical humano)

PBLs (linfocitos T de sangre periférica)

Todas las líneas celulares utilizados se crecieron en medio DMEM suplementado con glutamina al 1%, suero fetal de ternera al 5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 50 U/ml penicilina y estreptomycin 50 U/ml (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD), a excepción de Jurkat y PC3 que fueron crecidas en RPMI 1640 suplementado con suero fetal de ternera al 10% y las células endoteliales primarias HUVECs que fueron crecidas en medio de cultivo EBM-2 suplementado con suero fetal de ternera al 4%, hidrocortisona,

ácido ascórbico, heparina y los siguientes factores de crecimiento recombinantes: “insulin-like” (IGF-1), endotelio vascular (VEGF), epidérmico (EGF) y de fibroblastos (FGF), así como los antibióticos gentamicina y anfotericina B cuando fue necesario. Los cultivos se mantuvieron en incubadores a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de humedad.

## **2.2 Construcciones de ADN. Oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos utilizados para el clonaje fueron sintetizados por Isogen mientras que los oligos para los experimentos de interferencia (RNAi) fueron adquiridos a Ambion y se muestra la secuencia de todos ellos en la **tabla n° 2**

La clonación de bigMAL1 se llevó a cabo mediante la amplificación de fragmentos de ADN por PCR en condiciones estándar utilizando los oligos bigMAL1 5' y bigMAL1 3' que contienen además de las secuencias específicas, las dianas para EcoRI y XbaI, respectivamente. Como molde se utilizó el ADN genómico obtenido de células humanas de carcinoma de colon, Caco-2. El fragmento obtenido se clonó en el vector de expresión pCR3.1 obteniéndose la construcción pCR3.1bigMAL1. Para la inserción del epítipo HA en el extremo 5' de bigMAL1 se procedió de la misma manera anterior utilizando los oligos HA-bigMAL1 5' y bigMAL1 3' y el plásmido pCR3.1bigMAL1 como molde. Las construcciones de bigMAL1 fusionadas a GFP ó a la proteína de fusión roja se realizaron de forma similar utilizando los vectores pEGFP-N1, pEGFP-C1 y pdiHcRED (Clontech). Todas las construcciones fueron secuenciadas para comprobar que no contenían mutaciones.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
<b>BigMAL1 5'</b>	5'CCATgCCAgTgACggTAA3'
<b>BigMAL1 3'</b>	5'CgggAgCCTCTTgggAgAgTC3'
<b>HABigMAL15'</b>	5'AgTggAGAATTCATgTACCCCTACgACgTgCCCgACTACgCCTACC CAgTgACggTAACCCgCACCACC3'
<b>BigMAL15N1</b>	5'gggCCCAAgCTTATgCCAGTgACggTAACCCgC3'
<b>BigMAL13N1</b>	5'CCCgggggATCCgggACCTTgACAAAAACCAggTg3'
<b>BigMAL15C1</b>	5'gggCCCAAgCTTCgCCAgTgACggTAACCCgCACC3'
<b>BigMAL13C1</b>	5'CCCgggggATCCTTAgACCTTgACAAAAACCAg3'
<b>mycBigMAL2-5'</b>	5'gggCCCgAATTCATggAgCAGAAgCTgATCTCCgAggAAgACCTgggCAGCACCA TggAgCCCCCT3'
<b>BigMAL2 3'</b>	5'CCCgggCTCgAgTgCCACTgTgggCTACAggCT3'
<b>BigMAL2 5C1</b>	5'gggCCCCTCgAgCTggCAGCACCATggAgCCCCCT3'
<b>BigMAL2 3C1</b>	5'CCCggggAATTCTgCCACTgTgggCTACAggCT3'
<b>mycbigMAL3 5'</b>	5'gggCCCgAATTCATggAgCAGAAgCTgATCTCCgAggAAgACCTgCCggTgACTg TTACCCACCCA3'
<b>BigMAL3 3'</b>	5'CCCgggCTCgAgCCTTTgggAgTCTTAgACCTT3'
<b>5hMYADM1</b>	5'CgACgTCATCTTCgggCCT3'
<b>3hMYADM1</b>	5'gTAGTAggCATggCTgCgg3'
<b>5hMYADM2</b>	5'TCCCCTgTgggCACAgCCC3'
<b>3hMYADM2</b>	5'TCAACgACgTACAggAgC3'
<b>5hMYADM3</b>	5'ACATTgTCTCTCgCTgTT3'
<b>3hMYADM3</b>	5'AAggTAGgggTTTCTgTCg3'
<b>MYADM1hibrid</b>	5'CggCCAgCCTCggCgCT3'
<b>MYADM2hibrid</b>	5'GCTggTCCATgACAgCCg3'
<b>MYADM3hibrid</b>	5'TgTCCAgCCCTggCAG3'
<b>RNA2hMYADM1 5'</b>	5'gATCCCCggTgCTgAgCTCACATCCATTCAAgAgATggATgTgAgCTCAGCACC TTTTTggAAA3'
<b>RNA2hMYADM1 3'</b>	5'AgCTTTTCCAAAAaggTgCTgAgCTCACATCCATCTCTTgAATggATgTgAgCT CAGCACCggg3'
<b>siRNA 1 sense</b>	5'gAUCACUggCUAUUAUgCCTT3'
<b>siRNA 1 antisense</b>	5'ggCCAUAUAgCCAguGAUUCTC3'
<b>siRNA 2 sense</b>	5'ggUgCUgAgCUCACAUCCATT3'
<b>siRNA 2 antisense</b>	5'UggAUgUgAgCUCAGCACCTT3'
<b>siRNA 3 sense</b>	5'ggUCUAAgACUCUCCCAAgTT3'
<b>siRNA 3 antisense</b>	5'CUUgggAgAgUCUUAgACCTT3'

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en el desarrollo de este trabajo.

Para la clonación de bigMAL2 y bigMAL3 se procedió de manera análoga, obteniéndose los plásmidos pCR3.1-mycbigMAL2, pEGFP-bigMAL2 y pCR3.1-mycbigMAL3. En la **figura 11** se muestra un esquema de las construcciones realizadas en este trabajo.

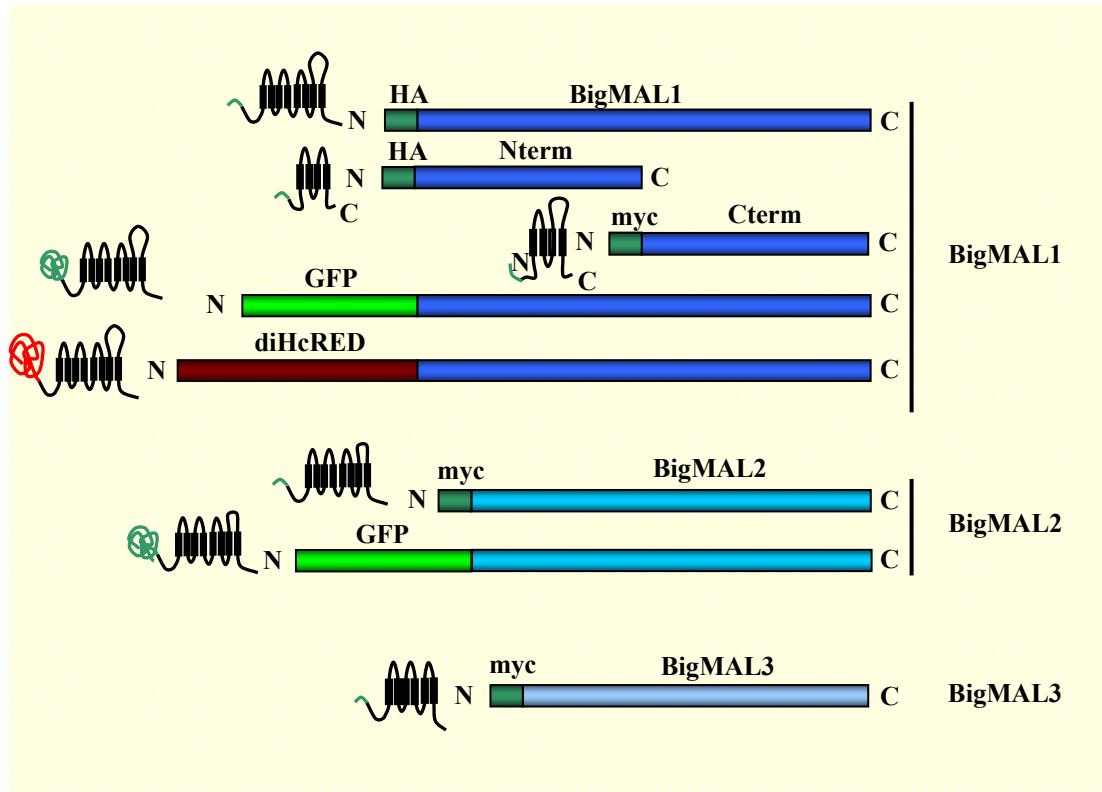


Figura 11. Esquema de las construcciones empleadas en este trabajo.

### 2.3 Transfecciones de ADN y generación de clones estables

La transfección en células COS-7, HeLa y MDCK de los vectores de expresión anteriormente descritos se realizó por electroporación (200V, 960 $\mu$ F y 480 $\Omega$ ) en un aparato ECM 600 (BTX, San Diego, CA). En el caso de células HepG2, se transfectaron por el método del fosfato cálcico. Por último, las células endoteliales primarias HUVECs fueron transfectadas por electroporación con Nucleofector-II (Amaxa Biosystem) empleando las soluciones específicas para HUVECs. La generación de clones transfectantes estables de células se realizó mediante selección con geneticina G-418, añadiéndola al medio de cultivo a una concentración de 1mg/ml durante un tiempo mínimo de 21 días. Los clones resistentes al antibiótico y positivos para la expresión de



la proteína en cada caso, fueron aislados y analizados por inmunotransferencia o inmunofluorescencia con anticuerpos específicos.

#### **2.4 Microscopía de fluorescencia convencional y confocal**

Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos, fijadas con formalina durante 15 minutos a temperatura ambiente, tratadas durante 5 minutos con Glicina 10 mM para bloquear los grupos aldehídos libres, permeabilizadas o no con Tritón X-100 (0,2%) durante 5 minutos a 4° C y bloqueadas con PBS/BSA al 3% durante 15 minutos a temperatura ambiente. En el caso de células fijadas con metanol, ésta se realizó durante 2 minutos a -20°C seguido del bloqueo con PBS/BSA al 3% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron los cubres con los anticuerpos primarios y secundarios apropiados en la misma solución de bloqueo a distintos tiempos y diferentes diluciones según el anticuerpo utilizado. Finalmente se prepararon las muestras con el medio de montaje Fluoromont. Los controles para asegurar la especificidad de la inmunofluorescencia se realizaron incubando las células solamente con el primer anticuerpo o bien omitiendo el mismo e incubando únicamente con el secundario. Las preparaciones fueron analizadas con un microscopio Zeiss de fluorescencia convencional invertido Axiovert200 o un microscopio Zeiss Confocal LSM510 Meta. Todas las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando los programas LSM 5 Image Browser, Adobe Photoshop 7.0 y Adobe Illustrator 10.

#### **2.5 Inmunotransferencia**

Para el análisis de las proteínas por inmunotransferencia, las muestras se prepararon en solución de Laemmli en presencia o no de un agente reductor y se hirvieron durante 5 minutos a 70° C. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), en los que la concentración de acrilamida varió entre un 4% y un 15% según el tamaño de las proteínas a estudiar. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas Inmobilon-P en un aparato de transferencia semi-seca. Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon con PBS/Tween 20 al 0,05% (PBST) y leche en polvo al 5% durante 1 hora. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos (1 hora con el primario y 30 minutos con el secundario a temperatura ambiente), se lavaron con PBST y fueron

---

reveladas mediante una reacción de quimioluminiscencia con el kit de detección ECL (Amersham).

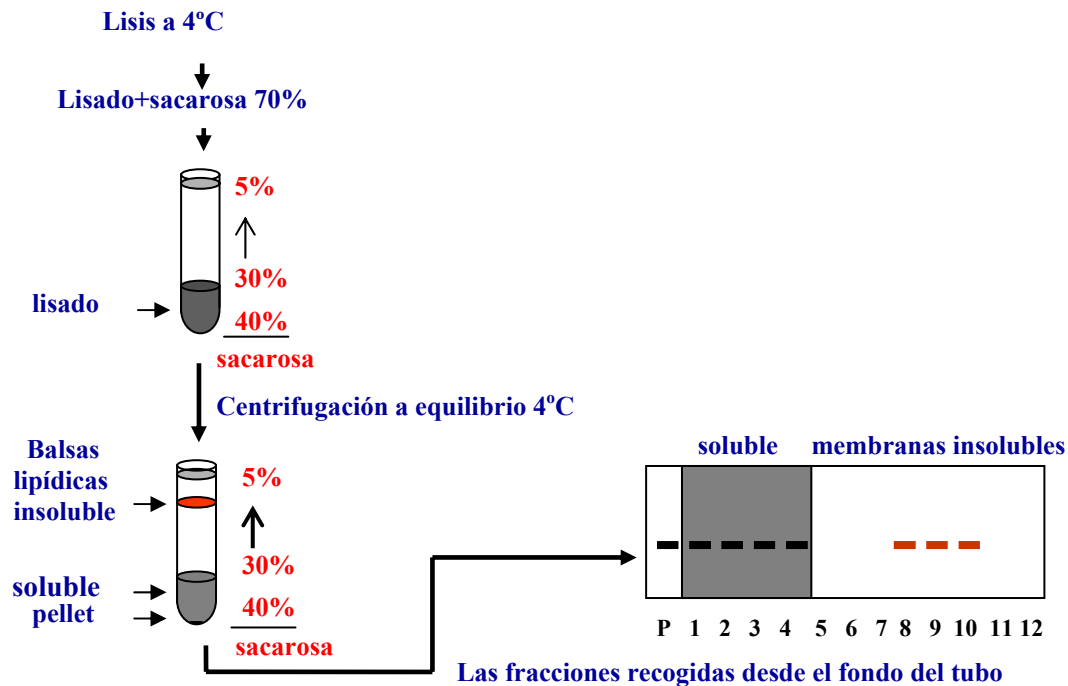
## 2.6 Aislamiento de fracciones de membranas insolubles en detergentes

Para el aislamiento de las fracciones insolubles en detergentes se siguió el método de Brown y Rose utilizando gradientes continuos de densidad de sacarosa centrifugados a equilibrio (Brown and Rose, 1992). Las células crecidas a confluencia en placas p100 se lavaron con PBS frío y se lisaron durante 30 minutos a 4°C en el tampón de lisis TNE (25 mM Tris-HCl pH7,4, 150 mM NaCl, 2mM EDTA) y Tx-100 al 1% suplementado con inhibidores de fosfatasa (25  $\mu$ M NaF, 1 mM ortovanadato sódico, 1 mM ácido okadaico y 10 mM  $\beta$ -glicerol fosfato) e inhibidores de proteasas (100  $\mu$ g/ml PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptina, 1  $\mu$ g/ml aprotinina y 1  $\mu$ g/ml pepstatina A).

Este lisado se homogeneizó pasándolo 8 veces por una aguja de tamaño 22-G y se mezcló 1:1 (v/v) con una solución de sacarosa al 70% (p/v) en TNE, de manera que la mezcla quedara a una concentración aproximada del 35% (p/v). Este extracto se situó en el fondo de un tubo de ultra centrifuga Beckman de 12 ml de capacidad. Sobre él se generó un gradiente lineal 30-5% (p/v) de sacarosa y la muestra se sometió a una ultracentrifugación durante al menos 15 horas de duración para alcanzar el equilibrio de densidad, a 4°C y a 39000 rpm en un rotor flotante SW40. Finalizada la ultracentrifugación se recogieron fracciones de 1 ml desde la parte inferior a la superior y posteriormente se analizaron mediante inmunotransferencia o se sometieron a inmunoprecipitación con los anticuerpos apropiados. La densidad de cada fracción fue determinada midiendo su índice de refracción (**figura 12**).

Los gradientes discontinuos se realizaron situando el lisado al 35% (p/v) de sacarosa en el fondo de un tubo de ultra centrifuga Beckman de 4 ml de capacidad. Sobre él se colocaron 2 ml y 1 ml de sacarosa al 30% y al 5%, respectivamente. La ultracentrifugación se llevó a cabo en las mismas condiciones de velocidad que en el gradiente continuo. Por último, se recogieron 0,5 ml de la fracción insoluble (interfase entre las sacarosas del 5% y del 30%), considerada como la fracción derivada de los “rafts” y 0,5 ml de la fracción soluble (del fondo del tubo), considerada como proteínas no asociadas a rafts. En último lugar, el aislamiento de “rafts” por el método de Skibbens (Skibbens y cols., 1989) consistió en sedimentar los rafts por centrifugación a

14000 rpm, 3 min y 4°C en una centrifuga refrigerada Hettich a partir de los lisados iniciales. El sobrenadante 1 (fracción soluble) fue retirado. El sedimento fue nuevamente resuspendido en tampón TNE 1% Tritón X-100, 60mM  $\beta$ -octil-glucósido e incubado 15 min a 37°C. Por último se sometió a una segunda centrifugación a 14.000 rpm, obteniéndose el sobrenadante 2 (fracción insoluble) que contenían los complejos de membrana ricos en glicosfingolípidos y colesterol o “rafts”.



**Figura 12. Aislamiento de membranas insolubles en detergentes.** Esquema en el que se representa el aislamiento de las membranas insolubles en detergentes no iónicos a baja temperatura (Tx-100, 4°C) y posterior centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa de los extractos celulares. La detección se realiza por técnicas de inmunotransferencia o inmunoprecipitación, analizando las diferentes fracciones obtenidas del gradiente.

## 2.7 Preparación y obtención de anticuerpos

### 2.7.1 Preparación y obtención del anticuerpo monoclonal anti-bigMAL1

Los péptidos AWTGSMGNWSMFTWC (péptido1), correspondiente a los aminoácidos 59-73, RARPGEITGYMATVPG (péptido 2), correspondiente a los aminoácidos 158-175, FEDKYGGQPRRSRDVSC (péptido 3), correspondiente a los aminoácidos 263-279 y por último HSAHLVFVKV (péptido 4), correspondiente a extremo C terminal, todos ellos pertenecientes a la proteína bigMAL1 humana, fueron generados en un sintetizador automático (AMS 422, Abimed, Langerfeld, Germany) mediante un procedimiento de fase sólida. Éstos péptidos fueron acoplados a KLH, en

---

unos casos de manera lineal por un residuo de cisteína terminal y en otros, como el caso del péptido 3, de manera cíclica por dos cisteínas simulando el loop que se predice para esta secuencia dentro la proteína bigMAL1. Una vez acoplados se prepararon emulsiones de estos con coadyuvante completo de Freund y se inmunizaron ratones BALB/c, según métodos estándar. Las células del bazo de los ratones inmunizados fueron fusionadas con células de mieloma de ratón siguiendo protocolos estándar (Lane and Harlow, 1982) y cultivadas en placas de 96 pocillos. La selección de los hibridomas se realizó primero frente al péptido lineal por ensayos de ELISA y después todos los clones con valores más altos se analizaron por inmunotransferencia utilizando fracciones de membrana enriquecidas en HA-bigMAL1 expresada en células MDCK de forma estable.

### **2.7.2 Preparación y obtención del anticuerpo policlonal anti-bigMAL2 humano.**

Para la obtención del suero policlonal anti bigMAL2 se llevó una estrategia similar, para lo que se sintetizó el péptido FDPKYGEPKRPPNC correspondiente a los aminoácidos 254-267 de la proteína bigMAL2 humana siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Este péptido fue acoplado también a KLH y utilizado en este caso para inocular conejos, primero por vía intramuscular y después por vía subcutánea siguiendo una pauta de inmunización de 28 días. Después se procedió al sangrado y obtención del suero reactivo que fue analizado en su especificidad en la inmunodetección frente a la proteína entera utilizando tanto fracciones enriquecidas en “rafts”, como por inmunofluorescencias de células transfectadas con la proteína exógena myc-bigMAL2.

## **2.8 Videomicroscopía y ensayos de migración celular**

Las células transfectadas o no con construcciones de DNA para la expresión de proteínas fluorescentes fueron crecidas en placas p35 provistas en el fondo con un cubre de cristal, MatTek (Ashland, MA, U.S.A.). Para la filmación, las células se lavaron 2 veces con HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*), a 37°C y se incubaron en medio HBSS al 2% de suero durante el tiempo total de grabación en un microscopio Zeiss Axiovert200 provisto de una cámara cerrada con temperatura y humedad constantes que permitían a las células mantenerse vivas en cultivo (37 °C y 5% CO<sub>2</sub>). En los casos en

los que la filmación duró más de 8 horas, se añadió HEPES al 0.01% (v/v) para mantener el pH en valores constantes. Las imágenes fueron adquiridas con el objetivo 20x ó 40x. Posteriormente, los videos fueron montados y procesados utilizando el software MetaMorph 6.1r6 (Universal Imaging). El análisis morfométrico de las células para calcular el factor elíptico, determinar las trayectorias celulares y calcular su velocidad se hizo con las funciones “morphometric analysis” y “track objects” disponibles en el programa MetaMorph.

## 2.9 Ensayos de actividad GTPasa

Para el análisis del estado de activación de las GTPasas RhoA, Rac y Cdc42, las células HeLa no transfectadas, y transfectadas establemente con los plásmidos shRNA1 control) y shRNA2 fueron lisadas en 0,5 ml de tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glicerol, 1mM NaVO<sub>4</sub>, 0,1mM PMSF) enfriado en hielo y estos lisados fueron clarificados por centrifugación. Se utilizaron 15 µl de sobrenadante para determinar la cantidad total de las GTPasas y el volumen restante se incubó con 300 µl de proteínas purificadas C21-RTK-GST o PAK-GST y 50 µl de la resina Glutation-sepharosa (dilución 1:2) durante 30 min a 4°C. Posteriormente la resina se lavó con tampón de lisis y las proteínas unidas se eluyeron hirviendo en tampón de carga Laemli. Las muestras se separaron por SDS-PAGE en geles del 15% de archilamida y se transfirieron a membranas de inmobilon, para la posterior detección de RhoA, Rac y Ccd42 con anticuerpos específicos.

## 2.10 Ensayos de adhesión celular

Células HUVECs tratadas o no con siRNA específicos y crecidas en monocapas confluentes sobre placas de cultivo M24 fueron co-cultivadas durante 10 minutos con Linfocitos periféricos (PBL) procedentes de un sujeto sano que habían sido cultivados durante 12 días en presencia de IL-2 y  $\alpha$ -CD3 y que habían sido marcados con una sonda fluorescente verde, BCECF-AM durante 30 minutos. Tras la incubación con la sonda fluorescente, las células HUVECs fueron lavadas una vez con medio de cultivo y fijadas con PFA durante 20 minutos. La intensidad de fluorescencia se midió en un lector de placas provisto de los filtros para la emisión de 480 nm.

### **2.11 Ensayos de permeabilidad celular**

Células HUVECs crecidas en transwell provistos de filtros de policarbonato de 0,4  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y dispuestos sobre placas M-24 fueron incubadas con FITC-dextrano e incubadas 1 hora a 37°C, 95% humedad y 0,5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, los transwell fueron retirados y se analizó la fluorescencia que alcanzó el fondo de la placa mediante un lector de placas de ELISA y que por tanto representa una medida de la permeabilidad celular.

### **2.12 Aislamiento de ARN total y análisis por Northern blot**

El ARN total fue extraído a partir de células adherentes o en suspensión, previamente lavadas 2 veces con PBS y después incubadas con el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Tras la extracción y su aislamiento se determinó la concentración utilizando el espectrofotómetro Nanodrop. 5  $\mu\text{g}$  de ARN total aislado fue separado en un gel de agarosa y transferido durante toda la noche en buffer SSC 2X por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente Hybond N<sup>+</sup> (Amersham). Un fragmento de ADN correspondiente a toda la secuencia codificante del gen de bigMAL1 humano fue utilizada como sonda para la hibridación con el ARN extraído de las células a analizar. El marcaje radiactivo de esta sonda se realizó con 50  $\mu\text{Ci}$  de [<sup>32</sup>P] dCTP empleando para ello el kit de marcaje Rediprime de Amersham Biosciences. Como control de carga, se utilizó una sonda de  $\beta$ -actina humana, que representa un gen de expresión ubicua.

Las membranas con el ARN se hibridaron con las sondas radiactivas durante 1 h a 60°C. Después se realizaron lavados con las soluciones 2x SSC/SDS al 0,05% y, posteriormente con SSC/SDS al 0,25%.

Las muestras de ARN con poli(A)<sup>+</sup> (2 $\mu\text{g}$  por carril) de diferentes tejidos humanos fueron de Clontech.

### **2.13 RT-PCR y Southern blot con oligonucleótidos**

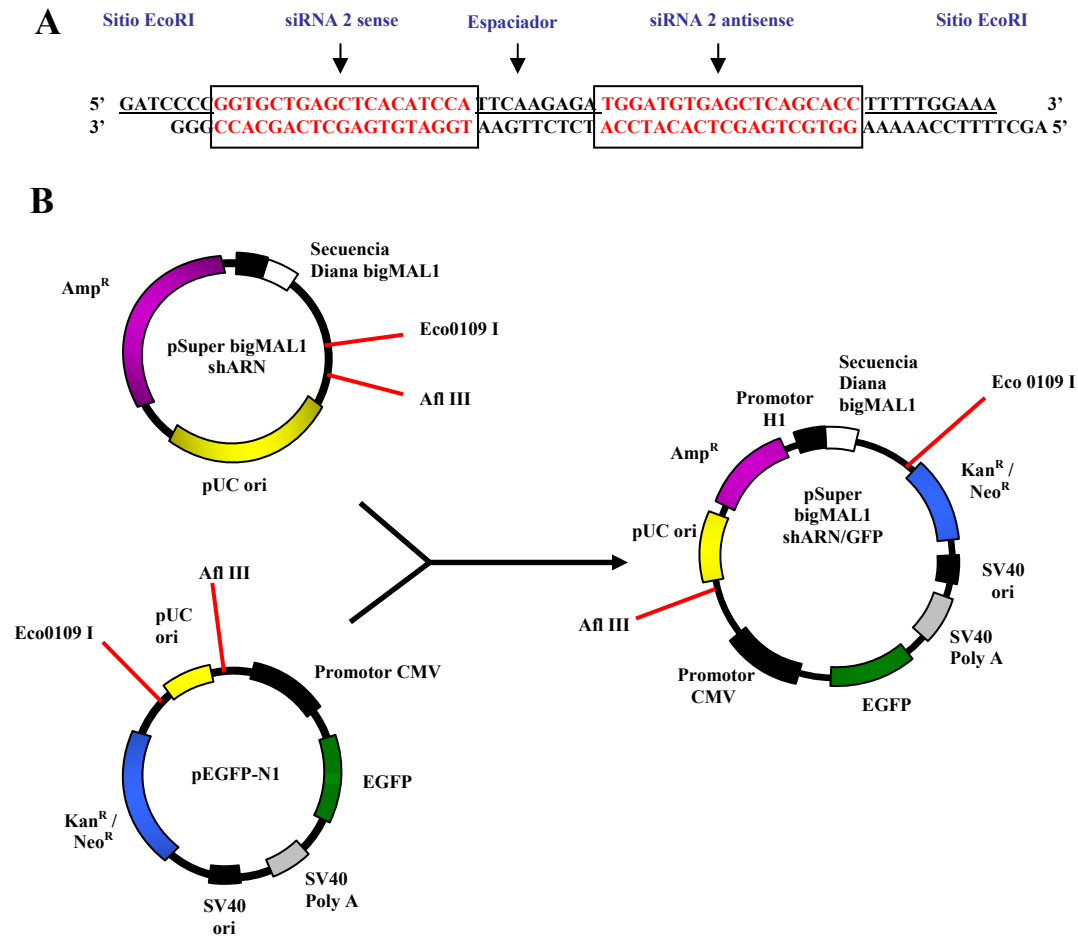
La transcripción reversa (RT) y posterior PCR se llevó a cabo empleando un método en un solo paso para lo que se utilizó el kit Titan One Tube RT-PCR system (Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor y usando 1 $\mu\text{g}$  de ARN total de cada

muestra. Los fragmentos de ADN obtenidos de la amplificación por RT-PCR fueron transferidos a membranas de nylon cargada positivamente Hybond N<sup>+</sup> (Amersham) de la misma manera que en caso del análisis por Northern blot y posteriormente hibridados con sondas de oligonucleótidos de ADN de 18 nucleótidos marcadas radiactivamente con 50  $\mu$ Ci de [<sup>32</sup>P] dCTP correspondientes a regiones únicas y específicas de los genes humanos de bigMAL1, bigMAL2 y bigMAL3.

#### **2.14 Transfecciones de siRNA. Generación de los plásmidos pSuper bigMAL1 shRNA/GFP.**

Las transfecciones de oligonucleótidos pequeños de interferencia de ARN “siRNA” complementario al ARNm de bigMAL1 humano se llevaron a cabo por electroporación (200V, 960 $\mu$ F y 480 $\Omega$ ) en un aparato ECM 600 (BTX, San Diego, CA) en el caso de células HeLa, HepG2 y PC3 (2x10<sup>6</sup> células por transfección) y con oligofectamina2000 (Invitrogen), según instrucciones del proveedor, en el caso de las células primarias de endotelio HUVECs.

Los plásmido pSuper-bigMAL1 shRNA/GFP fueron utilizado para la expresión estable de ARN de interferencia y por tanto la supresión de la expresión de la proteína bigMAL1 endógena. Para ello, se eligieron las secuencias de ARN de interferencia 1 y 2 (siRNA1 como control y siRNA2) que habían sido validadas previamente. Estas secuencias se incluyeron como ADN doble cadena en dos oligos diseñados de tal forma que hibridaban entre sí como se muestra en la **figura 13**. El anillamiento de estos oligos y su posterior inserción en el plásmido pSuper dieron lugar a la construcción pSuper-bigMAL1-shRNA1 y 2 que al transcribirse dentro de la célula genera un ARN de doble cadena complementario y unido por un pequeño bucle espaciador (*Short hairpin “shRNA”*). Este shRNA es posteriormente procesado por el sistema RISC para dar lugar a las moléculas de ARN de interferencia de 19.21 nucleótidos que hibridarían con el ARNm del gen de bigMAL1 humano impidiendo su traducción y tanto, la expresión de esta proteína (**Figura 13**). Estos dos plásmidos se recombinaron con el plásmido pEGFPN1 cortando ambos plásmidos con las enzimas de restricción Eco 0109 I y Afl III y ligándolos posteriormente. De este modo, obtuvimos los plásmidos recombinantes amos pSuper-bigMAL1 shRNA/GFP 1 y 2 que contenían el gen de la GFP (**Figura 13**).



**Figura 13. Esquema de la construcción de los plásmidos pSuper bigMAL1 shARN/GFP. A.** secuencia de ADN de doble cadena con 19 nucleótidos (rojo) correspondientes a una región 3' no traducida del ARNm del gen de bigMAL1. **B** esquema que muestra los pasos seguidos para la obtención de los plásmidos recombinantes pSuper bigMAL1 shRNA/GFP.



# Resultados

## 1. Identificación de nuevos miembros de la familia MAL

Este trabajo comenzó con la búsqueda de secuencias de ADN que codificasen proteínas homólogas a la proteína MAL humana y cuya función fuese desconocida. En primer lugar, y mediante el programa bioinformático BLAST para la búsqueda por homología de secuencia, se utilizó la secuencia de MAL como sonda para rastrear la base de datos del *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*. Como resultado, aparecieron los genes correspondientes a miembros de la familia MAL como BENE, MAL2 (de Marco et al., 2001; de Marco et al., 2002) y plasmolipina (PLP)(Fischer and Sapirstein, 1994; Sapirstein et al., 1988), previamente descritos y caracterizados. Además, y seguidas en porcentaje de homología, se identificaron varias secuencias que correspondían a varios ADNc completos. Tres de estas secuencias de ADN, con los números de identificación en GenBank BC095412 (“*MYADM*”), BC029306 (“similar to *MYADM*”) y BC013088 (“*MYADM-like*”) contenían ADNc que codificaban proteínas hasta ahora inéditas, con una elevada homología entre sí y cuya secuencia está muy conservada sobre todo entre especies pertenecientes a mamíferos. Uno de estos genes, “*MYADM*” (“*myeloid associated differentiation marker*”), ha sido previamente descrito como un marcador genético que aumenta su expresión en células de la médula ósea CD34+ cuando éstas inician su diferenciación hacia células mieloides (Pettersson et al., 2000). En cuanto a los genes “similar to *MYADM*” y “*MYADM-like*”, presentan un alto porcentaje de homología con el gen “*MYADM*” y codifican 2 proteínas de función desconocida.

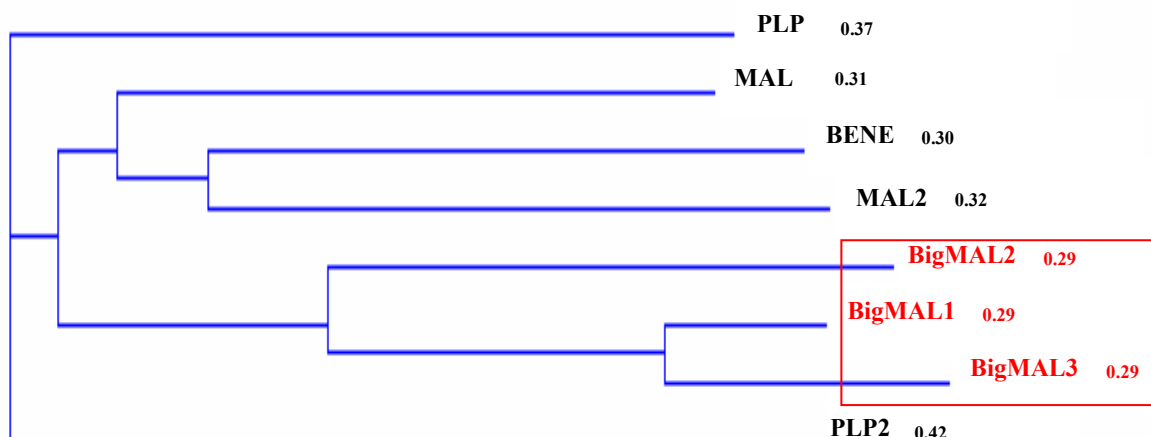
El tamaño teórico de las proteínas codificadas por estos tres genes es aproximadamente el doble de la proteína MAL y poseen una estructura secundaria con más dominios transmembrana que la proteína MAL. Por este motivo, se denominaron a las tres nuevas proteínas bigMAL1 (codificada por el gen *MYADM*), bigMAL2 (gen “similar to *MYADM*”) y bigMAL3 (gen “*MYADM-like*”). Por tanto y hasta el momento estas tres proteínas, junto con MAL, MAL2, BENE, PLP y PLP2, conforman un grupo de 8 proteínas homólogas en secuencia, relacionadas bioquímica y estructuralmente y que se incluyen en la denominada familia MAL de proteínas. Ésta, a su vez pertenece a la superfamilia de proteínas que poseen dominios MARVEL como se muestra en la **figura 14**.

	TM 1	TM 2	
BENE	21	LFLTLPFAFFLPELLEFGFLVWTVAA---GWVMYVSLTSFLLSLMFLLSYLFQFYKR--	
MAL2	30	ILRTYSGAFVCLEILFGGLVWILVAS---GWVMFVSVTAFFFSLLFLGMFLSGMVAQ--	
MAL	17	VFTTLPDLLFIFEFEFGGLVWILVAS---GWVMFVSVFCFVATTTLLIILYLIIGAHGG--	
BigMAL1 MARVEL1	31	ALTQPLGLLRLLQLVSTCVAFSLVAS---NWSMFTWCFCFSVTLIILLIVELCGLQAR--	
BigMAL1 MARVEL2	167	YMATVPGLLKVLETFVACIIFAFISD---EWCVAVYACFILAATAILLNLGECTNV--	
BigMAL3	90	YMASELGLLKVLETFVACLIFFVFIN---EWCVAVYALCFVLAALTLLSLGHCTNM--	
BigMAL2	158	YMATVSGLLKIVQAFVACIIFGALVH---QWCVAVYSLCFLATVAVVALSVMGHTGG--	
PLP	31	FVRSRLGALMLLQLVLGLLVWALIAD---GWVMFVAVFLWLVTVIVLFNLYLQQLHMK--	
PLP2	18	FSRTRKGILLFAEIIILCLVILLI CFS---PGYSSLSVIEMILAAIFFVVYMCDDLHTK--	
	TM 3	TM 4	
BENE		--FES--WRVLDSYHGTTGLYMSAAVLQ---SAASFFAFIATLLY---TIHAFST---	151
MAL2		--IDAN--WNFLDFAYHFTVFVYFYGAFLE---VAASIFAFMTTACYGCSLGLALRRWRP	173
MAL		--ETS--WVTLDAAYHCTAALFYLSASVLE---IAAVVFSYIATLLYVVHAVVFLIR---	150
BigMAL1 MARVEL1		--FPLS--WRNFPIITFACYAALFCLASAIY---IAATFFSCIACVAYATEVAWTRARPG-	162
BigMAL1 MARVEL2		--LPIF--FPSFLSGLALLSVLLYATALVLW---LAVAILTAINLLAYVADLVHSAHLV---	319
BigMAL3		--LPIR--FPSFLSGLALLSVLLYATALVLW---LAVTNLTAVNLLAYVGDLVYSAHLV---	242
BigMAL2		--LGCP--FDWLVVVYTFVALVLLYLSAAVIW---LVVAIFTYVNNLLYVVDLAYSQRIRF-	303
PLP		--LYMVPWPLVLMIFNISATVLYITAFIAC---AAASFFACLVMIAYGVSAFFSYQA---	179
PLP2		--LPIF--FPSFLSGLALLSVLLYATALVLW---LAVAILTAINLLAYVADLVHSAHLV---	149

**Figura 14. Alineamiento del dominio MARVEL en los miembros de la familia MAL.** Mediante el programa bioinformática ClustalW se obtuvo el alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a las 4 regiones transmembrana de los dominios MARVEL de BENE, MAL2, MAL, 1° dominio MARVEL de bigMAL1, 2° dominio MARVEL de bigMAL1, bigMAL3, bigMAL2, PLP y PLP2. Los aminoácidos conservados en la secuencia correspondiente al dominio MARVEL se hayan representados en colores dependiendo de la naturaleza química de estos aminoácidos, que en su mayoría son de carácter hidrofóbico. En el caso de la proteína bigMAL1, se muestran los dos dominios MARVEL presentes en esta molécula.

## 2. Caracterización de la subfamilia bigMAL

Mediante el programa informático para el alineamiento múltiple ClustalW, se obtuvo el dendrograma derivado del alineamiento de las secuencias completas de las 8 proteínas de la familia MAL humana (**figura 15**). Este árbol muestra una representación de la proximidad genética entre todos los miembros de la familia (medida en términos de homología), y como se observa, las proteínas bigMAL1, bigMAL2 y bigMAL3 derivan de una misma rama y están más próximas y relacionadas entre ellas que con el resto del grupo. Este grupo comparte un grado intermedio de homología con el grupo de MAL, MAL2 y BENE, que ocupan otra rama dentro del árbol. Por último, los miembros más alejados son PLP y PLP2 con porcentajes de homología menores. En la **figura 16** se muestra el alineamiento de las proteínas bigMAL1, bigMAL2 y bigMAL3 observándose el grado elevado de homología de secuencia entre ellas, sobre todo en los residuos aromáticos que componen los segmentos transmembrana y más aún en los dominios MARVEL. El análisis de homología a nivel de secuencia de aminoácidos entre estos miembros, dio como resultado los porcentajes de similitud de 60.2 %, 40 % y 30.2 % entre bigMAL1 y bigMAL3, bigMAL1 y bigMAL2 y bigMAL2 y bigMAL3, respectivamente.



**Figura 15. Dendrograma de la familia MAL.** Mediante el programa bioinformático ClustalW se generó el árbol filogenético o dendrograma correspondiente a las proteínas de la familia MAL. Los valores numéricos al lado de cada proteína representan la distancia en términos de similitud de secuencia con respecto al miembro más cercano en el árbol (ramas próximas). Valores numéricos bajos indican una mayor similitud y valores altos, menor similitud.

Las secuencias de los ortólogos encontradas en las bases de datos para estos nuevos miembros de la familia MAL dan cuenta de la presencia de estas proteínas no sólo en organismos superiores como mamíferos, sino también en otros de escala evolutiva inferior. Por medio del alineamiento de las secuencias encontradas en las bases de datos de diferentes especies, se observa que tanto bigMAL1 como bigMAL2 están muy conservadas. Así por ejemplo, a nivel de la estructura primaria de proteína, en el caso de bigMAL1 humana, existe un 71% de identidad y un 76% de similitud con la proteína de rata, y un 70% de identidad y un 76% de similitud con la proteína de ratón. En conjunto, el análisis de homología mostró que existe una semejanza estrecha (que varía desde el 40% hasta el 95%) entre las proteínas de la subfamilia bigMAL de diferentes especies como *Canis familiaris*, *Box taurus*, *Gallus gallus*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis* y *Tetraodon nigroviridis*. Por todo lo anterior, se ha agrupado a estos 3 nuevos miembros en la que se ha denominado como subfamilia bigMAL, dentro de la familia MAL.

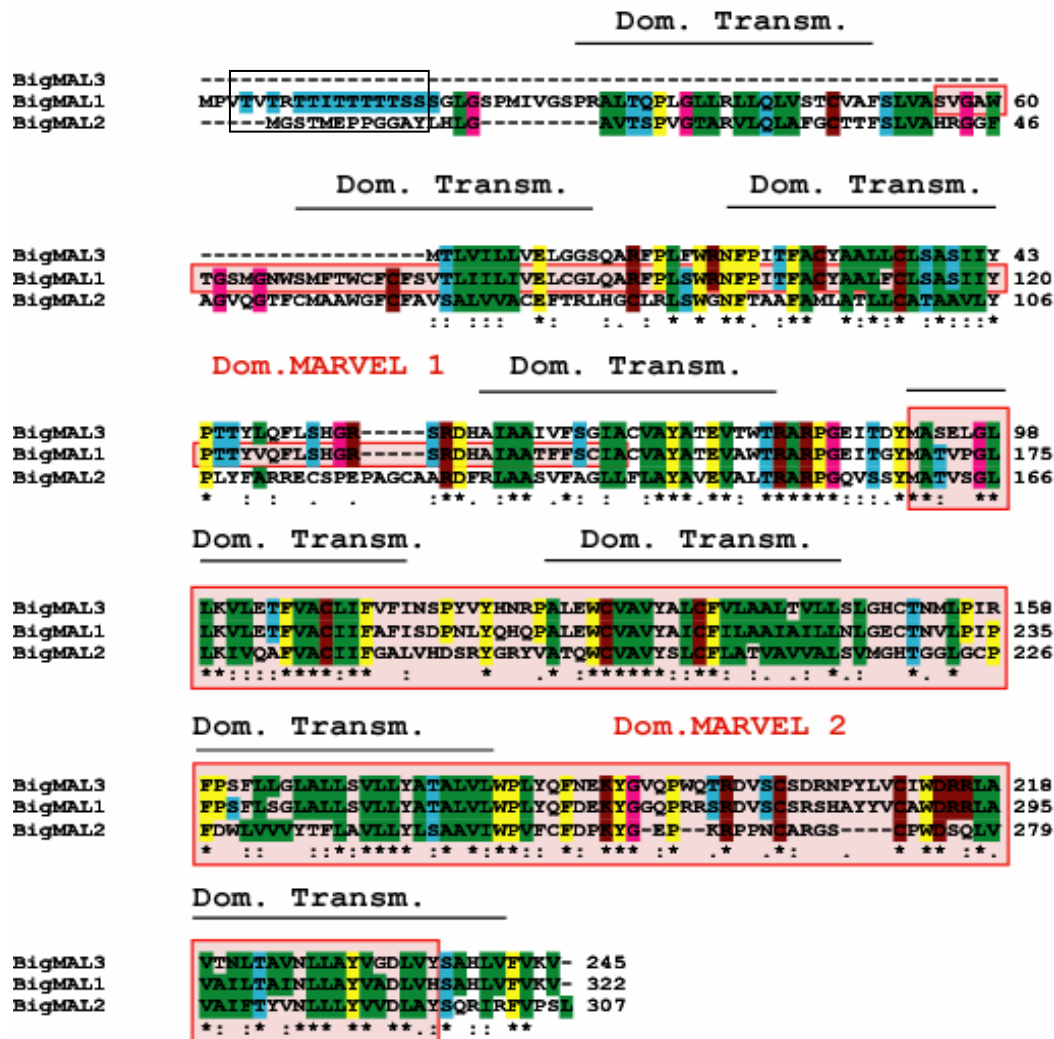


Figura 16. Alineamiento de los miembros de la subfamilia BigMAL. Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de bigMAL1, bigMAL2 y bigMAL3. Los asteriscos (\*) representan aminoácidos idénticos. Los signos (.) y (:) representan cambios conservativos de aminoácidos. Los colores de cada aminoácido representan la naturaleza química distinta de cada uno. Se muestra la posición de los dominios transmembrana y con cajas rojas los aminoácidos contenidos en los dominios MARVEL en las tres proteínas. La caja negra del extremo N-terminal señala la región de poli-treoninas específica de bigMAL1.

### 3. Organización genómica y cromosómica de la subfamilia bigMAL humana

La información acerca de la composición exónica, localización cromosómica, dominios y motivos proteicos de los miembros de la subfamilia bigMAL se recopila en la figura 17. Los genes que codifican las tres proteínas están localizados en cromosomas diferentes, por lo que no están asociados en una familia génica. La organización genómica en exones e intrones de cada gen es semejante. Toda la secuencia codificante, en los 3 casos, está contenida en un solo exón. BigMAL1 y

bigMAL2, con 322 y 303 aminoácidos respectivamente, son los miembros de mayor tamaño dentro de la familia MAL. Sus perfiles de hidrofobicidad, según el algoritmo de Kyte y Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982) predice proteínas con una estructura secundaria formada por 8 dominios transmembrana. Estos dominios están compuestos por aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos que están conectados por segmentos cortos de aminoácidos hidrofílicos. Para la proteína bigMAL3, de 245 aminoácidos, se predice una estructura con 6 segmentos hidrofóbicos transmembrana. De las 3 proteínas, sólo bigMAL1 contiene dos dominios MARVEL en tándem en su secuencia, en la región N y C terminal, respectivamente, como se muestra en la **figura 16**, siendo el único miembro de la familia MAL con esta característica. Las proteínas bigMAL2 y bigMAL3 contienen un sólo dominio MARVEL, que está localizado en la región C-terminal.

El análisis de las secuencias aminoacídicas de las tres proteínas revela que existen diferencias significativas entre ellas, sobre todo en el extremo N-terminal. Sólo bigMAL1 posee una región de poli-treoninas seguidas de residuos de serina en los primeros 20 aminoácidos de la proteína, región que no está presente ni en bigMAL2 ni en bigMAL3. Empleando programas que predicen sitios de fosforilación en una proteína (NetPhos 2.0), varios de los aminoácidos (Ser y Thr) contenidos en esta región serían potencialmente fosforilables.

No se han encontrado otros motivos proteicos para posibles modificaciones postraduccionales como N-glicosilación, farnesilación, prenilación o miristoilación así como tampoco señales para la adición de grupos glicosil-fosfatidil-inositol (GPI).

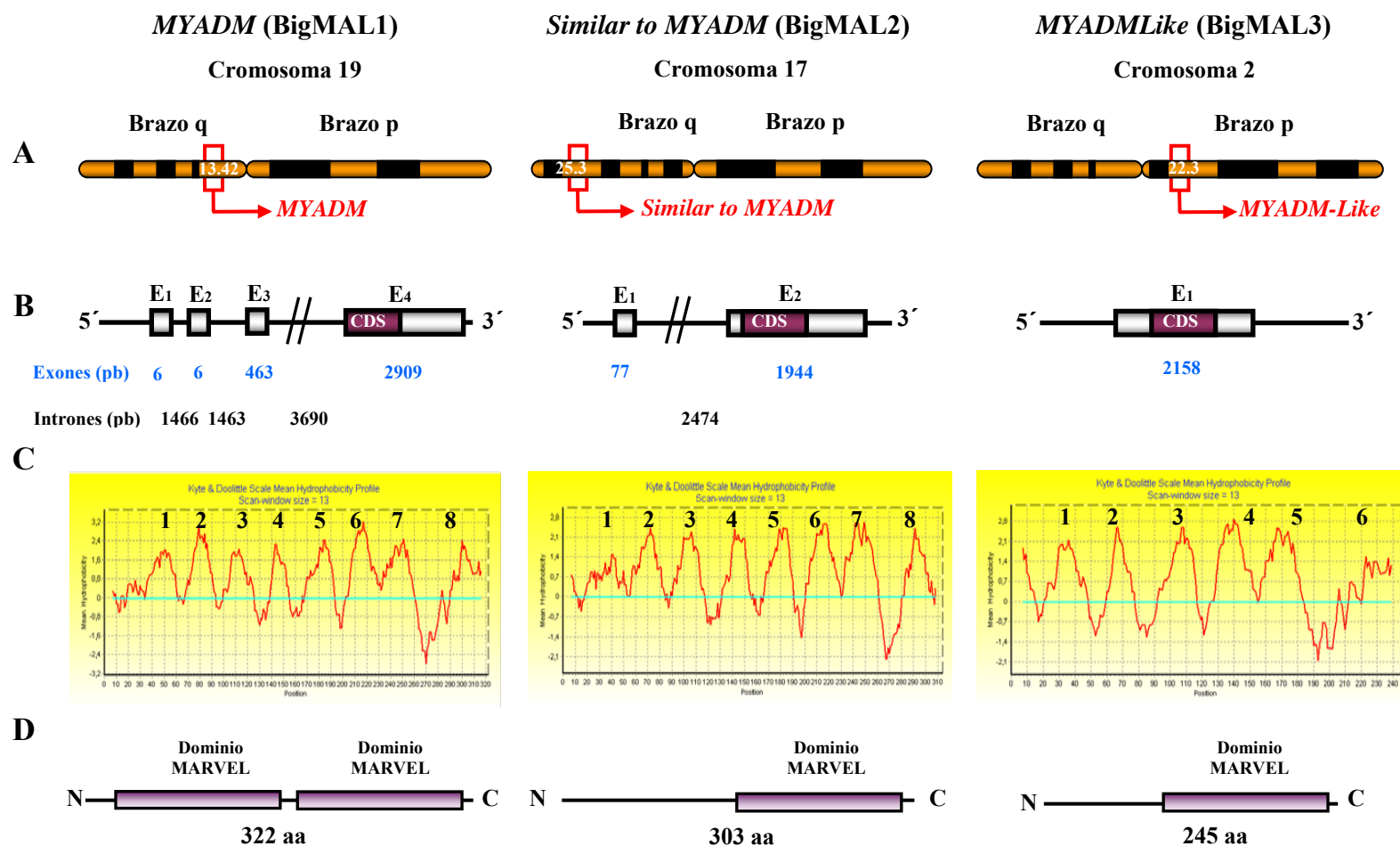


Figura 17. Esquema de la organización genómica y cromosómica de la subfamilia bigMAL y predicción de la estructura de las proteínas codificadas. **A.** Localización cromosómica **B.** Organización genómica de los genes de la subfamilia bigMAL. **C.** Perfiles de hidrofobicidad obtenidos mediante el algoritmo de Kyte y Doolittle para las proteínas bigMAL1, bigMAL2 y bigMAL3 en el que se indican el número de dominios transmembrana. **D.** Localización y número de dominios MARVEL presentes en las proteínas de la subfamilia bigMAL

#### 4. Expresión de bigMAL1 en diferentes tejidos y líneas celulares

Para abordar el estudio de la subfamilia bigMAL llevamos a cabo la clonación de cada miembro con el fin de examinar las diferencias que existían entre sus patrones de expresión e iniciar la caracterización bioquímica y funcional de cada proteína de forma individual.

##### 4.1 Clonación del cDNA de *MYADM* (bigMAL1)

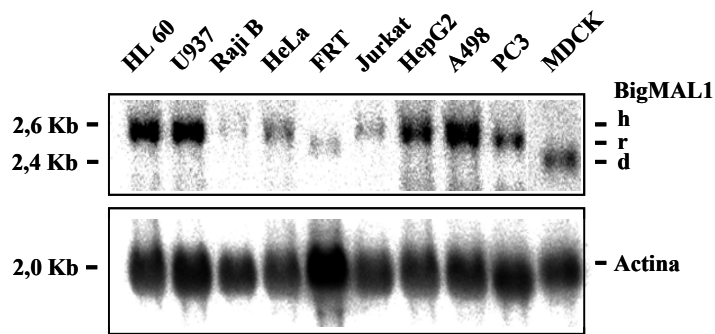
El ADNc de bigMAL1 se clonó mediante una doble estrategia que nos permitía detectar también su expresión. Por un lado, puesto que se conocía que toda la secuencia codificante está contenida en su totalidad en el exón 4, se amplificó directamente por PCR a partir del ADN genómico aislado de células humanas Caco-2. Por otro lado, se utilizaron oligos de ARN diseñados para amplificar bigMAL1 por RT-PCR a partir del ARN total aislado de la misma línea celular. El fragmento amplificado en ambos casos, con un tamaño aproximado de 969 pb, fue secuenciado y clonado en el vector de expresión eucariótico pCR3.1.

##### 4.2 Análisis de la expresión de *MYADM* (bigMAL1) por Northern blot

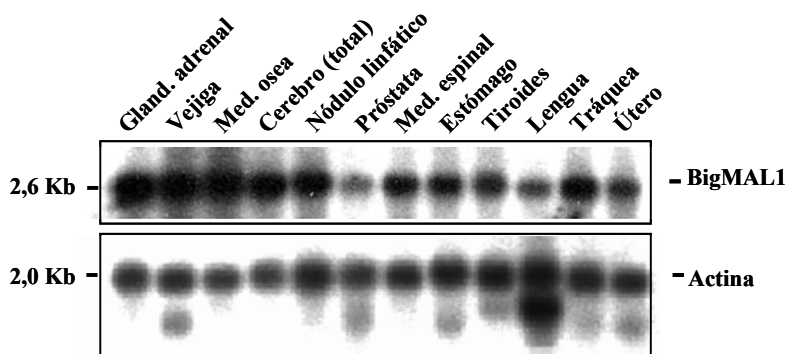
Se analizó un panel de ARN total aislado de distintas líneas celulares y por otro, un panel de RNA total de diferentes tejidos humanos utilizando una sonda correspondiente a bigMAL1. Como se muestra en la **figura 18**, y a diferencia de los resultados obtenidos en el análisis de expresión de los genes *MAL*, *MAL2* y *BENE* (**figura 10**), el patrón de expresión de *MYADM* (bigMAL1) resultó ser ubicuo ya que su ARNm, con un tamaño de 2.6 kb, aparece en todas las líneas celulares así como en todos los tejidos humanos analizados (**figura 18A, B**). Como se observa en el panel de líneas celulares (**figura 18A**), el gen se expresa tanto en células no polarizadas HeLa y PC3, como en células que pueden adquirir un fenotipo polarizado, tanto de forma estable como HepG2 y A498, como de forma transitoria en el caso de células Jurkat, Raji B, HL60 y U937. Asimismo se pudieron detectar 2 transcritos con un tamaño aproximado de 2.4 y 2.5 kb correspondientes a los ARNm de bigMAL1 de perro y de rata en células MDCK y FRT, respectivamente.



## A Líneas celulares



## B Tejidos



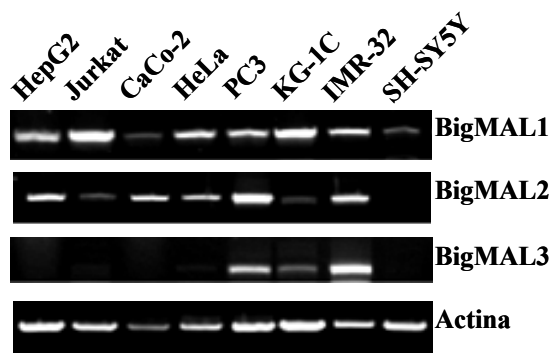
**Figura 18. Expresión del gen *MYADM/bigMAL1* en diferentes líneas celulares y tejidos humanos.** A. Northern blot de líneas celulares. 5 µg de ARN total aislado de cada línea celular fue hibridado con una sonda de ADN de bigMAL1. Se indica el tamaño de los mensajeros detectados, así como la especie a la que corresponde cada uno: h: humano; r: rata; d: perro. Como control de carga se hibridó la misma membrana con una sonda de β-actina. B. 2 µg de ARN total procedente de cada tejido humano fue analizado de la misma manera que en el panel A.

### 4.3 Análisis de la expresión de la subfamilia bigMAL por RT-PCR

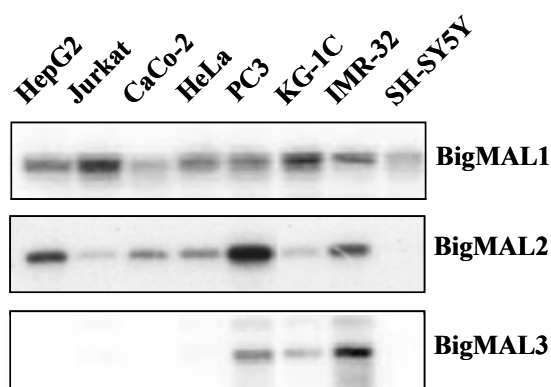
Debido al alto grado de similitud de secuencia entre los tres miembros de la subfamilia podía ser difícil discernir entre la expresión de cada uno de los miembros individualmente. Se decidió por lo tanto llevar a cabo un abordaje distinto para el estudio de su expresión diferencial. Se examinó para el mismo panel de líneas celulares, la expresión individual de cada gen por separado mediante RT-PCR. Para ello se diseñaron oligonucleótidos que amplificaban un fragmento específico y de tamaño diferente a partir del ARNm de cada miembro. Para asegurar la especificidad del fragmento amplificado se realizaron experimentos de Southern blot con tres nuevos oligonucleótidos específicos que hibridaban con una secuencia interna contenida en cada fragmento amplificado procedente del ARNm. Como se muestra en la **figura 19** se ratificó que la expresión de bigMAL1 es amplia y ubicua, ya que se detectó su ARNm en todas las líneas celulares analizadas, incluyendo líneas celulares neuronales como SH-SY5Y e IMR-32 de neuroblastoma humano y KG-1C de oligodendrocitos humanos (**figura 19**). En el caso de bigMAL2, se observó que también posee un patrón de expresión casi ubicuo, detectándose su ARNm en todas las líneas celulares anteriores a

excepción de SH-SY5Y. Por último, la expresión de bigMAL3 fue indetectable en las líneas celulares humanas HeLa, Caco-2, HepG2 y en la línea T Jurkat y sólo se detectó en algunos tipos celulares neuronales analizados como IMR-32 y KG-1C y en la línea de carcinoma de próstata PC3.

### A. RT-PCR



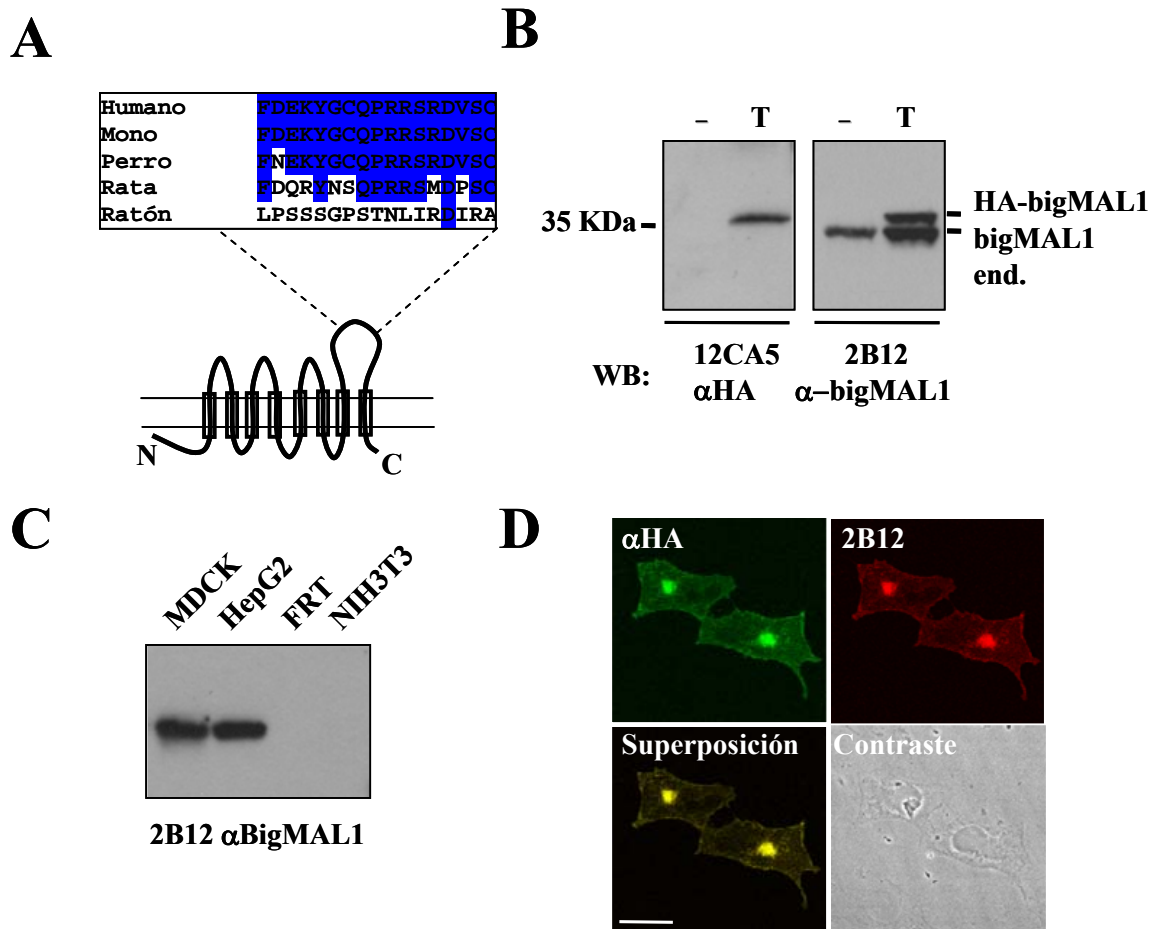
### B. Southern Blot



**Figura 19. Expresión diferencial de los miembros de la familia bigMAL.** A. Análisis de la expresión por RT-PCR. Se diseñaron parejas de oligos que amplificaban específicamente fragmentos del ARN mensajero de bigMAL1, bigMAL2 y bigMAL3. Dichos oligos fueron utilizados en ensayos de RT-PCR a partir de ARN total aislado de cada línea celular. Como control se amplificó un fragmento de la región no traducida del ARN mensajero de actina. B. Para asegurar la especificidad del fragmento amplificado se transfirieron a membranas de Nylon N<sup>+</sup> y se hibridaron con 3 oligos de ADN radiactivos que habían sido diseñados para detectar específicamente cada miembro de la subfamilia.

## 5. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a bigMAL1 humano

Una vez clonado el ADNc de *MYADM* (bigMAL1) como se ha descrito anteriormente, se modificó la proteína codificada por la adición del epítipo HA en el extremo N terminal y se realizaron estudios preliminares de expresión y caracterización bioquímica. Para poder detectar niveles endógenos de la proteína se obtuvo un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína bigMAL1 humana. De todos los péptidos utilizados para inmunizar ratones BALB/c (consultar materiales y métodos), sólo el comprendido entre los aminoácidos 263 y 279 (**figura 20A**), correspondiente al bucle entre el sexto y séptimo segmento  $\alpha$ -hélice transmembrana resultó ser altamente inmunogénico. Los sueros de todos los ratones inoculados con este péptido fueron reactivos y positivos reconociendo a la proteína entera por inmunoblot.



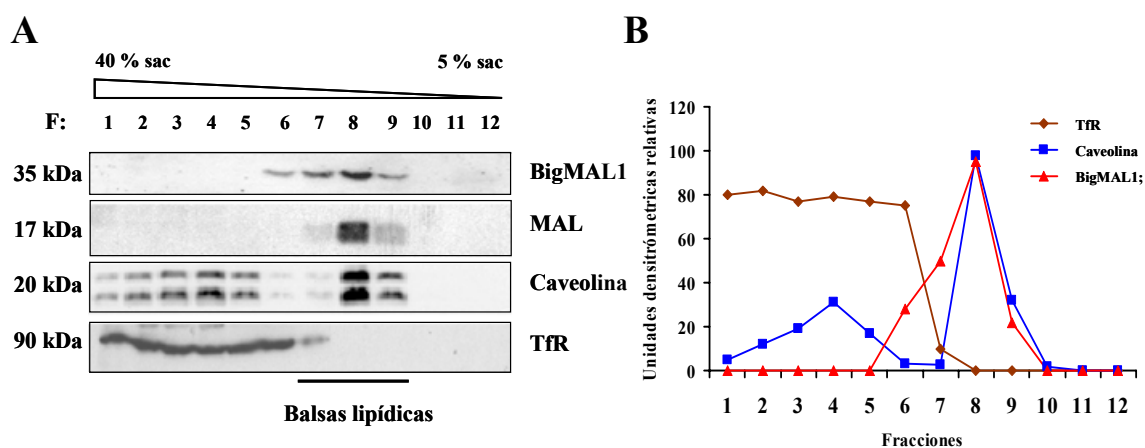
**Figura 20. Caracterización del anticuerpo monoclonal anti-bigMAL1, 2B12.** **A.** Representación esquemática de la estructura de membrana de bigMAL1, donde se señala el péptido utilizado en la obtención del anticuerpo y en el que se muestra el alineamiento de la secuencia correspondiente a ese péptido (los aminoácidos conservados están subrayados en azul) entre las especies que se indican. **B.** Análisis por inmunoblot del mAb 2B12. Para asegurar la especificidad, se transfectaron células COS-7 con una construcción de bigMAL1-HA. El anticuerpo 2B12 es capaz de reconocer tanto la forma endógena de 37 kDa en células no transfectadas y transfectadas, como la forma exógena HA-bigMAL1 transfectada con un tamaño ligeramente mayor. **C** Especificidad de especie del anticuerpo monoclonal 2B12. Se utilizó el anticuerpo en la inmunodetección en fracciones de membrana de proteínas endógenas en células de perro (MDCK), humanas (HepG2), de rata (FRT) y de ratón (NIH3T3). **D** Detección de la proteína bigMAL1 por inmunofluorescencia con el anticuerpo 2B12. Células COS-7 fueron transfectadas con la forma bigMAL1-HA y a las 48 horas fueron analizadas mediante doble marcaje con 2B12 y pAb anti-HA por microscopía de fluorescencia. Barra 20  $\mu\text{m}$ .

A partir de uno de estos ratones se obtuvo el clon 2B12 que fue elegido por la especificidad e intensidad de la señal en Western blot. La **figura 20B** muestra que el anticuerpo monoclonal 2B12, reconoce en células COS-7 que expresan de forma transitoria HA-bigMAL1 una proteína de tamaño aproximado de 35 kDa, correspondiente al tamaño predicho para bigMAL1 y que corresponde a la forma endógena. Este anticuerpo también reconoce otra proteína de tamaño ligeramente mayor correspondiente a la proteína exógena que porta un epítipo HA. Además el anticuerpo

reconoce a la proteína exógena en experimentos de microscopía confocal de fluorescencia (**figura 20D**). El alto porcentaje de identidad de los aminoácidos (en azul en la **figura 20A**) entre las especies humana, perro y mono en el péptido utilizado permitió también detectar las proteínas endógenas de estas dos especies. No se detectó sin embargo, las proteínas de las especies de rata y ratón, por lo que la especificidad del anticuerpo 2B12 frente a este péptido quedó patente, limitándola a las especies humana, mono y perro (**figura 20C**).

## 6. La proteína bigMAL1 endógena está presente en los microdominios de membrana.

Quisimos determinar si, al igual que otros proteolípidos descritos de la familia MAL, bigMAL1 también se encuentra asociada a los rafts. Para ello se utilizaron las líneas celulares MDCK, que expresa MAL, y HepG2 que expresa MAL2. Como se



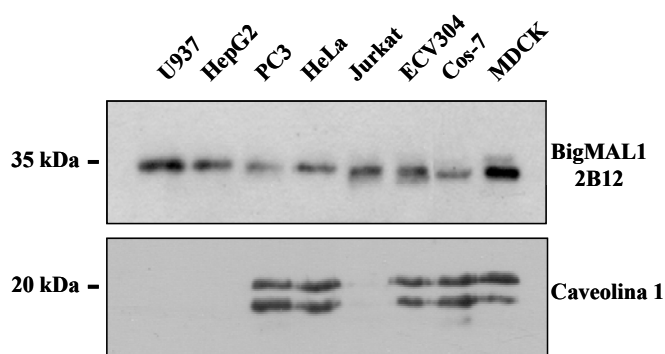
**Figura 21. La proteína bigMAL1 está asociada a los microdominios de membrana o balsas lipídicas.** **A.** Identificación de bigMAL1 endógeno en las fracciones de membrana insolubles en detergente de células MDCK. Las fracciones fueron recogidas desde el fondo del tubo (1-12) y analizadas por western blot para la presencia de bigMAL1 (2B12), MAL (2E5), caveolina y receptor de transferrina (TfR). Las fracciones 1-5 tienen una densidad de sacarosa del 40% y están enriquecidas en proteínas solubles en TX100, que representan el 99% del total de las proteínas celulares. Las fracciones 6-12 con una densidad de sacarosa de 30-5%, representan el 1% de las proteínas celulares y contienen las membranas solubles o resistentes al detergente TX100 (DRMs). **B** Cuantificación por densitometría de la cantidad relativa de proteínas analizadas presentes en las fracciones del gradiente anterior. La mayoría del TfR está en las fracciones 1-6. La caveolina está presente en su mayoría en las fracciones 7-8, pero también hay un porcentaje de esta en la fracción soluble en TX100. La proteína bigMAL1, al igual que MAL, reside exclusivamente en las fracciones insolubles en TX100.

muestra en la **figura 21**, se comprobó que bigMAL1 reside exclusivamente en microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos correspondientes a las fracciones de baja densidad como la proteína MAL en el caso de MDCK, ó MAL2 en el caso de HepG2 (no mostrado). Proteínas como caveolina 1,

asociada mayoritariamente a microdominios de membrana ó la proteína anclada a la membrana por grupos GPI, CD59, que se localiza exclusivamente en las fracciones de rafts, fueron utilizadas como controles positivos ya que cofraccionan con bigMAL1. Por otro lado, se muestra la distribución de otras proteínas de membrana, como el receptor de transferrina (TfR) que quedan excluidas de estos microdominios lipídicos y se hallan enriquecidas en las fracciones de alta densidad de sacarosa.

## 7. La proteína bigMAL1 es ubicua y oligomeriza.

A continuación se analizaron líneas celulares representativas de diferentes tejidos y órganos, que incluían el sistema nervioso, inmune, etc. Se obtuvieron de todas ellas las fracciones de membranas insolubles en detergente, siguiendo el método de Skibbens (Skibbens et al., 1989). En todas las células humanas analizadas, encontramos la



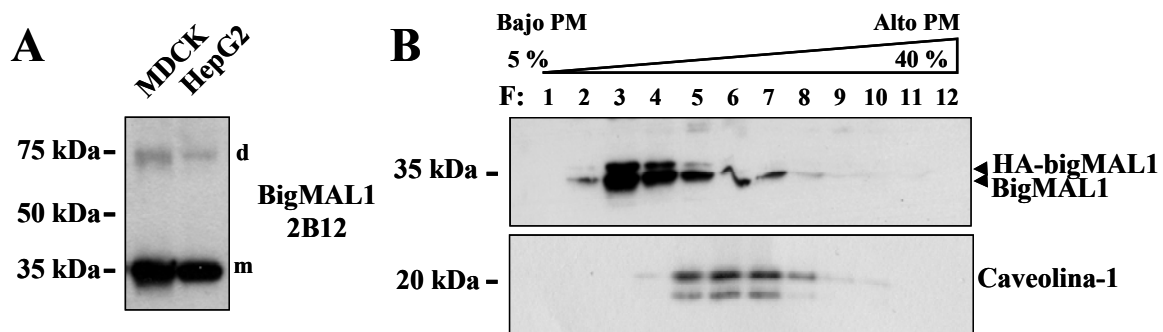
**Figura 22. Presencia de bigMAL1 en diversas líneas celulares.** Identificación de bigMAL1 endógeno en las fracciones insolubles de membrana de un panel de líneas celulares humanas de distintos orígenes y en células COS-7 y MDCK. En las mismas fracciones de membrana se analizó la presencia de caveolina-1.

presencia de bigMAL1 en las fracciones de membrana insolubles, lo que confirmaba los datos obtenidos por Northern blot y RT-PCR. En la **figura 22** se muestran algunas de las líneas celulares que han sido analizadas utilizando caveolina como control. Se sabe que la expresión de la caveolina no es ubicua ya que no aparece en sistema nervioso ni en

determinados tipos celulares. De hecho el análisis de los niveles endógenos de caveolina en las líneas celulares analizadas para bigMAL1 (**figura 22**) muestra que a pesar de su amplia expresión, las células U937 (línea mieloide), Jurkat (línea T linfoblástica) y HepG2 (hepatocarcinoma) carecen de niveles detectables de caveolina. Por lo tanto se puede considerar a la proteína bigMAL1 como un elemento constitutivo y ubicuo de la maquinaria proteica asociada a las balsas lipídicas.

En la mayoría de las fracciones de membrana analizadas con el anticuerpo anti-bigMAL1 2B12, se observó la presencia de una banda correspondiente a una proteína de un tamaño aproximado de 70 kDa (**figura 23A**), que podría corresponder a un dímero de bigMAL1. Se analizaron células MDCK establemente transfectadas con HA-

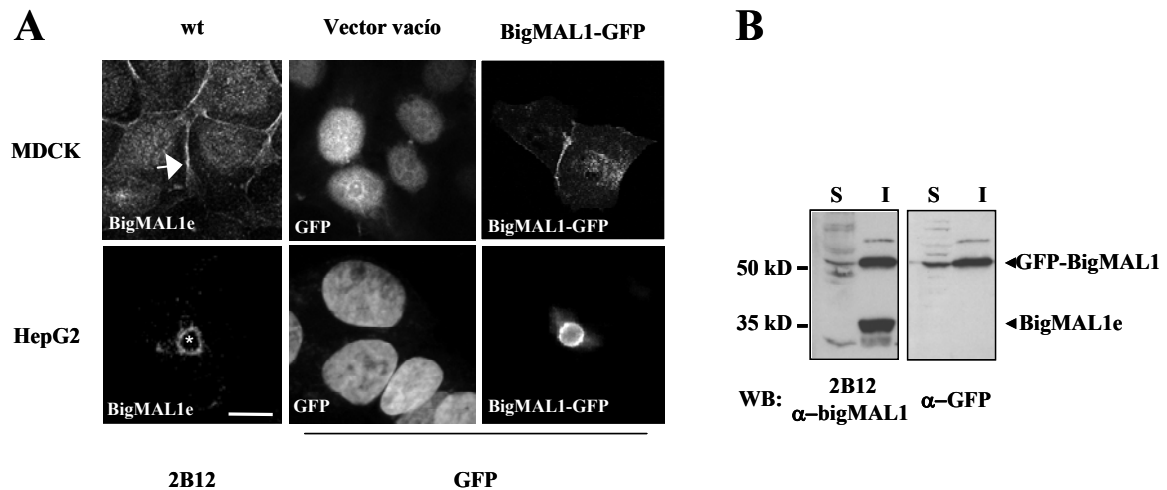
bigMAL1 por ultracentrifugación en gradientes de velocidad para detectar la posible existencia de oligómeros. Se observó que una proporción de bigMAL1 sedimenta en las fracciones correspondientes a proteínas o complejos de mayor tamaño lo que sugiere que se asocian con otras proteínas o consigo misma formando oligómeros (**figura 23B**). Como control positivo de oligomerización se analizó la presencia de oligómeros de caveolina en las mismas fracciones del gradiente.



**Figura 23. Oligomerización de bigMAL1 en células MDCK.** **A.** Análisis por inmunotransferencia con el anticuerpo 2B12 de la presencia de bigMAL1 endógeno en células de perro y humanas. Se observa la aparición de bandas discretas correspondientes a un tamaño aproximado del doble de bigMAL1, que pueden corresponder a dímeros. m: monómero, d: dímero. **B** Análisis de la formación de oligómeros de bigMAL1 resistentes a SDS. Células MDCK transfectadas establemente con la forma exógena HA-bigMAL1 fueron lisadas en tampón TNE/TX100 y SDS y sometidas a centrifugación de velocidad en gradientes de densidad de sacarosa.

## 8. Distribución subcelular de bigMAL1

El estudio de la localización y distribución subcelular de la proteína endógena se llevó a cabo por técnicas de microscopía de fluorescencia confocal en células fijadas con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Como se puede observar en la **figura 24** en las células MDCK y HepG2, bigMAL1 aparece mayoritariamente en la membrana plasmática, asociada sobre todo a las regiones de contacto célula-célula. La distribución de la proteína endógena en células no transfectadas coincidió con la observada en células que expresaban establemente la proteína de fusión bigMAL1-GFP ó con el epítipo HA (no se muestra), por lo que las formas exógenas reproducen la localización celular de la forma endógena. Además, la inserción del epítipo HA o de la proteína fluorescente no perturba la capacidad de bigMAL1 para su inclusión en rafts (**figura 24 B**).



**Figura 24. Distribución subcelular de bigMAL1 endógeno en células MDCK y HepG2.** A. Células MDCK y HepG2 fueron fijadas con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se analizó la distribución de la proteína bigMAL1 con el anticuerpo monoclonal 2B12 para detectar su localización subcelular. La flecha indica la localización en las membranas de los contactos célula-célula y el asterisco el lumen del canalículo biliar en células HepG2. Barra  $20\ \mu\text{m}$ . B. Análisis por Western blot de la presencia en membranas insolubles en detergentes de las formas, tanto endógenas como exógenas, de bigMAL1 en células humanas HepG2

Para estudiar con mayor detalle la distribución subcelular de la proteína realizamos experimentos de microscopía confocal con doble marcaje. Como se observa en la **figura 25** en células HeLa bigMAL1 se distribuye en la membrana plasmática colocalizando parcialmente con la actina cortical. Se observa que existe un compartimento intracelular perinuclear de bigMAL1 que colocaliza parcialmente con marcadores de la región del aparato de Golgi, como GM130. También existe colocalización con el acúmulo intracelular de caveolina en la zona del Golgi (**figura 25**). No se encontró colocalización de bigMAL1 con marcadores de endosomas tempranos como EEA-1 (**figura 25**) ó de reciclaje como TfR (no mostrado).

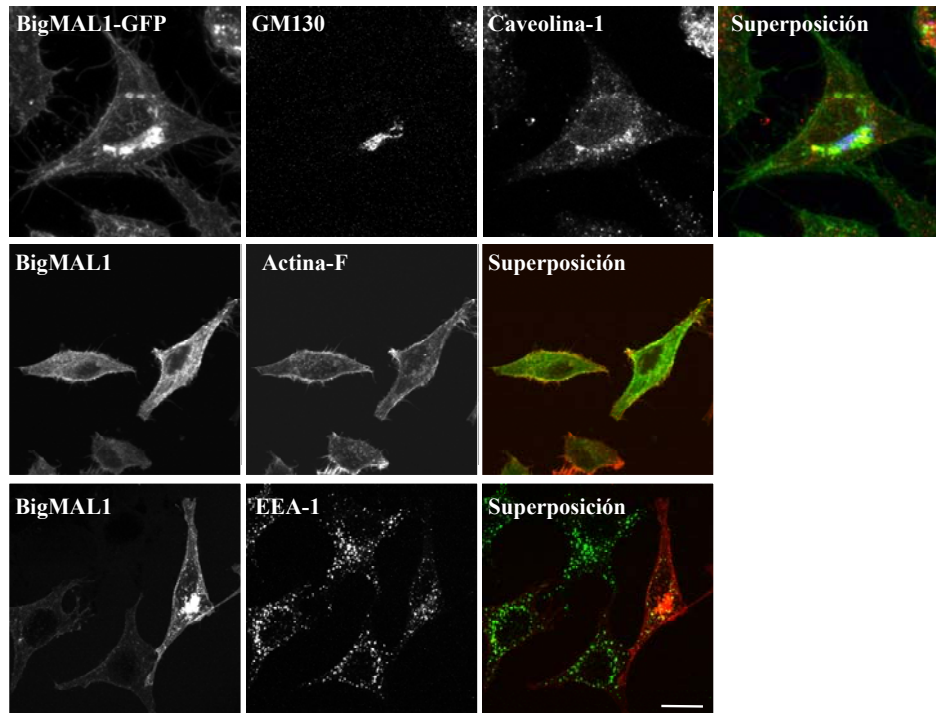
## 9. Caracterización de bigMAL2



### 9.1 Obtención y caracterización de un anticuerpo policlonal frente a bigMAL2 humano

Para iniciar la caracterización de bigMAL2 se utilizó el clon con número de acceso en el genbank BC029306 (*Homo sapiens* clone I.M.A.G.E.:5172276) correspondiente al ADNc del gen “*similar to MYADM*”. Este clon fue secuenciado para comprobar que efectivamente contenía un ADNc completo y que no contenía errores. Posteriormente se amplificó por PCR el ADNc de bigMAL2 con el epítipo myc en fase

en el extremo 5' de su secuencia codificante. El fragmento amplificado se clonó en el vector de expresión eucariota pCR3.1. De manera análoga se realizó una construcción para expresar bigMAL2 como proteína de fusión a GFP en el vector pEGFP-N1.



**Figura 25. Distribución de bigMAL1 con respecto a marcadores de diferentes compartimentos en células HeLa.** Células HeLa transfectadas con las formas bigMAL1-GFP fueron analizadas por inmunofluorescencia con los anticuerpos pAb caveolina 1, mAb GM130 (marcador de Golgi), mAb EEA-1 (marcador de endosomas tempranos), y el reactivo faloidina-TRICT (actina-F). Todas las inmunofluorescencias se analizaron mediante microscopía óptica confocal. El plano horizontal (X-Y) mostrado corresponde a una sección en la zona central de la célula. Barra 20  $\mu\text{m}$ .

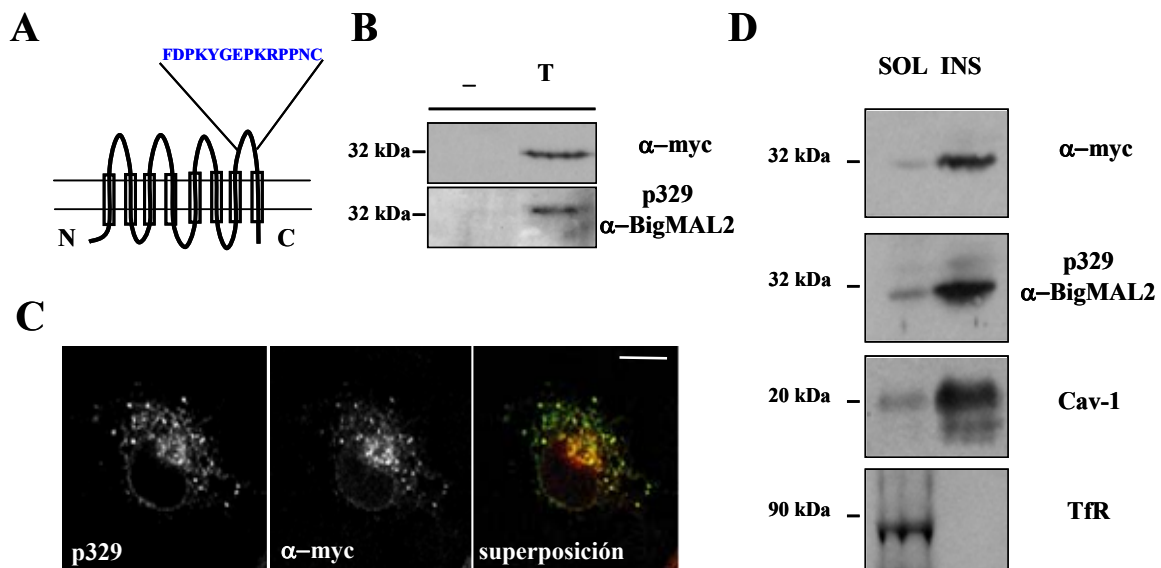
Para la obtención de anticuerpos contra bigMAL2, se utilizó un péptido correspondiente a los aminoácidos entre las posiciones 253 y 267 de la proteína bigMAL2, localizados en el bucle existente entre el sexto y séptimo segmento  $\alpha$ -hélice transmembrana (**figura 26A**). Éste se acopló a KLH y se utilizó para inocular conejos siguiendo protocolos estándar de inmunización. El antisuero reactivo obtenido, al que denominamos p329, reconoció a la proteína myc-bigMAL2 transfectada en células COS-7 con un tamaño aproximado de 32 kDa. La especificidad del antisuero se comprobó tanto por Western blot como por análisis de inmunofluorescencia (**figura 26B y C**). La dificultad para expresar la proteína bigMAL3 de forma exógena en células COS-7 y HeLa ha hecho imposible hasta este momento la obtención de un anticuerpo específico que detecte la proteína endógena. En cambio, la expresión de bigMAL2 exógeno en diferentes



sistemas celulares ha posibilitado un estudio inicial de esta proteína y la obtención de anticuerpos específicos contra bigMAL2.

## 9.2 La proteína bigMAL2 está asociada a los microdominios de membrana

El análisis de fracciones de fracciones enriquecidas en “rafts” aisladas de diversas líneas celulares transfectadas con myc-bigMAL2 mostró que también se encuentra asociada a microdominios de membrana, como se observa en la **figura 26D**.

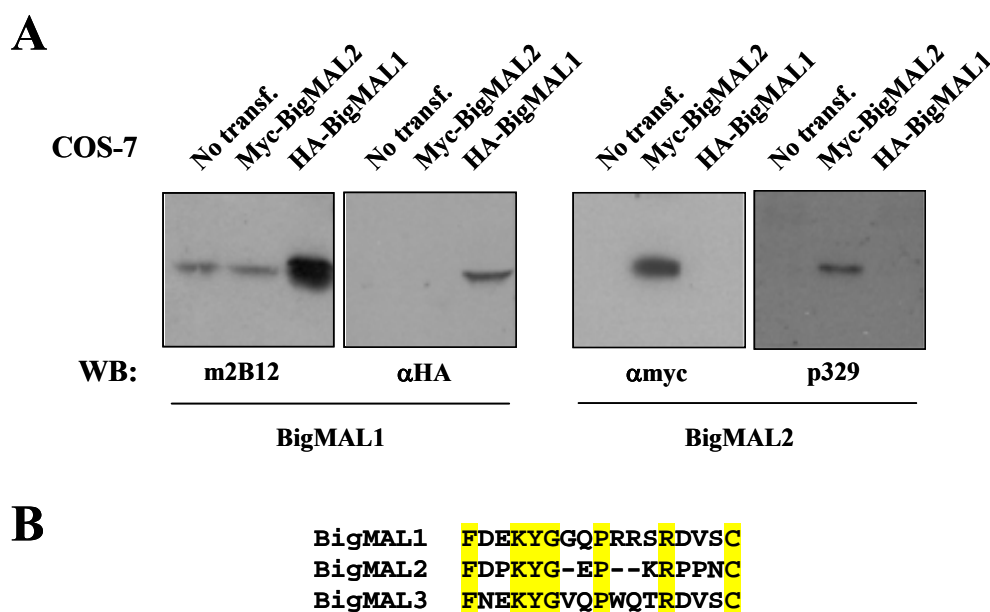


**Figura 26. Caracterización de un nuevo anticuerpo policlonal contra la proteína bigMAL2 humana. A.** Representación esquemática de la estructura predicha para la proteína bigMAL2 donde se indica la posición y secuencia del péptido utilizado para la obtención del anticuerpo. **B.** Caracterización del suero policlonal, p329, anti bigMAL2 por inmunotransferencia. Células COS-7 sin transfectar o transfectadas con la forma exógena myc-bigMAL2 fueron analizadas a las 48 horas con el pAb 329 y con el mAb 9E10 que reconoce el epítipo myc. **C.** Detección por inmunofluorescencia de la proteína bigMAL2. Células COS-7 fueron transfectadas con la forma exógena myc-bigMAL2 fijadas a las 48 horas y analizadas por inmunofluorescencia por doble marcaje con los anticuerpos mAb 9E10 y p329. **D.** Identificación de bigMAL2 en fracciones de rafts de células COS-7. Células transfectadas con la forma exógena myc-bigMAL2 fueron lisadas en tampón TNE con TX100 1% a 4°C y después sometidas a centrifugación de equilibrio en gradiente de densidad discontinuos. Se recogieron dos fracciones, una fracción de proteínas solubles en Tritón X-100 (SOL) y otra insoluble que contenía las membranas resistentes al detergente (INS). Aliquotas de cada fracción fueron analizadas por Western blot con los anticuerpos, mAb 9E10 (myc), p329 (bigMAL2 humano), pAb caveolina- 1 y mAb TfR. Barra 20µm.

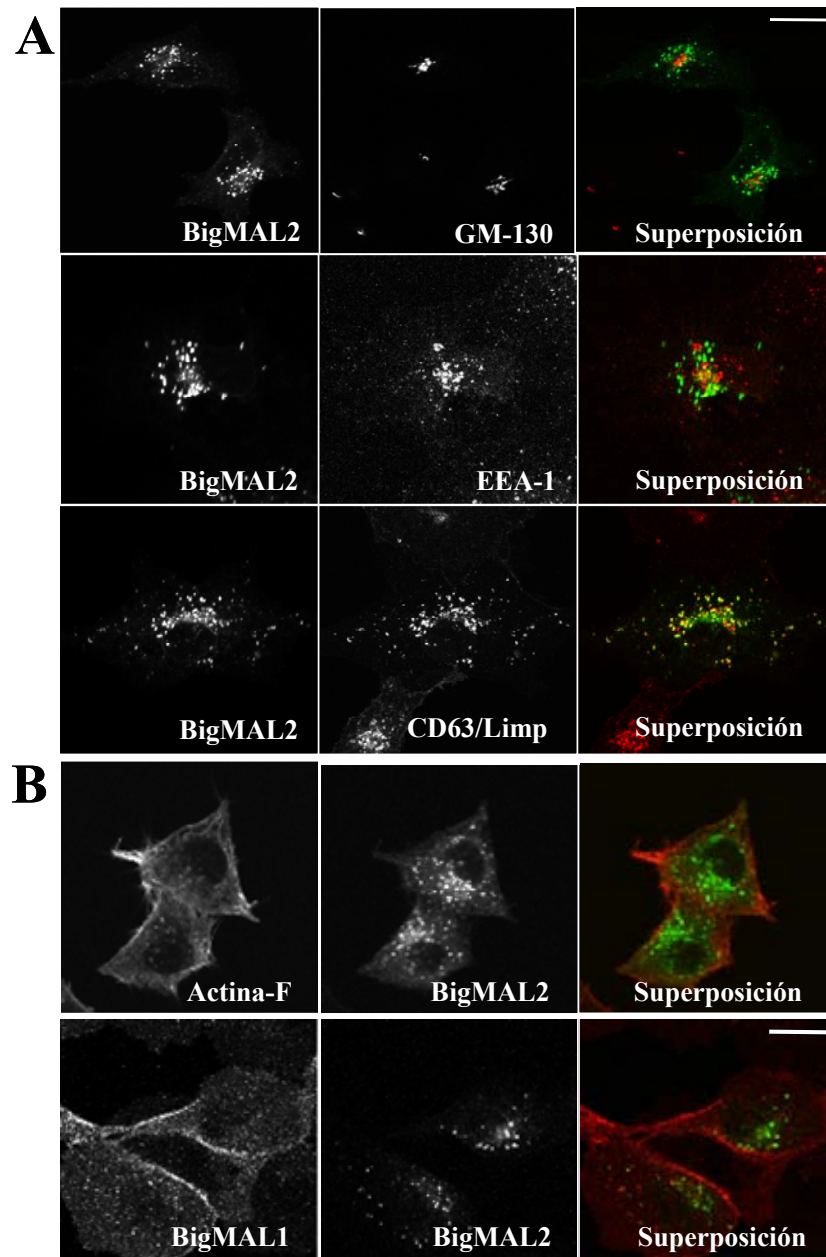
Se comprobó que los anticuerpos que habían sido generados para bigMAL1 y bigMAL2, mAb 2B12 y p329, eran específicos para cada proteína respectivamente ya que aunque los péptidos utilizados corresponden a regiones homólogas en las secuencias de ambas proteínas como se observa en la **figura 27B**, son lo suficientemente diferentes para que no se produzca un reconocimiento cruzado (**figura 27A**).

## 9.2 La proteína bigMAL2 se encuentra en vesículas intracelulares que colocalizan con marcadores lisosomales.

Mediante el establecimiento de transfectantes estables de bigMAL2 en varios tipos celulares distintos se estudió la distribución subcelular de bigMAL2. En células COS-7, HeLa y HepG2, se observa que bigMAL2 posee una distribución intracelular en vesículas repartidas y dispersas en el citoplasma. En HeLa (**figura 28A**), dichas vesículas colocalizan con el marcador lisosomal CD63, pero no con el marcador de endosomas tempranos EEA-1 ni con la proteína de Golgi, GM-130 (**figura 28A**). Tampoco se observó colocalización con la red de endosomas de reciclaje mediante el doble marcaje con TfR (no mostrado). Se comprobó que tampoco aparecía asociada a la membrana plasmática como se observa en un doble marcaje para bigMAL2 y faloidina que tiñe el citoesqueleto de actina (actina F) (**figura 28B**). La localización subcelular de bigMAL2 en relación a bigMAL1, que se localiza más en la membrana, es diferente en todas las líneas celulares analizadas ocupando compartimentos intracelulares diferentes (**figura 28B**).



**Figura 27. Especificidad de los anticuerpos mAb 2B12 y pAb 329.** A. Células COS-7 fueron transfectadas con las formas exógenas HA-bigMAL1 y myc-bigMAL2 y tras 48 horas se lisaron con tampón TNE con TX100 y se obtuvieron fracciones de membrana insolubles en TX100. Se analizó por Western blot cada fracción con los anticuerpos mAb 2B12 (bigMAL1), pAb 329 (bigMAL2), mAb 9E10 (myc) y mAb 12CA5 (HA). B. Alineamiento de las secuencias de bigMAL1, bigMAL2 y bigMAL3 en la región correspondientes a los péptidos utilizados para la obtención de los anticuerpos. En amarillo se muestra los aminoácidos conservados en esa región.



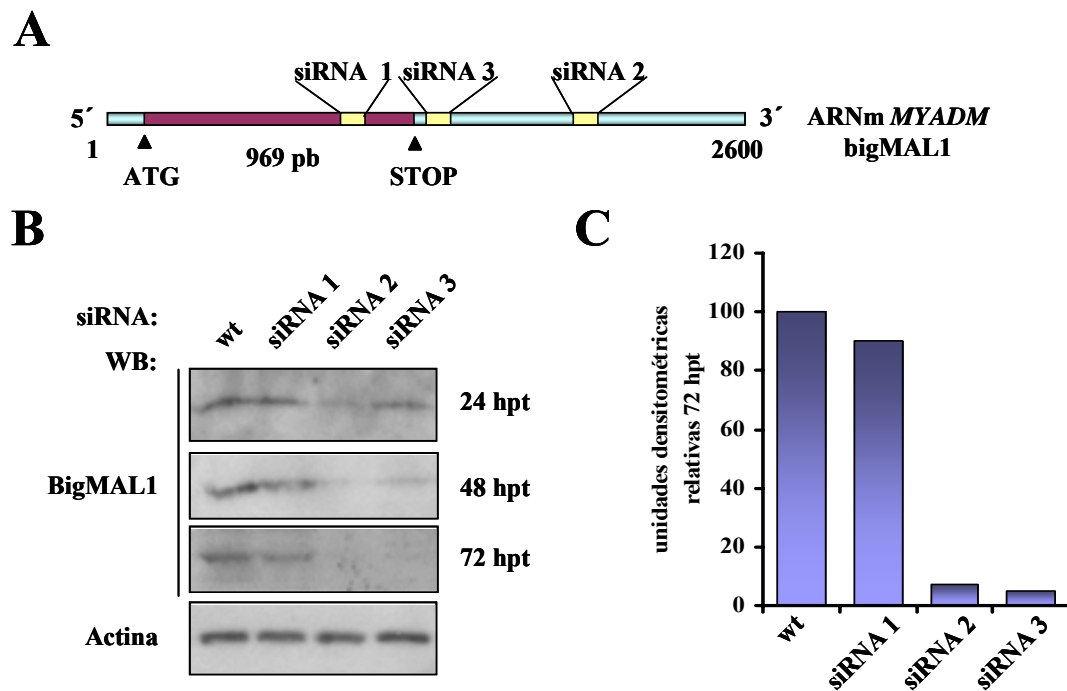
**Figura 28. A. Distribución de bigMAL2 con respecto a marcadores de diferentes compartimentos en células HeLa.** Células HeLa transfectadas con la forma myc-bigMAL2 fueron analizadas por inmunofluorescencia realizando dobles marcajes con los anticuerpos pAb 329 (bigMAL2) y los anticuerpos mAb GM-130 (marcador de Golgi), mAb EEA-1 (marcador de endosomas tempranos) y mAb CD63/limp (marcador de lisosomas). Todas las inmunofluorescencias se analizaron mediante microscopía óptica confocal. El plano horizontal (X-Y) mostrado corresponde a una sección en la mitad de la célula. Barra 20  $\mu\text{m}$ . **B.** Distribución de bigMAL2 con respecto bigMAL1 y actina. Células HeLa transfectadas con las formas exógenas myc-bigMAL2 y HA-bigMAL1 fueron analizadas por inmunofluorescencia por doble marcaje con el anticuerpo p329 (bigMAL2) y el reactivo faloidina-TRICTC que marca la actina-F ó el mAb 2B12 (bigMAL1). Barra 20  $\mu\text{m}$ .

---

La obtención del anticuerpo monoclonal 2B12, que reconoce específicamente la proteína endógena bigMAL1, nos permitía abordar estudios con mayor profundidad en relación a su función, distribución y sus características distintivas con respecto a los demás miembros de la familia MAL. La proteína bigMAL1 es el miembro de mayor tamaño dentro de la familia MAL y la única proteína descrita con dos dominios MARVEL y también es, junto a bigMAL2 uno de los miembros de la familia presente de forma constitutiva en todas las líneas celulares analizadas por nuestro grupo. De forma diferencial a bigMAL2 y bigMAL3, bigMAL1 presenta una distribución subcelular distinta, con una mayor presencia en la membrana plasmática.

#### **10. Eliminación selectiva de la proteína bigMAL1 mediante siRNA.**

Se decidió llevar a cabo una estrategia basada en la tecnología del RNA de interferencia (RNAi) para disminuir los niveles de la proteína bigMAL1 humana endógena con el objetivo de estudiar qué efectos se producen en las células deplecionadas. Se diseñaron tres oligos de siRNA de 19 nucleótidos específicos contra regiones diferentes del mRNA de bigMAL1 humano (**Figura 29A**). Dos de ellos hibridan con la región 3' no traducida (siRNA 2 y siRNA3) y el otro hibrida en una región interna de la secuencia codificante del mRNA (siRNA 1). La transfección de estos oligos en células HeLa, desde 24 h y hasta 72 h postransfección, dió lugar a la disminución de más de un 90% de los niveles endógenos de bigMAL1 en el caso del siRNA 2 y 3, con respecto a las células no transfectadas. En el caso del siRNA1, aunque hibrida con el mRNA de bigMAL1, no resultó eficiente en la depleción de la proteína (**figura 29Ay B**). Como se muestra en la **figura 29A** no se afectaron los niveles de otras proteínas como actina, utilizadas además como control de carga.

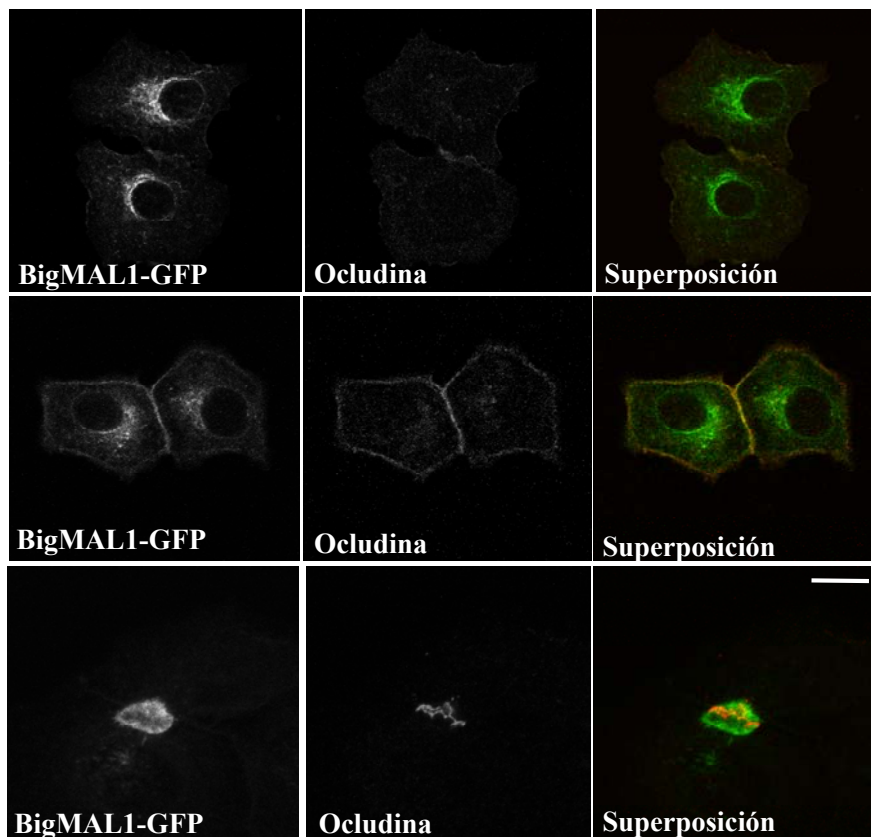


**Figura 29. Eliminación de la proteína bigMAL1 endógena por transfección de siRNA específicos.** A. Esquema del RNA mensajero de bigMAL1 en el que se muestra la localización en la que hibridan los distintos siRNA que fueron diseñados para interferir la expresión de bigMAL1. B. Las células HeLa fueron transfectadas con los 3 siRNA y lisadas a 24, 48 y 72 horas para monitorizar la eliminación de la proteína bigMAL1 endógena cuyos niveles fueron analizados por inmunotransferencia con el mAb 2B12 y el mAb anti-actina. C. Cuantificación por densitometría de la disminución de bigMAL1 tras 72 horas.

## 11. La proteína bigMAL1 en HepG2.

HepG2 es una línea celular polarizada que posee la capacidad de especializar su membrana apical en una estructura que se asemeja al canalículo biliar hepático. Aproximadamente el 20 % de las células HepG2 que crecen en cultivo forman el canalículo biliar. Esto nos permitía estudiar la localización subcelular de bigMAL1 tanto en la población polarizada como no polarizada de células HepG2. Dicho estudio mostró que bigMAL1 puede aparecer en un compartimento intracelular perinuclear en la población de células que no forman el canalículo, además de una localización en la membrana plasmática de las células que están contactando (**figura 24 y 30**). Mediante experimentos de microscopía confocal se observa que cuando las células contactadas forman el canalículo biliar, por especialización de su membrana apical, la localización de bigMAL1-GFP se hace también completamente apical, colocalizando con proteínas como la ocludina, una proteína con un dominio MARVEL y que forma parte de la estructura de las uniones adherentes (**figura 30**). También colocaliza con F-actina

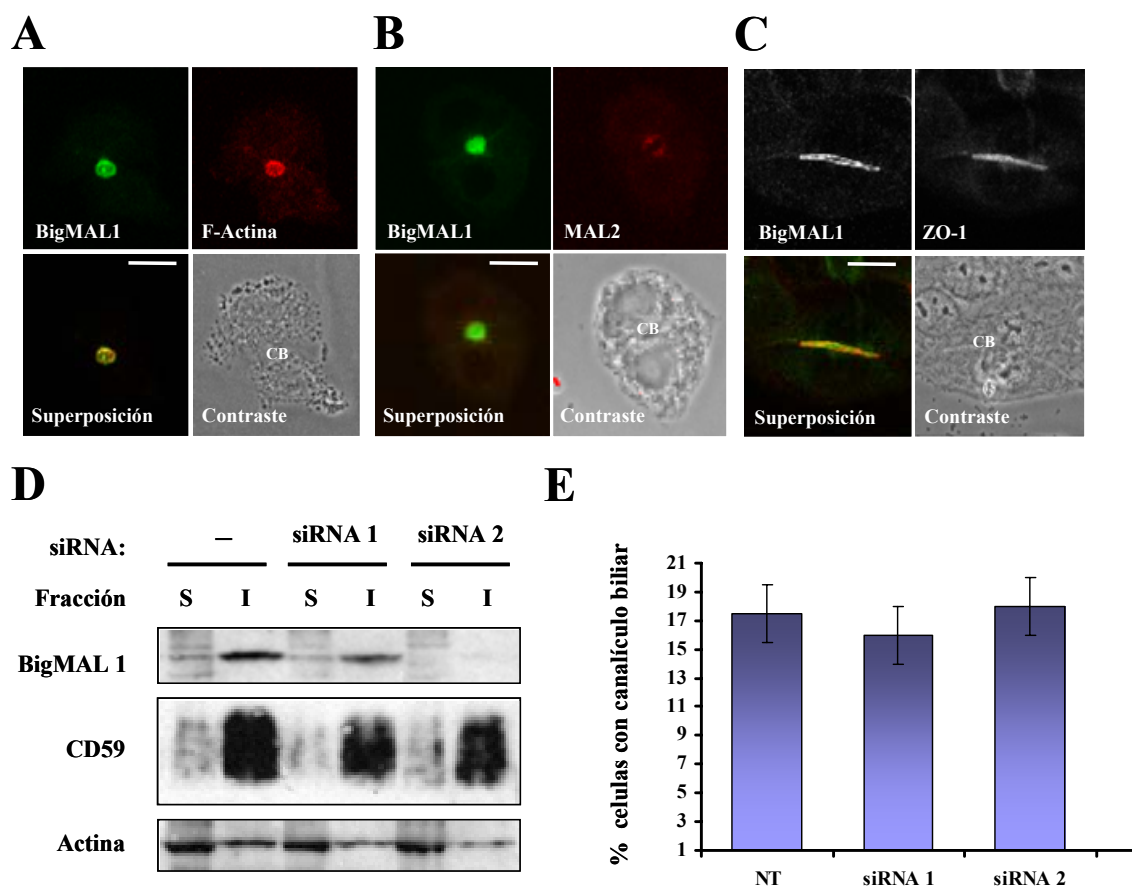
(figura 31A) y con respecto a MAL2, perteneciente a la familia MAL y que se encuentra presente en el compartimento subapical (SAC), bigMAL1 accede más a la membrana del canalículo biliar (figura 31B), donde también se observa el alto grado de localización de bigMAL1 con ZO-1 (figura 31C), un marcador de uniones adherentes que separa los compartimentos apical y basolateral



**Figura 30. Distribución subcelular de bigMAL1 en células HepG2.** Células HepG2 transfectadas establemente con la proteína bigMAL1-GFP fueron fijadas y analizadas por inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal anti-occludina que marca las uniones estrechas entre dos células polarizadas. En el panel superior se muestra la localización subcelular de ambas proteínas en células no polarizadas. En el panel intermedio e inferior se muestra la distribución en células que han contactado y que se han polarizado respectivamente. Barra 20  $\mu$ m.

(figura 31C). La localización apical observada de bigMAL1 en células HepG2, sugerían un posible papel en la biogénesis del canalículo biliar y/o en los procesos de tráfico apical mediado por “rafts”. Se analizó su implicación en la formación de esta estructura mediante el empleo de ARNi. La eliminación selectiva de la proteína endógena en estas células no tuvo ningún efecto en la capacidad para formar el canalículo biliar (figura 31 D y E). La distribución subcelular de marcadores apicales

como F-actina, CD59 o MAL2 tampoco se vio afectada. Tampoco se observaron diferencias en la distribución subcelular de MAL2 (no se muestra). Puesto que el canalículo se forma correctamente en ausencia de bigMAL1, se analizó la funcionalidad de éste mediante experimentos de transcitosis. Estos, se llevaron a cabo marcando con anticuerpos específicos contra determinadas proteínas basolaterales que, tras su internalización alcanzan la membrana apical o canalicular. Proteínas cargo como CD59, aminopeptidasa N (APN) o nucleotidasa (5'NT), que en situación control son transportadas al canalículo mediante esta ruta indirecta o de transcitosis no se vieron



**Figura 41. Distribución de bigMAL1 con respecto a marcadores de diferentes compartimentos en células HepG2.** Células HepG2 transfectadas con la proteína bigMAL1GFP fueron analizadas por inmunofluorescencia con los anticuerpos mAb 9D1 (MAL2) **A**, pAb ZO-1 (uniones estrechas) **B** y el reactivo faloidina-TRICT (actina-F) **C**. Los análisis se hicieron mediante microscopía óptica confocal. El plano horizontal (X-Y) mostrado corresponde a una sección en la mitad de la célula. Barra 20  $\mu$ m. **D**. Eliminación de bigMAL1 endógeno en células HepG2. Células HepG2 no transfectadas y transfectadas con siRNA 1 y 2 fueron lisadas en tampón TNE Tritón X-100 1 % para obtener fracciones de membranas insolubles. Alícuotas de estas fracciones fueron analizadas por Western Blot para detectar bigMAL1, CD59 y actina. **E**. Cuantificación del porcentaje de canalículos en las células HepG2 tras la eliminación de bigMAL1.

afectadas en su tráfico en ausencia de bigMAL1 (no mostrado). Nuestros datos en

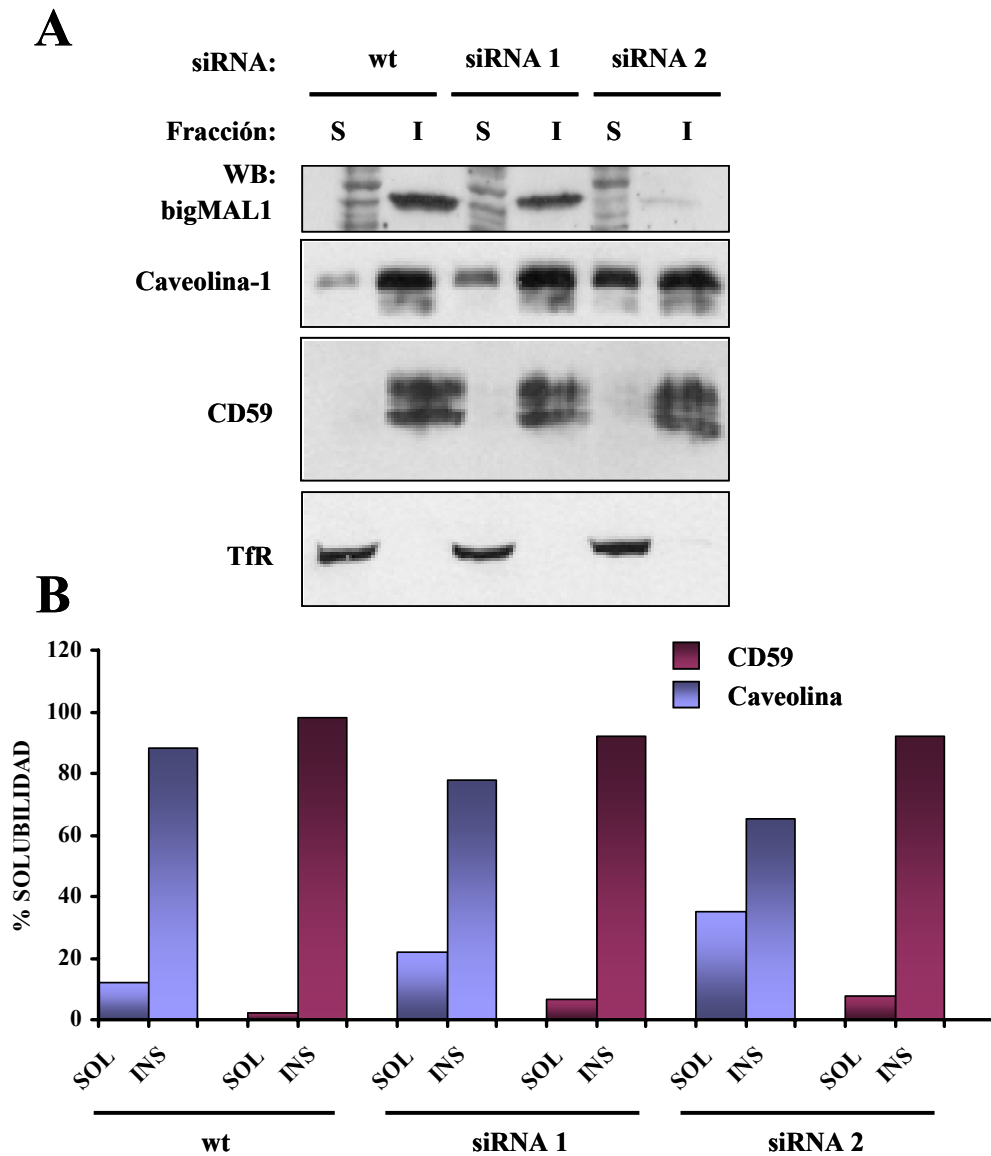
---

conjunto indican que la inhibición de la expresión de bigMAL1 en HepG2 no afecta a la polaridad de dichas células, ni a nivel de la biogénesis del canalículo ni a nivel del transporte transcitótico, lo que sugiere que bigMAL1 y MAL2 tienen diferentes funciones.

## **12. Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre los microdominios de membrana en células HeLa**

Nuestro siguiente modelo celular de estudio celular fue células no polarizadas HeLa. Puesto que bigMAL1 es un miembro residente exclusivo de los microdominios de membrana, se analizó qué efecto tenía la eliminación de la proteína endógena sobre las balsas lipídicas. Se aislaron membranas insolubles en detergentes por ultracentrifugación en gradientes discontinuos, tanto de células control como deplecionadas de bigMAL1, y se examinó la composición e integridad de los microdominios de membrana. En ausencia de bigMAL1, se produjo un aumento del 20 %, como valor medio, de caveolina en la fracción soluble de membrana (no rafts), con la consiguiente disminución de esta proteína en la fase insoluble (rafts). Este efecto sobre la caveolina parece ser específico, ya que otras proteínas que residen en microdominios como la flotilina (no mostrado) y la proteína anclada a la membrana por GPI, CD59 no se vieron afectadas su presencia en las membranas insolubles (**Figura 32A y B**). Se estudió también el posible efecto sobre la distribución intracelular de la caveolina. El paso de la caveolina desde fracciones insolubles a las fracciones solubles en detergente, debido a la disminución de los niveles de bigMAL1, no afectó a su localización subcelular ya que se observa que la caveolina ocupa un compartimento intracelular perinuclear en la región Golgi y en vesículas repartidas por el citoplasma independientemente de los niveles de bigMAL1 (no mostrado) Como se ha mostrado con anterioridad, la caveolina puede formar heteroligómeros. El análisis del grado de oligomerización de la caveolina no se vió alterado por la depleción de bigMAL1 (no mostrado).



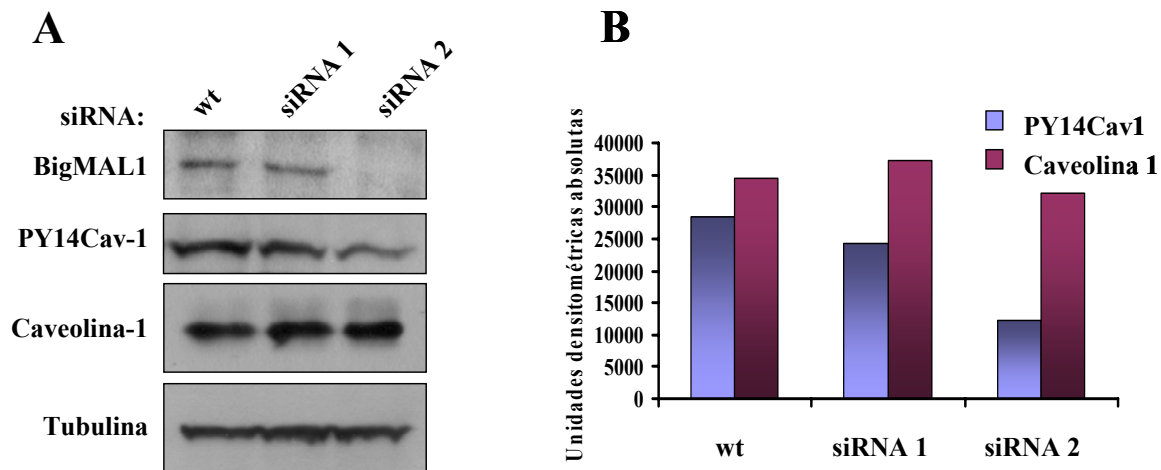


**Figura 32. Efecto de la eliminación de bigMAL1 endógena sobre proteínas asociadas a los microdominios de membrana.** **A.** Células HeLa no transfectadas y transfectadas con los siRNA1 y 2 fueron lisadas a 48 horas y sometidas a gradientes discontinuos para obtener membranas enriquecidas en rafts. Después se analizó la distribución por Western Blot de proteínas asociadas o no a microdominios lipídicos con los anticuerpos pAb cav-1, mAb CD59 y mAb TfR. **B** Cuantificación del efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre la presencia en membranas insolubles de caveolina-1 y CD59.

### 13. Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre la fosforilación de la caveolina

Se ha descrito que la caveolina se puede fosforilar en distintos aminoácidos (Caselli et al., 2001). La fosforilación en el residuo de tirosina 14, promueve su localización en las adhesiones focales que se forman en la membrana plasmática (del

Pozo et al., 2005; Grande-Garcia et al., 2007), al igual que lo hacen las proteínas que conforman la estructura de dichas adhesiones focales, como la paxilina o la quinasa de adhesión focal (FAK). Como se puede observar en la **figura 33A y B**, la depleción de



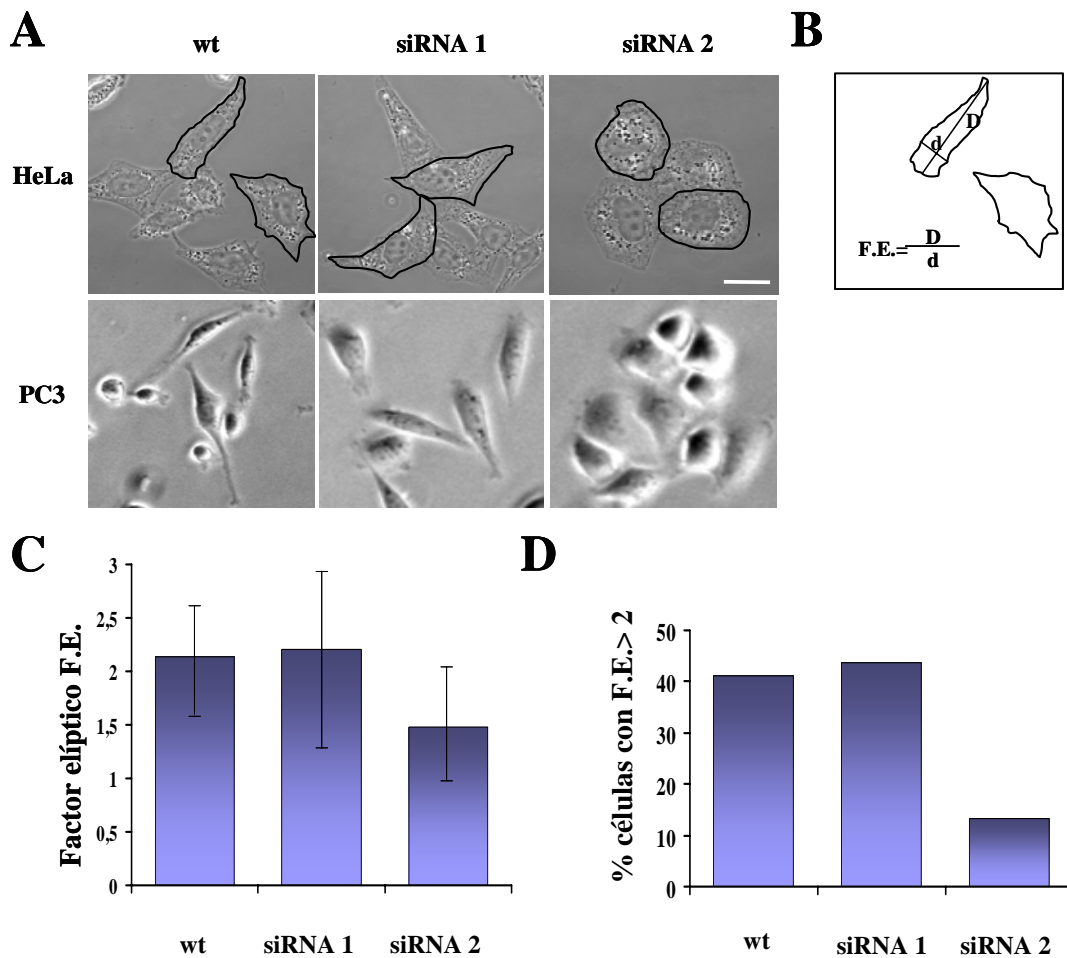
**Figura 33. Efecto de la eliminación de bigMAL1 endógena sobre la fosforilación de caveolina-1.** A. Células HeLa no transfectadas y transfectadas con los siRNA1 y 2 fueron lisadas a 48 horas y se analizaron los niveles de caveolina-1 fosforilada en el residuo Y14, caveolina total y tubulina por inmunotransferencia tras la eliminación de bigMAL1. B Cuantificación por densitometría de los niveles de caveolina fosforilada y total en un experimento representativo.

bigMAL1 endógeno, provocó una disminución de la fosforilación de la caveolina en Tyr 14, sin afectar a los niveles totales de caveolina.

#### 14. Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre la morfología celular de HeLa y PC3

El análisis por inmunofluorescencia de células HeLa y PC3 con niveles disminuidos de bigMAL1, mostró que la morfología celular estaba afectada como se observa en las imágenes tomadas por microscopía con contraste de fase en la **figura 34A**. Las células transfectadas con el siRNA 2 con niveles reducidos de bigMAL1 adquieren una forma redondeada perdiendo la forma alargada característica de estas células. Este efecto, que se produce por la eliminación de la proteína endógena, es opuesto al observado por sobreexpresión de la forma exógena, en el que se produce un aumento del número y longitud de protusiones de las células HeLa. Con el objetivo de cuantificar el cambio de forma observado, se calculó el Factor Elíptico celular (ó factor de forma) (F.E.). Éste se define como la relación existente entre la longitud del eje mayor y la longitud del eje menor de una célula (**figura 34B**). En la gráfica de la **figura**

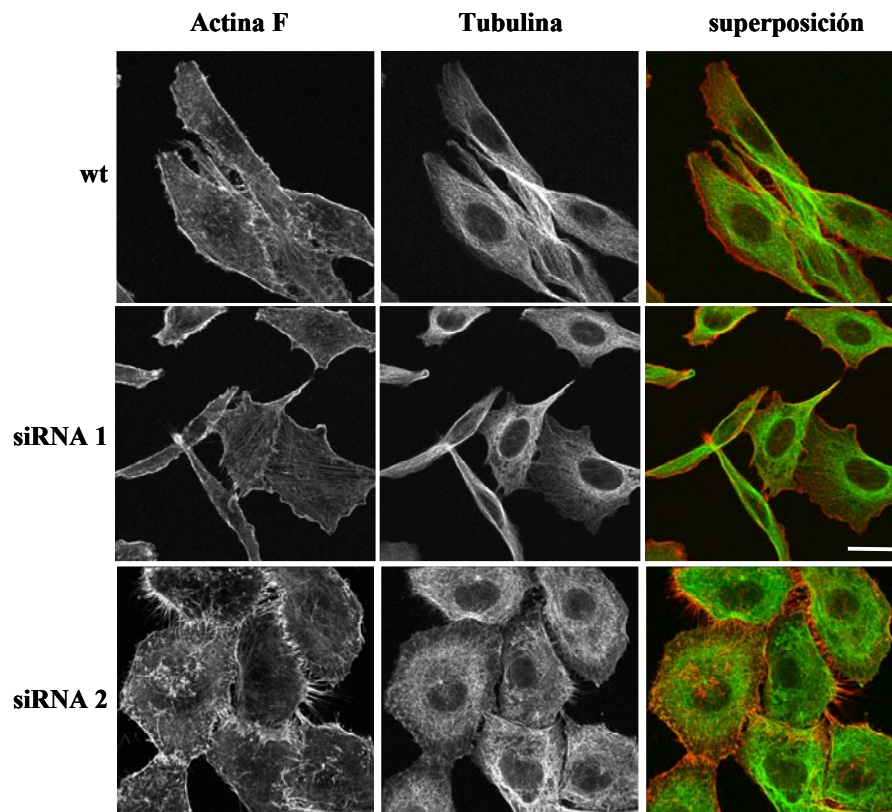
**34C**, se muestra el valor del F.E. que se ha calculado para células HeLa en las 3 condiciones. Las células no transfectadas o transfectadas con siRNA 1 poseen los valores más altos de F.E., que como media tiene un valor de 2, y por tanto corresponde a una forma celular alargada. Las células con niveles reducidos de bigMAL1 poseen un F.E. cercano a 1.5, lo que significa que se acercan más a una forma esférica. Con respecto a las células deplecionadas, las no transfectadas o transfectadas con siRNA1



**Figura 34. Efecto de la eliminación de bigMAL1 endógena sobre la morfología de células HeLa. A.** Inmunofluorescencias por contraste de fase de células HeLa y PC3 no transfectadas y transfectadas con los siRNA1 y 2. **B** Esquema de la medida del factor elíptico celular (F.E.) calculado para las células HeLa **C.** Cuantificación del F.E. en las tres condiciones anteriores (HeLa wt n=105, siRNA1, n=111 y siRNA2 n=132). **D.** Cuantificación del porcentaje de células HeLa con F.E. > 2 en los tres condiciones. Barra 20  $\mu$ m.

presentan una mayor dispersión en el valor de F.E. ya que se encontró gran variabilidad en su morfología celular. El porcentaje de células con un factor elíptico mayor de 2 es inferior en el caso de las células deplecionadas como se observa en la **figura 34D**.

Se llevó a cabo la tinción de actina y tubulina para examinar si los cambios en la morfología celular iban acompañados de cambios en el citoesqueleto o microtúbulos. Como se ve en la **figura 35**, la eliminación de bigMAL1 endógeno en PC3, provoca un cambio en la organización de las estructuras de actina en las células tratadas con siRNA2. En estas células la actina aparece organizada en estructuras semejantes a los microvilli.

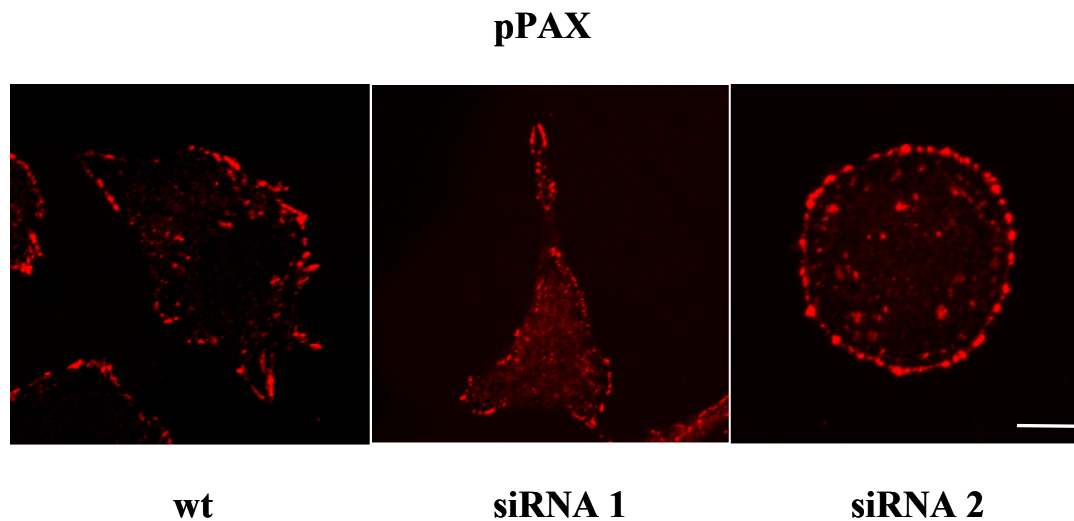


**Figura 35.** Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre el citoesqueleto de actina y tubulina en células PC3. Inmunofluorescencias dobles de F-actina y tubulina en células PC3 no transfectadas y transfectadas con los siRNA1 y 2. Barra 20  $\mu\text{m}$ .

Los cambios en la morfología de la célula y la organización del citoesqueleto de actina mediados por la inhibición de la expresión de bigMAL1, se observan tanto en células HeLa (no se muestra) como en PC3 (**figura 35**). Dado que las células HeLa sólo expresan bigMAL1 y bigMAL2 mientras que PC3 expresan además de los 3 miembros de la subfamilia bigMAL, otros miembros de la familia MAL, como MAL, MAL2 y BENE (Llorente et al., 2004), nuestros datos indican que no existe redundancia de bigMAL1 con otros miembros de la familia MAL de proteolípidos.

Estos cambios en la morfología celular no son debidos a defectos en adhesión ni a alteraciones en las adhesiones focales ya que no se observaron diferencias ni en la

cinética de adhesión sobre plástico ó fibronectina (FN) (*no mostrado*) ni en la localización subcelular de proteínas de adhesiones focales como vinculina, paxilina y fosfo-paxilina (pPAX) (**figura 36**).



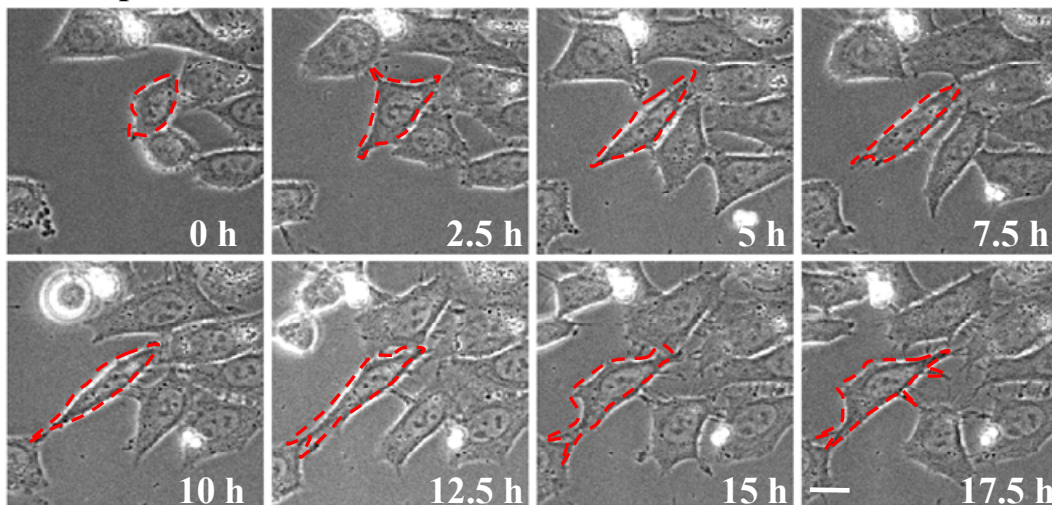
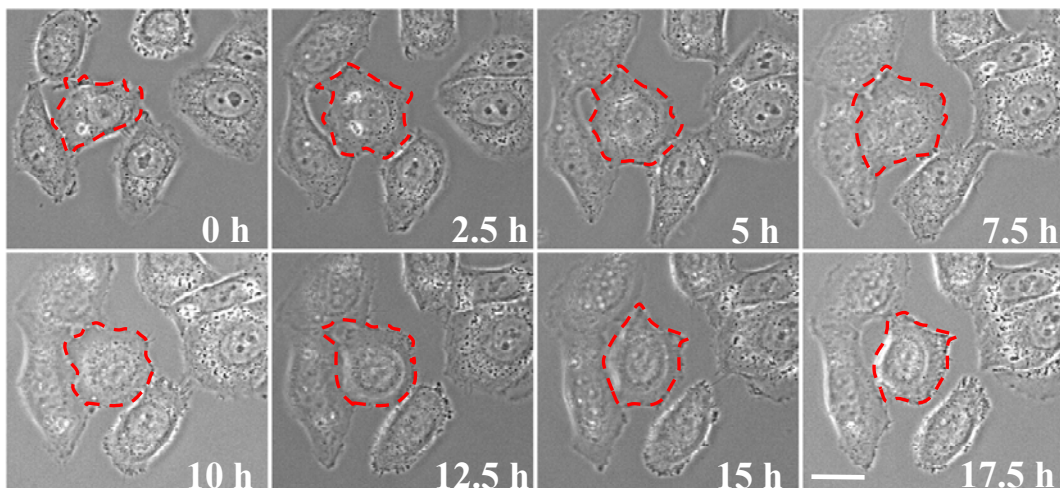
**Figura 36.** Efecto de la eliminación de bigMAL1 endógena sobre las adhesiones focales Distribución subcelular de fosfo-paxilina en células control y tratadas con siRNA 1 y 2. Barra 10  $\mu$ m.

#### **14. Generación y caracterización de clones estables de células HeLa pSUPER-shRNA-bigMAL1 con niveles disminuidos de bigMAL1.**

Quisimos obtener clones de células HeLa establemente deplecionados de bigMAL1, para lo que llevamos a cabo la clonación de un pequeño fragmento de ADN, que contenía la secuencia del oligo siRNA 2 que habíamos utilizado como ARN de interferencia, en el plásmido de interferencia eucariótica pSUPER. Como plásmido control se realizó una construcción similar que portaba la secuencia del oligo siRNA 1. Ambas construcciones se transfectaron y se seleccionaron aquellos clones con los niveles disminuidos de bigMAL1 endógeno. De esta manera se obtuvieron 2 clones que denominamos shRNA1 y shRNA2. Las células HeLa shRNA2, establemente deplecionadas de bigMAL1, son viables y reproducen las anomalías observadas en las células que habían sido transfectadas de forma transitoria mediante siRNA. Se comprobó que también poseen una forma celular redondeada y que la caveolina, aparece en la fase soluble en un porcentaje mayor que en las células control. La generación de estos clones estables nos permitió llevar a cabo estudios para determinar si bigMAL1 estaba implicada en motilidad celular. Para ello se filmaron células HeLa shRNA2 y shRNA1 durante 12h para observar la dinámica del movimiento aleatorio.

En la **figura 37A y B**, se muestra la reconstrucción de dos experimentos de videomicroscopía a distintos intervalos de tiempo, en el que se observa el desplazamiento de varias células. En el caso de células shRNA1 se observa cómo esta célula se va alargando y se va desplazando por el sustrato (marcada con línea de puntos rojos). Para ello, la célula emite prolongaciones de su membrana o lamelipodios. En cambio, durante la filmación de células HeLa shRNA2, en ausencia de bigMAL1, se observa que en el mismo intervalo de tiempo, la célula marcada no emite apenas prolongaciones alargadas por tanto no cambia de posición ni tampoco cambia sustancialmente de forma.

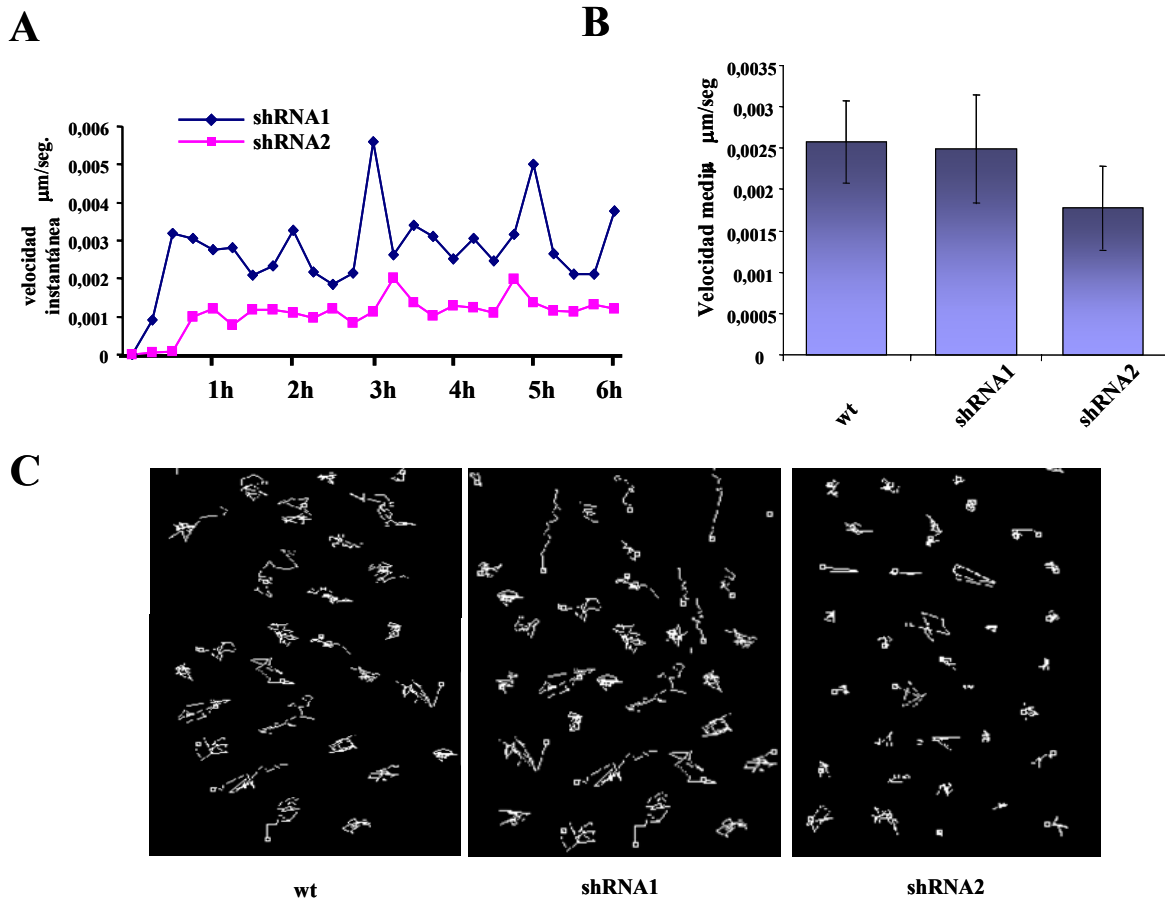
Se calculó la velocidad a la que migran las células en ambas condiciones. Estableciendo como unidad medible el área del centroide formado por cada célula, se pudo seguir el movimiento de células individuales en cada plano tomado en la filmación a distintos tiempos. En la **figura 38A** se muestra la velocidad instantánea durante las 6 horas del experimento y en la **figura 38B** se determinó el valor de velocidad media para cada célula analizada, independiente de la trayectoria seguida por ésta. También se midieron las trayectorias seguidas por un número representativo de cada célula en las tres condiciones como se muestra en los paneles de la **figura 38C**.

**HeLa pSUPER-shRNA 1****HeLa pSUPER-shRNA 2**

**Figura 37. Video-microscopía de células HeLa transfectadas con shRNA1 y shRNA2.** Células HeLa fueron filmadas a intervalos de 15 min durante 17,5 horas para observar la migración aleatoria. Mediante una línea de contorno roja se marca una célula a través de todo el video. Se muestran 8 instantáneas de las 72 imágenes que componen el video completo. Barra 10  $\mu$ m.

Sometimos a células HeLa shRNA2 establemente deplecionadas a transfecciones transitorias con una construcción fluorescente bigMAL1-roja, con objeto de rescatar el fenotipo de células alargadas. Esto, se pudo llevar a cabo ya que la construcción fluorescente roja en el plásmido no contiene la secuencia 3' no traducida y por tanto no se afectada por la transfección de shRNA2. Como se observa en la **figura 39**, las células reconstituidas que expresan recuperan el fenotipo alargado.

La pérdida de la forma alargada de las células HeLa, al tratarlas con siRNA2, nos llevó a analizar si la proteína bigMAL1 estaba implicada en los procesos de formación de polaridad celular. En respuesta a determinados estímulos como el cierre de una



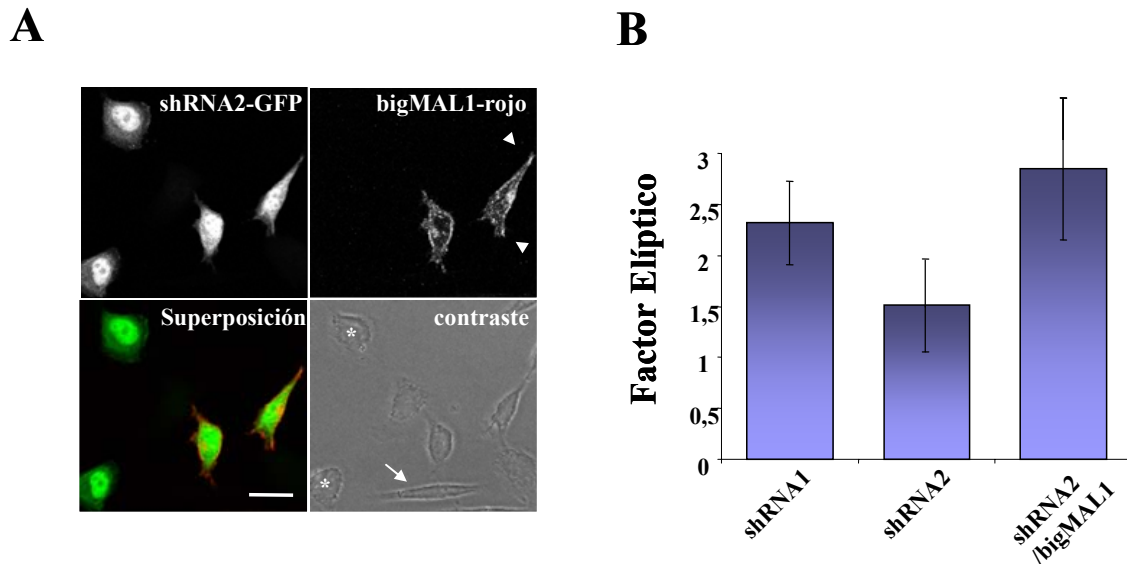
**Figura 38.** Efecto de la eliminación de bigMAL1 endógena sobre la velocidad de migración en células HeLa. **A.** Cuantificación de la velocidad instantánea en 53 células para cada caso pertenecientes al mismo experimento. **B.** Cuantificación de la velocidad media de migración durante 6 horas en las 3 condiciones. (shRNA1 n=151 y shRNA2 n=166 correspondientes a tres experimentos independientes) **C.** Paneles que muestran las trayectorias seguidas por las células transfectadas con shRNA1 y shRNA2 durante 6 horas una vez adheridas al sustrato.

herida en una monocapa celular, se produce la reorientación del aparato de Golgi y del Centro Organizador de Microtúbulos (MTOC). Mediante ensayos de cicatrización de herida, realizados sobre células control y deplecionadas, examinamos la reorientación del Golgi. Para ello, las células crecidas en monocapas hasta confluencia, fueron analizadas por microscopía confocal de fluorescencia, después de 4, 8, 12 y 24 horas tras realizar la herida. Se analizó la posición de proteínas marcadoras del aparato del Golgi, como 58K o GM130, y se comprobó que se reorientan de manera similar hacia la herida, tanto en células con niveles normales como disminuidos de bigMAL1 (no mostrado).

La direccionalidad en la migración tampoco se vio afectada tras la reducción de bigMAL1 en células PC3 que en condiciones normales presentan mayor motilidad que

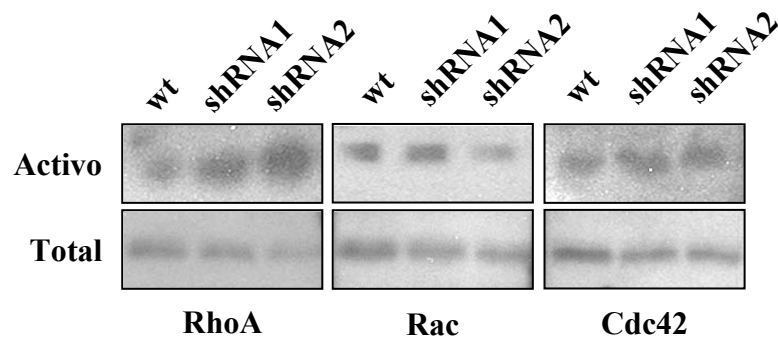


las células HeLa. En estos ensayos quedó patente el cambio de morfología celular pero sin que esto impida el cierre de la herida (no se muestra).



**Figura 39. Rescate del fenotipo de morfología alargada en células HeLa pSuper-shRNA2** inmunofluorescencia que muestra la expresión de una construcción de bigMAL1-roja que resiste la inhibición de su expresión por RNAi ya que éste hibrida con la región 3' no traducida del mRNA de bigMAL1.

Utilizamos la línea celular humana DU145, a que a diferencia de PC3, forma uniones celulares estables (Adherens junctions). Las células DU145 responden a HGF (Hepatocyte Growth factor ó scattering factor) por lo que pueden deshacer las uniones celulares y dispersarse, adquiriendo un fenotipo alargado o migratorio. No se observaron diferencias en la migración por dispersión (o Scattering) debida a la disminución de los niveles de bigMAL1, por lo que concluimos que bigMAL1 no está implicada en este proceso. Los cambios en la morfología celular observados tras la eliminación de bigMAL1 sugerían que el estado de activación de las GTPasas de la familia Rho podía estar afectado. Mediante ensayos de arrastre (pull down) en la línea HeLa y en los clones shRNA1 y shRNA2 se comprobó que la actividad basal de Rac está disminuida a niveles totales constantes de ésta en ausencia de bigMAL1 y la de RhoA está aumentada en la mismas condiciones, mientras que la de Cdc42 no se encuentra afectada (**figura 40**)

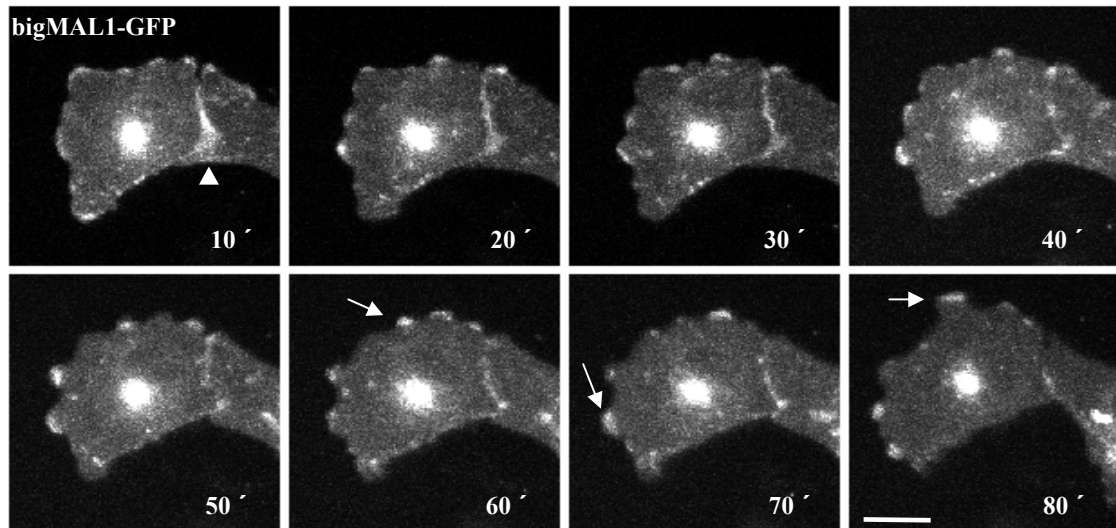


**Figura 40. Ensayos de actividad de Rho GTPasas.** Células HeLa no transfectadas o transfectadas con shRNA1 y shRNA2 fueron lisadas en tampón de lisis e incubadas en presencia de las proteínas purificadas GST-RTK para detectar la forma activa de RhoA y GST-PAK que se une a la forma activa de Rac y Cdc42. Posteriormente se analizaron por Western blot fracciones de la proteína unida y totales cada caso para determinar el estado de activación de las tres GTPasas

## 16. Dinámica de bigMAL1

Los procesos de polaridad transitoria implican la reorientación de la maquinaria de transporte de proteínas, para iniciar primero el avance de la célula, y en caso necesario, mantener de forma estable y direccional gran parte del tráfico intracelular. De esta manera se emiten prolongaciones que forman el frente de avance de una célula y que constituyen la base para la migración celular.

Estudiamos la dinámica de la proteína bigMAL1 mediante filmación por videomicroscopía de MDCK transfectantes estables con una construcción de bigMAL1-GFP. Cuando estas células MDCK fueron filmadas en su movimiento aleatorio, se observó que se producía una acumulación de la proteína bigMAL1 (o tráfico intracelular hacia la membrana) en la membrana plasmática que constituye el frente de avance y/o lamelipodia (**figura 41**).



**Figura 41. Video-microscopía de células MDCK transfectadas con bigMAL1GFP.** Dinámica de la proteína bigMAL1-GFP en células MDCK. Se filmó el movimiento de una célula transfectada en la que se observa la localización de la proteína de fusión en un pool intracelular, en las zonas de contacto célula-célula y en los lamelipodios que la célula emite al migrar. La cabeza de flecha señala la membrana en los contactos celulares y las flechas algunos de los lamelipodios que se elongan y se retraen. Se indican el tiempo de adquisición y la barra de tamaño corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .

Para explorar su posible asociación con el frente de avance de las células se transfectaron la proteína de fusión bigMAL1-roja y una construcción que contiene el dominio de homología a pleckstrina (PH) de la fosfolipasa C  $\gamma$  (PLC  $\gamma$ ) fusionada a GFP. El dominio PH está relacionado con la región de la célula que marca el frente de avance y se utiliza como una sonda para detectar sitios en la membrana de unión a fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>). Observamos que ambas proteínas transfectadas colocalizan sobre todo en la membrana plasmática (**figura 42 panel superior**). Mediante la filmación de células vivas que expresan las dos construcciones se observó como la célula, al migrar sobre el sustrato emite prolongaciones de membrana o lamelipodios donde la colocalización es más fuerte entre las dos proteínas (*video no mostrado*). Examinamos también si los sitios de la membrana en los que se localiza bigMAL1 se corresponden a zonas activas de migración por polimerización de actina. Para ello se emplearon mutantes constitutivamente activos de las GTPasas pequeñas, Rac y Cdc42. La co-expresión de estas, junto con bigMAL1 mostró un alto grado de colocalización entre ambas proteínas. Como se observa en la **figura 42 (paneles inferiores)**, se produce un *reclutamiento* de bigMAL1 a sitios activos de Rac y Cdc42 en las membranas de lamellipodia y filopodios inducidos en la célula como consecuencia de la activación de ambas vías, respectivamente.

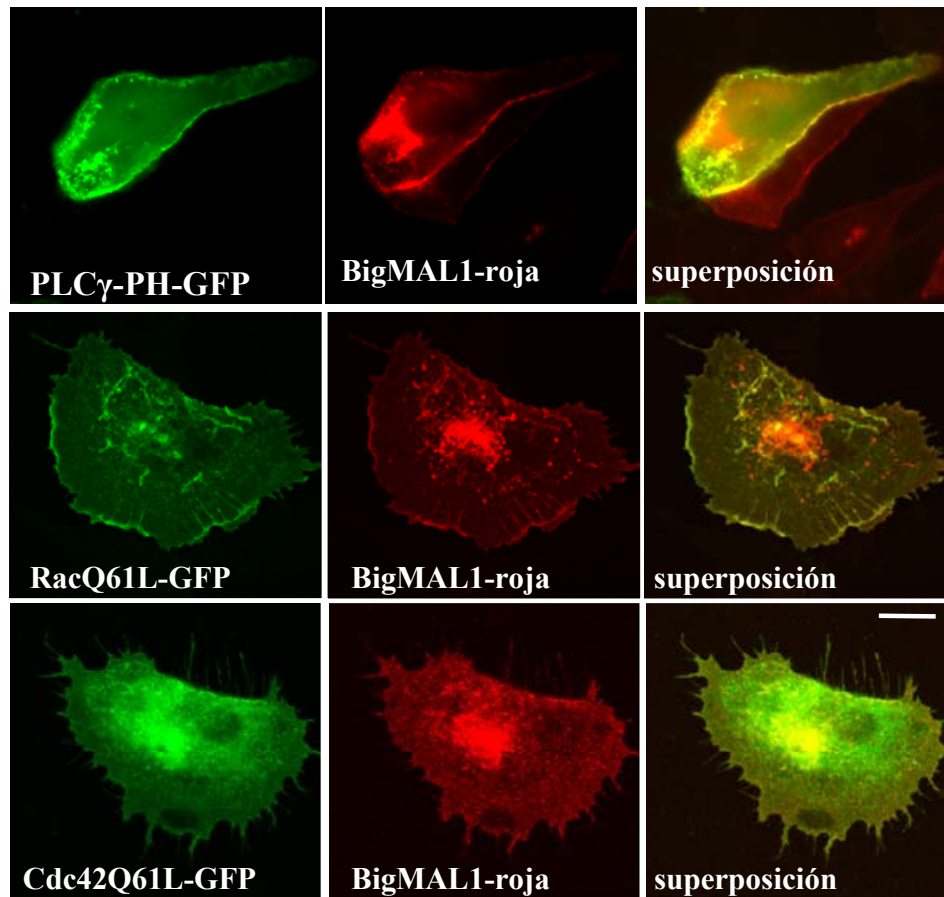


Figura 42. Co-expresión de bigMAL1-roja con la sonda para PIP<sub>2</sub>, PLC- $\gamma$ -PH-GFP y los mutantes constitutivamente activos RacQ61L y Cdc42Q61L en células MDCK. La barra de tamaño corresponde a 20  $\mu$ m.

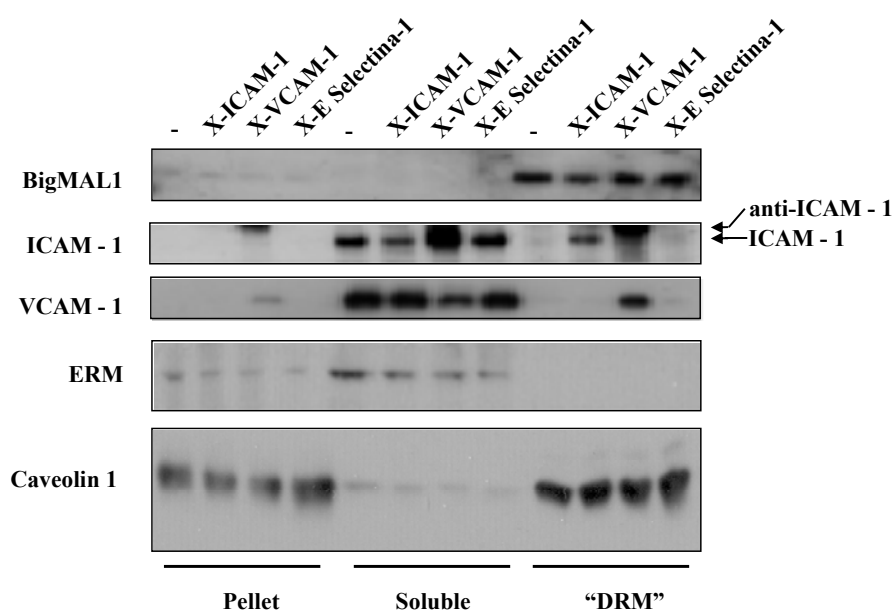
### 17. La proteína BigMAL1 en células primarias de endotelio HUVECs

Las células primarias HUVECs derivadas de la vasculatura de cordón umbilical constituyen un modelo para el estudio de los procesos biológicos de endotelio como la inflamación y la angiogénesis. Durante la inflamación tisular, se produce la extravasación de células del sistema inmune a los tejidos inflamados a través del endotelio. Dicho proceso comprende diferentes etapas como son el reclutamiento, la adhesión a la superficie apical del endotelio y finalmente la migración transendotelial de leucocitos. Recientemente se ha descrito que la disminución de los niveles endógenos de caveolina-1 mediante siRNAs específicos inhibe las rutas de trans migración de leucocitos a través de células HUVECs. Dado este importante papel de la caveolina-1 se decidió profundizar en el estudio del papel que podría desempeñar bigMAL1 en células

endoteliales ya que se detectaron niveles elevados de expresión de esta proteína en estas células.

### 18. El crosslinking de ICAM-1 ó VCAM-1 con anticuerpos provoca su inclusión en “rafts” en células HUVECs.

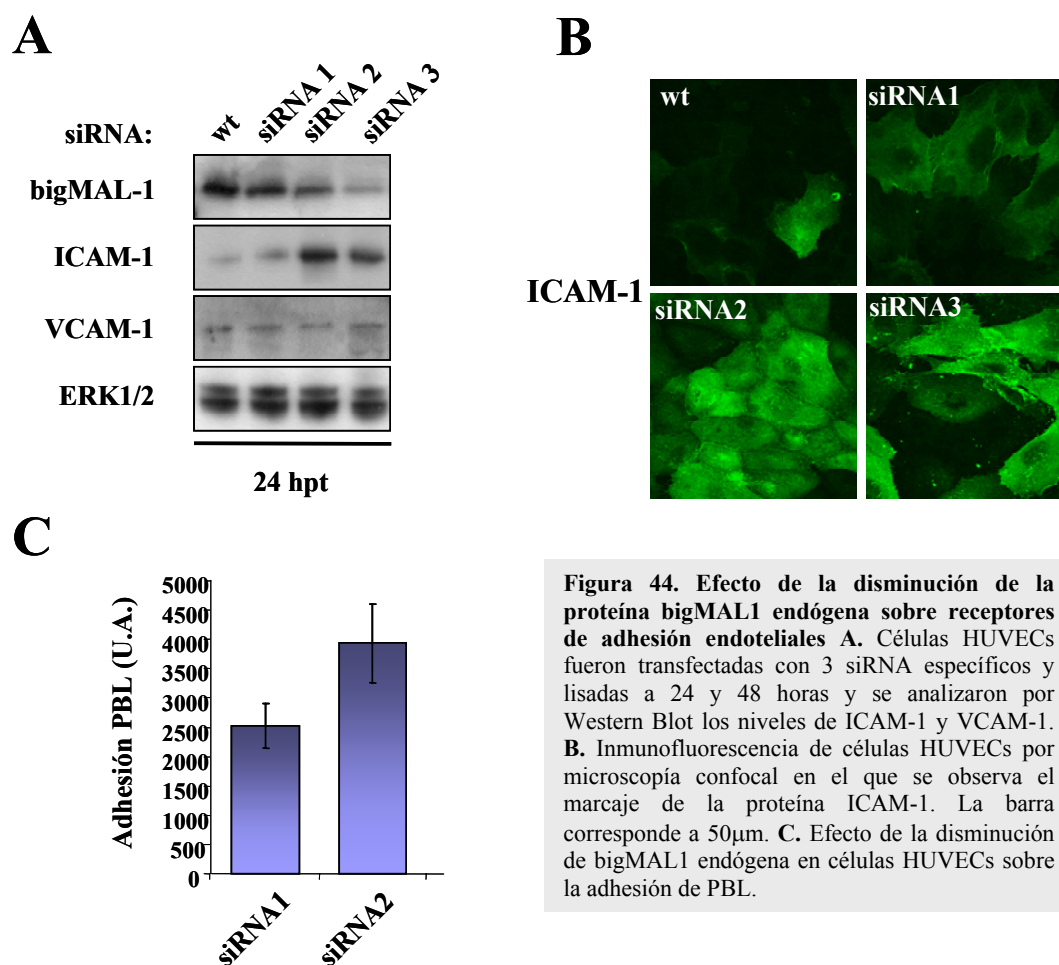
ICAM-1 y VCAM-1 son glicoproteínas que aparecen en la superficie celular del endotelio que se unen a sus ligandos del tipo integrinas ( $\alpha 1\beta 2$ ) LFA-1 y VLA-4 respectivamente, presentes en los leucocitos lo que provoca que estos se adhieran firmemente a las células del endotelio. Por medio del entrecruzamiento con anticuerpos específicos frente a estos receptores de la superficie del endotelio se mimetiza la unión de estos a sus ligandos por lo que analizamos la distribución de estos receptores en la membrana tras un tratamiento de 30 minutos. Como se muestra en la **figura 43** se detectó que una proporción de ICAM-1 y VCAM-1 se incluyen en las balsas lipídicas donde quedan agrupados junto a proteínas que residen constitutivamente en estos microdominios, como bigMAL1 y caveolina.



**Figura 43. Entrecruzamiento de ICAM-1 y VCAM-1 con anticuerpos específicos.** Células HUVECs fueron incubadas durante 30 minutos con anticuerpos específicos anti-ICAM-1 y anti-VCAM-1 y después lisadas y sometidas a centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa para aislar membranas insolubles ó “DRM”. Alicuotas de cada fracción fueron analizadas por Western blot para las proteínas bigMAL1, ICAM-1, VCAM-1, ERM y caveolina-1.

### **19. Efecto de la eliminación de bigMAL1 en células HUVECs sobre la expresión de ICAM-1 y la adhesión de leucocitos a la monocapa.**

Se ha comprobado que ICAM-1 y VCAM-1 se asocian a microdominios de membrana inmediatamente tras el entrecruzamiento con anticuerpos específicos por lo que se decidió también examinar el efecto de la disminución de bigMAL1 endógeno sobre los niveles totales de estas proteínas. Como resultado de estos experimentos se produce un aumento en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 (**figura 44 A y B**). El análisis por inmunofluorescencia de ICAM-1 muestra que efectivamente se produce un aumento de esta proteína en la membrana plasmática de células HUVECs (**figura 44B**). Otras proteínas como VCAM-1 no se afectaron tras la eliminación de bigMAL1, por lo que el efecto sobre ICAM-1 parece específico. El aumento de la expresión de ICAM-1 en situaciones fisiológicas que se produce en respuesta a estímulos proinflamatorios tiene como consecuencia un aumento de la adhesión de linfocitos circulantes a las células del endotelio, por lo que examinamos si existían diferencias en la adhesión de leucocitos sobre monocapas de células HUVECs confluentes no tratadas y tratadas con siRNA específicos. Se aislaron PBLs de un sujeto sano y se diferenciaron con interleuquina-2 (IL-2) y  $\alpha$ -CD3 durante 12 días. Posteriormente se marcaron con una sonda fluorescente para poder detectar la adhesión de éstos tras 10 minutos de incubación. La disminución de los niveles de bigMAL1 endógeno produjo un aumento de la adhesión de PBLs en relación a las células control (**Figura 44C**), en consonancia con el aumento observado de los niveles totales de ICAM-1.



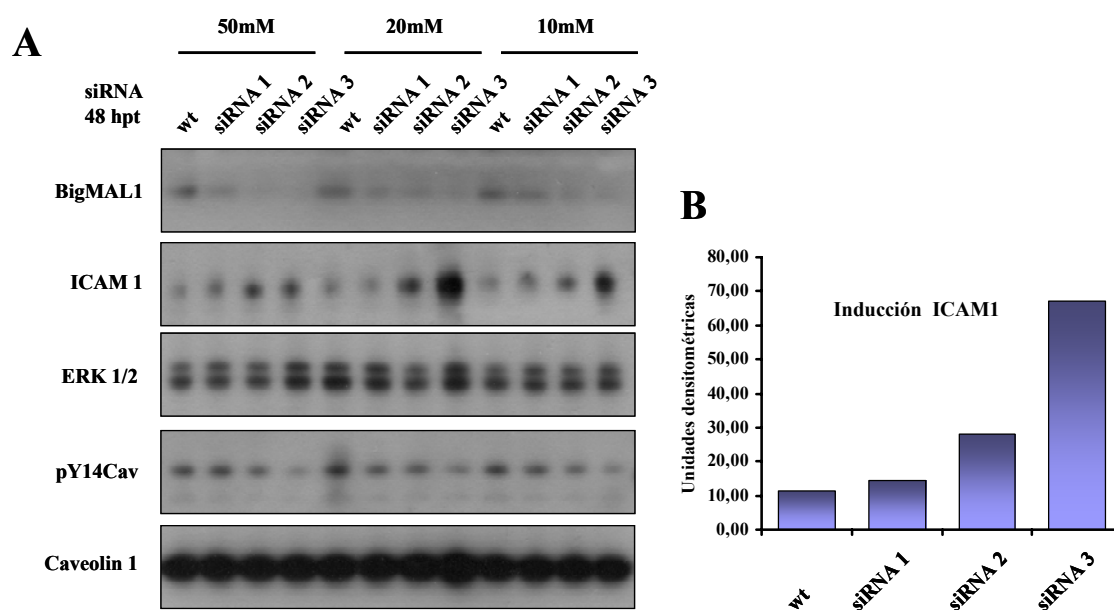
**Figura 44. Efecto de la disminución de la proteína bigMAL1 endógena sobre receptores de adhesión endoteliales** A. Células HUVEC fueron transfectadas con 3 siRNA específicos y lisadas a 24 y 48 horas y se analizaron por Western Blot los niveles de ICAM-1 y VCAM-1. B. Inmunofluorescencia de células HUVEC por microscopía confocal en el que se observa el marcaje de la proteína ICAM-1. La barra corresponde a 50 $\mu$ m. C. Efecto de la disminución de bigMAL1 endógena en células HUVEC sobre la adhesión de PBL.

Para evitar efectos inespecíficos, debidos a la concentración de siRNA a la que se emplean, se llevó a cabo un ensayo de dosis respuesta, reduciéndola desde 50 nM hasta 10 nM y como se muestra en la **figura 45** se siguen observando los mismos efectos sobre la expresión de ICAM-1. Como se ha comprobado con anterioridad en este trabajo en células HeLa, la fosforilación de la caveolina en el residuo Tyr14 estaba disminuida también en estas células con altos niveles endógenos de caveolina (**figura 45**).

## 21. Efecto de la eliminación de bigMAL1 mediante siRNA sobre pERM.

Analizamos los efectos sobre los niveles de otras proteínas que se asocian o no a balsas lipídicas y que intervienen en procesos específicos del endotelio. Las células tratadas con siRNA2 y 3 específicos que presentan reducidos los niveles de bigMAL1, tienen aumentado los niveles de fosforilación de las ERMs en el residuo de Treonina conservado (T567/T564/T568 de ezrina, radixina y moesina respectivamente) de su extremo C-terminal, manteniéndose constantes los niveles de ERM total (**Figura 46A**).

Este efecto, que se mantiene desde 24 hasta 48 horas después de la transfección, parece responder a un efecto de dosis-respuesta, ya que la disminución de bigMAL1 mediante el empleo de oligos siRNA diferentes presentó distinta eficiencia en la disminución de los niveles de bigMAL1 y produjo un aumento concomitante de la fosforilación de las ERMs (Figura 46B).

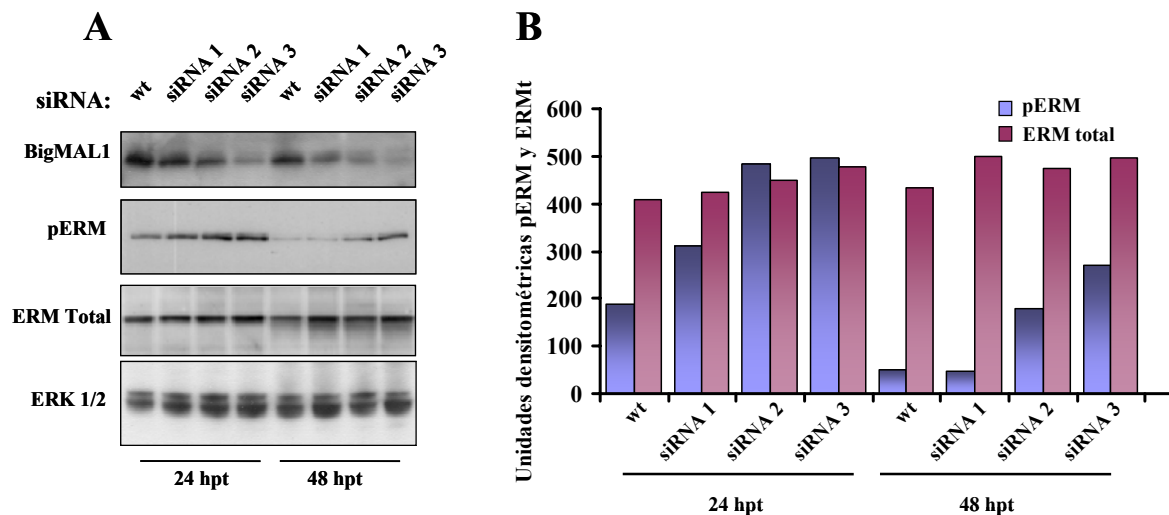


**Figura 45. Efecto de distintas dosis de siRNA sobre los niveles de proteínas en HUVECs** A. Células HUVECs fueron tratadas con las tres dosis y durante los tiempos de transfección que se indican, lisadas y analizadas por Western Blot para las proteínas que se indican B. Cuantificación por densitometría del efecto de este tratamiento sobre ICAM-1.

## 22. Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre la permeabilidad en células HUVECs.

El estudio de la distribución subcelular de bigMAL1 en HUVECs mostró que, al igual que en otras líneas celulares, aparece en una localización intracelular perinuclear y asociada a la membrana plasmática donde colocaliza parcialmente con F-actina cortical. Pero también colocaliza con proteínas que forman parte de los complejos de membrana de las uniones adherentes y uniones estrechas como VE-cadherina y  $\beta$ -catenina (figura 47). Analizando más en detalle la distribución de la proteína bigMAL1 en la membrana, se observó que una proporción de ésta también aparece asociada a los microvilli celulares como se observa en la figura donde colocaliza con ICAM-1 y ezrina. Para comprobar la distribución de bigMAL1 en respuesta al anclaje y/o adhesión de



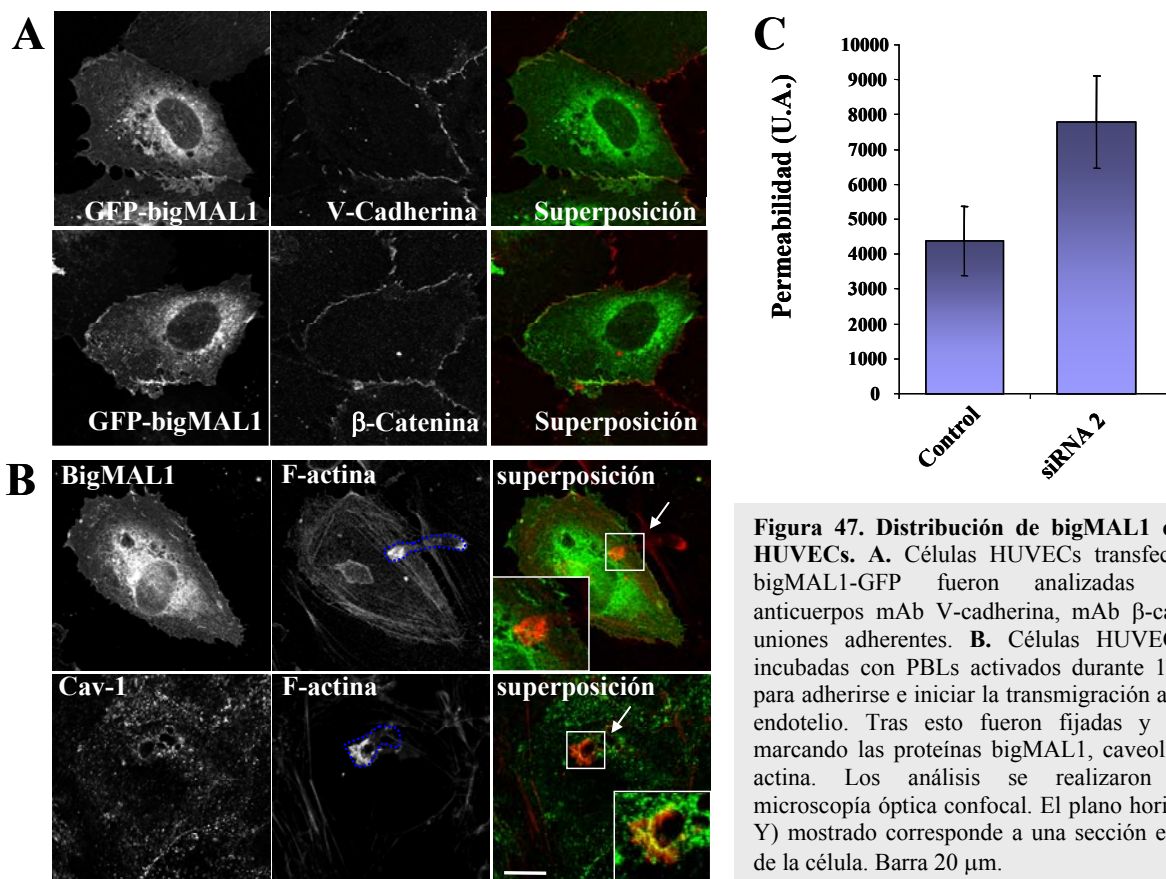


**Figura 46. Eliminación de la proteína bigMAL1 endógena por transfección de siRNA específicos.** A. Células HUVECs fueron transfectadas con 3 siRNA específicos y lisadas a 24 y 48 horas para monitorizar la eliminación de la proteína bigMAL1 endógena, para lo que analizaron por Western Blot con el mAb 2B12. Se analizaron además por western Blot los niveles totales de las ERMs, fosfo-ERM, ERK1/2. B. Cuantificación por densitometría del efecto sobre los niveles de ERMs y fosfo-ERMs.

leucocitos a estas células, se analizaron por inmunofluorescencia células HUVECs confluentes que habían sido incubadas con PBLs durante 15 minutos para iniciar la trans migración. Como se observa en la **figura 47**, bigMAL1 no rodea a la actina presente en el frente de avance de los leucocitos, mientras que como está descrito, (Millan et al., 2006) la caveolina-1 se localiza en una estructura en forma de anillo que rodea al leucocito que inicia la trans migración y donde colocaliza con F-actina, además de con ICAM-1. Por tanto la localización subcelular de bigMAL1 en algunas zonas de la membrana plasmática nos llevó a analizar si ésta tenía relación con los procesos de permeabilidad celular. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de permeabilidad a FITC-Dextrano con células HUVECs confluentes que habían sido deplecionadas de bigMAL1 endógeno. Mediante estos experimentos se comprobó que la permeabilidad a este soluto estaba aumentada cuando reducíamos los niveles de bigMAL1 con respecto a la situación control, por lo que esta proteína podría ser necesaria para la organización y mantenimiento de las estructuras que conforman las uniones adherentes entre células del endotelio (**Figura 47**)

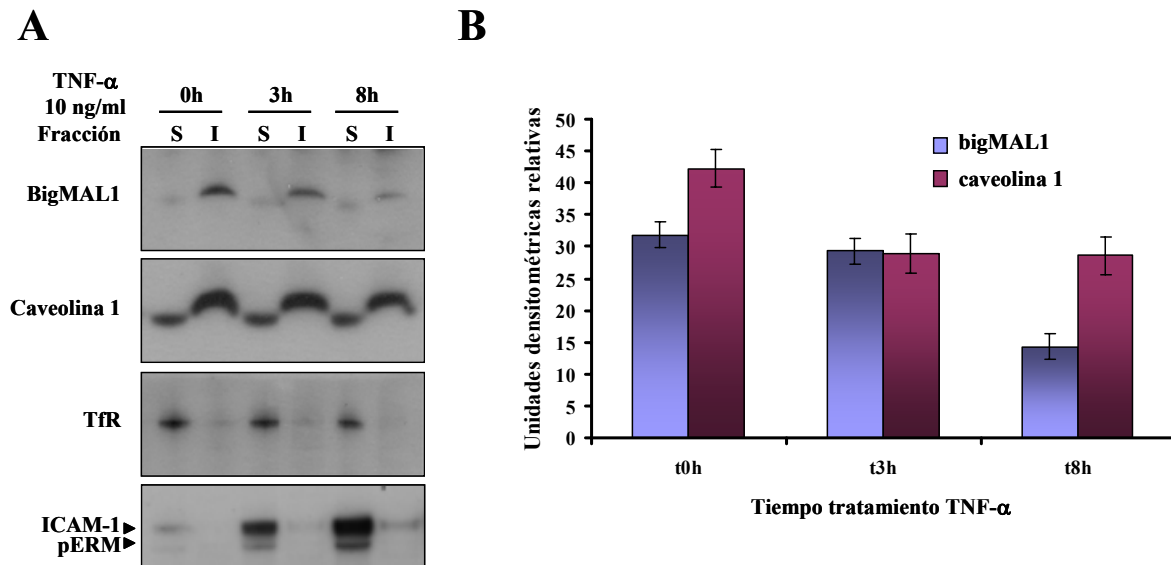
### 23. Efecto del tratamiento con TNF- $\alpha$ en la expresión de bigMAL1 en células HUVECs.

Puesto que se observa un aumento de los niveles de ICAM-1 tras la eliminación de bigMAL1, se analizaron también los niveles de bigMAL1 en respuesta al mismo estímulo proinflamatorio que aumenta los niveles de ICAM-1. El tratamiento de las células HUVECs con TNF- $\alpha$  a una concentración de TNF- $\alpha$  de 10 ng/ml provocó una disminución de la expresión de bigMAL1 de más de la mitad de su nivel basal a tiempos de 8 h de tratamiento. Como se puede observar también provocó el aumento de la expresión de ICAM-1 y de la fosforilación de las ERMs en su extremo C terminal (figura 48). Por lo tanto, la eliminación de bigMAL1 endógena es suficiente para aumentar la expresión de ICAM-1 al nivel de una situación de inflamación tisular.



### 24. Relación entre ICAM-1, ERM y bigMAL1.

Según los resultados anteriores en células HUVECs, el tratamiento con TNF- $\alpha$  induce la expresión de ICAM-1, el aumento de la fosforilación de las ERMs y la reducción de la expresión de la proteína bigMAL1. Por otro lado, se ha descrito que



**Figura 48. Efecto del tratamiento con TNF- $\alpha$  de células HUVECs** A. Células HUVECs fueron tratadas con 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante los tiempos indicados, lisadas y analizadas por Western blot para las proteínas que se indican B. Cuantificación por densitometría del efecto de este tratamiento sobre bigMAL1 y caveolina.

muchos receptores de la superficie del endotelio como ICAM-2 y CD44, pueden asociarse por sus dominios citoplásmicos a proteínas de familia de las ERM, que a su vez actúan como interconectores entre dichos receptores de superficie y el citoesqueleto de actina (Barreiro et al., 2002). Puesto que la reducción de los niveles de bigMAL1 provoca un aumento de la fosforilación de las ERM y un aumento de la expresión de ICAM-1, se decidió analizar si existía un relación funcional entre estas tres proteínas por lo que se disminuyeron los niveles de bigMAL1 individualmente y/o junto a la Ezrina, Radixina y Moesina mediante siRNA específicos. Como se muestra en la **figura 49** las células tratadas con siRNA para bigMAL1 y una combinación de siRNA de ezrina, radixina y moesina (ERM) impiden el aumento de la expresión de ICAM-1 provocado por la disminución de bigMAL1. Se analizó también el efecto de la eliminación de las ERMs y de bigMAL1 de forma conjunta sobre la adhesión de PBLs marcados a la superficie del endotelio y sobre la permeabilidad de FITC-dextrano.

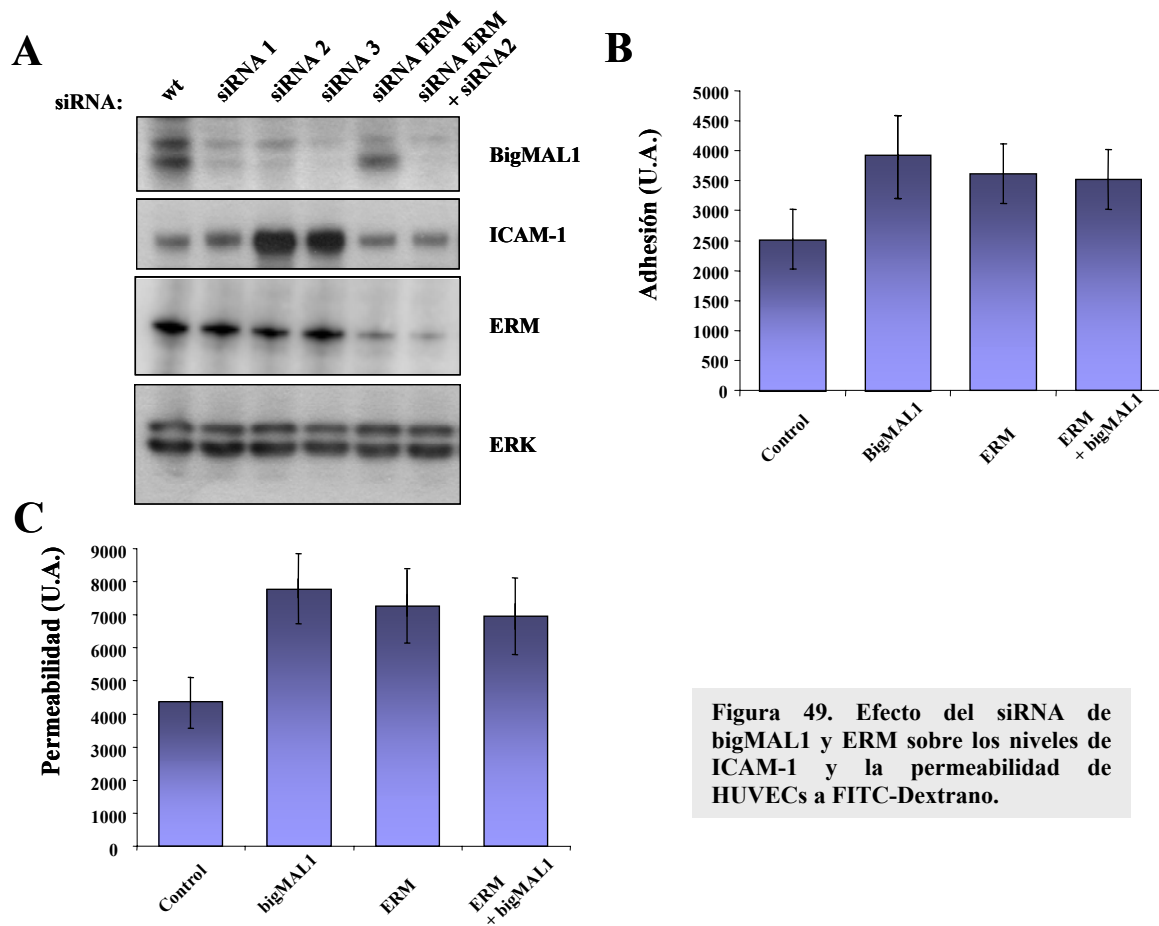


Figura 49. Efecto del siRNA de bigMAL1 y ERM sobre los niveles de ICAM-1 y la permeabilidad de HUVECs a FITC-Dextrano.

# Discusión

La familia MAL de proteínas está compuesta actualmente por 8 miembros de los que MAL, MAL2 y BENE, han sido previamente caracterizados por nuestro grupo. Se trata de proteínas hidrofóbicas pequeñas relacionadas químicamente con los proteolípidos y asociadas constitutivamente a los microdominios de membrana. Estos tres miembros poseen un patrón de expresión muy complejo en distintos tejidos y líneas celulares altamente diferenciadas, en los que aparecen de forma diferencial (**figura 9**) y han sido implicados en procesos específicos de tráfico de membranas. Los resultados previos acerca de la familia MAL han llevado a la demostración de que MAL y MAL2 actúan específicamente en la ruta directa o apical y en la de transcitosis o indirecta, respectivamente, en células polarizadas. En ambos casos se consideran como elementos esenciales de la maquinaria de tráfico polarizado de proteínas mediados por microdominios de membrana. Se piensa que la existencia de los microdominios lipídicos es una característica general a todos los tipos celulares ya sean polarizados o no, por lo que se inició la búsqueda y caracterización de nuevos miembros de la familia MAL con una expresión constitutiva que pudieran ejercer funciones generales dentro del entorno de estas membranas especializadas.

## **1. La subfamilia bigMAL**

### **1.1 Identificación de la subfamilia bigMAL dentro de la familia MAL**

El dominio MARVEL cuya función fue relacionada con eventos de fusión y aposición de membrana, ha sido identificado en los miembros de la familia MAL y en otras proteínas relacionadas. Gracias a la descripción de este dominio se han agrupado a toda una serie de proteínas que tienen en común el estar asociadas constitutivamente a la membrana y cuya función en relación a éstas se piensa que podría tener lugar porque organicen los microdominios dentro de las membranas celulares. En nuestro grupo hemos identificado tres nuevos miembros con dominios MARVEL pertenecientes a la familia MAL, que han sido denominados bigMAL1, bigMAL2 y bigMAL3 por ser los miembros de mayor tamaño. Estas proteínas presentan un alto porcentaje de similitud en sus secuencias aminoacídicas y una estructura secundaria semejante. Las características más destacadas de estos nuevos miembros son la presencia de un mayor número de dominios transmembrana que el resto de miembros de la familia, y de forma diferencial al resto de la familia MAL, bigMAL1 es el único miembro que posee dos dominios

---

MARVEL consecutivos que conforman sus 8 dominios transmembrana. Todas estas características hacen que puedan clasificarse en un subgrupo aparte dentro de la familia MAL.

## **1.2 Caracterización y expresión de la subfamilia bigMAL humana**

Para establecer el patrón global de expresión de la subfamilia bigMAL, se analizó por RT-PCR la expresión de los tres miembros en un rango amplio de líneas celulares. Aunque hasta la fecha no hay estudios sobre el promotor del gen humano MYADM/bigMAL1, se ha descrito recientemente que el promotor del gen homólogo en ratón contiene varios sitios de unión para factores de transcripción ubicuos aunque también presenta otros sitios específicos de la línea mieloide (Dannaeus et al., 2005). Mediante experimentos de RT-PCR y Northern blot se detectó que bigMAL1 presenta una expresión constitutiva ya que está presente en todos los tejidos y líneas celulares analizadas. BigMAL2 comparte con bigMAL1 un patrón amplio de expresión en las líneas celulares analizadas. Aunque estas dos proteínas poseen 8 dominios transmembrana y por tanto una estructura secundaria similar, difieren sobre todo en su secuencia primaria en dos regiones. Por un lado bigMAL1 presenta un extremo N terminal más largo que bigMAL2 y contiene una repetición de residuos de Treonina (TVTRTTTTTTTTSSS) que no está presente en bigMAL2. Por otro lado, las regiones que conectan el 3° y 4° y el 7° y 8° dominio transmembrana también difieren significativamente y muestran a nivel local un porcentaje bajo de homología. La detección del RNA mensajero de bigMAL3 se redujo, en comparación con la de bigMAL1 y bigMAL2, a líneas celulares de origen neuronal y de próstata PC3. Las secuencias encontradas en GenBank constatan la presencia de mensajeros de bigMAL3 procedentes sólo de tejido cerebral lo que concuerda con nuestros resultados. BigMAL3 posee un 60% de identidad de secuencia aminoacídica con bigMAL1 en la región C terminal. Debido al alto porcentaje de similitud entre ambas se pensó que bigMAL3 podría ser una variante de procesamiento alternativo de bigMAL1, al tratarse de una proteína más corta o truncada, pero descartamos esa posibilidad, porque se trata de genes situados en cromosomas distintos. Tampoco se trata de un pseudogen inactivo porque se ha podido detectar la expresión a nivel de mRNA. Los estudios de expresión con formas exógenas de bigMAL3 fusionadas al epítipo myc permitieron determinar su distribución subcelular que consistía en un patrón de vesículas dispersas por el citoplasma de células COS-7. Hasta la fecha no ha sido posible la obtención de anticuerpos específicos frente a

---

esta proteína. Puesto que se ha detectado su expresión restringida a células nerviosas y tumorales de próstata, será conveniente establecer modelos celulares de ambos orígenes para el estudio de su función.

En consecuencia bigMAL1 y bigMAL2 han resultado ser los primeros miembros con expresión constitutiva dentro de la familia MAL lo que contrasta con la expresión de los miembros previamente caracterizados que está restringida a determinados tipos celulares. Estos resultados concuerdan con los datos existentes en la base de datos, en el que se han registrado toda una colección de ARN mensajeros de ambos genes procedentes de una gran variedad de tejidos.

### **1.3 Las proteínas bigMAL1 y bigMAL2 son componentes constitutivos de los microdominios de membrana celulares y residen en compartimentos celulares distintos**

Mediante la obtención de anticuerpos, se ha detectado que bigMAL1 y bigMAL2 fraccionan exclusivamente en las membranas insolubles en detergentes que supuestamente están enriquecidas en los microdominios de membrana o balsas lipídicas. El estudio de la distribución subcelular de ambas proteínas mostró que no ocupan los mismos compartimentos dentro de la célula. El marcaje doble de las dos proteínas en células HeLa, MDCK y HepG2, mostró que bigMAL1 se localiza en la membrana plasmática en una región subcortical y en un compartimento perinuclear, mientras que bigMAL2 se localiza en vesículas dispersas por el citoplasma que, al menos en estado estacionario, no alcanzan la membrana. La distribución subcelular observada de esta proteína es muy semejante a la que muestran tanto bigMAL3, como la construcción truncada de bigMAL1-Cterm que comparten con bigMAL2 un patrón de distribución subcelular en vesículas citoplásmicas. Mediante experimentos de microscopía confocal se determinó que reside en estructuras vesiculares positivas para CD63/limp, una tetraspanina que marca endosomas tardíos y lisosomas. Este resultado sugiere que bigMAL2 formaría parte de los microdominios de membrana presentes en este compartimento endo-lisosomal donde estaría involucrada en procesos celulares distintos a los de bigMAL1 dada su localización celular diferente.

Las diferencias mencionadas anteriormente a nivel de secuencia de aminoácidos entre bigMAL1 y bigMAL2 podrían dar cuenta de su diferente localización subcelular, ya que aunque ambas proteínas tienen 8 dominios transmembrana y una estructura



secundaria relacionada, sólo bigMAL1 posee 2 dominios MARVEL y una región N-terminal más larga y enriquecida en residuos consecutivos de treonina.

El estudio de la distribución subcelular de ambas proteínas comparando líneas celulares polarizadas y no polarizadas mostró que también existían diferencias entre la propia localización observada para bigMAL1. Mientras bigMAL2 se localiza siempre en vesículas citoplásmicas independientemente del tipo celular examinado, polarizado o no, y de la confluencia celular, bigMAL1 parece residir entre dos compartimentos celulares uno intracelular y otro asociado a la membrana plasmática. Podemos establecer que en células no polarizadas y polarizadas pero a baja confluencia, bigMAL1 se encuentra en mayor proporción en un acumulo intracelular que colocaliza con marcadores de Golgi y en menor medida en la membrana celular asociada a las prologaciones o lamelipodios como se observó en los experimentos de videomicroscopía. En células polarizadas y en células no polarizadas pero en condiciones de alta confluencia, se observó una acumulación paulatina de la proteína en la membrana plasmática, sobre todo en los contactos célula-célula colocalizando con F-actina y con marcadores de uniones celulares. Además en determinados tipos celulares polarizados como HepG2 y MDCK cuando forman cistos, la localización de bigMAL1 es completamente apical situándose en una región subcortical que da al lumen.

El uso del anticuerpo mAb 2B12 generado por nosotros nos permitió detectar que bigMAL1 endógeno es capaz de formar oligómeros resistentes a SDS. Por tanto tras su biosíntesis en el retículo, bigMAL1 aparece en el aparato de Golgi donde reside en gran medida y probablemente ahí se produciría su oligomerización, finalmente alcanzaría la membrana plasmática. Estos resultados, junto con su presencia exclusiva en los microdominios de membrana sugieren que bigMAL1 podría estar organizando microdominios de membrana semejantes a los que forman otros miembros de la familia MAL, pero en compartimentos celulares diferentes.

## **2. La proteína bigMAL1 no está implicada en la biogénesis ni en la funcionalidad del canalículo biliar en células HepG2.**

En células polarizadas HepG2, se detectó que bigMAL1 aparece concentrada en la membrana apical o canalicular. En la población de células no polarizadas, bigMAL1 se localiza sobre todo en las regiones de contacto célula-célula. La colocalización con marcadores de la membrana apical como la F-actina o los marcadores de uniones estrechas ZO-1, Claudina y Ocludina, sugería un posible papel de bigMAL1 como

maquinaria de “rafts” en relación a la biogénesis de la polaridad de forma estable. Sin embargo, la eliminación de bigMAL1 no tuvo ningún efecto sobre la estructura o la formación del canalículo biliar, ni tampoco sobre su funcionalidad. Así en ausencia de bigMAL1 las células mantienen la capacidad de formar el canalículo biliar, la distribución normal de proteínas apicales y basolaterales y el transporte transcitótico inalterado.

En estudios preliminares en nuestro laboratorio se ha visto que la eliminación de MAL2 sí que afecta a la transcitosis de moléculas cargo y a la polaridad en células HepG2 donde esta proteína se expresa específicamente y reside en el compartimento subapical (SAC)(de Marco et al., 2002). Queda por determinar el papel de bigMAL1 en relación a su localización apical y su posible implicación en polaridad en otros modelos celulares en tres dimensiones como la línea celular de epitelio polarizado MDCK crecidas sobre matrices de colágeno, donde se ha visto que bigMAL1 se trasloca en etapas tempranas de la polarización a la membrana apical que forma el lumen.

### **3. La proteína bigMAL1 es necesaria para el mantenimiento de la morfología celular en células no polarizadas HeLa y PC3.**

La eliminación de bigMAL1 endógena mediante RNAi, provocó cambios en la morfología celular tanto en células HeLa como PC3. Dichos cambios consistían en la pérdida de la forma alargada y en la desaparición de lamelipodios, de forma que las células adquirirían una morfología redondeada. Cuando redujimos los niveles de bigMAL1 en el caso de células PC3, el efecto fue más acusado ya que estas células poseen grandes lamelipodios que aumentan considerablemente el tamaño y la longitud de la célula. La distribución de la actina también fue diferente en ausencia de bigMAL1, apareciendo agrupada en estructuras semejantes a las microvellosidades. La adhesión de estas células no se vio afectada por la ausencia de bigMAL1 y las proteínas de las adhesiones focales se localizaban correctamente en la membrana, como la paxilina y la vinculina. Dado que las células HeLa expresan bigMAL1 y bigMAL2 mientras que PC3 expresan todos los proteolípidos de la familia MAL, la observación del mismo efecto en estas dos líneas celulares, sugiere que no existe redundancia en el papel de bigMAL1 en relación a la morfología celular.

### **4. La disminución de los niveles de bigMAL1 en células HeLa y PC3 afecta a la migración celular**

La observación de células vivas control y sin bigMAL1 mediante filmación por videomicroscopía corroboró los efectos observados sobre la morfología celular obtenidos en células fijadas. Dichos efectos se podrían subdividir en 2 tipos: actividad a nivel de membrana plasmática y motilidad celular. En cuanto a la actividad de la membrana plasmática, se observó que las células con niveles reducidos de bigMAL1, no emitían apenas lamelipodios, lo que provocaba pequeños cambios morfológicos durante el movimiento celular. En contraste, si que se observaba actividad de la membrana a nivel de la formación de filopodios en ausencia de bigMAL1 endógeno, ya que las células emitían continuamente pequeñas prolongaciones celulares semejantes a microvilli. Por otro lado se observó que las células deplecionadas en división una vez concluida la citocinesis, permanecen más tiempo en contacto con sus membranas que las células no tratadas o tratadas con siRNA control. Para descartar que bigMAL1 fuera necesaria para el establecimiento o el mantenimiento de las uniones célula-célula ya que observamos un mayor contacto entre las células deplecionadas y puesto que se había comprobado el alto grado de colocación con marcadores de uniones estrechas como ocludina y ZO-1 entre otras, se llevó a cabo un ensayo de dispersión o “scattering” con HGF en células de próstata humanas DU145. No se observaron diferencias entre las células tratadas y las células control en respuesta a este tratamiento en cuanto a la rotura de sus uniones celulares, la adquisición de una morfología alargada y el inicio de la migración.

En cuanto a la motilidad, se observó una disminución en la velocidad de las células HeLa con niveles reducidos de bigMAL1 tanto de forma transitoria por expresión de siRNA como en los clones en los que se había suprimido establemente su expresión. En ambas situaciones estaba afectada la persistencia en el movimiento durante la migración aleatoria observándose que la disminución de los niveles de bigMAL1 correlaciona con la pérdida de la persistencia en la migración aleatoria. Sin embargo la direccionalidad de la migración en respuesta al cierre de herida no se vio afectada así como tampoco la reorientación del aparato de Golgi.

Los cambios observados en la morfología celular y la motilidad sugerían que las vías de señalización de la familia de las Rho GTPasas podrían estar afectadas, y en efecto se observó que la disminución de los niveles endógenos de bigMAL1 en células HeLa provocaba una disminución de la activación de Rac, en consonancia con la pérdida de lamelipodios y la disminución de la velocidad de migración observada en estas células. Se ha descrito que Rac una vez activado se transloca a la membrana

plasmática (ref) donde se ha observado que colocaliza con bigMAL1 en experimentos de coexpresión con la forma constitutivamente activa, RacQ61L. Por tanto bigMAL1 podría ser necesario para la residencia de Rac activo en la membrana. También se observó un aumento del estado activado de RhoA. Esta GTPasa ha sido implicada en varias etapas de la migración como la retracción de la cola de células en migración y la dinámica de formación de las adhesiones focales (Rottner et al., 1999)

### **5. Efecto de la eliminación de bigMAL1 sobre los “rafts” de células HeLa**

Al analizar la asociación de proteínas a las fracciones de membrana insolubles en detergente se observó que la eliminación de bigMAL1 en células HeLa tenía como consecuencia la disminución de la caveolina presente en esta fracción, en un porcentaje medio del 20 %. Este efecto también se observó en PC3 y fue muy acusado sobre todo en las células ECV304 que expresan niveles altos de caveolina. Sin embargo no se vio afectada la inclusión de otras proteínas cargo como la flotilina y la proteína anclada a la membrana por grupos GPI, CD59. Al examinar la localización subcelular de la caveolina 1 en ausencia de bigMAL1 no se observó ninguna diferencia en cuanto a su distribución en estructuras intracelulares y en la región del Golgi ni tampoco en la oligomerización de la caveolina. Sin embargo se detectaron cambios significativos en la fosforilación de la caveolina en el residuo Tyr14, sobre todo en células endoteliales. Se ha descrito que la pY14-caveolina se distribuye fundamentalmente en las adhesiones focales lo que ha sido relacionado con la traslocación de microdominios de membrana promovida por la adhesión mediada por integrinas. Los efectos sobre la morfología, la polarización y la migración celular similares a los observados en ausencia de bigMAL1 son semejantes a los descritos en fibroblastos de ratón KO para la caveolina (Grande-García et al., 2007). El hecho de que al disminuir los niveles de bigMAL1 se afecten por un lado la capacidad de la caveolina para acceder a las fracciones de membrana insolubles en detergente y por otro el estado de fosforilación de ésta, sugiere que bigMAL1 pueda estar involucrada, como maquinaria de “rafts” al igual que la caveolina, en el establecimiento del fenotipo polarizado transitorio necesario para que se produzca la adhesión y la migración celular de forma correcta. La generación de clones en los se ha suprimido establemente la expresión de bigMAL1 nos permitió revertir el fenotipo de morfología celular alargada observado en células carentes de bigMAL1, comprobándose así la especificidad del efecto del siRNA utilizado.

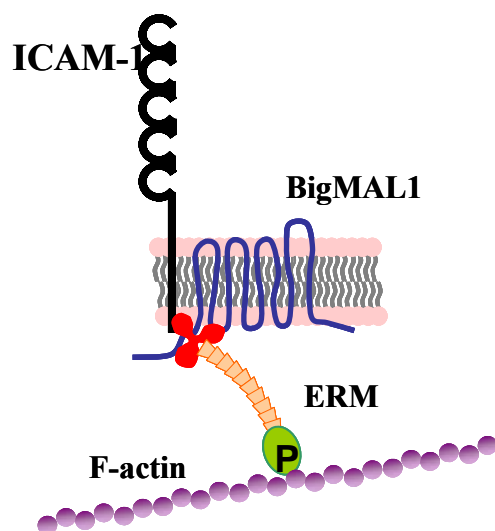
## **6. BigMAL1 y regulación de la expresión de receptores de membrana en células endoteliales**

Para profundizar en el estudio de bigMAL1 y puesto que presenta una expresión constitutiva en todo tipo de células, se eligieron las células primarias de endotelio, HUVECs, que constituyen un modelo para el estudio de la inflamación y la angiogénesis. Estas células expresan niveles elevados de caveolina y presentan muchas peculiaridades con respecto a otras células polarizadas ya que son capaces de responder a estímulos proinflamatorios, sufriendo cambios morfológicos drásticos que les permiten ejercer funciones específicas en la permeabilidad vascular. El análisis de la fracción de “rafts” procedentes de estas células mostró que también expresan bigMAL1, incluso a niveles superiores a los de la mayoría de las líneas celulares analizadas en este trabajo. Las proteínas ICAM-1 y VCAM-1 participan en las fases iniciales de la trans migración celular haciendo que se produzca el anclaje firme de los leucocitos a las células del endotelio. Cuando se examinaron los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 en células con niveles reducidos de bigMAL1 observamos que los niveles totales de ICAM-1 y no los de VCAM-1 aumentaban. Este efecto fue corroborado utilizando distintas dosis de siRNA y se observó que se mantenía en el tiempo desde las 24 hasta las 48 horas post-transfección. La distribución de ICAM-1 también fue analizada por inmunofluorescencia en células HUVECs comprobándose que se distribuía en la misma localización asociada a los microvilli presentes en la membrana plasmática tanto en unas condiciones como en otras. Como consecuencia del aumento de ICAM-1 en la membrana también se detectó un aumento en la adhesión de PBLs en co-cultivo con células HUVECs que tenían niveles reducidos de bigMAL1 con respecto al control. Por lo tanto, las moléculas de ICAM-1 que sintetizadas en respuesta a la reducción de bigMAL1 son capaces de alcanzar la superficie celular y llevar a cabo su función normal en el proceso de la adhesión intercelular.

Las proteínas ERMs que forman parte de la estructura de los microvilli y actúan conectando el citoesqueleto de actina a los receptores de la superficie celular del endotelio en este caso. La fosforilación en el residuo de treonina conservado del extremo C-terminal favorece la activación de las ERM que es la que interacciona con los receptores de superficie (Ivetic and Ridley, 2004). Cuando se examinó el efecto de la reducción de bigMAL1 sobre los niveles totales de las ERM se comprobó que éstos no estaban afectados pero, en cambio, si que se modificaba el estado de fosforilación en el dominio C-terminal que aumentaba significativamente. Este aumento podría favorecer

la interacción con receptores de la superficie como ICAM-1 como ya ha sido descrito. Por otro lado la ausencia de bigMAL1 provocaba también la activación de RhoA, que regula la actividad de uno de sus principales efectores, la quinasa ROCK. Esta proteína que fosforila a las ERMs en su C-terminal (Matsui et al., 1999) podría ser por lo tanto la responsable del aumento de la fosforilación de las ERMs observado al reducir los niveles de bigMAL1. En resumen, puesto que bigMAL1 regula el estado de activación de las Rho GTPasas, esta regulación tendría un efecto sobre la activación de las ERMs que a su vez regularían la dinámica de determinados receptores de adhesión como ICAM-1 en la membrana plasmática.

Otro de los factores que contribuye a la fosforilación de las ERM son los fosfoinosítidos (sobre todo, PiP2) que están enriquecidos en los microdominios de membrana. Mediante el empleo del dominio PH de la PLC- $\gamma$  fusionada a GFP como sonda, que se une específicamente a PiP2, hemos detectado que bigMAL1 se localiza en las mismas zonas de la membrana en las que se acumula PIP2, por lo tanto una interpretación posible de los efectos observados sobre las ERMs y subsiguientemente sobre los receptores de adhesión por la eliminación de bigMAL1 es que estén mediados por microdominios de membrana enriquecidos en PIP2.



Para profundizar en la relación funcional de las ERMs, ICAM-1 y bigMAL1 se transfectaron células HUVECs con siRNA específicos de bigMAL1, Ezrina, Radixina y Moesina. Solo cuando se disminuyeron simultáneamente los niveles de bigMAL1 y de las tres ERMs se recuperó la expresión basal de ICAM-1 que fue similar a la de las células control, de hecho la reducción de las ERMs por si sola, es capaz de

disminuir los niveles de ICAM-1.

Los niveles de expresión basal de ICAM-1 son muy bajos en condiciones normales, aumentando en respuesta a estímulos proinflamatorios como TNF- $\alpha$  o IL-1, por lo que al examinar los efectos de la estimulación del TNF- $\alpha$  sobre los niveles de

bigMAL1, ERM e ICAM-1 se obtuvieron los mismos resultados que se habían observado sobre los niveles de ICAM-1 y la fosforilación de las ERM cuando se eliminó selectivamente bigMAL1 mediante siRNA. Por tanto estas tres proteínas podrían actuar en la misma ruta que se produce de forma fisiológica en respuesta a la inflamación, en la que las proteínas bigMAL1 y ERMs regularían de forma diferente la expresión de ICAM-1.

El mecanismo por el cual bigMAL1 puede ejercer su acción sobre los niveles de ICAM-1 podría ser a nivel transcripcional o favoreciendo su degradación específica. En el primer caso, con niveles normales de bigMAL1 o en ausencia de estímulos proinflamatorios la transcripción de ICAM-1 podría encontrarse inhibida. En el segundo caso, bigMAL1 favorecería la degradación de ICAM-1 y sólo cuando reducimos específicamente los niveles de bigMAL1 o estimulamos con TNF- $\alpha$  se aumentan los niveles totales de ICAM-1. Queda por establecer el papel que ejerce bigMAL1 sobre el receptor ICAM-1 en el entorno de las balsas lipídicas. Se ha descrito que tras el entrecruzamiento de este receptor y el de otros como VCAM-1, se produce su inclusión en “rafts”. El papel que podrían jugar las balsas lipídicas en este proceso sería el de agrupar a los receptores de adhesión unidos a los leucocitos para facilitar la transmigración celular. Al examinar la distribución de bigMAL1 y caveolina-1, dos proteínas residentes en “rafts”, en células HUVECs en co-cultivo con PBLs se observó que mientras la caveolina se localizaba en el anillo o región que rodea a los linfocitos que están transmigando, bigMAL1 reside en una localización subcelular distinta, descrita anteriormente en otras líneas celulares, como son las regiones de membrana en contactos célula-célula y en un acumulo intracelular. De hecho la eliminación de bigMAL1 tuvo como consecuencia el aumento de permeabilidad a determinados solutos como dextrano, por lo que podría ser necesario para el manteniendo de las uniones adherentes o las uniones estrechas. Aunque el mecanismo por el cual ocurre esto se desconoce, se sabe que las proteínas presentes en las estructuras de las uniones estrechas y adherentes se encuentran enriquecidos en microdominios de membrana ricos en colesterol y glicoesfingolípidos (Nusrat et al., 2000).

---

## CONCLUSIONES

1. Las proteínas bigMAL1, bigMAL2 y bigMAL3 constituyen un subgrupo dentro de la familia MAL de proteínas que a su vez pertenecen a la superfamilia de proteínas con dominios MARVEL. BigMAL1 el único miembro descrito hasta ahora con dos dominios MARVEL.
2. Las proteínas bigMAL1 y bigMAL2 se caracterizan por ser los miembros de mayor tamaño dentro de la familia MAL con 35kDa y 32 kDa respectivamente y presentar un patrón de expresión constitutivo en todos los tipos celulares analizados. Ambas son detectadas exclusivamente en las fracciones de membrana insolubles en detergentes que se piensa que derivan de los microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos de células HeLa, HepG2 y PC3. Tanto en células no polarizadas como en las polarizadas la distribución subcelular de estas dos proteínas es distinta. BigMAL1 se localiza en acúmulo intracelular perinuclear y en la membrana plasmática mientras que bigMAL2 se distribuye en vesículas intracelulares que colocalizan con marcadores endo-lisomales.
3. BigMAL1 en células HeLa colocaliza parcialmente con la caveolina-1 intracelular en una región cercana al Golgi. La disminución de los niveles de bigMAL1 redujo la proporción de caveolina-1 que accede a las balsas lipídicas y provocó una disminución de la fosforilación en el residuo de Tyr14 de la caveolina 1. Ni la distribución subcelular de caveolina 1, ni su grado de oligomerización se vieron afectados en estas condiciones.
4. La reducción estable de los niveles de bigMAL1 en células HeLa y PC3 provocó un cambio en la morfología celular haciéndolas más redondeadas y como consecuencia de este cambio se afectó la motilidad celular, por pérdida de lamelipodios, disminución de la velocidad de migración aleatoria y cambios en el estado de activación de las Rho-GTPasas, de forma que Rac disminuía su actividad mientras que RhoA aumentaba. La reconstitución de estas células HeLa con una forma exógena de bigMAL1, hace que se recuperen la morfología celular y la velocidad de migración aleatoria. La expresión de los mutantes dominante negativo RhoA-N19 y constitutivamente activo Rac-V17 en estas células también revirtió el efecto sobre la morfología celular.



Las conclusiones anteriores 3 y 4 sugieren que bigMAL1 podría estar controlando la forma y la velocidad de migración celular por su efecto en RhoA y Rac, posiblemente a través de modificaciones de los microdominios de membrana.

5. La ausencia de bigMAL1 en células primarias de endotelio, HUVECs, indujo la expresión de ICAM-1, pero no de VCAM-1 y el aumento de los niveles de fosforilación de las proteínas ERMs en su residuo de treonina conservado C terminal, manteniéndose constantes los niveles totales de las proteínas ERM. Como consecuencia se produjo una adhesión mayor de linfocitos circulantes (PBLs) a células endoteliales debido probablemente al aumento de ICAM-1 y a una mayor permeabilidad de estas células
6. El tratamiento con TNF- $\alpha$  de células HUVECs que es conocido que induce la síntesis de ICAM-1 y la fosforilación de las ERMs, redujo los niveles de bigMAL1 endógenos.
7. La disminución simultánea de los niveles de bigMAL1 y de las ERMs en células HUVECs, impidieron el aumento de la expresión de ICAM-1 que se observaba con la mera ausencia de bigMAL1.

Las conclusiones anteriores 5-7 nos han llevado a plantear un modelo según el cual el TNF- $\alpha$  podría inducir la expresión de ICAM-1 a través de la disminución de los niveles de bigMAL1, lo que provocaría un aumento de la fosforilación de las ERM.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, M.A., and S.M. Weissman. 1987. cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:1997-2001.
- Arthur, C.P., and M.H. Stowell. 2007. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL-domain channel protein. *Structure.* 15:707-14.
- Balda, M.S., and K. Matter. 1998. Tight junctions. *J Cell Sci.* 111 ( Pt 5):541-7.
- Barreiro, O., M. Yanez-Mo, J.M. Serrador, M.C. Montoya, M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, H. Furthmayr, and F. Sanchez-Madrid. 2002. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol.* 157:1233-45.
- Brown, D.A., and J.K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68:533-44.
- Caselli, A., M.L. Taddei, G. Manao, G. Camici, and G. Ramponi. 2001. Tyrosine-phosphorylated caveolin is a physiological substrate of the low M(r) protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem.* 276:18849-54.
- Cherukuri, A., P.C. Cheng, H.W. Sohn, and S.K. Pierce. 2001. The CD19/CD21 complex functions to prolong B cell antigen receptor signaling from lipid rafts. *Immunity.* 14:169-79.
- Cochary, E.F., O.A. Bizzozero, V.S. Sapirstein, C.E. Nolan, and I. Fischer. 1990. Presence of the plasma membrane proteolipid (plasmolipin) in myelin. *J Neurochem.* 55:602-10.
- Dannaeus, K., M. Bessonova, and J.I. Jonsson. 2005. Characterization of the mouse myeloid-associated differentiation marker (MYADM) gene: promoter analysis and protein localization. *Mol Biol Rep.* 32:149-57.
- de Marco, M.C., L. Kremer, J.P. Albar, J.A. Martinez-Menarguez, J. Ballesta, M.A. Garcia-Lopez, M. Marazuela, R. Puertollano, and M.A. Alonso. 2001. BENE, a novel raft-associated protein of the MAL proteolipid family, interacts with caveolin-1 in human endothelial-like ECV304 cells. *J Biol Chem.* 276:23009-17.
- de Marco, M.C., F. Martin-Belmonte, L. Kremer, J.P. Albar, I. Correas, J.P. Vaerman, M. Marazuela, J.A. Byrne, and M.A. Alonso. 2002. MAL2, a novel raft protein of the MAL family, is an essential component of the machinery for transcytosis in hepatoma HepG2 cells. *J Cell Biol.* 159:37-44.
- de Marco, M.C., R. Puertollano, J.A. Martinez-Menarguez, and M.A. Alonso. 2006. Dynamics of MAL2 during glycosylphosphatidylinositol-anchored protein transcytotic transport to the apical surface of hepatoma HepG2 cells. *Traffic.* 7:61-73.
- del Pozo, M.A., N. Balasubramanian, N.B. Alderson, W.B. Kiosses, A. Grande-Garcia, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2005. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol.* 7:901-8.
- Drake, D.R., 3rd, and T.J. Braciale. 2001. Cutting edge: lipid raft integrity affects the efficiency of MHC class I tetramer binding and cell surface TCR arrangement on CD8+ T cells. *J Immunol.* 166:7009-13.
- Dupree, P., R.G. Parton, G. Raposo, T.V. Kurzchalia, and K. Simons. 1993. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *Embo J.* 12:1597-605.

- Estrada, B., A.D. Maeland, S.S. Gisselbrecht, J.W. Bloor, N.H. Brown, and A.M. Michelson. 2007. The MARVEL domain protein, Singles Bar, is required for progression past the pre-fusion complex stage of myoblast fusion. *Dev Biol.* 307:328-39.
- Etienne-Manneville, S. 2004. Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci.* 117:1291-300.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420:629-35.
- Fielding, C.J., A. Bist, and P.E. Fielding. 1997. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3753-8.
- Fischer, I., and V.S. Saperstein. 1994. Molecular cloning of plasmolipin. Characterization of a novel proteolipid restricted to brain and kidney. *J Biol Chem.* 269:24912-9.
- Friedrichson, T., and T.V. Kurzchalia. 1998. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature.* 394:802-5.
- Gagescu, R., N. Demaurex, R.G. Parton, W. Hunziker, L.A. Huber, and J. Gruenberg. 2000. The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell.* 11:2775-91.
- Gaus, K., S. Le Lay, N. Balasubramanian, and M.A. Schwartz. 2006. Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *J Cell Biol.* 174:725-34.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K.M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:793-805.
- Gingras, D., F. Gauthier, S. Lamy, R.R. Desrosiers, and R. Beliveau. 1998. Localization of RhoA GTPase to endothelial caveolae-enriched membrane domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 247:888-93.
- Grande-Garcia, A., A. Echarri, J. de Rooij, N.B. Alderson, C.M. Waterman-Storer, J.M. Valdivielso, and M.A. del Pozo. 2007. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol.* 177:683-94.
- Gri, G., B. Molon, S. Manes, T. Pozzan, and A. Viola. 2004. The inner side of T cell lipid rafts. *Immunol Lett.* 94:247-52.
- Heiska, L., K. Alftan, M. Gronholm, P. Vilja, A. Vaheri, and O. Carpen. 1998. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem.* 273:21893-900.
- Hooper, N.M. 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol Membr Biol.* 16:145-56.
- Hussain, N.K., S. Jenna, M. Glogauer, C.C. Quinn, S. Wasiak, M. Guipponi, S.E. Antonarakis, B.K. Kay, T.P. Stossel, N. Lamarche-Vane, and P.S. McPherson. 2001. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol.* 3:927-32.
- Ivetic, A., and A.J. Ridley. 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology.* 112:165-76.
- Janetopoulos, C., L. Ma, P.N. Devreotes, and P.A. Iglesias. 2004. Chemoattractant-induced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation is spatially amplified and adapts, independent of the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8951-6.

- Kawamura, S., S. Miyamoto, and J.H. Brown. 2003. Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through caveolae: cytoskeletal regulation of ERK translocation. *J Biol Chem.* 278:31111-7.
- Kim, T., K. Fiedler, D.L. Madison, W.H. Krueger, and S.E. Pfeiffer. 1995. Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 42:413-22.
- Kurzchalia, T.V., P. Dupree, R.G. Parton, R. Kellner, H. Virta, M. Lehnert, and K. Simons. 1992. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol.* 118:1003-14.
- Kyte, J., and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol.* 157:105-32.
- Lane, D., and E. Harlow. 1982. Two different viral transforming proteins bind the same host tumour antigen. *Nature.* 298:517.
- Lang, D.M., S. Lommel, M. Jung, R. Ankerhold, B. Petrausch, U. Laessing, M.F. Wiechers, H. Plattner, and C.A. Stuermer. 1998. Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J Neurobiol.* 37:502-23.
- Langhorst, M.F., A. Reuter, G. Luxenhofer, E.M. Boneberg, D.F. Legler, H. Plattner, and C.A. Stuermer. 2006. Preformed reggie/flotillin caps: stable priming platforms for macrodomain assembly in T cells. *Faseb J.* 20:711-3.
- Langhorst, M.F., A. Reuter, and C.A. Stuermer. 2005. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci.* 62:2228-40.
- Langlet, C., A.M. Bernard, P. Drevot, and H.T. He. 2000. Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol.* 12:250-5.
- Liang, X., A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, W. Bornmann, P. Tempst, and M.D. Resh. 2001. Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J Biol Chem.* 276:30987-94.
- Lisanti, M.P., Z.L. Tang, and M. Sargiacomo. 1993. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J Cell Biol.* 123:595-604.
- Liu, P., Y. Ying, Y. Zhao, D.I. Mundy, M. Zhu, and R.G. Anderson. 2004. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem.* 279:3787-92.
- Llorente, A., M.C. de Marco, and M.A. Alonso. 2004. Caveolin-1 and MAL are located on prostasomes secreted by the prostate cancer PC-3 cell line. *J Cell Sci.* 117:5343-51.
- Martin-Belmonte, F., P. Arvan, and M.A. Alonso. 2001. MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 276:49337-42.
- Martin-Belmonte, F., L. Kremer, J.P. Albar, M. Marazuela, and M.A. Alonso. 1998. Expression of the MAL gene in the thyroid: the MAL proteolipid, a component of glycolipid-enriched membranes, is apically distributed in thyroid follicles. *Endocrinology.* 139:2077-84.
- Martin-Belmonte, F., J.A. Martinez-Menarguez, J.F. Aranda, J. Ballesta, M.C. de Marco, and M.A. Alonso. 2003. MAL regulates clathrin-mediated endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 163:155-64.
- Martin-Belmonte, F., R. Puertollano, J. Millan, and M.A. Alonso. 2000. The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in

- the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines. *Mol Biol Cell*. 11:2033-45.
- Matsui, T., S. Yonemura, and S. Tsukita. 1999. Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol*. 9:1259-62.
- Matter, K., and I. Mellman. 1994. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol*. 6:545-54.
- Melkonian, K.A., A.G. Ostermeyer, J.Z. Chen, M.G. Roth, and D.A. Brown. 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem*. 274:3910-7.
- Mellman, I., P. Pierre, and S. Amigorena. 1995. Lonely MHC molecules seeking immunogenic peptides for meaningful relationships. *Curr Opin Cell Biol*. 7:564-72.
- Michaely, P.A., C. Mineo, Y.S. Ying, and R.G. Anderson. 1999. Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. *J Biol Chem*. 274:21430-6.
- Millan, J., and M.A. Alonso. 1998. MAL, a novel integral membrane protein of human T lymphocytes, associates with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Src-like tyrosine kinases. *Eur J Immunol*. 28:3675-84.
- Millan, J., J. Cerny, V. Horejsi, and M.A. Alonso. 1999. CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains. *Tissue Antigens*. 53:33-40.
- Millan, J., L. Hewlett, M. Glyn, D. Toomre, P. Clark, and A.J. Ridley. 2006. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol*. 8:113-23.
- Millan, J., M.C. Montoya, D. Sancho, F. Sanchez-Madrid, and M.A. Alonso. 2002. Lipid rafts mediate biosynthetic transport to the T lymphocyte uropod subdomain and are necessary for uropod integrity and function. *Blood*. 99:978-84.
- Millan, J., R. Puertollano, L. Fan, C. Rancano, and M.A. Alonso. 1997. The MAL proteolipid is a component of the detergent-insoluble membrane subdomains of human T-lymphocytes. *Biochem J*. 321 ( Pt 1):247-52.
- Millan, J., and A.J. Ridley. 2005. Rho GTPases and leucocyte-induced endothelial remodelling. *Biochem J*. 385:329-37.
- Muniz, M., P. Morsomme, and H. Riezman. 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 104:313-20.
- Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*. 115:377-88.
- Murata, M., J. Peranen, R. Schreiner, F. Wieland, T.V. Kurzchalia, and K. Simons. 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:10339-43.
- Negulescu, P.A., T.B. Krasieva, A. Khan, H.H. Kerschbaum, and M.D. Cahalan. 1996. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity*. 4:421-30.
- Neumann-Giesen, C., B. Falkenbach, P. Beicht, S. Claasen, G. Luers, C.A. Stuermer, V. Herzog, and R. Tikkanen. 2004. Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem J*. 378:509-18.
- Nieto, M., J.M. Frade, D. Sancho, M. Mellado, A.C. Martinez, and F. Sanchez-Madrid. 1997. Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J Exp Med*. 186:153-8.

- Nusrat, A., C.A. Parkos, P. Verkade, C.S. Foley, T.W. Liang, W. Innis-Whitehouse, K.K. Eastburn, and J.L. Madara. 2000. Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 10):1771-81.
- Oh, H.M., S. Lee, B.R. Na, H. Wee, S.H. Kim, S.C. Choi, K.M. Lee, and C.D. Jun. 2007. RKIKK motif in the intracellular domain is critical for spatial and dynamic organization of ICAM-1: functional implication for the leukocyte adhesion and transmigration. *Mol Biol Cell.* 18:2322-35.
- Perez, P., R. Puertollano, and M.A. Alonso. 1997. Structural and biochemical similarities reveal a family of proteins related to the MAL proteolipid, a component of detergent-insoluble membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun.* 232:618-21.
- Pettersson, M., K. Dannaeus, K. Nilsson, and J.I. Jonsson. 2000. Isolation of MYADM, a novel hematopoietic-associated marker gene expressed in multipotent progenitor cells and up-regulated during myeloid differentiation. *J Leukoc Biol.* 67:423-31.
- Pimpinelli, F., S. Lehmann, and I. Maridonneau-Parini. 2005. The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central- but not peripheral-derived neuronal cell lines. *Eur J Neurosci.* 21:2063-72.
- Pollard, T.D. 2003. The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature.* 422:741-5.
- Pralle, A., P. Keller, E.L. Florin, K. Simons, and J.K. Horber. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol.* 148:997-1008.
- Puertollano, R., S. Li, M.P. Lisanti, and M.A. Alonso. 1997. Recombinant expression of the MAL proteolipid, a component of glycolipid-enriched membrane microdomains, induces the formation of vesicular structures in insect cells. *J Biol Chem.* 272:18311-5.
- Puertollano, R., F. Martin-Belmonte, J. Millan, M.C. de Marco, J.P. Albar, L. Kremer, and M.A. Alonso. 1999. The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 145:141-51.
- Puertollano, R., J.A. Martinez-Menarguez, A. Batista, J. Ballesta, and M.A. Alonso. 2001. An intact dilysine-like motif in the carboxyl terminus of MAL is required for normal apical transport of the influenza virus hemagglutinin cargo protein in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell.* 12:1869-83.
- Rajalingam, K., C. Wunder, V. Brinkmann, Y. Churin, M. Hekman, C. Sievers, U.R. Rapp, and T. Rudel. 2005. Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nat Cell Biol.* 7:837-43.
- Ridley, A.J. 2001. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11:471-7.
- Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302:1704-9.
- Rodriguez-Boulan, E., and W.J. Nelson. 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science.* 245:718-25.
- Rodriguez-Pena, J.M., C. Rodriguez, A. Alvarez, C. Nombela, and J. Arroyo. 2002. Mechanisms for targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored cell wall protein Crh2p to polarised growth sites. *J Cell Sci.* 115:2549-58.
- Rottner, K., A. Hall, and J.V. Small. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol.* 9:640-8.

- Sanchez-Madrid, F., and M.A. del Pozo. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J.* 18:501-11.
- Sanchez-Pulido, L., F. Martin-Belmonte, A. Valencia, and M.A. Alonso. 2002. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem Sci.* 27:599-601.
- Sankaram, M.B., and T.E. Thompson. 1990. Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry.* 29:10670-5.
- Sapirstein, V.S., C. Nolan, R. Stern, M. Ciocci, and S.K. Masur. 1988. Identification of the plasma membrane proteolipid protein as a constituent of brain coated vesicles and synaptic plasma membrane. *J Neurochem.* 51:925-33.
- Scheiffele, P., M.G. Roth, and K. Simons. 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *Embo J.* 16:5501-8.
- Shea, T.B., I. Fischer, and V. Sapirstein. 1986. Expression of a plasma membrane proteolipid during differentiation of neuronal and glial cells in primary culture. *J Neurochem.* 47:697-706.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387:569-72.
- Simons, K., and G. van Meer. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry.* 27:6197-202.
- Skibbens, J.E., M.G. Roth, and K.S. Matlin. 1989. Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J Cell Biol.* 108:821-32.
- Small, J.V., and I. Kaverina. 2003. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol.* 15:40-7.
- Smart, E.J., G.A. Graf, M.A. McNiven, W.C. Sessa, J.A. Engelman, P.E. Scherer, T. Okamoto, and M.P. Lisanti. 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.* 19:7289-304.
- Smart, E.J., Y.S. Ying, C. Mineo, and R.G. Anderson. 1995. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10104-8.
- Soderling, S.H., K.L. Binns, G.A. Wayman, S.M. Davee, S.H. Ong, T. Pawson, and J.D. Scott. 2002. The WRP component of the WAVE-1 complex attenuates Rac-mediated signalling. *Nat Cell Biol.* 4:970-5.
- Sotgia, F., B. Razani, G. Bonuccelli, W. Schubert, M. Battista, H. Lee, F. Capozza, A.L. Schubert, C. Minetti, J.T. Buckley, and M.P. Lisanti. 2002. Intracellular retention of glycosylphosphatidyl inositol-linked proteins in caveolin-deficient cells. *Mol Cell Biol.* 22:3905-26.
- Souto, R.P., G. Vallega, J. Wharton, J. Vinten, J. Trantum-Jensen, and P.F. Pilch. 2003. Immunopurification and characterization of rat adipocyte caveolae suggest their dissociation from insulin signaling. *J Biol Chem.* 278:18321-9.
- Srinivasan, S., F. Wang, S. Glavas, A. Ott, F. Hofmann, K. Aktories, D. Kalman, and H.R. Bourne. 2003. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol.* 160:375-85.
- Tang, Z., P.E. Scherer, T. Okamoto, K. Song, C. Chu, D.S. Kohtz, I. Nishimoto, H.F. Lodish, and M.P. Lisanti. 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem.* 271:2255-61.

- 
- Tavernarakis, N., M. Driscoll, and N.C. Kyrpides. 1999. The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci.* 24:425-7.
- Tilghman, R.W., and R.L. Hoover. 2002. E-selectin and ICAM-1 are incorporated into detergent-insoluble membrane domains following clustering in endothelial cells. *FEBS Lett.* 525:83-7.
- Trigatti, B.L., R.G. Anderson, and G.E. Gerber. 1999. Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 255:34-9.
- Varma, R., and S. Mayor. 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature.* 394:798-801.
- Wandinger-Ness, A., M.K. Bennett, C. Antony, and K. Simons. 1990. Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J Cell Biol.* 111:987-1000.
- Wang, F., P. Herzmark, O.D. Weiner, S. Srinivasan, G. Servant, and H.R. Bourne. 2002. Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol.* 4:513-8.
- Webb, D.J., J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2002. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol.* 4:E97-100.
- Welch, M.D., and R.D. Mullins. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:247-88.
- Wozniak, M., J.R. Keefer, C. Saunders, and L.E. Limbird. 1997. Differential targeting and retention of G protein-coupled receptors in polarized epithelial cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 17:373-83.