

Universitat de València

Departament de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de doctorado de Bioquímica Clínica-Médica e Inmunología



La biología celular de GPBP

(Goodpasture-antigen binding protein).

Tesis doctoral

Presentada por:

Ignacio Ventura González

Dirigida por:

Dr. Juan Saus Mas y Dr. Fernando Revert Ros

Julio 2014

A mi padre



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

FibroStatin

El Dr. **JUAN SAUS MAS**, Investigador Jefe del Laboratorio de Patología Autoinmune (LPA) y Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia y el Dr. **FERNANDO REVERT ROS**, Investigador.

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por **IGNACIO VENTURA GONZÁLEZ**, titulada "**La biología celular de GPBP (*Goodpasture-antigen binding protein*)**", ha sido realizada bajo su dirección y reúne a nuestro juicio todos los requisitos necesarios para su calificación.

Valencia, Junio de 2014.

Dr. **Juan Saus Mas**

Dr. **Fernando Revert Ros**

CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	11
1.1	EL SISTEMA INMUNE Y LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA.....	13
1.2	LA ENFERMEDAD AUTOINMUNE: UNA PATOLOGÍA ASOCIADA A UNA RESPUESTA INMUNE CONTRA COMPONENTES PROPIOS.	14
1.3	LA ENFERMEDAD DE GOODPASTURE COMO MODELO DE ENFERMEDAD AUTOINMUNE.....	16
1.4	BASES MOLECULARES DE LA PRODUCCIÓN DE AUTOANTICUERPOS EN LA ENFERMEDAD DE GOODPASTURE.	22
1.5	ESTRUCTURA TERCIARIA Y CUATERNARIA DE $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	23
1.6	GPBP, UNA ENZIMA QUE CATALIZA TRANSFERENCIA DE FOSFATOS Y LA AGREGACIÓN SUPRAMOLECULAR DEL ANTÍGENO GOODPASTURE.	25
1.7	GPBP ES UNA ENZIMA IMPLICADA EN LA PATOGENIA AUTOINMUNE.	28
1.8	GPBP-1 AUMENTA SU EXPRESIÓN EN TEJIDOS AFECTADOS POR UNA PATOLOGÍA AUTOINMUNE.	29
1.9	EL PROMOTOR DE GPBP RESPONDE A <i>TUMOR NECROSIS FACTOR-α</i> (TNF- α).....	31
1.10	UN INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE GPBP-1 CAUSA UNA DESORGANIZACIÓN DE LA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR CON DEPÓSITOS DE IGA.	33
1.11	OTRAS FUNCIONES BIOLÓGICAS DESCRITAS PARA GPBP.	35
2	OBJETIVOS	39
3	METODOLOGÍA	43
3.1	ANTICUERPOS Y PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	45
3.2	<i>WESTERN BLOT</i>	50
3.3	PLÁSMIDOS.....	50
3.4	RT (RETROTRANSCRIPCIÓN) Y PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>).....	52
3.5	MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.....	53
3.6	ESTUDIOS DE HIBRIDACIÓN DE COLONIAS DE BACTERIAS CON SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	55
3.7	PURIFICACIÓN DE ARN.	56
3.8	TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i>	56
3.9	CULTIVOS CELULARES.....	57

3.10	FRACCIONAMIENTOS CELULARES.....	58
3.11	ENSAYOS DE <i>CROSS-LINKING EX VIVO</i>	60
3.12	CITOMETRÍA DE FLUJO.	61
3.13	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	61
3.14	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.....	62
3.15	MICROSCOPIA CONFOCAL DE ALTA RESOLUCIÓN (4π).....	63
3.16	ENSAYOS DE AUTOFOSFORILACIÓN <i>IN VITRO</i>	66
3.17	ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	67
4	RESULTADOS.....	69
4.1	EL GEN <i>COL4A3BP</i> TRANSCRIBE TRES ARNm.....	71
4.2	CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA GPBP.....	72
4.3	IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE <i>COL4A3BP</i>	74
4.4	GPBP-3 PROCEDE DE UN INICIO ALTERNATIVO DE LA TRADUCCIÓN.	77
4.5	GPBP-3 SE UNE A MEMBRANAS CELULARES.	79
4.6	GPBP-1 ES UNA PROTEÍNA SOLUBLE EXTRACELULAR QUE INTERACCIONA CON EL COLÁGENO TIPO IV.	81
4.7	LA UNIÓN A VAP FACILITA LA EXPORTACIÓN DE GPBP-1.	85
4.8	GPBP-3 REGULA LOS NIVELES DE GPBP-1 EN EL MEDIO EXTRACELULAR.	86
4.9	GPBP-1 RECOMBINANTE SE EXPORTA AL MEDIO Y ES CAPTURADA POR CÉLULAS EN CULTIVO.....	89
4.10	GPBP-1 NO ES SENSIBLE AL TRATAMIENTO CELULAR CON ESFINGOMIELINASA.....	91
4.11	GPBP-2 TIENE UNA SECUENCIA KDEL DE RETENCIÓN EN EL RE QUE IMPIDE SU EXPORTACIÓN.	93
4.12	GPBP-2 REGULA EN EL TRÁFICO DE PROTEÍNAS EN LA RUTA SECRETORA.	101
5	CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN.....	105
6	BIBLIOGRAFÍA.....	113
7	ABREVIATURAS.....	129
8	AGRADECIMIENTOS.....	135

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El sistema inmune y la tolerancia inmunológica

El sistema inmune comprende un conjunto de células y tejidos que velan por la integridad del organismo que los alberga. El sistema inmune es el encargado del discernimiento entre lo propio y lo ajeno, y también entre lo propio y lo propio que ha degenerado. Su principal función es defensiva, con una alta especificidad de reconocimiento de moléculas ajenas, acoplada a mecanismos potentes para la eliminación de los microorganismos que las portan (Paul, 1999). Esta función la desarrollan los leucocitos y un número de células accesorias que están distribuidas por todo el organismo, que se encuentran preferentemente en los órganos linfoides (médula ósea, timo, bazo, nódulos linfáticos y mucosa asociada a tejido linfoide). La localización de los órganos linfoides permite proteger áreas diferentes del cuerpo frente a la infección. Las células linfoides migran entre estas localizaciones, el torrente sanguíneo y el sistema linfático, para interactuar y generar respuestas inmunes coordinadas que ayudan a la eliminación de patógenos y a minimizar el daño que éstos ocasionan (Male, 1998).

Una de las respuestas del sistema inmune es la producción de anticuerpos frente a un patógeno particular, lo que se conoce por respuesta inmune adaptativa. Esta confiere inmunidad para toda la vida, lo que se denomina memoria inmunológica. Se pueden generar anticuerpos específicos contra una amplia variedad de moléculas, denominadas antígenos, pero como no todas las respuestas inmunes adaptativas implican la producción de anticuerpos, el término antígeno se usa hoy en día en un sentido más amplio

para describir a cualquier molécula capaz de ser reconocida por el sistema inmune y activarlo (Janeway y Travers, 1997).

La respuesta inmune que se genera frente a los antígenos es muy específica y capaz de discriminar entre una gran variedad de antígenos. Y discernir entre los determinantes antigénicos expresados por organismos ajenos y los expresados por el propio organismo. La capacidad del sistema inmune para ignorar antígenos propios es un proceso activo denominado tolerancia inmunológica (Paul, 1999).

1.2 La enfermedad autoinmune: una patología asociada a una respuesta inmune contra componentes propios.

La autoinmunidad debe entenderse como un fenómeno inmune asociado a componentes propios (autoantígenos) y, por lo tanto, como un fracaso de la tolerancia inmunológica y el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa específica contra antígenos propios (Shlomchick *et al.*, 1987). Cuando el fenómeno autoinmune causa una enfermedad, ésta se denomina enfermedad autoinmune. Actualmente la definición de enfermedad autoinmune incluye la demostración de una respuesta autoinmune: autoanticuerpos y/o linfocitos autorreactivos asociados al establecimiento o mantenimiento de una patología independientemente de que el agente inmunológico autorreactivo desempeñe o no, el papel patogénico principal (Ermann y Fathman, 2001; Lipsky, 2001). Las enfermedades autoinmunes tienen una amplia prevalencia en la población (3-8%; Bona & Theofilopoulos, 2002), pueden ser fatales y a menudo ocurren en edad temprana, afectando más a las mujeres que a los

hombres. La consecuencia normal de una respuesta inmune adaptativa contra un antígeno foráneo es su eliminación. Sin embargo, cuando una respuesta inmune se desarrolla contra antígenos propios es difícil eliminar los antígenos completamente. La consecuencia es que las vías inmunitarias efectoras, causan habitualmente inflamaciones crónicas dañinas para los tejidos, que pueden resultar mortales como por ejemplo sucede en el síndrome Goodpasture (Janeway y Travers, 1997). En otros casos, autoanticuerpos dirigidos contra receptores funcionales de la superficie celular estimulan o inhiben funciones celulares específicas, provocan enfermedades en las que la destrucción celular no es un hallazgo patológico relevante, como sucede por ejemplo en la miastenia gravis, en la que los receptores de acetilcolina de la membrana postsináptica de la unión neuromuscular son bloqueados por autoanticuerpos (Bona y Theofilopoulos, 2002).

Aunque está ampliamente aceptado que las enfermedades autoinmunes se producen por un fracaso en la tolerancia inmunológica, no se conoce el mecanismo íntimo por el que un número limitado y específico de componentes pueden escapar a los mecanismos de tolerancia y desencadenar una respuesta inmune. Una de las principales dificultades para el conocimiento de la patogenia autoinmune ha sido la escasez de información sobre la naturaleza de los autoantígenos que inician y perpetúan las respuestas autoinmunes. No obstante, estas enfermedades parecen ser multifactoriales, y en su patogénesis se requiere de la acción concertada de factores ambientales, genéticos y, en algunos casos, también de una disfunción (o predisposición) del sistema inmune (Ermann y Fathman, 2001; Lipsky, 2001). En este sentido se ha

propuesto que ciertos fenómenos autoinmunes podrían no estar estrictamente causados por un fracaso en la tolerancia, sino más bien estarían desencadenados por la aparición de antígenos propios creados *de novo* para los que la tolerancia no había sido previamente establecida (Saus, J., 1998; Borza *et al.*, 2000).

1.3 La enfermedad de Goodpasture como modelo de enfermedad autoinmune.

En 1919, Ernest Goodpasture describió la coexistencia de una hemorragia pulmonar y una glomerulonefritis rápidamente progresiva en un hombre joven que había sido víctima de una gripe pandémica (Goodpasture, 1919). Posteriormente, el término síndrome de Goodpasture fue acuñado para describir la coexistencia de estas manifestaciones (Stanton y Tange, 1958) y más tarde, se ha utilizado para designar una enfermedad autoinmune que cursa con una glomerulonefritis rápidamente progresiva, presencia de autoanticuerpos circulantes y depósitos lineares de los mismos a lo largo de la membrana basal del glomérulo renal, y con la asociación frecuente de hemoptisis.

El **riñón** es un órgano del aparato urinario adosado a la pared posterior del abdomen. Se extiende entre la última vértebra torácica y la tercera lumbar. Tiene forma de habichuela y, cuando se secciona longitudinalmente (Figura 1A), se observan en él dos porciones de una estructura diferente: la corteza, de un color rojo burdeos, y la médula, de una tonalidad rosácea. El borde medial del riñón está excavado formando el seno renal.

El parénquima renal está constituido por unidades funcionales denominadas **nefronas** (Figura 1B), encargadas de filtrar la sangre y reabsorber las sustancias útiles del filtrado.

La orina se filtra en los **glomérulos** (Figura 1C), y es vertida a los conductos colectores que desembocan en los cálices menores de la pelvis renal. El glomérulo renal está formado por una red de capilares, células mesangiales y la capsula de Bowman. La **barrera de filtración glomerular** está compuesta por células endoteliales que presentan fenestraciones, una membrana basal, y por células epiteliales denominadas podocitos (Figura 1D).

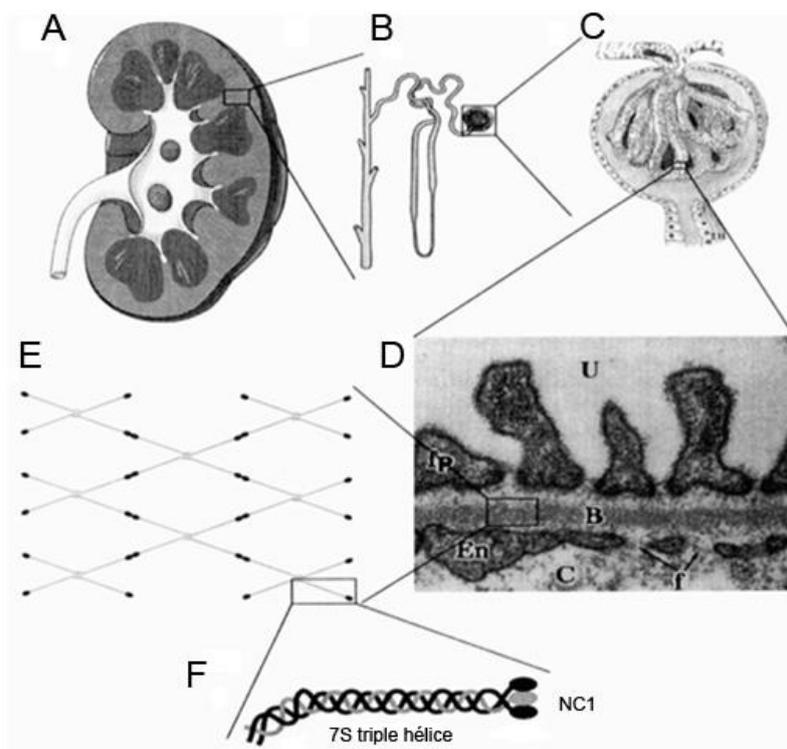


Figura 1. Estructura de la red de colágeno en la membrana basal glomerular. Se representa en **A**. Corte sagital de riñón humano. **B**. Nefrona renal. **C**. Glomérulo renal. **D**. Micrografía electrónica de una sección de la membrana basal glomerular (**B**), resultado de la fusión de dos membranas basales durante el desarrollo, una epitelial y una endotelial. (**U**), espacio urinario; (**fp**), podocitos epiteliales; (**En**), endotelio; (**C**), capilar; (**f**), fenestraciones endoteliales. **E**. Estructura supramolecular del colágeno IV en forma de red poligonal tridimensional sobre la que se ensamblan el resto de los componentes de la membrana basal. **F**. Molécula de colágeno en la que se distinguen tres dominios estructurales: dominio 7S, triple hélice y dominio NC1. Las moléculas de colágeno IV se unen a través de sus dominios NC1 para formar dímeros, mientras que lo hacen a través de sus dominios 7S para formar tetrámeros.

Las **membranas basales** son estructuras especializadas de la matriz extracelular que separan las células de un tejido del tejido conectivo, y están formadas por una trama de fibras reticulares y sustancia intercelular con mucopolisacáridos. Las membranas basales sirven como soporte físico (Timpl, *et al.*, 1981), actúan como substrato para procesos de adhesión (McCarthy y Furcht, 1984), e intervienen en la migración celular y en la ultrafiltración (Haberern y Kupchik, 1985).

La **membrana basal glomerular** (MBG) procede de la fusión embrionaria de dos membranas basales: una sintetizada por el endotelio fenestrado y otra por los podocitos. La MBG tiene un grosor de 240 a 340 nm y está hecha de una gran malla reticular de **colágeno tipo IV** (Figura 1E), glicoproteínas y proteoglicanos, como por ejemplo el heparán sulfato y una proteína denominada laminina. Durante los últimos veinte años se creía que la función fisiológica más relevante de la MBG es la ultrafiltración de la sangre para producir la orina primaria (Rennke *et al.*, 1975); la MBG actuaría como un tamiz que retiene las proteínas en la sangre, evitando que pasen a la orina. La aparición de proteínas en la orina (proteinuria) es un signo de fallo renal. Recientemente este concepto ha cambiado: ratones con bajos niveles de proteoglicanos heparán sulfato, en los que la carga negativa de la MBG se pierde, no desarrollan proteinuria. Por otro lado, ratones con mutaciones en el colágeno tipo IV con hematuria, tienen una proteinuria leve. Estos resultados ponen de manifiesto que el papel de la MBG como barrera de filtración macromolecular no es tan relevante como se creía, y su principal función sería

la de servir como estructura de soporte para los podocitos y las células endoteliales de los capilares (Chiang e Inagi, 2010).

El **colágeno IV** es el principal componente estructural de las membranas basales sobre el que se ensamblan el resto de los componentes (Figura 1E y F). La molécula de colágeno IV o protómero, está compuesta por tres cadenas α que se superenrollan y generan una estructura característica denominada triple hélice. En mamíferos existen seis genes que codifican cadenas α , desde $\alpha 1$ hasta $\alpha 6$, según se fueron descubriendo (Borza *et al.*, 2002). La molécula de colágeno IV posee tres dominios principales, un dominio central en triple hélice con una secuencia característica G-X-Y necesaria para que las tres cadenas se puedan enrollar, un dominio amino terminal (N-ter) también triple helicoidal denominado 7S, y un dominio carboxi terminal (C-ter) globular no colagenoso, denominado NC1 (Hudson *et al.*, 2003). Estudios de microscopía electrónica muestran que los dominios 7S y NC1, son los dominios de la molécula que más interaccionan (Timpl *et al.*, 1981). Cuatro protómeros de colágeno IV interaccionan a través de sus dominios 7S, y los seis dominios NC1 de dos protómeros interaccionan dando lugar a una estructura característica del colágeno IV denominada hexámero. Los dominios NC1 individuales están estabilizados por puentes disulfuro intramoleculares y puentes disulfuro intermoleculares que estabilizan parcialmente el hexámero (Timpl *et al.*, 1981). Entrecruzamientos a través de los dominios 7S y NC1 y otros laterales, estabilizan el entramado denso e irregular de la red de colágeno IV (Tsilibary *et al.*, 1987). Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de enlace que estabiliza el dominio NC1 del colágeno IV, los enlaces sulfilimina (-

S=N-) que se forman por la unión de un residuo hidroxilisina con una metionina de protómeros adyacentes (Vanacore *et al.*, 2009). Los dominios NC1 dirigen el trenzado del protómero, y a través de motivos RGD también actúan como ligandos para los receptores tipo integrina situados en la superficie celular mediando, la adhesión, la migración, el crecimiento y la diferenciación celular (Vanacore *et al.*, 2009).

La implicación de los **autoanticuerpos** en la patogénesis de glomerulonefritis humanas fue inicialmente propuesta por Scheer y Grossman al observar la presencia de depósitos lineares de anticuerpos a lo largo de la MBG en pacientes con enfermedad de Goodpasture (Scheer *et al.*, 1964). Posteriormente, el papel patogénico de los anticuerpos en este síndrome se demostró al inducir en primates una glomerulonefritis similar mediante la inyección de los anticuerpos humanos extraídos a partir de riñones de pacientes Goodpasture (Lerner *et al.*, 1967).

Finalmente, la identificación del dominio C terminal no colagenoso, NC1, de la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV como único **autoantígeno**, y la existencia de un epitopo principal común en todos los pacientes Goodpasture, fue el hallazgo que permitió acuñar el término enfermedad de Goodpasture para designar a la entidad nosológica causada por una respuesta autoinmune contra el epitopo de este dominio (Wieslander *et al.*, 1984a; Wieslander *et al.*, 1984b; Butkowski *et al.*, 1987; Saus *et al.*, 1988; Johansson *et al.*, 1994; Kalluri *et al.*, 1994; Hudson *et al.*, 2003).

La baja solubilidad y la alta interactividad del colágeno IV dificultan mucho su aislamiento, obligando a que los estudios sobre su composición catenaria se hayan realizado con productos proteolíticos más manejables. En este sentido, la colagenasa bacteriana ha sido una herramienta muy útil, ya que solubiliza los dominios NC1 en su forma hexamérica. En condiciones desnaturalizantes, el hexámero se disocia en monómeros y dímeros que resultan de la unión mediante puentes disulfuro de dos o más cadenas α pertenecientes a moléculas distintas (Figura 2).

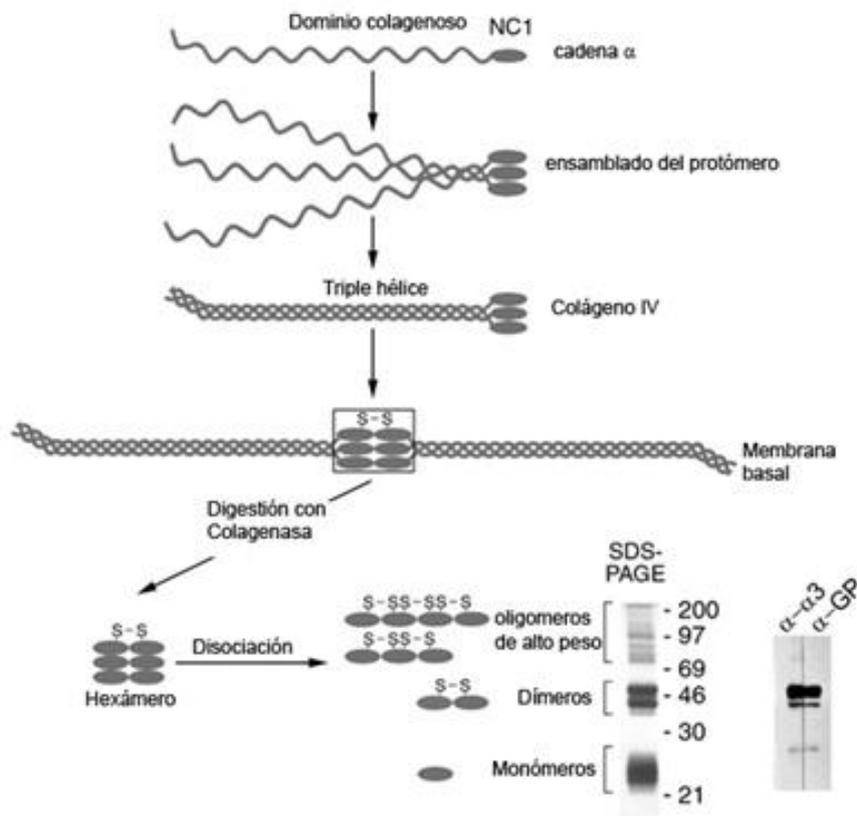


Figura 2. Representación esquemática de la formación del hexámero de colágeno y su solubilización mediante colagenasa bacteriana. La digestión mediante colagenasa bacteriana de la red de colágeno IV libera el hexámero formado por los seis dominios NC1 de dos moléculas de colágeno, que se disocia en monómeros y dímeros en condiciones desnaturalizantes. Los determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos GP están ocultos dentro del hexámero aislado, y solo está presente en el dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. En la parte inferior derecha el hexámero se estudia mediante la técnica de *Western blot* en el que la membrana se divide en dos y cada una de las piezas se incuba con suero GP (derecha) o con anticuerpos monoclonales que reconocen la región N-terminal del dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ humano (izquierda). El patrón de reactividad es indistinguible para monómeros (M) y dímeros (D) confirma la localización del antígeno Goodpasture en el dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$.

1.4 Bases moleculares de la producción de autoanticuerpos en la enfermedad de Goodpasture.

La enfermedad de Goodpasture es exclusivamente humana. De las seis cadenas α de colágeno IV humano sólo el dominio NC1 de la cadena $\alpha3$ es capaz de desencadenar una respuesta autoinmune natural. Esta secuencia de 244 residuos que no digiere la colagenasa bacteriana se denomina antígeno Goodpasture (GP). Este hecho y el alto grado de homología estructural entre cadenas y entre especies, ha permitido llevar a cabo estudios comparativos encaminados a identificar rasgos biológicos de relevancia en la patogenia de esta enfermedad. El clonado molecular de las distintas cadenas alfa (α) permitió identificar una región altamente divergente en el extremo N-terminal del antígeno GP, que contiene un gran número de residuos fosforilables y también un motivo de reconocimiento para integrinas que forma parte de un consenso para varias proteínas cinasas -KRGDS⁹- (Quiñones, *et al.*, 1992). Estudios posteriores demostraron que esta región, y específicamente la Ser⁹, es un sitio principal de fosforilación para proteína cinasa(s) endógenas, y que este proceso de fosforilación es característico del antígeno GP cuando se compara con otros dominios relacionados no antigénicos (Revert *et al.*, 1995).

Otro rasgo biológico característico del antígeno GP implica la diversificación estructural que se genera mediante ensamblado alternativo de exones ("*alternative exon splicing*") del correspondiente pre-ARNm. Un proceso de diversificación que es único entre las cadenas de colágeno IV, y que no se observa en otros mamíferos superiores. El fenómeno de reordenamiento

exónico sólo implica los exones de la región génica que codifica el antígeno GP, y se han descrito hasta seis ARNm a partir del pre-ARNm de $\alpha 3$ (IV) humano (Bernal *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1994; Penadés *et al.*, 1995). En todos los tejidos estudiados el ARNm que codifica el producto primario (antígeno GP) es el más abundante, y los niveles relativos de expresión de cada ARNm alternativo varían según el tejido (Bernal *et al.*, 1993). Los productos alternativos (GP Δ III, GP Δ V, GP Δ III/IV/V) divergen entre sí a través de su región C terminal y comparten la región N terminal fosforilable (Revert *et al.*, 1995). Los riñones de pacientes Goodpasture tienen niveles de expresión elevados de productos alternativos (GP Δ III) (Bernal *et al.*, 1993; Saus, 2002).

1.5 Estructura terciaria y cuaternaria de $\alpha 3$ (IV)NC1.

El hexámero aislado con colagenasa a partir de testículo bovino (abundante en colágeno IV), contiene dos polipéptidos del dominio $\alpha 3$ (IV)NC1, designados como M_H (monómero de alto peso molecular) y M_L (monómero de bajo peso molecular) (Calvete *et al.*, 2006). Mientras M_H contiene cuatro tripletes Gly-X-Y en el extremo N-terminal, M_L contiene un solo triplete Gly-X-Y (Gunwar *et al.*, 1990) (Figura 3). Estudios proteómicos dirigidos a caracterizar su estructura terciaria revelan que M_H y M_L tienen una organización intramolecular de puentes disulfuro diferente (Figura 3; Calvete *et al.*, 2006). Los resultados indican que se trata de estructuras terciarias distintas procedentes de una misma estructura primaria, por lo que se han denominado “confórmeros” (Calvete *et al.*, 2006).

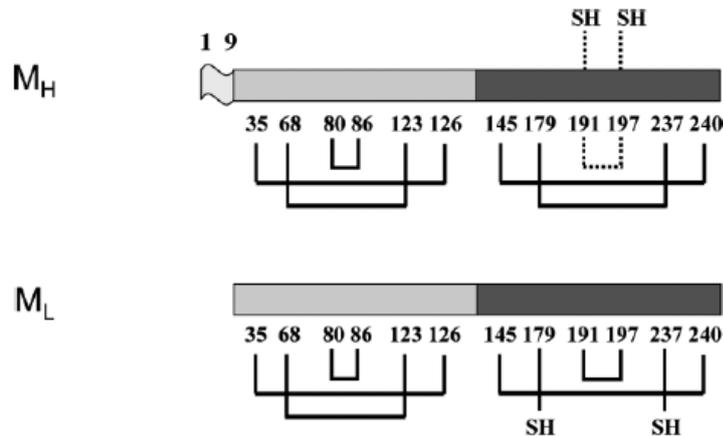


Figura 3. Organización intramolecular de enlaces disulfuro en los conformémeros $\alpha 3(IV)NC1$. Con barras se esquematiza la estructura de los dos conformémeros principales (M_H y M_L). Con números se indica la posición de las Cys que estabilizan los dos subdominios homólogos (distinto relleno). Las líneas y corchetes indican el estado reducido (SH) u oxidado de las Cys, respectivamente. La continuidad o discontinuidad hace referencia a la invariabilidad o variabilidad del estado redox, respectivamente. La secuencia N terminal que se proteoliza en M_L se delimita en M_H con números (1-9).

Mediante inmunoprecipitación con autoanticuerpos de paciente GP, se observa que M_L se ensambla en hexámeros (estructuras cuaternarias) donde el epítipo es accesible a los autoanticuerpos, mientras que M_H se ensambla en hexámeros donde el epítipo no es accesible a los mismos autoanticuerpos (Figura 4). Esto indica que los conformémeros M_H y M_L , en condiciones nativas, se ensamblan de forma diferente en la estructura cuaternaria, presentando una exposición diferente del epítipo GP, luego la estructura terciaria condiciona en gran medida la exposición del epítipo en la estructura cuaternaria. Este hallazgo sugiere que la estructura terciaria del antígeno tiene relevancia en la patogenia de la enfermedad, ya son los anticuerpos de paciente los que discriminan las estructuras terciarias y cuaternarias.

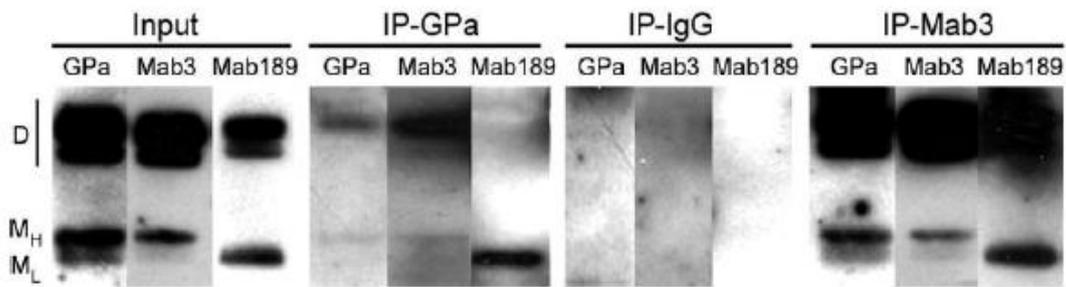


Figura 4. Exposición diferencial de los epitopos patogénicos. Se muestran los análisis mediante *Western blot* de inmunoprecipitaciones (IP) de hexámero procedente de testículo bovino, utilizando anticuerpos inmunopurificados de un paciente Goodpasture (GPa), o IgG humana (IgG) como control negativo, o un anticuerpo monoclonal (mAb 3) cuyo epitopo solapa con el epitopo de los anticuerpos de paciente (GPa) y cuya reactividad depende de la correcta formación de un puente disulfuro (Michelle *et al.*, 2001). Los *Western blots* se analizaron con los anticuerpos GPa, mAb 3 y mAb 189, un anticuerpo monoclonal que preferentemente reconoce el monómero de bajo peso molecular (M_L). Se indica la movilidad de los dímeros con la letra **D**, y de los monómeros de alto peso y de bajo peso molecular M_H y M_L respectivamente. Los anticuerpos GPa extraen del hexámero preferentemente el monómero M_L (IP-GPa), que es reconocido por mAb 189. En cambio, mAb 3 no discrimina entre monómeros (IP-mAb3).

1.6 GPBP, una enzima que cataliza transferencia de fosfatos y la agregación supramolecular del antígeno Goodpasture.

Con el propósito de identificar proteínas con posible relevancia patogénica en la enfermedad de Goodpasture, se cribaron librerías de expresión buscando polipéptidos que interaccionaran con la región divergente N-terminal del antígeno GP. De forma combinada se utilizaron un péptido sintético de 21 residuos que representan esta región y anticuerpos monoclonales contra el mismo. Mediante esta estrategia se llevó a cabo el clonado molecular de una proteína de 624 residuos que interacciona y fosforila el péptido sintético y el antígeno GP humano, por lo que se denominó GPBP, “*Goodpasture-antigen binding protein*” (Raya *et al.*, 1999). GPBP contiene un alto número de aminoácidos fosforilables (17.9%) y ácidos (16%), siendo la serina el residuo más abundante (9.3%).

Desde un punto de vista estructural GPBP es una proteína compleja, que presenta numerosos dominios y motivos (Figura 5). En la región N terminal hay un dominio homólogo a *pleckstrina* (dominio PH) y dos regiones ricas en serinas, una de ellas N-terminal (SR1), con un motivo “Ser-X-Y” que es un sitio de fosforilación de la proteína cinasa D (PKD; Fugmann *et al.*, 2007). La región central contiene una secuencia de localización nuclear bipartita solapada con un dominio superhelicoidal o *coiled-coil* y un motivo FFAT, que es una secuencia de dos fenilalaninas seguidas dentro de una región ácida, (double *phenylalanine in an acidic tract*; Loewen *et al.*, 2003)¹. En la región C-terminal de GPBP hay un dominio START (*steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer*).

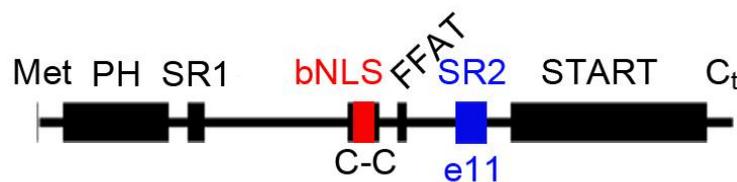


Figura 5. Representación esquemática de los principales dominios y motivos estructurales de GPBP-1. El polipéptido tiene 624 residuos, y la localización y extensión de los elementos estructurales está representada a escala. Los dominios y motivos son: dominio homólogo a *pleckstrina* (PH), próximo a la metionina de inicio (Met); dominios ricos en serinas (SR1 y SR2), el segundo de ellos se corresponde al exón 11 que no está presente en GPBP-2; secuencia de localización nuclear bipartita (bNLS), situada en medio de una secuencia *coiled-coil* (C-C); motivo FFAT; y dominio START.

Los **dominios PH** comprenden una variedad de estructuras poco conservadas presentes sólo en organismos eucariotas que sirven para que las proteínas interactúen con membranas celulares a través fosoinositidos (Dowler *et al.*, 2000). Varias proteínas cinasas presentan dominios PH (Alpy *et al.*, 2005). Los **motivos FFAT** unen las proteínas al retículo endoplasmático

¹ La secuencia de este motivo en GPBP es “³²²FFDAVE³²⁷”.

(RE) a través de la interacción con el dominio citosólico de las proteínas transmembrana VAP (*vesicle-associated membrane protein-associated proteins*; Loewen *et al.*, 2003). Las proteínas VAP juegan un papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis del RE necesaria para plegar correctamente las proteínas y exportarlas al exterior de la célula (Kanekura, *et al.*, 2006). Los **dominios START** unen lípidos, incluyendo ceramida, fosfolípidos y esteroides, y están presentes en diversas proteínas con diferentes funciones fisiológicas y patológicas (Raymond, 2003).

No hay genes que codifiquen proteínas semejantes a GPBP en el genoma humano, sugiriendo que se trata de una enzima única con capacidad para transferir fosfatos. La homología con otras especies de mamíferos supera el 95%, en cambio, con especies más alejadas se limita a dominios individuales o marcas estructurales.

El gen de GPBP, *COL4A3BP*, codifica dos isoformas principales, una canónica denominada GPBP-1 (previamente GPBP); y una isoforma alternativa denominada GPBP-2 (previamente GPBP Δ 26)². Esta última es una isoforma que se genera mediante procesamiento alternativo del pre-ARNm con la exclusión de un exón de 78 nucleótidos (exón 11) que codifica 26 residuos (Figura 5; Raya *et al.*, 2000). Las dos isoformas de la proteína presentan diferencias, tanto en su estructura como en su actividad. Así GPBP-1, forma estructuras cuaternarias de alto peso molecular, que inicialmente se

² En un trabajo reciente se cambió la nomenclatura para simplificarla (Revert-Ros, *et al.*, 2011). En esta tesis "GPBP" hace referencia cualquiera de ellas.

identificaron como posibles trímeros, y de muy alto peso molecular (superior a 10^6 Da), y se muestra como una cinasa con una actividad específica mayor que GPBP-2, que forma agregados de 310 kDa, posiblemente tetrámeros. Se ha propuesto que la presencia o ausencia del exón 11 es una estrategia para regular una misma actividad catalítica (Raya *et al.*, 2000).

La contrapartida recombinante de GPBP-1 producida en células de cultivo HEK 293 presenta un tamaño estimado de 77 kDa, frente a los 71 kDa que se esperan a partir de su estructura primaria principalmente por la presencia de fosforesiduos (PSer, PThr y PTyr; Raya *et al.*, 1999).

GPBP tiene capacidad para transferir fosfatos a residuos serina y/o treonina presentes en su molécula (autofosforilación) o en proteínas sustrato, a pesar de que no posee los requerimientos estructurales que definen el dominio catalítico de una proteína cinasa convencional (Raya *et al.*, 1999).

1.7 GPBP es una enzima implicada en la patología autoinmune.

GPBP-1 y GPBP-2 se expresan en todos los tejidos humanos analizados. El tejido donde más GPBP-1 se expresa es el músculo estriado (Raya *et al.*, 1999; Raya *et al.*, 2000; Revert-Ros *et al.*, 2011). En riñón, la mayor expresión de GPBP-1 y GPBP-2 se observa en las células epiteliales de los túbulos, en células mesangiales y en los podocitos del glomérulo. También se expresa en los alvéolos pulmonares y en los neumocitos, presentando una distribución lineal que sugiere una localización en la membrana basal. En el

tejido hepático se observa una baja expresión en parénquima y alta en los conductos biliares. En el sistema nervioso central se expresa en la materia blanca y poco en neuronas (Mencarelli *et al.*, 2009). En el testículo se observa una alta expresión en las espermatogónias, que contrasta con la ausencia de expresión en células de Sertoli. En el páncreas GPBP se expresa principalmente en los islotes de Langerhans. Otras localizaciones son las células epiteliales del tracto intestinal y las células de Purkinje del cerebelo. En general, en los tejidos donde GPBP-1 y GPBP-2 se expresan, el patrón es esencialmente citosólico difuso, aunque dependiendo del tejido estudiado se puede localizar en estructuras como el núcleo, la membrana plasmática o la matriz extracelular (Raya *et al.*, 1999), sugiriendo que los diferentes motivos y dominios permiten a GPBP alcanzar múltiples compartimentos intracelulares y el medio extracelular .

1.8 GPBP-1 aumenta su expresión en tejidos afectados por una patología autoinmune.

GPBP-1 y GPBP-2 también presentan diferencias en cuanto a su expresión, y de este modo GPBP-1 presenta una sobreexpresión relativa en los tejidos y células que son diana de respuestas autoinmunes comunes, incluyendo las membranas basales alveolares y glomerular, y de forma más acusada estas diferencias se hacen notar en la patología. Así, mientras que la expresión relativa de GPBP-1 está fuertemente aumentada en los tejidos que están sufriendo un ataque autoinmune (Figura 6), en células tumorales tiene una baja expresión (Raya *et al.*, 2000). Todo ello sugiere que la homeostasis se alcanza mediante una relación GPBP-1/GPBP-2 determinada y que un

incremento en esta relación se asocia a la patogenia autoinmune mientras que una disminución se asocia a transformación tumoral (Raya *et al.*, 2000). GPBP se sobre-expresa en enfermedades autoinmunes.

Las primeras evidencias que relacionan GPBP con otras enfermedades autoinmunes se hallaron mediante análisis de biopsias de piel de pacientes con liquen plano o lupus cutáneo, enfermedades autoinmunes cutáneas (Raya *et al.*, 2000). En queratinocitos periféricos de la epidermis de un donante sano, GPBP-1 tiene un nivel de expresión bajo, mientras que en las lesiones autoinmunes se observa una expresión abundante desde el estrato basal al córneo, en estructuras vesiculares que se asemejan a las vesículas apoptóticas descritas en estos procesos autoinmunes (Figura 6; Raya *et al.*, 2000), y que han sido relacionadas con la liberación al medio extracelular de autoantígenos, incluyendo versiones fosforiladas de los mismos (Utz y Anderson, 1998). En resumen, lo que se sugiere es que en estas células la expresión de GPBP-1 forma parte de un programa de muerte celular programada que opera de forma ilegítima en la patogenia autoinmune.

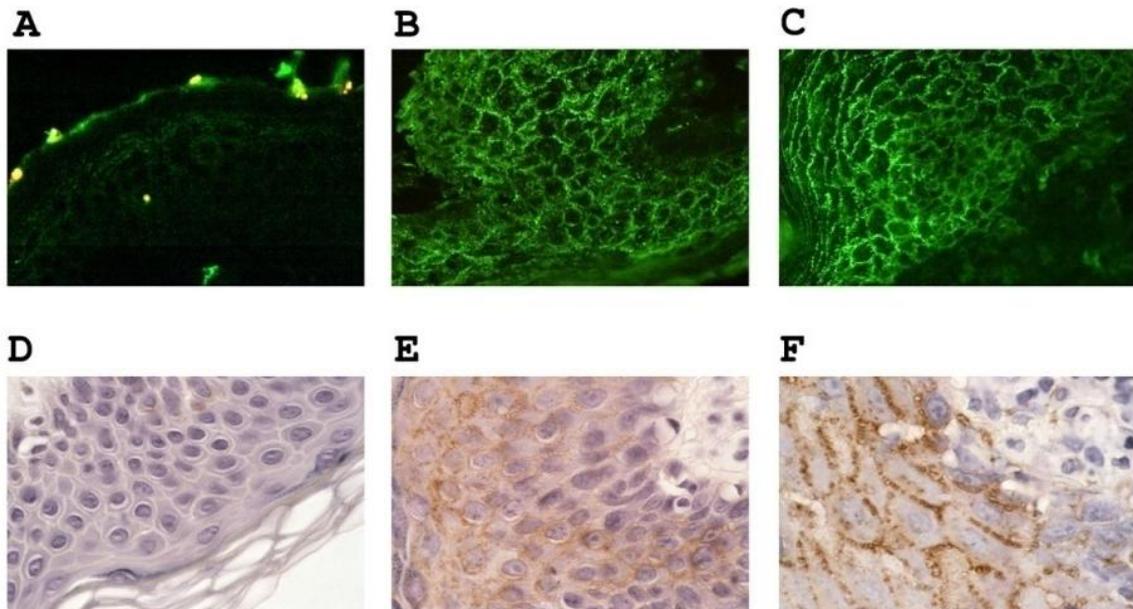


Figura 6. GPBP se sobre-expresa en autoinmunidad. Se muestra la reactividad de anticuerpos contra GPBP en preparaciones de piel de individuos control (**A**), procedente de un individuo afectado por una dermatitis inespecífica (**D**, piel sin patología); piel sufriendo un proceso autoinmune en pacientes con lupus cutáneo (**B** y **E**) o con liquen plano (**C** y **F**).

1.9 El promotor de GPBP responde a *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α).

El TNF es una citocina pro-inflamatoria que tiene tres isoformas, la primera, TNF- α , se encuentra en forma soluble que se exporta al medio extracelular (157 residuos), y otra asociada a membranas (TNF- β linfotoxina α , 233 residuos). Ambas están producidas por macrófagos en respuesta a estímulos inflamatorios. Su acción esta mediada por dos receptores, p60 y p80 situados en la membrana plasmática. TNF es necesario para la protección contra infecciones de origen bacteriano. Regula el crecimiento celular, controla la replicación viral y regula la respuesta inflamatoria e inmune en las patologías autoinmunes y reumáticas (Aggarwal *et al.*, 2001). Entre los efectos biológicos conocidos de TNF destacan el efecto citotóxico, la inducción de lisis celular y apoptosis. Una sobreproducción de TNF puede tener consecuencias graves

como ocurre en las enfermedades autoinmunes (Aggarwal *et al.*, 2001). TNF- α y β son dos citocinas diferentes con similares efectos biológicos, secretadas por macrófagos y células T_H1 en respuesta a varios estímulos inflamatorios (Aggarwal *et al.*, 2001). Además de estas dos existe una tercera citocina emparentada, mucho menos estudiada, que se denomina linfotoxina β o TNF-C (Browning *et al.*, 1993).

TNF- α induce la expresión coordinada de *COL4A3* y *COL4A3BP*, los genes que codifican el antígeno GP y GPBP respectivamente. *COL4A3BP* está organizado “cabeza con cabeza” con *POLK* el gen que codifica para pol κ , un miembro de la superfamilia de ADN polimerasas que extienden horquillas de replicación de ADN aberrante (Tomoo y Lehmann, 2006). *POLK* y *COL4A3BP* comparten 140 pares de bases ricas en G+C que son significativamente homólogas en regiones intergénicas de un buen número de unidades bidireccionales incluyendo aquellas que transcriben los genes que codifican las cadenas α del colágeno IV (Granero *et al.*, 2005). Estudios de expresión transitoria y de inducción con distintas citocinas indican que las unidades bidireccionales homólogas comparten factores de transcripción, que median en la inducción coordinada de estos genes en respuesta a TNF- α (Granero *et al.*, 2005). El promotor humano bidireccional *POLK-COL4A3BP* tiene un núcleo básico de 140 pares de bases que cuenta con tres elementos *cis*: TATA-like (TATA no canónico), Sp1 y NF κ B-like (Figura 7). En respuesta a TNF- α , los polipéptidos Sp1 y NF κ B (p65) forman un complejo que aumenta la tasa de transcripción de *COL4A3BP*.

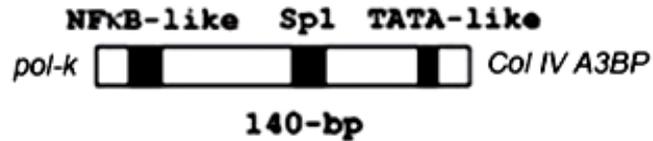


Figura 7. Representación de los sitios de unión de los factores nucleares NFκB y Sp1 en la región promotora de COL4A3BP de 140-pb. En la figura se representa el promotor de 140 pb con los elementos *in cis* reconocibles en negro. El promotor de 140-pb presenta tres elementos principales, un sitio Sp1, un sitio NFκB-like y un sitio TATA-like. Los sitios Sp1 y TATA-like con sus regiones flanqueantes, Sp1 y TATA-L, contienen iniciadores bidireccionales de la transcripción, mientras que el sitio NFκB-like y sus regiones flanqueantes (NFκB-L) contienen un elemento regulador. (Granero *et al.*, 2005).

Estos estudios han servido para explicar una posible causa del aumento de los niveles de transcripción de *COL4A3*, el gen que codifica la cadena α3 del colágeno IV, y de *COL4A3BP* en riñones de pacientes GP respecto a riñones control, y para relacionar a estos dos genes en un programa común que orchestra TNF-α (Granero *et al.*, 2005). Un trabajo reciente confirma estas observaciones y muestra que TNF-α también regula el estado de fosforilación de GPBP (Tihomir *et al.*, 2010).

1.10 Un incremento en la expresión de GPBP-1 causa una desorganización de la membrana basal glomerular con depósitos de IgA.

Los ratones *New Zealand White* (NZW) fue el primer modelo animal en el que se estudió el papel de GPBP-1 en la patogenia de enfermedades autoinmunes renales (Revert *et al.*, 2007). Estos ratones estaban considerados animales sanos, aunque mostraban una predisposición genética para padecer una glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos. Un estudio detallado de la cepa mostró que los ratones NZW desarrollan una respuesta autoinmune a partir de los 8 meses, que se manifiesta con autoanticuerpos circulantes contra

ADN de cadena simple y nucleosoma, propios del lupus eritematoso sistémico (LES). El cuadro también se caracteriza por una glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos con aumento de los niveles de GPBP-1 en el glomérulo. En la MBG se produce la desorganización del colágeno IV, acumulación de GPBP-1 y depósitos de IgA (Revert *et al.*, 2007).

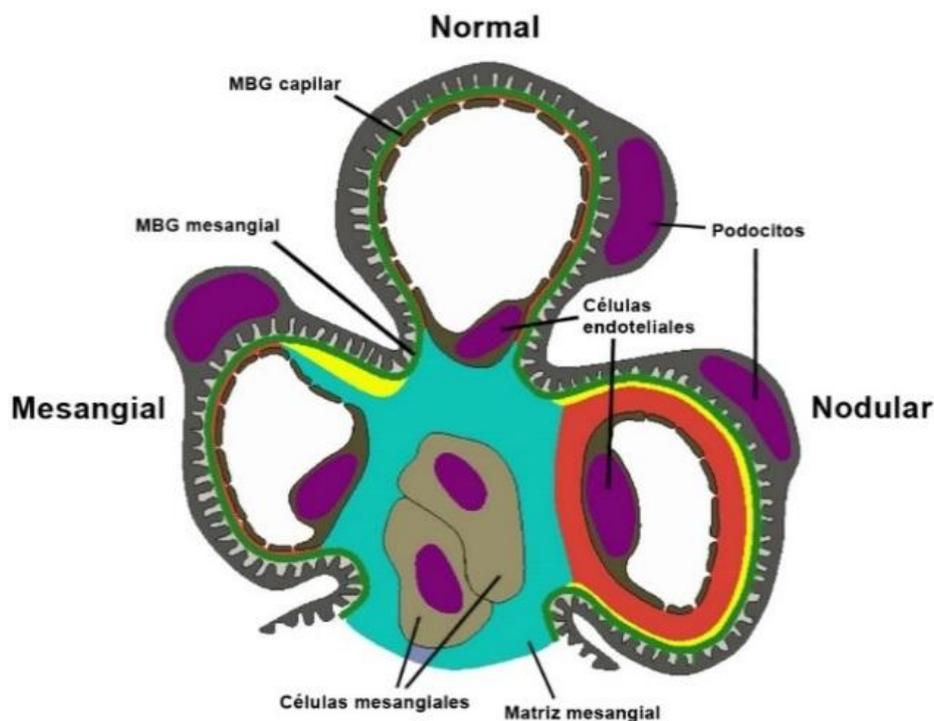


Figura 8. La sobre-expresión de GPBP en ratones transgénicos provoca una glomerulonefritis. Se representa una estructura en forma de hoja de trébol de una sección de un glomérulo renal, en la que se muestra los dos tipos de alteraciones observadas en la glomerulonefritis inducida por la sobre-expresión de GPBP (Mesangial y Nodular), comparadas con la estructura normal. En negro se muestra el componente epitelial de la MBG que contiene por las cadenas de colágeno $\alpha3-\alpha4-\alpha5(IV)$. En rojo se muestra la organización del endotelio de la MBG compuesto por las cadenas de colágeno $\alpha1-\alpha1-\alpha2(IV)$. En azul se representa el componente mesangial formado por las cadenas de colágeno $\alpha1-\alpha1-\alpha2$ del colágeno IV. En color blanco se representa el espacio de separación entre el mesangio o el componente endotelial y el componente epitelial de la MBG, En las lesiones nodulares el componente endotelial de la MBG crece y se separa del epitelial. Mientras que en lesiones mesangiales, el mesangio se separa de la membrana epitelial y sustituye la membrana de origen endotelial ocupando luz capilar. Tanto en ratones NZW como en Tg-hGPBP-1 se han observado ambos tipos de lesión.

La sobre-expresión transgénica de GPBP-1 humana (hGPBP-1) en ratones no enfermos de lupus provocó alteraciones glomerulares similares a las observadas en NZW de edad avanzada, con depósitos de IgA, pero en

ausencia de una respuesta autoinmune evidente. Esta observación demuestra que GPBP-1 regula la organización del colágeno de la MBG: la sobre-expresión de GPBP-1 causa su disociación y la posterior acumulación de IgA (Figura 8; Revert *et al.*, 2007).

1.11 Otras funciones biológicas descritas para GPBP.

En 2003 se publica que GPBP-2 interviene en el transporte no vesicular de ceramida entre el retículo endoplásmico (RE) y el trans-Golgi, el último compartimento del aparato de Golgi que alcanzan las proteínas que se exportan. Por este motivo a GPBP-2 se la denominó CERT (*ceramide transporter*; Hanada *et al.*, 2003). La ceramida del RE es transportada por GPBP-2/CERT al trans-Golgi, donde se usa para la síntesis de esfingomielina (Hanada *et al.*, 2003) y ceramida 1-fosfato (Lamour *et al.*, 2007). Un primer modelo propuesto para realizar esta actividad comprendía cuatro fases: 1) GPBP-2 se une a través del motivo FFAT a VAP en el RE y extrae ceramida de su membrana; 2) se suelta de su unión a VAP y se traslada al trans-Golgi; 3) el dominio PH se une a fosfatidil-inositol 4 fosfato (PI4P) en el trans-Golgi y deposita la ceramida en la membrana; y 4) GPBP-2 pierde afinidad por el PI4P y retorna al RE.

Esta actividad está regulada por el estado de fosforilación del motivo rico en serinas aminoterminal (SR1) de GPBP-2/CERT. Cuando GPBP-2/CERT se fosforila en este motivo por la proteína cinasa D (PKD; Fugmann *et al.*, 2007) o caseína cinasa I γ 2 (CKI γ 2) disminuye el tráfico de ceramida entre el RE y trans-

Golgi, por lo que se considera que GPBP-2 defosforilado es una forma inactiva para en transporte de ceramida (Kumagai *et al.*, 2007).

Posteriormente se observó que la interacción de GPBP-2 con VAP en la membrana del RE a través del motivo FFAT facilita la defosforilación la región SR1. Esta defosforilación la lleva a cabo la proteína fosfatasa 2C ϵ (Saito *et al.*, 2008), un polipéptido transmembrana que se asocia a VAP en el RE. La consecuencia de la defosforilación de GPBP-2 es un aumento de su afinidad por VAP, pero también por PI4P. Este hallazgo contradice el primer modelo de transporte de ceramida mediado por GPBP-2/CERT, lo que llevó a proponer un segundo modelo, que considera el hecho de que GPBP-2 defosforilado en la región SR1 tiene mayor afinidad por VAP (RE) y por el PI4P (trans-Golgi) al mismo tiempo: la forma defosforilada de GPBP-2 se une a ambos orgánulos a la vez, y el dominio START quedaría como un brazo móvil que extraería ceramida del RE y la depositaría en el trans-Golgi (Figura 9). Según este modelo, GPBP-2 defosforilado se localizaría en los “sitios de contacto RE-Golgi” (*ER-Golgi membrane contact sites*), que son sitios donde membranas de ambos orgánulos se sitúan a una mínima distancia, lo que permitiría que una molécula se una a ambos compartimentos a la vez. Esta localización aún no está bien definida, al no haber marcadores o proteínas que se localicen específicamente en los supuestos sitios de contacto RE-Golgi.

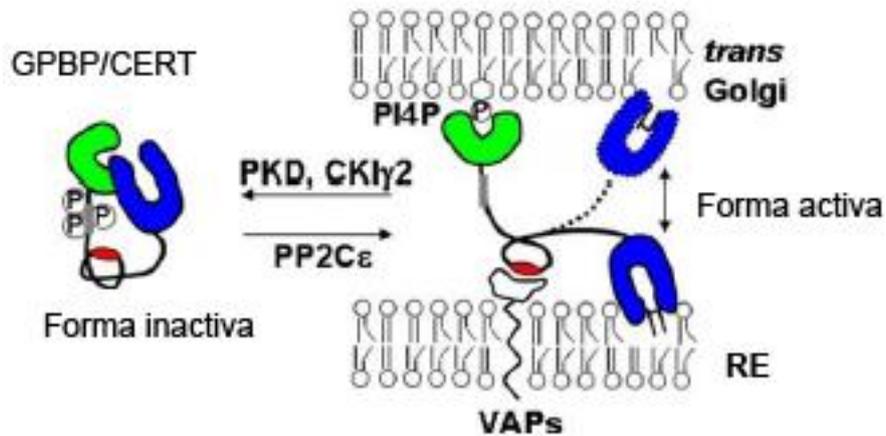


Figura 9. Transporte de ceramida no vesicular mediado por GPBP-2/CERT (Hanada *et al.*, 2009). La fosforilación del motivo SR1 por proteína cinasa D (PKD) o caseína cinasa I γ 2 (CKI γ 2) inactiva GPBP-2 para el transporte de ceramida, mientras que la proteína fosfatasa 2C ϵ (PP2C ϵ) que se asocia a VAP en el RE defosforila el motivo SR1 y activa el transporte de ceramida entre el RE y el trans-Golgi. La forma activa de GPBP-2 se une a la vez al RE y al trans-Golgi a través del dominio PH y el motivo FFAT respectivamente. El dominio START actúa como un brazo articulado que extrae ceramida del RE y la deposita en el trans-Golgi.

También se ha relacionado el estado de fosforilación de la región SR1 con la exportación de proteínas desde el trans-Golgi. La fosforilación del motivo SR1 por la PKD disminuye la secreción de proteínas. La Ser¹³² condiciona la fosforilación del resto de serinas de SR1 y cuando se introduce una mutación que cambia la Ser¹³² por una Ala, la proteína no es fosforilable en el motivo SR1 (Kumagai *et al.*, 2007) y se promueve la exportación de proteínas al medio extracelular (Fugmann *et al.*, 2007).

También se ha observado que GPBP-1, y no tanto GPBP-2, tiene una función relevante en la embriogénesis del pez cebra: la abolición de la expresión específica de GPBP-1 en pez cebra impide un correcto desarrollo del músculo esquelético y del cerebro. En cambio, la falta expresión específica de GPBP-2 no tiene el mismo efecto deletéreo (Granero-Moltó *et al.*, 2008).

Finalmente, otro trabajo muestra que la ceramida transportada por GPBP-2 es fosforilada por la ceramida cinasa produciendo ceramida 1 fosfato, que promueve la síntesis de ácido araquidónico y prostaglandina E₂, moléculas de un marcado carácter pro-inflamatorio. También se muestra que niveles bajos de GPBP-2 dificultan la activación de esta ruta inflamatoria en respuesta a IL-1 β , lo que sugiere que GPBP-2 es una nueva diana para tratamientos anti-inflamatorios (Lamour *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

Varios estudios han cuestionado el papel de GPBP en la organización del colágeno IV y su relevancia en las patologías autoinmunes, describiéndola como un transportador de ceramida desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi, (CERT). Dichos estudios proponen que el motivo FFAT de GPBP se une a la proteína VAP del retículo endoplasmático y el dominio de homología a *pleckstrina*, interacciona con fosfatidil-inositol-4-fosfato (PI4P) en la cara externa de la membrana del aparato de Golgi. Estas interacciones permitirían al dominio START, en posición carboxiterminal, unir ceramida en el retículo endoplasmático y posteriormente liberarla en el aparato de Golgi (Hanada *et al.*, 2003; Kumagai *et al.*, 2007). Los resultados fueron publicados sin tener en cuenta un estudio exhaustivo de la distribución celular de las formas nativas. Tampoco se tuvieron en cuenta estudios previos basados en inmunofluorescencias donde se mostraba la existencia de las isoformas de GPBP en la MBG (Raya *et al.* 2000; Revert, F., 2007). Pruebas de inmunohistoquímica sugieren que GPBP es principalmente extracelular, aunque con la posibilidad de localizar en varios sitios intracelulares (Raya, A., 2000). La distribución de las proteínas ofrece mucha información con respecto a la función, por tanto, se necesitan estudios adicionales para entender la función biológica de GPBP.

El objetivo general de la tesis doctoral consiste en profundizar en la biología de GPBP ahondando en los mecanismos de diversificación estructural de los diferentes productos del gen *COL4A3BP*, estudiando la expresión y la distribución de las diferentes isoformas de GPBP. Para concretar el estudio se fijan unos objetivos específicos:

1. Identificar isoformas de GPBP en líneas celulares. Estudiar su expresión y distribución.

2. Estudiar mediante líneas celulares la exportación de GPBP al medio extracelular, analizando la participación de las isoformas de GPBP en este proceso.

3. Estudiar el potencial biológico de nuevos motivos identificados en la estructura primaria de GPBP.

3 METODOLOGÍA

3.1 Anticuerpos y proteínas recombinantes.

Los anticuerpos policlonales contra el exón de 26 aminoácidos característico de GPBP, o frente a la pauta de lectura abierta presente en la región 5' no traducibles del ARNm de GPBP humano. Dichos anticuerpos fueron producidos en gallina por Genosys contra GPBPpep1, Ac-PYSRSSSMSSIDLVSASDDVHRFSSQ-NH₂. Específicamente, las yemas de huevos de gallinas inmunizadas (gallinas 12 y 13 contra GPBPpep1 y gallinas 1 y 3 contra GPBPpep2) fueron diluidas en agua 1:10, se ajustó el pH a 5.0, y tras una incubación de 6 h a 4 °C, la solución fue clarificada mediante centrifugación a 10.000 x g a 4 °C durante 25 min. Posteriormente, los anticuerpos se precipitaron por adición de sulfato sódico al 20% (g/ml) y centrifugación a 20.000 x g durante 20 min. Finalmente, los precipitados fueron resuspendidos en 1 ml de PBS por yema, y almacenados en alícuotas a -20 °C hasta su uso. En algunos casos, el procedimiento fue similar pero el ajuste de pH se hizo a 7.0, la precipitación se realizó con 40% de sulfato amónico y los precipitados finales fueron resuspendidos con 2.5 ml de PBS por yema.

Para obtener anticuerpos monoclonales específicos contra GPBP, se inocularon ratones Balb/c, por vía intramuscular en el muslo de cada pata, y por vía subcutánea en el pescuezo, con 100 µg de GST-exón26 aminoácidos, una proteína que contiene la *glutathion S transferasa* fusionada a los 26 residuos característicos de GPBP, emulsionados con adyuvante de Freund completo. Las mismas cantidades emulsionadas con el adyuvante incompleto se administraron como recuerdo cada tres semanas. Sueros obtenidos a la semana de cada recuerdo se testaron mediante ELISA para determinar el

grado de inmunización hasta que los ratones estuvieron suficientemente inmunizados (valores superiores a 1.0 OD₄₅₀ en reacción colorimétrica estándar de ELISA y diluciones 1:1600 del suero). A los ratones inmunizados se les administró un último recuerdo intraperitoneal sin adyuvante cuatro días antes de ser sacrificados. Tras el sacrificio de los animales, el bazo fue extraído y utilizado como fuente de linfocitos para procedimientos de fusión con células SP2 usando polietilenglicol según procedimientos estándar (Galfre y Milstein, 1981). Los medios de cultivo de las diferentes colonias (hibridomas) se testaron mediante ELISA para determinar la producción de anticuerpos específicos, y las células productoras se clonaron dos veces mediante dilución límite. Se identificaron varios hibridomas de los que sólo uno de los que producía un anticuerpo con una reactividad significativa logró prosperar. El anticuerpo correspondiente se testa contra GPBP-1 y GPBP-2 recombinantes. Finalmente, se obtuvieron altas concentraciones del anticuerpo mediante la producción de líquido ascítico en ratones Balb/c. Para ello se administró *Pristane* (ácido 2, 6, 10, 14-tetrametildecanoico) (*Sigma*) intraperitonealmente y, después de 10 días, se inyectaron en cavidad peritoneal 1×10^6 células del correspondiente hibridoma resuspendidas en 0.5 ml de PBS. Este protocolo está en desuso.

Los polipéptidos GPBP-1 y GPBP-2 son reconocidos por el anticuerpo monoclonal mAb 14 (*monoclonal Antibody* 14), mientras que mAb e26, que se une específicamente a los 26 aminoácidos del exón 11 de GPBP-1, no reacciona con GPBP-2.

Ab 24 es un fragmento F(ab)₂ de un anticuerpo monoclonal aislado a partir de una biblioteca de expresión (*MorphoSys AG*), usando un péptido sintético que representa el extremo aminoterminal de la región de traducción alternativa de GPBP. La reactividad del fragmento F(ab)₂ se caracterizó mediante *Western blot* con proteínas recombinantes que contenían la secuencia adicional que se traduce en la isoforma GPBP-3 (ver más abajo) . El F(ab)₂ Ab 24 fue el más reactivo y por ello se utilizó para la caracterización de las formas de GPBP nativas. Un clon de F(ab)₂ obtenido de la misma librería, Ab 20, y que resultó ser el menos reactivo, se utilizó como control negativo (Figura 10).

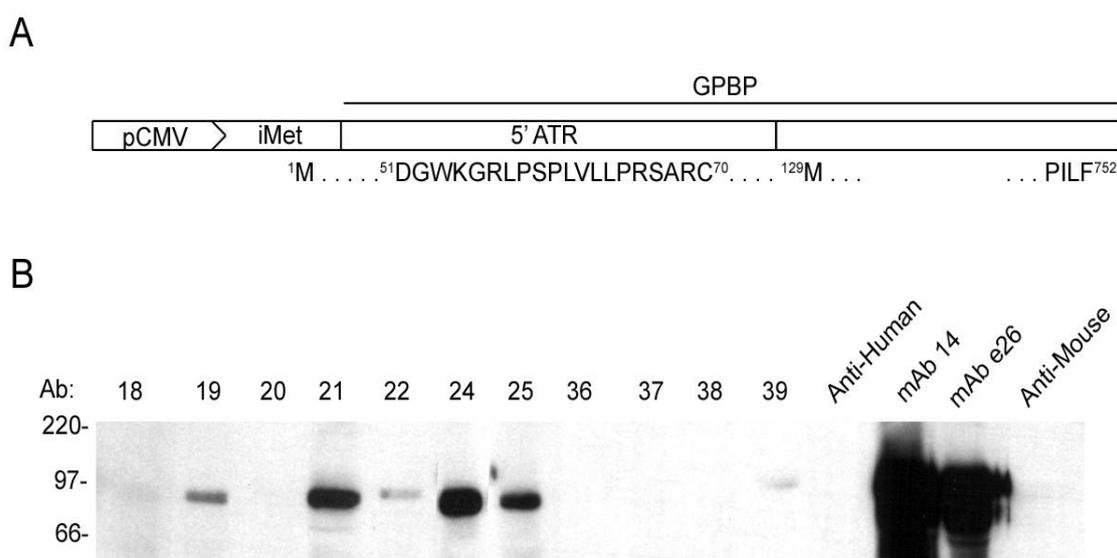


Figura 10. Selección de F(ab)₂ recombinantes contra un péptido sintético que forma parte de la ATR. En **A**, se representa el esquema del *cassette* de expresión del plásmido utilizado para testar los anticuerpos aislados de una biblioteca de expresión de F(ab)₂. Los la biblioteca se cribó mediante ELISA utilizando el péptido de la región 5' ATR indicado (51-70). En **B**, se muestra el análisis mediante *Western blot* de 50 µg de homogenado de células HEK 293 transfectadas con el plásmido esquematizado en **A** utilizando como anticuerpos primarios los clones de F(ab)₂ seleccionados. Se eligió el número 24 para estudios posteriores y el 20 como control negativo.

Para los experimentos con citometría de flujo se utilizó un anticuerpo policlonal de pollo inmunopurificado y biotinilado (αGPBP). Para

inmunofluorescencia directa el mismo anticuerpo fue marcado con *Alexa Fluor 647 (Invitrogen)*.

Para la obtención de anticuerpos policlonales en conejo que reconocían tanto GPBP-1 como GPBP-2 se siguieron protocolos estandarizados. Como normalizador de carga proteica en los *Western blots* se utilizó anti-GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa) proporcionado por Erwin Knecht.

Los anticuerpos policlonales para detectar calregulina, p65 y catepsina D fueron adquiridos en Santa Cruz *Biotechnology*, y para piruvato deshidrogenasa (PDH) en *Molecular Probes*. Los anticuerpos específicos para PrP (clon 3F4) y para Golgin-97 eran de *Clontech* y *Molecular Probes*, respectivamente.

Para la detección mediante *Western blot* de proteínas recombinantes que portan la secuencia “FLAG” DDDDKY se utilizó el anticuerpo α FLAG/M2 sin conjugar o conjugado con HRP, de *Sigma*, mientras que para inmunofluorescencia se utilizó α FLAG- marcado con *Alexa Fluor®488-* de *Molecular Probes*. Los anticuerpos secundarios *anti-rabbit* y *anti-mouse* conjugados con HRP procedían de *Promega*, *anti-human F(ab)₂* conjugado con HRP de *Jackson ImmunoResearch*. Finalmente los anticuerpos secundarios FITC y TRITC conjugados son de *Molecular Probes*.

Para la técnica de microscopia confocal 4 π , los anticuerpos primarios contra GPBP-2 y FLAG- α 3 se obtuvieron en el laboratorio, y contra GPBP

(N27, ratón) y Golgi (Giantina, rabbit) procedían de *Fibrostatin*, S.L. y *Abcam* respectivamente. Los *anti-rabbit* unidos a *Alexa Fluor 488* y *Alexa Fluor 633*, y el *anti-mouse* unido a *Alexa Fluor 633* proceden de *Molecular Probes*, y el *anti-mouse* unido a FITC procede de Jackson *ImmunoResearch*.

Las proteínas recombinantes de FLAG-GPBP-1 y FLAG-GPBP-2 fueron expresadas a partir de las construcciones pHIL-FLAG-n4' y pHIL-FLAG-n4'Δ26, en *Pichia pastoris* de la cepa GS115 (Invitrogen; Raya *et al.*, 1999; Raya *et al.*, 2000). Para obtener gran cantidad de proteína recombinante, células *Pichia pastoris* GS115 fueron transformadas con las construcciones arriba indicadas por electroporación (*The Electroporator II*, *Invitrogen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión de las proteínas recombinantes se comprobó por procedimientos de *Western blot* usando anticuerpos específicos anti-FLAG. Los clones de mayor nivel de expresión de proteína recombinante, fueron sometidos a fermentación con un fermentador *Biostat A* (*B. Braun Biotech International*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células de 300 ml de cultivo fueron recogidas por centrifugación y rotas con bolas de vidrio (*Sigma*) en 300 mL de solución de rotura siguiendo las instrucciones del fabricante (8 M urea, 40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM PMSF, pH 8). Los fragmentos celulares se eliminaron con dos centrifugaciones consecutivas (4000 x g 10 minutos y 45000 x g 20 minutos). El sobrenadante final se incubó con 3 ml de resina ANTI-FLAG M2 *Affinity Gel* (*Sigma-Aldrich*), con agitación suave durante 12 horas a 4 °C, y las proteínas unidas a la resina fueron eluidas con péptido FLAG (0.1 mg/ml en TBS).

3.2 *Western blot.*

Para los estudios de *Western blot* las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida del 10% en presencia de SDS y un agente reductor según procedimiento estándar (Laemmli, 1970). Las proteínas se transferían a membranas de difluoruro de polivinilino (PVDF; *Immobilon-P*, *Millipore*) y se bloqueaban con 5% de leche desnatada en 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20 (TBST) y 0,05% azida sódica, previa a la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios conjugados a peroxidasa correspondientes, también diluidos en TBST. Las proteínas detectadas fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia con ECL® (*GE Healthcare*) y en algunos casos con *Maxilucen*® (*Pierce*) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes, utilizando películas *T-Mat* de *Kodak*.

3.3 Plásmidos.

En las construcciones que codificaban FLAG-GPBP-1 o FLAG-GPBP-2, la secuencia específica de cada proteína iba precedida de la secuencia MAPLADYKDDDDK, que contiene la secuencia llamada “FLAG” (subrayada).

La construcción pc-n4' en pcDNA3 (*Invitrogen*) contiene todo el ADNc de GPBP, incluyendo secuencia 5' respecto al inicio canónico de traducción, y en el que se sitúan los sitios de inicio de transcripción identificados (Granero *et al.*, 2005). Un mutante derivado de este plásmido es el pc-n4'Mmut donde se ha sustituido la metionina canónica (AUG) por Alanina (GGA). Para la obtención

del mutante pc-FLAG-GPBP_{ΔFFAT} se realizó mediante mutagénesis dirigida por PCR una delección del motivo FFAT.

Para determinar la iniciación de traducción no canónica en el 5' RTA (región traducida de forma alternativa), se produjeron mutantes de pc-n4'-Mmut introduciendo codones de parada (TAG) en varias posiciones de la pauta abierta de lectura (ORF), corriente arriba de la metionina canónica.

Los oligonucleótidos que codifican ARNs de interferencia utilizados en los experimentos de “silenciación” (reducción de los niveles de un ARNm específico con sondas) se adquirieron de *Ambion*, y fueron clonados en el vector *pSilencerTM 2.1 U6 Hygro* (*Ambion*) para obtener construcciones posteriormente utilizadas en transfecciones transitorias para interferir la expresión de los ARNm de GPBP-1 y -2 o específicamente GPBP-1. Las secuencias diana reconocidas por las construcciones silenciadoras fueron las siguientes:

pSi-GPBP-1/2-2, ACAGAGTATGGCTGCAGAG.

pSi-GPBP-1/2-3, GTACTTTGATGCCTGTGCT.

pSi-GPBP-1, GCCCTATAGTCGCTCTTCC.

Se analizó la eficacia de las construcciones en células de cultivo utilizando como control negativo la construcción pSi-control, diseñada contra el ARNm de la proteína de fluorescencia verde (GFP), no expresada en células humanas.

Todos los ADNc y construcciones fueron caracterizados mediante digestión con enzimas de restricción y electroforesis, y mediante secuenciación nucleotídica. Los puntos de unión entre distintos ADNc en cada construcción fueron comprobados mediante secuenciación, y la fidelidad de las proteínas expresadas fue determinada mediante técnicas inmunoquímicas con anticuerpos específicos de las proteínas o de los “tags” que portaban fusionados (FLAG). Todas las construcciones mencionadas se obtuvieron mediante procedimientos de ADN recombinante, como PCR, digestión con endonucleasas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, purificación de fragmentos generados por cromatografía, ligación de fragmentos de ADN a los vectores oportunos, transformación de bacterias competentes, purificación de las construcciones obtenidas por técnicas cromatográficas (*miniprep*, *midiprep*) o por ultra-centrifugación en gradiente de concentración de cloruro de cesio (*maxiprep*), e hibridación de colonias de bacteria con sondas de oligonucleótidos o de ADNc cuando fue necesario.

3.4 RT (Retrotranscripción) y PCR (Polymerase Chain Reaction).

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron utilizando el sistema *Ready-to-go-you-prime-first* (GE Healthcare), a partir de 5 µg de ARN total y utilizando como cebadores hexanucleotidos degenerados.

Las PCRs se efectuaron con la ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) (*Stratagen*) o con la *Expand Long Template PCR System* (*Roche*), siguiendo las instrucciones de los fabricantes correspondientes.

Para determinar la expresión ARNm se utilizaron librerías MATCHMAKER de dos híbridos de *Clontech*. Son librerías de ADNc procedente de distintos tejidos que están clonados en un plásmido del sistema dos-híbridos en levadura, para generar proteínas de fusión con el dominio de activación del factor de transcripción GAL4.

3.5 Mutagénesis dirigida.

Las mutaciones puntuales se introdujeron en los ADNc correspondientes mediante tres PCRs utilizando la ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*, *Fermentas*), de baja tasa de errores. Las dos primeras PCRs se hicieron utilizando dos oligonucleótidos complementarios que introducían la mutación en el sitio deseado. Cada uno de los oligonucleótidos mutagénicos se usó en una PCR distinta junto con otro oligonucleótido que hibridaba en posición 5' o 3' respecto al sitio a mutar. De ese modo se obtuvieron dos productos, uno que se extendía hacia el extremo 5' de la mutación y el otro hacia el extremo 3'. Los dos productos obtenidos se aislaron mediante extracción a partir de un gel de agarosa con métodos comerciales. En una tercera PCR se utilizaron como molde los dos productos obtenidos en las dos primeras PCRs, y los oligonucleótidos que hibridaban en los extremos 5' y 3' de cada uno de los productos de las dos primeras PCRs. En los primeros ciclos de la tercera PCR una de las hebras de un producto hibrida con el extremo complementario de la hebra del otro producto. Los extremos hibridados hacen de cebadores, obteniéndose un primer producto con la secuencia completa que hace de molde en los ciclos posteriores. El producto final se analiza mediante

electroforesis en gel de agarosa, se corta con las enzimas de restricción adecuadas (EcoRI y Xho I para mutantes de GPBP-1), se purifica y se liga al plásmido de interés, habitualmente el mismo que contiene la secuencia no mutada (pcDNA3 en este caso). La fidelidad de la secuencia amplificada y comprendida entre los sitios de restricción utilizados se comprobó mediante secuenciación. Los oligonucleótidos mutagénicos empleados para determinar el sitio de inicio alternativo de traducción de GPBP, fueron los siguientes:

-T83 F1	5' GGGGTCACGGCGTAGGCGGCGGCGGCT 3'
-T83 R1	5' AGCCGCCGCCGCCTACGCCGTGACCCC 3'
-A84 F1	5' GCAGGGGTCACGTAGACGGCGGCGGCG 3'
-A84 RI	5'CGCCGCCGCCGTCTACGTGACCCCTGC 3'

Los oligonucleótidos mutagénicos usados para localizar el epítipo de mAb 14 y mAb e26 fueron:

-E26 HR R1	5'-GGTTAAACGTGAGGACAGCTGGCAG-3'
-E26 HR F1	5'-CTGATGATGTTGCCGCATTCAGCTC-3'
-DD-AA R1	5'AATCTGTGAACAGCAGCAGAGGCACT-3'
-DD-AA F1	5'AGTGCCTCTGCTGCTGTTACAGATT-3'
-FSS-FDD R1	5'CTTCAACCTGGTCGTGGAATCTGT-3'
-FSS-FDD F1	5'ACAGATTCGACGACCAGGTTGAAG-3'

Para la localización del epítipo de unión de mAb 14 el mutante generado fue pc-GPBP_{ΔFFAT} mediante los siguientes oligos:

-FDAVE F1	5'GAAGAAGAGTTCGCTGCTCTTGACAGACAA3'
-FDAVE R1	5'TTGTCTGTCAAGAGCAGCGAACTCTTCTTC3'.

Para la localización del epitopo de mAb e26 se generaron los siguientes mutantes: pc-FLAG-GPBP_{SAS-DAD}, pc-FLAG-GPBP_{HR-AA}, pc-FLAG-GPBP_{DD-AA}, pc-FLAG-GPBP_{FSS-FDD}.

3.6 Estudios de hibridación de colonias de bacterias con sondas de ácidos nucleicos.

Durante la obtención de las distintas construcciones empleadas para este trabajo se requirió en ocasiones localizar las colonias de bacterias en una placa que portaban el ADN de interés. Para ello se transferían por presión parte de las células de las colonias a filtros de nitrocelulosa (*Millipore*), haciendo agujeros en ellos para poder orientarlos posteriormente respecto a la placa original. Se ponían los filtros sobre placas nuevas y se dejaban crecer las réplicas de las colonias durante 3 horas sobre los filtros, que después eran transferidos secuencialmente a soluciones de:

- a) 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH.
- b) 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.5.
- c) 300 mM NaCl, 30 mM citrato de sodio pH 7.0.

Los filtros eran tratados durante 5 minutos en cada solución, y seguidamente sometidos a radiación ultravioleta mediante un horno *Stratalinker* (*Stratagen*), para unir covalentemente las cadenas desnaturalizadas de ADN a la nitrocelulosa de los filtros. Después, los filtros eran incubados con sondas de oligonucleótidos, y para ello se prehibridaban durante 1 hora a 37 °C con una solución de 0.9 M NaCl, 90 mM citrato de sodio, 10 mM tampón fosfato pH 6.8, 1 mM EDTA, 0.1% leche desnatada en polvo, 0.5% SDS y 100 µg/ml de

ADN de salmón sonicado y desnaturalizado. Tras la prehibridación, los filtros se incubaban con 5 pmoles de oligonucleótido marcado con ^{32}P diluido en solución de prehibridación. El marcaje del oligonucleótido se hacía con la T4 polinucleótido cinasa y $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$. La enzima transfiere el fosfato γ del ATP al extremo 5' del oligonucleótido. Los filtros se incubaban 12 horas con la sonda a 37 °C, se lavaban a temperatura ambiente (3 lavados de 5 minutos) con una solución de 0.3 M NaCl, 30 mM citrato de sodio y 0.1% SDS, y se sometían a autorradiografía exponiéndose durante 2 h a -70 °C a un film de rayos X, y a posterior revelado para identificar las colonias con el ADN de interés.

3.7 Purificación de ARN.

El ARN total fue preparado a partir de muestras de músculo esquelético humano o de células cultivadas (HEK 293) usando el reactivo *TRI-REAGENT* (*Sigma*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8 Transcripción y traducción *in vitro*.

La transcripción y traducción *in vitro* del ARN sintético se efectuó con un sistema de lisado de reticulocitos de conejo (*Promega*), 1 mM de mezcla de aminoácidos sin metionina y $^{35}\text{S}\text{-Met}$ (7.35 mCi/ml) en presencia de un inhibidor de la ARNasa *RNasin*® (*Promega*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar la transcripción/traducción *in vitro* de ~1 μg de plásmido, después de que los geles de electroforesis fueron fijados 1 h con el metanol del 45 %, el ácido acético del 7.5 %. Posteriormente, fueron tratados dos veces con dimetil-

sulfóxido (DMSO) durante 30 minutos y con el 22.5 % de 2,5-dipheniloxazol en DMSO durante 30 minutos adicionales. Finalmente, los geles se equilibraron con agua y se expusieron hasta 7 días -70 °C. Los productos fueron analizados mediante SDS-PAGE y autorradiografía.

3.9 Cultivos celulares.

Las células HEK 293 fueron cultivadas en *Dulbecco's modified Eagle's médium* (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% penicilina/estreptomicina. Las células HeLa se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 2 mM glutamina. Finalmente, las células COS-7 se cultivaban en DMEM suplementado con 5% suero bovino fetal, 2 mM glutamina, 1% piruvato sódico y 1% penicilina/estreptomicina. Todas las líneas celulares se mantuvieron en estufas a 37 °C, humedad y una atmósfera con un 5% de CO₂.

Las transfecciones se hicieron con los métodos comerciales *ProFection Mammalian Transfection (Promega)*, basado en la precipitación de ADN con fosfato cálcico, y con *Lipofectamine 2000 (Invitrogen)*, que utiliza un lípido catiónico que forma complejos con el ADN que se endocitan. En ambos casos se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Para el estudio de inmunofluorescencia las células se cultivaban sobre portas de cristal pre-tratados con poli-L-lisina en placa de 24 pocillos.

En los estudios de inmunoprecipitación y exocitosis se utilizó un clon de células HEK 293 [HEK 293-FLAG- α 3(IV)] que expresa constitutivamente una forma exportable de α 3(IV)NC1 humano [BM40-FLAG- α 3(IV)NC1].

Las células HeLa transfectadas con pc-FLAG-GPBP-1 y pc-FLAG-GPBP-2 fueron tratadas con esfingomielinasa procedente del *Bacillus cereus* (*Sigma*; Kumagai *et al.*, 2007). Posteriormente se fijaron con metanol-acetona y analizadas mediante inmunofluorescencia directa. También fueron analizadas mediante *Western blot*, para ello fueron lisadas con 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1 mM Na₂EDTA, 50 mM NaF y 1 mM Na₃VO₄, 10 μ g/ μ L de leupeptina, 1 mM *phenylmethanesulphonylfluoride* (PMSF). El lisado fue centrifugado (500 x g durante 10 minutos) y el sobrenadante inmunoprecipitado con resina Anti-FLAG (*Sigma*). Después se separó en dos fracciones, una de las cuales fue tratada con 5 U/ μ L con λ PPase (*New England Biolabs*) a 30 °C durante 30' siguiendo las recomendaciones del fabricante. Ambas fracciones fueron analizadas mediante *Western blot* con anti-FLAG-M2 (*Sigma*).

3.10 Fraccionamientos celulares.

Para obtener extractos celulares, cultivamos las células en placa de 150 mm, limpiados con PBS y homogeneizados sobre el hielo con 25 mM Tris-HCl el pH 7.5, 150 mM NaCl, el 0.5 % Tritón X-100, 1 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptina, en un volumen final de 1mL. Las fracciones fueron separadas por centrifugación en gradiente de sacarosa, la concentración de proteína era

medida y se almacenaban las muestras a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior el empleo. Para obtener un resultado óptimo en las fracciones celulares, la confluencia ha de ser aproximadamente de un 90%. Para homogeneizar la muestra se utiliza un homogenizador *Dounce* con el émbolo *tight* que se pasa 20 veces (“golpes”). Las sucesivas centrifugaciones secuenciales tienen como resultado obtener las diferentes fracciones celulares. Los precipitados de cada fracción se lavan con PBS. Las fracciones de núcleos y células no rotas fueron recogidas mediante centrifugación a $500\text{ g} \times 10$ minutos. La siguiente centrifugación es a $7000\text{ g} \times$ durante 10 minutos para obtener la fracción mitocondrial/lisosomal. Finalmente, el sobrenadante se centrifuga a $150,000\text{ g} \times 1\text{ h}$ para obtener la fracción microsomal que contiene los fragmentos de membranas celulares de retículo endoplasmático, membrana celular y vesículas de secreción y por último, la fracción citosólica, es el sobrenadante de $150.000 \times \text{g}$. Todos los pasos fueron realizados en $0-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y las concentraciones de proteína se midieron mediante el reactivo de cuantificación (*Bio-Rad*).

Para otros propósitos, el sobrenadante de $500 \times \text{g}$ fue cargado en una columna de intercambio iónico, *Resource Q* para FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) en gradiente de NaCl desde 0 hasta 1 M utilizando como fase móvil de 10 mM Tris pH 8. La fracción de 0,55 a 0,6 M NaCl contiene GPBP celular. Ésta fracción fue precipitada mediante etanol y usada parcialmente en diferentes análisis por *Western blot* con el Ab 24.

3.11 Ensayos de *cross-linking ex vivo*.

Las células HEK 293-FLAG- α 3 (IV) fueron sometidas o no a transfección transitoria con lipofectamina para expresar GPBP-1 recombinante. Una vez pasadas 48 h tras la transfección, y con una confluencia del 70-90%, las células transfectadas y no transfectadas fueron lavadas con PBS e incubadas en 1% formaldehído en DMEM a temperatura ambiente durante 10 minutos, y seguidamente con 125 mM Gly-HCl pH 7.4 durante otros 10 min también a temperatura ambiente. Tras ello, las células fueron lavadas con PBS y lisadas en buffer de extracción que contenía 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 160 mM NaCl, 2 mM ácido etilen-diamin-tetra-acético (EDTA), 1% Triton X-100, 0,01% *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10 μ g/mL, 1 mM *phenyl-methane-sulphonyl-fluoride* (PMSF), durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, los lisados fueron centrifugado (500 x g, 10 minutos), y el sobrenadante incubado durante toda la noche con 50 μ L de resina anti-FLAG y suave agitación. La resina con las proteínas unidas fue sedimentada por precipitación (1000 x g, 3 min) y lavada dos veces con 1 mL de 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl. La elución se realizó con tres volúmenes de solución de péptido FLAG en TBS a 100 μ g/mL a temperatura ambiente. A las eluciones obtenidas se les añadió tampón de muestra reductor (*sample buffer* con β -mercaptoetanol) y se hirvieron durante 15 min para revertir el entrecruzamiento y se analizaron mediante tinción con Azul de Coomassie o *Western blot*.

3.12 Citometría de Flujo.

Para estudios por citometría de flujo, células HEK 293 fueron levantadas con tripsina, lavadas con PBS y bloqueadas con anticuerpos no específicos de ratón (solución de bloqueo). Posteriormente, las células fueron incubadas con anticuerpos α GPBP biotinilados diluidos en solución de bloqueo, y en ciertos casos en presencia del péptido GPBPpep1 o de un péptido no relevante. Posteriormente las células fueron incubadas con estreptavidina marcada con Alexa Fluor 488 diluida en solución de bloqueo, y analizadas con un citómetro FC500 (*Beckman-Coulter*). Para medir el “*side-scattering*” se utilizaron células HEK 293 no tratadas. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente durante 1h.

3.13 Inmunofluorescencia indirecta.

Para visualizar proteínas recombinantes, en células HEK 293 y COS-7 fueron transfectadas mediante el procedimiento del fosfato cálcico (*Promega*) con 1 μ g de la construcción indicada en cada caso. Tras 12 horas el medio de transfección era retirado y reemplazado por medio fresco y el cultivo se mantenía 24 h adicionales, tras lo que las células eran lavadas con PBS y fijadas con metanol-acetona (50:50) durante 5 min a -20 °C, lavadas posteriormente con PBS y bloqueadas con 3% BSA en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las células eran incubadas con anticuerpos primarios anti-GPBP diluidos en solución de bloqueo, durante 2 h a temperatura ambiente. Tras esta incubación las células eran lavadas 3 veces con PBS e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad con

anticuerpos secundarios marcados con diferentes fluoróforos. Finalmente, las preparaciones eran lavadas con PBS y montadas para su observación con líquido de montaje (DAKO), que contenía o no 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) a 1,25 $\mu\text{g/ml}$. El DAPI permite visualizar el núcleo celular al teñir el ADN. Las células no transfectadas se utilizaban como control negativo al observarse las preparaciones. El microscopio utilizado era un *Axioscope plus* (Carl Zeiss), el cual tenía acoplada una cámara y un software de captura v2.2 de *Diagnostics Instruments*.

3.14 Inmunofluorescencia directa.

Para la detección de GPBP sobre la superficie de células vivas, estas fueron cultivadas utilizando cristales inferiores (*MatTek. Corp.*), donde crecen hasta obtener una confluencia del 50%, tras lo que los medios de cultivo fueron sustituidos por medios de cultivo frescos que contenían 10 $\mu\text{g/ml}$ αGPBP -Alexa Fluor 647 y un exceso del péptido de bloqueo GPBPpep1 o de un péptido aleatorio control. Se utilizó rodamina 123 (Invitrogen) para marcar la actividad mitocondrial de células vivas. El análisis por fluorescencia de células *in vivo* fue realizado con un microscopio confocal invertido *Leica TCS SP2*. Las células fueron mantenidas a 37 °C al 5 % CO_2 en todos los pasos.

Las células utilizadas para la microscopia 4π fueron sembradas sobre cubres de cuarzo de ~ 150 μm de espesor y a una confluencia del $\sim 70\%$. Posteriormente fueron permeabilizadas, fijadas e inmunomarcadas, tratándolas con 1 mg/ml de BH_4Na , tres veces durante 15 min en agitación, para reducir los

aldehídos no reactivos que quedan tras la fijación. Las muestras, después de haber sido marcadas con los anticuerpos, fueron montadas sobre un soporte especial para la microscopia 4π , con un medio que contenía 87% glicerol/PBS e índice de refracción de 1.46, y posteriormente selladas con una silicona dental de doble componente (*Dupliflex® Siliconas, Protechno, España*).

3.15 Microscopia confocal de alta resolución (4π).

La utilidad del microscopio óptico, según la Ley de *Abbe*, se acaba cuando queremos observar detalles de tamaño inferior al rango de longitudes de onda que abarca la luz visible en el espectro electromagnético. Así, mientras que el haz de luz que proviene del punto iluminado (*PSF, Point Spread Function*) puede tener una anchura de 200 nm en el plano XY, nunca puede ser inferior a 500 nm a lo largo del eje óptico (XZ), o lo que es lo mismo en la dirección de propagación de la luz. Estos son los valores mínimos absolutos. Como resultado, las imágenes tridimensionales finales están fuertemente distorsionadas en esta dirección, y por lo tanto, la imagen del punto iluminado tiene más o menos la forma de una pelota de rugby en vez de una esfera. La microscopia 4π elimina esta distorsión aumentando la resolución por encima de la ley de *Abbe*.

Con la tecnología 4π la luz de una fuente puntual se divide en dos haces que se focalizan en el objeto mediante dos lentes idénticas de gran apertura. Como el objeto está coherentemente iluminado, la PSF sobre el objeto proviene de la interferencia de dos frentes de onda esféricos, dando lugar a

una sola onda de forma esférica. Este principio da lugar al nombre del microscopio, 4π , en referencia al ángulo sólido total de una onda esférica. Como consecuencia, se obtiene un aumento de la abertura efectiva para la dirección axial. La luz difundida por el objeto (emitida si la muestra es fluorescente) es recogida por los objetivos y focalizada en un detector puntual. Con este esquema, las imágenes tienen de 5 a 7 veces más resolución que en la microscopía confocal convencional, llegándose hasta los 100 nm de resolución.

El principio de la microscopía confocal es generar imágenes tridimensionales de más alta resolución. El término “confocal” se refiere a la posibilidad de visualizar un sólo plano focal óptico de manera nítida. La tecnología confocal elimina toda la información de la imagen procedente de otros planos focales, con una reducción de la profundidad de campo dando como resultado imágenes de mayor nitidez y resolución. Para poder ver la imagen tridimensional completa de una muestra, el microscopio confocal registra diferentes capas de esa muestra (como la tomografía computarizada), las almacena como imágenes nítidas, y las ordena a través de un software generando la imagen tridimensional esperada. El resultado es una imagen con una alta profundidad de campo que se puede rotar en el equipo, y que puede ser vista y medida por todos sus ángulos.

Las imágenes A y B de la figura 29 fueron obtenidas con un microscopio (invertido) confocal convencional *Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany)*, usando un objetivo de inmersión en

glicerol de 100x/1,35 NA. Las fluorescencias del FITC y *Alexa Fluor 488* (verdes) se obtuvieron mediante excitación con un láser de Argón iluminando a una longitud de onda de 488 nm, ajustando la apertura del canal de detección de la emisión entre 500 nm y 600 nm. La fluorescencia del *Alexa Fluor 633* (roja) se obtuvo mediante excitación con un láser de He-Ne iluminando a una longitud de onda de 633 nm, ajustando la apertura del canal de detección de la emisión entre 645 nm y 725 nm. El *pinhole* de emisión se ajustó a un diámetro de *Airy* 1. Las imágenes fueron tomadas bidimensionalmente con una resolución de 1024 x 1024 *pixels*.

Las imágenes 4π de la figura (A_{1-4} , B_{1-4}) de la figura 31 fueron obtenidas con un microscopio confocal de alta resolución *Leica TCS 4 π* (*Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany*) equipado con dos objetivos de inmersión en glicerol de 100x/1,35 NA. Ambos objetivos están enfocados sobre el mismo plano focal, logrando así una resolución axial de 100 nm. Las fluorescencias del FITC y *Alexa Fluor 488* (verdes), y del *Alexa Fluor 633* (roja) se obtuvieron mediante excitación multifotón simultánea para ambos fluorocromos a 780 nm de longitud de onda, y para ello se utilizó un láser pulsante multifotón (*Mai Tai, Spectra-Physics*) sintonizable en el rango del infrarrojo (720-900nm). Para la detección se usó un sistema de filtros formado por un filtro barrera de paso corto SP700, un filtro dicroico BS560 y dos filtros de emisión de paso de banda BP500/50 y BP607/83 (*Chroma Technology Corp.*), y dos fotodiodos de avalancha como fotodetectores. El *pinhole* de emisión se ajustó a un diámetro de *Airy* 0.75. Los collares de corrección de los objetivos, la alineación de enfoque y la fase de interferencia del microscopio

fueron ajustados de manera individual para cada una de las muestras que se utilizaron.

Las series de imágenes x-z fueron tomadas con una distancia entre ellas de 61 nm en el eje y. El tamaño del píxel de todas las imágenes x-z fue de 35 nm x 35 nm. Las dimensiones de las series se han adaptado al tamaño de la estructura observada, siendo 20 x 23 x 10 μm para la imagen A₁₋₄ y 18 x 11 x 09 μm para la imagen B₁₋₄.

Las imágenes fueron procesadas mediante el software LCS (*Leica Microsystems*) aplicando a cada serie un filtro para suavizar el píxel y un proceso de deconvolución de tres puntos. Posteriormente se crearon las proyecciones tridimensionales de iso-superficie utilizando el programa *ImageSurfer 1.24* (*Center for Computer-Integrated Systems for Microscopy and Manipulation and the Department of Cell and Developmental Biology at The University of North Carolina at Chapel Hill*).

3.16 Ensayos de autofosforilación *in vitro*.

FLAG-GPBP y los mutantes recombinantes situados en la región R3 y SHCIE fueron incubados con 25 mM β -glicerofosfato (pH 7.0), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 8 mM MgCl_2 , 5 mM MnCl_2 , 95 mM NaCl, 1 mM DTT y 0.132 μM [³²P- γ] ATP, en un volumen total de 50 μl , durante 1 h a 30 °C. La reacción se detuvo con 10 μl de 8 M urea, 5% SDS, 40 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.5% β -

mercaptoetanol y las mezclas eran posteriormente analizadas mediante *Western blot* con anti-FLAG y autorradiografía.

3.17 Espectrometría de Masas.

Para la identificación de las bandas de proteínas que interaccionan con GPBP (analizado por la técnica del *Cross-link*), se determina mediante espectrometría de masas. Los polipéptidos separados mediante *SDS-PAGE*, eran sometidos a digestión enzimática automatizada utilizando una mezcla de tripsina pancreática bovina (*Roche*) y α -quimotripsina (*Sigma*) a una concentración final de 20 ng/ μ l en 50 mM bicarbonato amónico pH 8.3, empleando un digestor *ProGest* (*Genomic Solutions*) siguiendo la instrucciones del fabricante.

Las digestiones se efectuaron con o sin reducción previa con DTT (10 mM) y 15 minutos a 65°C. Las mezclas de péptidos tripsinizados fueron secadas en *SpeedVac* y posteriormente disueltas en 5 μ l de 50% α -Cyano-4-acido *hydroxicinamic*, acetonitrilo (ACN) 0.1% y trifluoroacético (TFA) para ser sometidas al estudio de MALDI/TOF/TOF. Posteriormente los picos son recogidos y analizados mediante el software de *Applied Biosystems*. Para la identificación de las proteínas se utilizó el programa MASCOT v2.0 (*Matrix Science*).

4 RESULTADOS

4.1 El gen *COL4A3BP* transcribe tres ARNm.

Se han descrito tres ARNm expresados por el gen *COL4A3BP* (Figura 11). NM_005713 codifica para GPBP-1 (Raya *et al.*, 1999) y NM_031361 codifica para GPBP-2 (Raya *et al.*, 2000). El tercer ARNm, NM_001130105, se encontró en células endoteliales de arteria pulmonar humana y contiene un primer exón adicional (exón -1, Figura 10) que procede de una región que comparte con el gen *POLK* situado 5' respecto al inicio de la transcripción descrito para *COL4A3BP* (Granero *et al.*, 2005). *COL4A3BP* y *POLK* comparten la región promotora y se transcriben en sentidos opuestos (ver el apartado 1.9 de la Introducción).

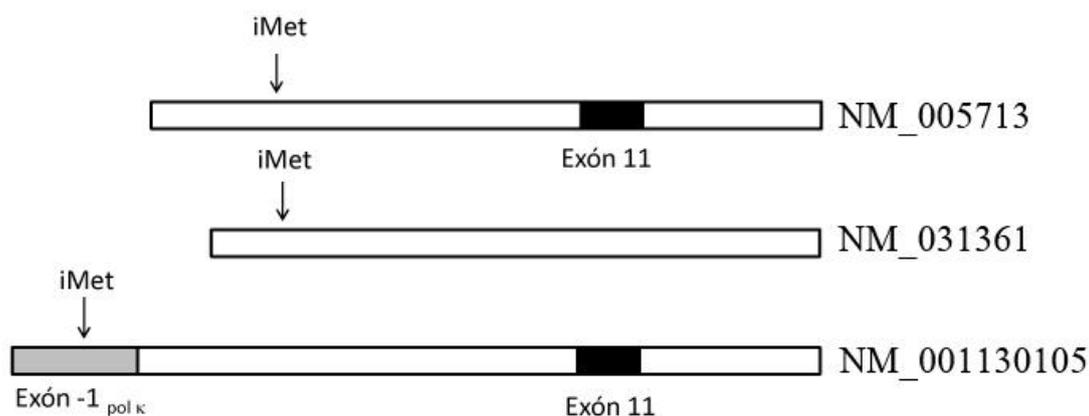


Figura 11. Esquema de los tres ARNm del gen *COL4A3BP*. Los dos primeros expresan los polipéptidos GPBP-1 (NM_005713) y GPBP-2 (NM_031361), y difieren en la presencia o ausencia del exón 11. El tercer ARNm (NM_001130105) se traduciría desde un exón precedente del gen *POLK*, lo que implica la existencia de una segunda región promotora situada 5' respecto al descrito para ambos genes.

Para estudiar la relevancia biológica del tercer ARNm descrito (NM_001130105) tratamos de identificar su expresión en diferentes librerías de ADN de tejidos humanos (hígado, riñón, cerebro, músculo, páncreas, queratinocitos y linfocitos) y de células HeLa mediante PCR, comparándola con la expresión conjunta de los otros dos ARNm (Figura 12). El resultado muestra

que NM_001130105 no se detecta en las librerías analizadas, indicando que los ARNm con relevancia biológica son NM_005713 y NM_031361.

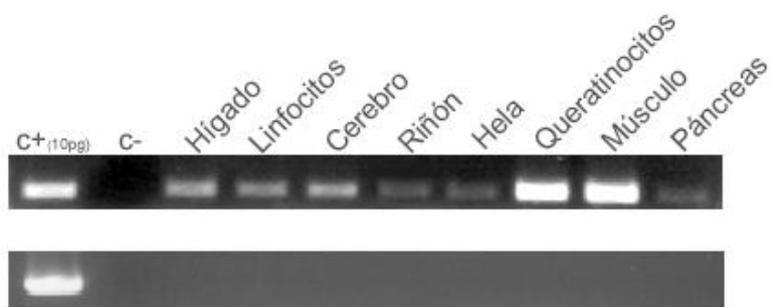


Figura 12. Expresión del ARNm NM_001130105 en diferentes tejidos. Se muestra el análisis de electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de una PCR sobre librerías de ADNc de los tejidos humanos indicados y células HeLa. Se utilizaron oligos que amplifican una secuencia común a cualquier ARNm de *COL4A3BP* (arriba) o el extremo 5' específico de NM_001130105 (abajo). Como controles positivos se utilizaron 10 pg. de los plásmidos que contienen los ADNc correspondientes a la isoforma de GPBP-1 (arriba), y una construcción realizada *ad hoc* basada en el ARNm NM_001130105 (abajo).

4.2 Caracterización de anticuerpos monoclonales contra GPBP.

Para identificar los productos de los ARNm de *COL4A3BP* se han obtenido y caracterizado dos anticuerpos monoclonales que reconocen GPBP. Los anticuerpos monoclonales: mAb 14 (Figura 13A) capaz de reconocer a GPBP-1 y GPBP-2; y mAb e26 cuyo epítopo se localiza en los 26 aminoácidos codificados en el exón 11 del gen *COL4A3BP* presentes en GPBP-1 y ausentes en GPBP-2 (Figura 11).

4.2.1 Caracterización de mAb 14.

Usando mutantes de delección y péptidos sintéticos hemos localizado el epítopo de mAb 14 próximo al motivo FFAT de GPBP (Figura 13 y resultados no mostrados): la delección del motivo FFAT impide que mAb 14 reconozca la proteína, lo que sitúa el epítopo sobre el motivo o próximo a él.



Figura 13. El sitio de unión de mAb 14 se sitúa próximo al motivo FFAT de GPBP. En **A** se muestra el motivo FFAT de GPBP (residuos contenidos en los recuadros) y la secuencia de aminoácidos delecionados en FLAG-GPBP Δ FFAT. En **B** se muestra un *Western blot* de las proteínas recombinantes FLAG-GPBP y FLAG-GPBP Δ FFAT analizadas con mAb 14 o mAb e26.

4.2.2 Caracterización de mAb e26.

El anticuerpo monoclonal mAb e26 se obtuvo inmunizando ratones con un péptido sintético de 26 aminoácidos que representa la traducción del exón 11 de GPBP-1 (ausente en GPBP-2). Para identificar residuos que formarían parte del epítipo de mAb e26 se realizaron diferentes construcciones a partir de pc-FLAG-GPBP-1 con mutaciones consistentes en la deleción de los nucleótidos que traducen 5 aminoácidos consecutivos de forma sucesiva hasta completar los 26 residuos de la región codificada por el exón 11. Se construyeron 5 mutantes de deleción; el último carecía de los 6 aminoácidos finales para completar los 26 aminoácidos. Los mutantes de deleción de los 15 primeros residuos son reconocidos por mAb e26, y no lo son los dos polipéptidos mutados que carecen de los últimos 11 aminoácidos (no se muestra). De este modo se concluyó que los últimos 11 residuos (³⁸⁶ASDDVHRFSSQ³⁹⁶) contienen el epítipo. Mediante mutaciones puntuales introducidas estos 11 aminoácidos se delimitó el epítipo a la secuencia ³⁸⁸DDVHR³⁹² (Figura 14).

Además un mutante en el que las dos últimas serinas se han sustituido por dos aspárticos, un análogo de la fosfoserina, es reconocido peor que la proteína nativa (Figura 14), indicando que las dos serinas contribuyen a conformar el epítipo de mAb e26.

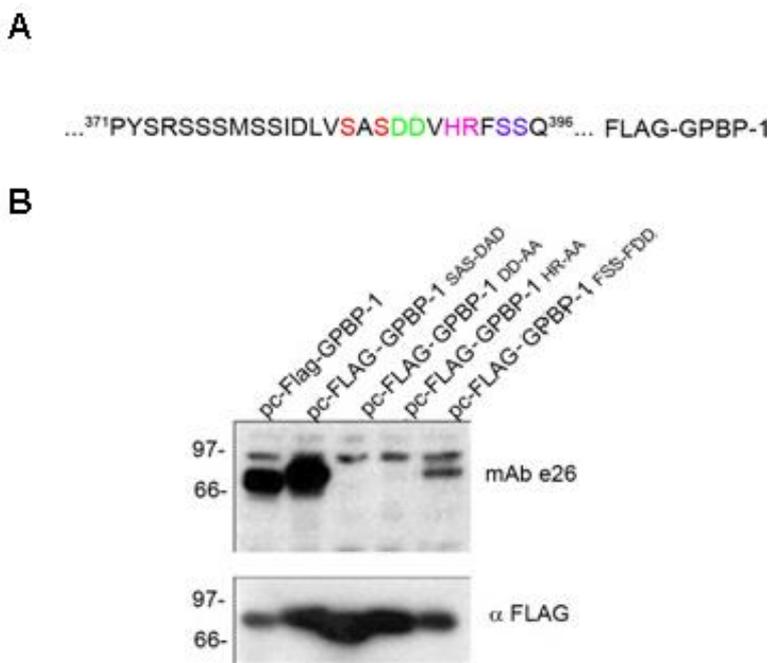


Figura 14. Caracterización del epítipo de mAb e26. En **A** se muestra las mutaciones introducidas en la secuencia de GPBP en diferentes colores. En **B** Se muestra mediante *Western blot* la reactividad e mAb e26 frente a GPBP-1 y los mutantes indicados. Se utilizó α FLAG para comprobar la presencia de los mutantes de GPBP-1 que no identifica mAb e26.

4.3 Identificación de los productos de *COL4A3BP*.

El análisis mediante *Western blot* de extractos de células HEK 293 muestran que el anticuerpo monoclonal mAb 14 reconoce un único polipéptido con un peso molecular aproximado de 77 kDa, mientras que mAb e26 reconoce principalmente dos polipéptidos, de 91 kDa y 120 kDa (Figura 15A), junto con otros polipéptidos de 77, 60, 50 y 32 kDa. Hemos identificado polipéptidos equivalentes en diferentes cultivos de células humanas tales como fibroblastos humanos, HeLa, hTERT-RPE y hTERT-BJ1 (no se muestra).

Para la caracterización adicional de los productos proteicos del gen *COL4A3BP*, se comparó la expresión recombinante de GPBP-1 con los polipéptidos nativos (Figura 15B). Se transfectaron transitoriamente células HEK 293 con el plásmido pc-n4' (Raya *et al.*, 1999), que incluye el 5'UTR (región no traducida "*Untranslated Region*") y toda la secuencia codificante de *COL4A3BP* (Raya *et al.*, 1999). La expresión de pc-n4' produjo tres polipéptidos que se detectan con mAb e26, de 77, 91 y 120 kDa. En cambio, sólo los polipéptidos de 77 kDa y 91 kDa reaccionan de forma significativa con el anticuerpo monoclonal mAb 14. Cabe destacar que el polipéptido recombinante más reactivo con el anticuerpo mAb e26, tiene un peso molecular aparente de 77 kDa (Figura 15B) y representa un producto del ARNm que no tiene un polipéptido equivalente nativo.

Para determinar el origen de las proteínas nativas, utilizamos plásmidos que expresan ARNs de interferencia (siARNs) específicos de *COL4A3BP* (Figura 15C). La expresión de los tres polipéptidos nativos se redujo sensiblemente con cualquiera de los siARNs específicos de *COL4A3BP*. El siARN que interfiere los ARNm NM_005713 y NM_031361 es más eficiente reduciendo el polipéptido de 77 kDa, mientras que el siARN que interfiere específicamente NM_005713 reduce de forma más eficaz la expresión de los polipéptidos de 91 kDa y 120 kDa (en lo sucesivo los denominaremos GPBP-3), y, en menor medida que los otros siARNs, también reduce los niveles del polipéptido de 77 kDa reconocido por mAb 14.

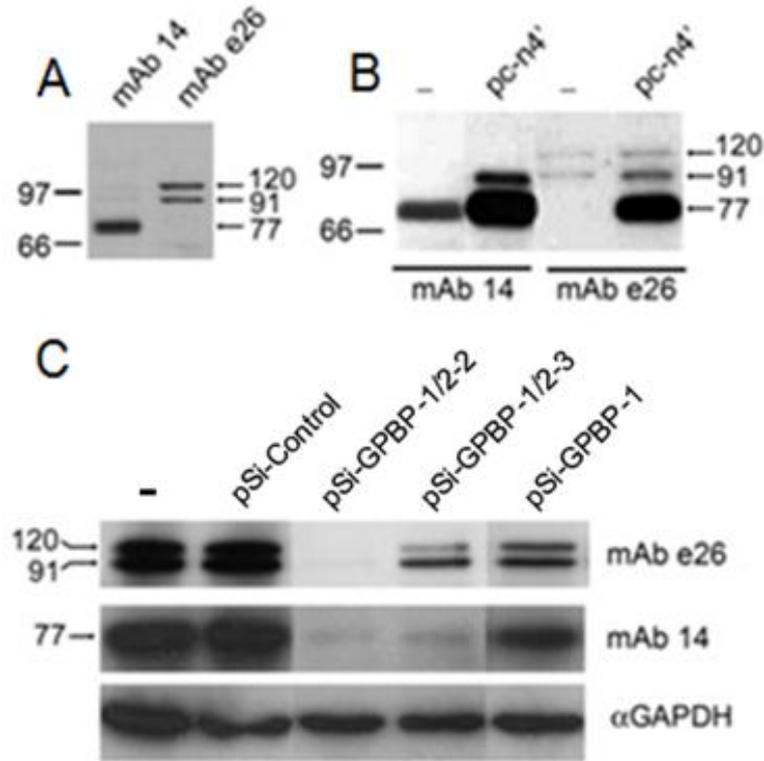


Figura 15. COL4A3BP codifica para las isoformas de 77, 91 y 120 kDa. En A, se muestra el análisis mediante *Western blot* con los anticuerpos indicados de 50 μ g de proteína de lisados de células HEK 293. En B, 10 μ g de lisados de células HEK 293 control (-) o transfectadas con pc-n4' se analizan como en A. En C, 50 μ g de lisados de células HEK 293 no transfectadas o transfectadas con los plásmidos indicados se analizaron como en A, utilizando gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa como control de carga. La reactividad de mAb e26 se abole utilizando GPBPpep1 (20 μ M) como péptido bloqueante (no se muestra). En esta y en las siguientes figuras, las barras y las flechas indican el tamaño en kDa y posición de los marcadores de peso molecular y de los polipéptidos de GPBP respectivamente.

En conjunto, nuestros datos sugieren que el resultado de la transcripción de *COL4A3BP* son dos ARNm con relevancia biológica: 1) NM_005713 traduce un polipéptidos de 91 kDa (GPBP-3) que mediante modificaciones post-traduccionales adquiere un tamaño de 120 kDa; 2) la “silenciación” específica de NM_005713 sugiere que también traduce un tercer polipéptido de 77 kDa (GPBP-1) que no es reconocido por mAb e26; y 3) NM_031361 que expresa GPBP-2.

4.4 GPBP-3 procede de un inicio alternativo de la traducción.

Las regiones 5'UTR de los ARNm suelen tener sitios de parada en cualquiera de las pautas de lectura de los ARNm. La existencia de una pauta abierta de lectura en el 5'UTR sugiere que podría producirse una traducción alternativa. Para estudiar si el ARNm de *COL4A3BP* puede traducirse desde el 5'UTR se realizaron dos construcciones a partir de pc-n4'. En la primera se deletionó todo el 5'UTR (pc-GPBP-Met, Figura 16A) y en la segunda se sustituyó el codón de la metionina de inicio por un codón de glicina (pc-n4'Mmut, Figura 16A), y se utilizaron en ensayos de expresión transitoria (Figura 16B). En células HEK 293, pc-GPBP-Met expresa únicamente GPBP-1 (77 kDa), y pc-n4'Mmut expresa GPBP-3 (Figura 16B, *ex vivo*). De acuerdo con estos resultados, con un sistema de traducción *in vitro* (libre de células) pc-GPBP-Met expresa solamente GPBP-1, mientras que la construcción pc-GPBP-Mmut expresa GPBP-3 (Figura 16B, *in vitro*). Los resultados indican que NM_005713 que traduce GPBP-1 también contiene un inicio de traducción no canónico en la región situada en 5' respecto a la metionina inicial (Met_i), que traduce los polipéptidos de 91 kDa y 120 kDa. Esta secuencia se denomina región de traducción alternativa (RTA; en inglés ATR, de *alternative translate region*). El producto de 77 kDa procede de la traducción canónica del ARNm.

Los resultados también sugieren que la isoforma de 91 kDa es el producto primario de traducción no canónica y el polipéptido de 120 kDa procede de la modificación post-traduccional de la de 91 kDa, ya que esta proteína no se expresa en un sistema libre de células desprovisto de membranas.

Para una caracterización más detallada del inicio de la traducción no canónica, la pauta abierta de lectura presente en el 5'UTR del ARNm de GPBP (Figura 16C) se interrumpió introduciendo codones de parada en posiciones concretas de la construcción pc-n4'mMut (Figura 16C). La expresión en células HEK 293 de los productos de las construcciones mutadas se analizó mediante *Western blot* (Figura 16D). La construcción en la que se sustituye el codón -83 por un codón de parada (originalmente ACG, treonina), no permite la expresión de las formas no canónicas de GPBP. En cambio, una mutación similar introducida en el codón anterior (originalmente GCG, alanina) expresa GPBP-3. Por tanto, el inicio de la traducción no canónica se encuentra en el codón T-83 (recuadro de la Figura 16C).

Para confirmar que la traducción no canónica es un fenómeno que ocurre de forma natural obtuvimos un anticuerpo quimérico (Ab 24) que reacciona específicamente con el polipéptido sintético que representa parte de la secuencia que traduce la RTA (Figura 16C). Ab 24 reconoce polipéptidos de 91 kDa y 120 kDa (Figura 15E) lo que sugiere que el ARNm nativo contiene un RTA y que los polipéptidos GPBP-3 nativos proceden de una traducción no canónica.

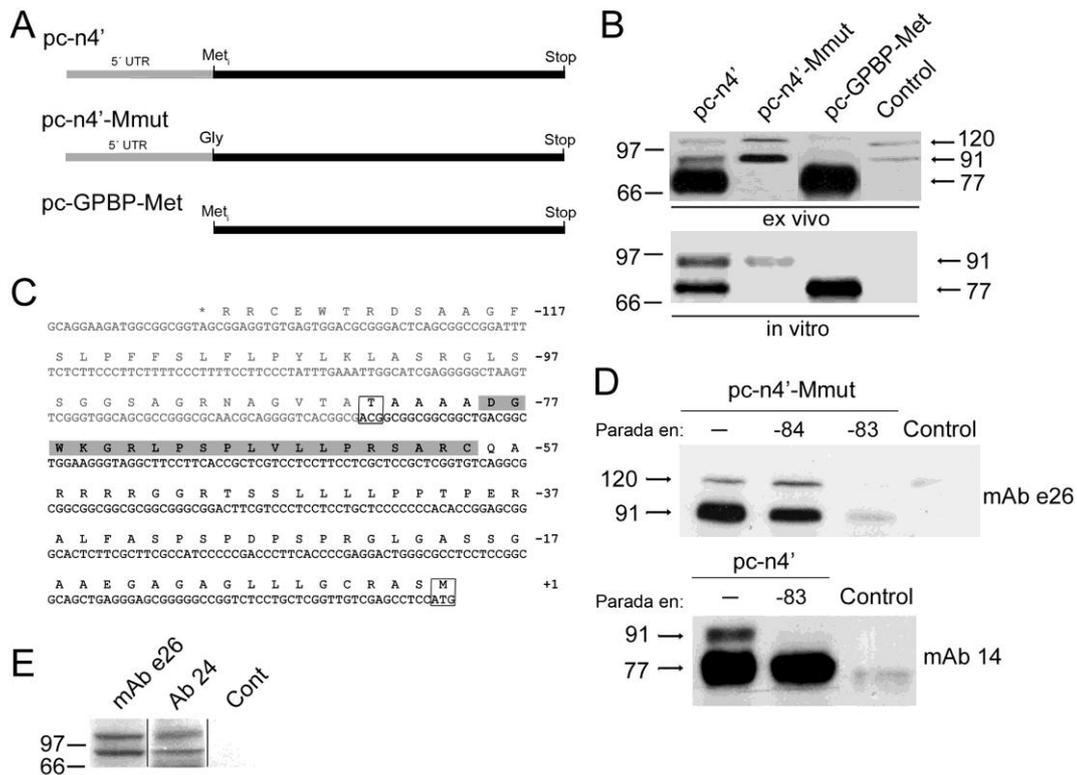


Figura 16. Los polipéptidos de GPBP de 91 kDa y 120 kDa son productos del inicio de traducción no canónico del ARNm. En A, se muestra una representación esquemática de las construcciones utilizadas. En B, en la parte superior (*ex vivo*) se muestra un análisis mediante *Western blot* con mAb e26 de 10µg de extractos de células HEK 293 transfectadas con las construcciones indicadas y en la parte inferior (*in vitro*) se muestra una fluorografía de una transcripción y traducción *in vitro* utilizando las mismas construcciones. En C, se representa la secuencia 5'UTR del ADNc de GPBP. Con recuadros se indican los codones de inicio. Destacado en gris se indica la secuencia del péptido sintético que se utilizó para obtener el anticuerpo Ab 24. En D, se muestra el análisis mediante *Western blot* con los anticuerpos indicados de 10µg de lisados de células HEK 293 (control) o las mismas células transfectadas con las construcciones indicadas. En E, se muestra el análisis mediante *Western blot* con los anticuerpos indicados de 50µg de una purificación parcial mediante cromatografía de intercambio iónico de extractos de células HEK 29. Se utilizó como anticuerpo control (Cont) Ab 20, un anticuerpo quimérico semejante a Ab 24 que no reconoce GPBP-3 recombinante (Figura 10).

4.5 GPBP-3 se une a membranas celulares.

El programa informático “Secretome P 2.0” alojado en la página <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/> predice que GPBP-3 es un polipéptido exportable aunque carece de una secuencia canónica de exportación. Por otro lado, la predicción de la localización subcelular de GPBP-3 mediante el programa de predicción PSORT II (Nakai *et al.* 1999; <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>) indica que tiene una alta probabilidad

para localizarse en diferentes compartimentos celulares como mitocondria (60,9%), núcleo (26,1%), citoesqueleto (8,7%) y vesículas secretoras del sistema (4,3%). Estas consideraciones teóricas sugieren que los polipeptidos GPBP-3 no son solubles en el citosol, sino que se encuentran en orgánulos celulares y que podría seguir la ruta secretora.

Para estudiar la validez de estas predicciones, se cultivaron células en presencia de anti-GPBP marcado con un fluorocromo y se analizaron mediante inmunofluorescencia directa y citometría de flujo (Figura 17A y B) sin fijarlas (células vivas). En ambos casos la unión de los anticuerpos anti-GPBP a las células se compite de forma eficiente con un péptido sintético que contiene el epitopo (GPBPpep1) y no se compite con un péptido control. Estos datos sugieren que hay isoformas de GPBP presentes en la cara externa de la membrana plasmática.

Para caracterizar la distribución intracelular de GPBP, se fraccionaron lisados de células HEK 293 y se analizaron mediante *Western Blot* con mAb 14 y mAb e26 (Figura 17C). En concordancia con las predicciones no se detectó GPBP-3 en la fracción soluble (citosol), sino que se encuentran en la fracción mitocondrial-lisosomal (7.000 x g) y en la fracción microsomal (150.000 x g). Queda por determinar si la presencia de GPBP-3 en la fracción nuclear es natural o procede de células que no se han lisado.

El polipéptido de 77 kDa que reacciona con mAb 14 y no con mAb e26 (GPBP-2), sólo se detecta en el citosol (sobrenadante de 150.000 x g, Figura

17C). Estos datos sugieren que GPBP-3 se encuentra asociado a membranas mientras que la isoforma de 77 kDa, GPBP-2, se encuentra de forma soluble en el citoplasma.

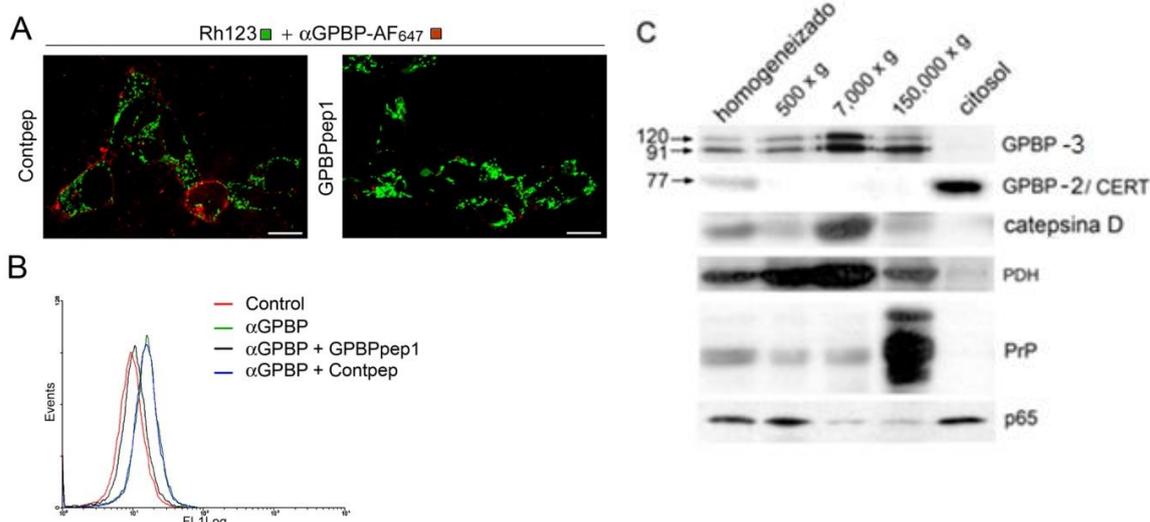


Figura 17. GPBP-3 se asocia a membranas celulares. En **A**, se muestra una inmunofluorescencia de células HEK 293 vivas, analizada mediante microscopía confocal. Las células se incuban con anti-GPBP marcado con Alexa-Flúor 647 (α GPBP-AF647) en presencia de GPBPpep1 (péptido bloqueante) o de una cantidad equimolar de un péptido no relevante (Contpep), y con rodamina 123 (Rh123) que tiñe las mitocondrias de las células vivas. La barra representa 21 μ m. En **B**, las células en suspensión se incubaban con una solución de bloqueo en ausencia (control) o presencia de anticuerpos biotinilados contra GPBP. Los anticuerpos biotinilados de la superficie de las células se detectaron con estreptavidina-FITC y citometría de flujo. Controla especificidad de la unión de los anticuerpos anti-GPBP a la superficie de las células se conformó compitiendo su unión con GPBPpep1 o con un péptido control (Contpep). En **C**, cantidades similares (10 μ g) de las fracciones celulares indicadas se analizaron mediante *Western blot* con los anticuerpos que reconocen las proteínas también indicadas, que se utilizaron las como marcadores de las diferentes fracciones celulares: la piruvato deshidrogenasa (PDH) de mitocondrias; catepsina D de la fracción lisosomal; prión (PrP) de la fracción microsomal; y p65 para identificar las fracción nuclear y el citosol. GPBP-2 y GPBP-3 se identificaron con mAb 14 y mAb e26, respectivamente.

4.6 GPBP-1 es una proteína soluble extracelular que interacciona con el colágeno tipo IV.

Trabajos previos sugieren que GPBP-1 interacciona con el colágeno tipo IV (Raya *et al.*, 1999; Raya *et al.*, 2000; Revert *et al.*, 2007). Para confirmar la interacción se hicieron ensayos *ex vivo* de entrecruzamiento e inmunoprecipitación con lisados procedentes de células que expresan BM40-

FLAG- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, un polipéptido recombinante exportable de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ que representa en antígeno GP (Netzer *et al.*, 1999). Al antígeno GP se le ha añadido un péptido señal que permite su exportación (BM40) y un péptido FLAG que permite su identificación como material recombinante. El péptido BM40 se corta quedando el péptido FLAG en el extremo N-terminal de la proteína que sigue la ruta secretora. Los anticuerpos anti-FLAG precipitan de forma muy eficiente FLAG- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, un polipéptido de 77 kDa que podría ser GPBP-1 o GPBP-2 (*Western blot*), y las proteínas GRP78 y GRP94 (*Coomassie*) (Yang y Li, 2005; Ni y Lee, 2007) (Figura 18A), chaperonas que se encuentran en el interior del RE y están implicadas en el mantenimiento de su homeostasis regulando en el plegamiento de proteínas y la respuesta al estrés dentro del RE. Con el fin de determinar si GPBP-1 interacciona con FLAG- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ en el retículo endoplasmático, se transfectan células HEK 293 y HEK 293 que expresan BM40-FLAG- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ con pc-n4' o con un plásmido control y se analizan de forma similar mediante entrecruzamiento e inmunoprecipitación (Figura 18B). Los anticuerpos anti-FLAG precipitaron de forma muy eficiente la GPBP-1 recombinante a partir de las células que expresaban FLAG- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ pero no en las células control, indicando que GPBP-1 entra en la ruta secretora e interactúa con FLAG- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$.

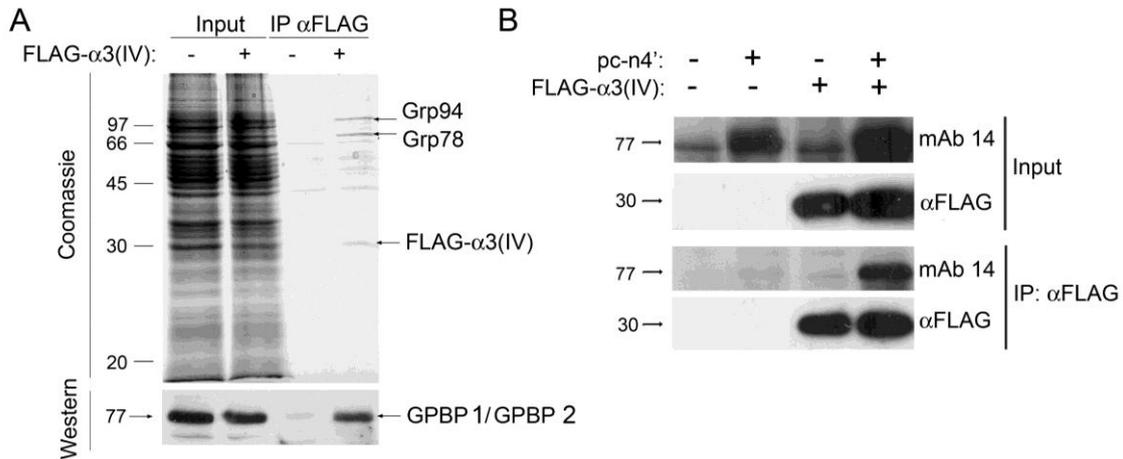


Figura 18. GPBP-1 interacciona con colágeno IV en células cultivadas. En **A**, las líneas celulares de HEK 293 o HEK 293-FLAG-α3(IV) se entrecruzan, se lisan y posteriormente se inmunoprecipitan con agarosa-Anti-FLAG®. Cincuenta microgramos de lisado (Input) y el producto inmunoprecipitado y eluido con péptido FLAG (IP αFLAG) se analizan mediante tinción Azul de Coomassie o *Western blot* y anti-GPBP policlonal. Los péptidos indicados con flechas en la tinción Azul de Coomassie se identificaron mediante espectrometría de masas (MALDI/TOF/TOF). En **B**, células HEK 293 o HEK 293-FLAG-3 (IV) se transfectan con pcDNA3 (-) o con pc-n4' y se analizan como en **A**, mediante *Western blot* con los anticuerpos indicados.

El análisis de la estructura primaria de la isoforma de GPBP de 77 kDa predice que la localización es citosólica. Sin embargo, los estudios realizados *in vitro* (Raya *et al.*, 1999; Raya *et al.*, 2000), *ex vivo*, (Figura 17) e *in vivo*, (Revert *et al.*, 2007) sugieren que GPBP-1 se une y fosforila antígeno GP. Además aunque los estudios de expresión de la forma recombinante revelaron que la isoforma predominante es la de 77 kDa, no hay niveles significativos de la contrapartida nativa en las células. Estas observaciones sugieren que GPBP-1, es secretada al exterior de forma no convencional (careciendo de péptido señal).

Para estudiar la secreción de GPBP-1 se expresaron en células HeLa la proteína recombinante FLAG-GPBP-1 a partir del plásmido pc-FLAG-GPBP-1. De esta forma mediante anticuerpos específicos se analizó por inmunofluorescencia en células fijadas (Figura 19A). El resultado fue la

colocalización de GPBP-1 y calregulina, una proteína del RE, lo que sugiere que, tal y como se describe para GPBP-2 (Perry y Ridgway, 2006; Kawano *et al.*, 2006), FLAG-GPBP-1 se une al retículo endoplasmático a través de la interacción con FFAT-VAP.

Cuando a GPBP-1 se le deleta el motivo FFAT (pc-FLAG-GPBP-1 Δ FFAT) que hace imposible la unión a VAP (por paralelismo con los resultados descritos para GPBP-2) cambia la localización de GPBP-1, que pasa del RE al aparato de Golgi (Figura 19A).

Nuestros datos son consistentes con la idea de que la exportación de GPBP-1 recombinante está mediada por la unión a VAP a través del motivo FFAT, y sólo cuando la interacción de FFAT se altera, la proteína se puede asociar al aparato de Golgi. Esta hipótesis se estudió mediante la expresión de FLAG-GPBP-1 y FLAG-GPBP-1 Δ FFAT en cultivos celulares y el análisis de la presencia de estos polipéptidos en los medios de cultivo mediante inmunoprecipitación y análisis mediante *Western blot* (Figura 18B). Los anticuerpos específicos de FLAG precipitan de forma muy eficiente la proteína procedente de los medios de cultivo de las células que expresan FLAG-GPBP-1 pero no del medio de las células que expresan FLAG-GPBP-1 Δ FFAT. Revelando que FFAT media la unión con el RE y es esencial para la secreción de GPBP-1. GPBP-2 también se une al RE a través de FFAT (Perry *et al.*, 2006; Kawano *et al.*, 2006). Sin embargo, hemos encontrado GPBP-2 en el citosol (Figura 17C) y GPBP-1 en el compartimento extracelular (Figura 19B), apoyando la idea que la región de los 26 aminoácidos ricos en serinas

exclusivo de GPBP-1 es crítico para la secreción. Se investigó de forma similar la exportación de FLAG-GPBP-1 y FLAG-GPBP-2 (Figura 19C). La presencia de los 26 aminoácidos ricos en serinas fue crítica para la secreción, ya que FLAG-GPBP-2 no se encuentra de forma significativa en el medio de cultivo.

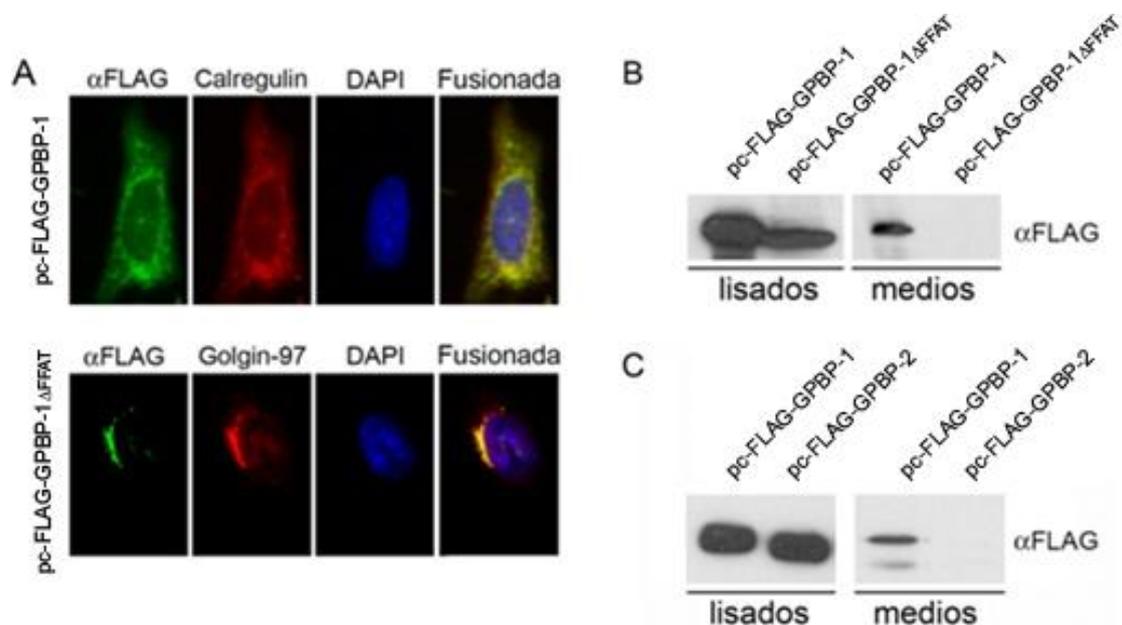


Figura 19. Exportación GPBP-1 al compartimento extracelular. En A, se transfectaron células HeLa con el plásmido indicado y la expresión de las proteínas recombinantes se visualizó con anti-FLAG mediante inmunofluorescencia indirecta. El ADN se tiñó con 4, 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para la visualización del núcleo. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia convencional con un objetivo 40x En B y C, 10 μ g de lisados de células transfectadas con los plásmidos indicados y las inmunoprecipitaciones de los correspondientes medios de cultivo se analizaron mediante *Western blot* con el anticuerpo indicados.

4.7 La unión a VAP facilita la exportación de GPBP-1.

La delección del motivo FFAT impide que GPBP-1 llegue al medio de cultivo (Figura 19B), lo que sugiere que su unión a VAP condiciona la exportación. Ya que la ausencia de fosfatos en la región SR1 aumenta la afinidad de GPBP por VAP (Kumagai *et al.*, 2007), para evaluar mejor la importancia de esta interacción en la exportación de GPBP-1 produjimos un mutante al que se le había sustituido la Ser¹³² por Ala. La proteína mutada no es fosforilable en la

región SR1, ya que la fosforilación de la Ser¹³² es necesaria para que se fosforilen el resto de serinas (Kumagai *et al.*, 2007). La falta de fosforilación de este motivo provoca una disminución del tamaño molecular aparente analizado mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (Kumagai *et al.*, 2007, Fugmann *et al.*, 2007 y Figura 20). Cuando se analiza la proteína exportada al medio de cultivo de células transfectadas transitoriamente con plásmidos que expresan FLAG-GPBP-1 o FLAG-GPBP-1S132A, se observa que hay más proteína mutada que nativa (Figura 20), sugiriendo que un aumento de la afinidad de GPBP-1 por VAP facilita su exportación.

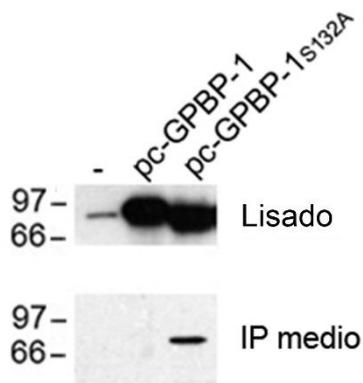


Figura 20. La Ser¹³² es un residuo fundamental en la exportación de GPBP-1. En la figura se muestra un análisis similar al de la figura 19B y C de lisados y del producto de la inmunoprecipitación con α FLAG del medio de cultivo de células HEK 293 transfectadas transitoriamente con los plásmidos indicados o con un plásmido control (-).

4.8 GPBP-3 regula los niveles de GPBP-1 en el medio extracelular.

GPBP-3 y GPBP-1 entran en la ruta secretora, pero mientras que GPBP-2 permanece asociada a las membranas, GPBP-1 es soluble y exportable. Esta evidencia nos hace plantearnos la posibilidad de si los niveles GPBP-1 extracelulares son regulados por GPBP-3. Para demostrar que GPBP-3 está asociada a membranas celulares mientras que GPBP-1 es una proteína de secreción, se generaron líneas celulares estables que expresaban constitutivamente la GPBP-3 con diferentes niveles de expresión (no se muestran todos los clones GPBP-3) (Figura 21A). Se utilizaron dos clones, uno

que expresa la proteína (Figura 21, c8) y otro con una expresión que no llega a detectarse (Figura 21, c19). Los clones se transfectaron transitoriamente con pcDNA3-FLAG-GPBP-1. La inmunoprecipitación del medio de cultivo muestra que el clon que expresa más GPBP-3 exporta más GPBP-1, indicando que GPBP-3 facilita este proceso.

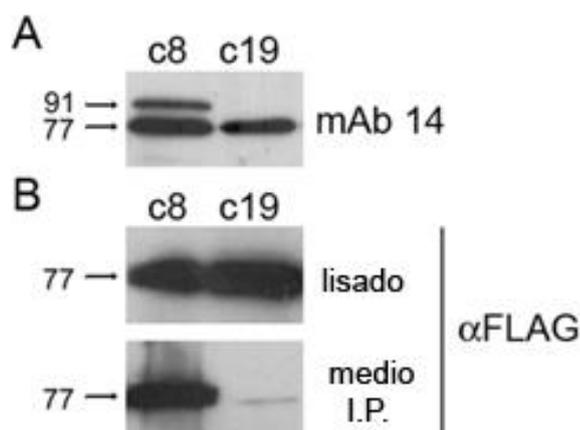


Figura 21. GPBP-3 facilita la secreción de GPBP-1 en células HEK-293. En A, se muestra el análisis mediante *Western blot* de los niveles de GPBP-3 (91) y GPBP-1/2 (77) en 10µg de lisados de dos clones independientes (c8 y c19) aislados a partir de células HEK-293 transfectadas con pcDNA3-n4'-Mmut. En B, los mismos clones se transfectaron con pc-FLAG-GPBP-1. Las células se lisaron y se analizaron como en A con anti-FLAG, y los medios de cultivo se inmunoprecipitaron con resina anti-FLAG® y la presencia de FLAG-GPBP-1 en el material eluido se determinó mediante *Western blot* con αFLAG.

El proceso de exportación al medio extracelular está mediado por GPBP-3. En situaciones donde la expresión de GPBP-1 es anormalmente elevada, como por ejemplo, en situaciones de transfección transitoria, se acumulan los polipéptidos de GPBP-1 en el citosol (Figura 22). Este hecho, indica que el transporte al exterior es saturable y por tanto, mediado por un enzima, en este caso, la isoforma de GPBP de 91 kDa (GPBP-3). Los resultados de *Western blot* muestran como GPBP-3 y GPBP-1 recombinantes expresados de forma transitoria a partir de las construcciones pc-n4'-Mmut y pc-GPBP-1 (respectivamente) se distribuyen de forma similar a las isoformas nativas.

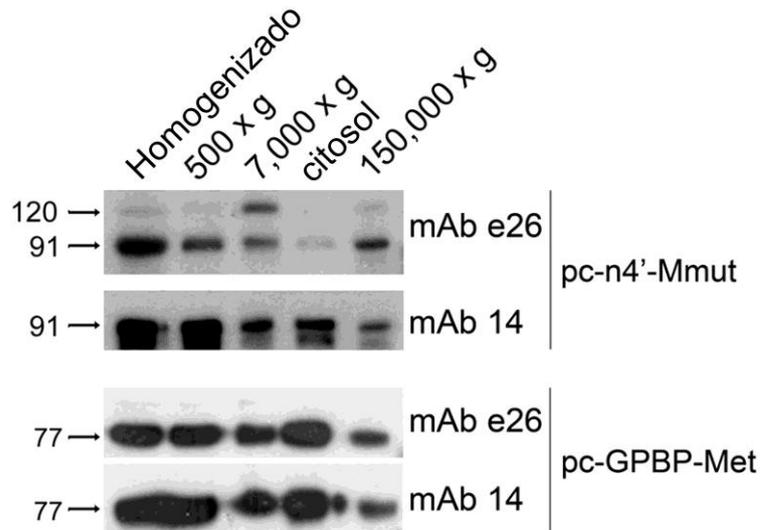


Figura 22. La expresión recombinante de GPBP-1 acumula los polipéptidos en el citosol. El análisis mediante *Western blot* con los anticuerpos indicados del fraccionamiento de células HEK 293 transfectadas transitoriamente con los plásmidos indicados. Se muestra las fracciones de núcleos y células no rotas 500 xg, fracción de membranas 7000 xg, microsomas 150000 xg, y sobrenadante de 150000 xg citosol.

Curiosamente bajo dichas condiciones mAb e26 muestra una mayor reactividad frente a la isoforma citosólica de 77 kDa (GPBP-1) que a la isoforma presente en el medio extracelular (Figura 23).

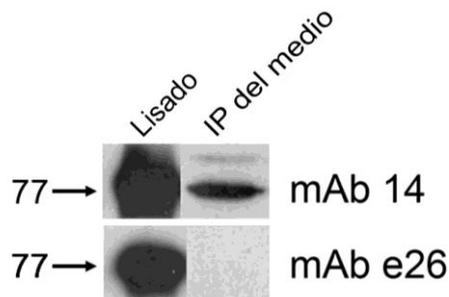


Figura 23. La secreción de GPBP-1 está asociada a una pérdida de afinidad de mAb e26. El análisis mediante *Western blot* lisados celulares y de la inmunoprecipitación del medio de cultivo de las mismas células mediante los anticuerpos monoclonales indicados muestra la pérdida de reactividad de la isoforma de GPBP-1 de 77 kDa en el medio extracelular.

4.9 GPBP-1 recombinante se exporta al medio y es capturada por células en cultivo.

FLAG-GPBP-1 expresado de forma transitoria en células cultivadas se distribuye por el RE (Figura 19A), en cambio FLAG-GPBP-1S132A muestra un patrón punteado que no colocaliza con polipéptidos marcadores del RE (no se muestra). Un análisis más amplio determinó que FLAG-GPBP-1S132A se localiza en parte en endosomas (Figura 24), lo que sugiere que al alcanzar el medio de cultivo (Figura 20) el polipéptido secretado puede volver al interior celular por la vía endosomal.

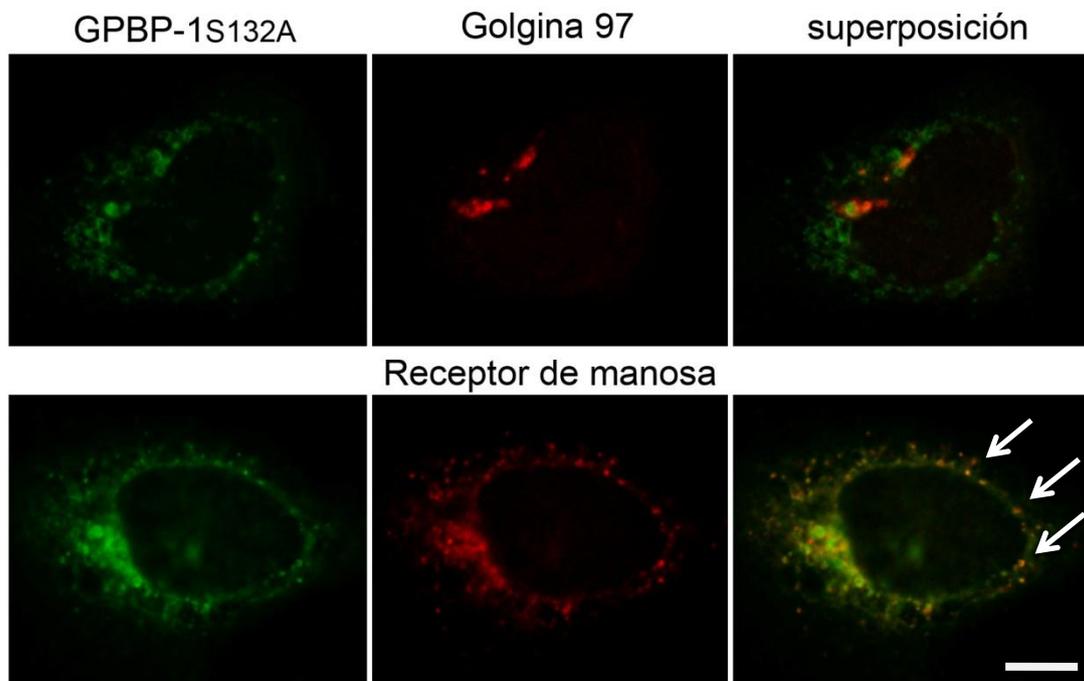


Figura 24. GPBP-1S132A se localiza en endosomas. Se muestra el resultado de dos inmunofluorescencias de células HeLa transfectadas con pc-GPBP-1S132A y analizadas mediante microscopía confocal utilizando anti-FLAG-FITC (verde) y anti-Golgina 97 o anti-receptor de manosa (rojo), marcadores del cis-Golgi y endosomas respectivamente. Se obtuvieron resultados similares con pc-GPBP-2S132A (no se muestra). La barra representa 8 μ m.

Para estudiar esta posibilidad se incubaron células HEK 293 con medio de cultivo que contenía FLAG-GPBP-1, procedente de células del mismo tipo transfectadas transitoriamente con pc-FLAG-GPBP-1 (medio condicionado), y

se utilizó como control un medio de cultivo similar de células transfectadas con plásmido vacío (sin ADNc). Las células incubadas con el medio condicionado y el medio control se lisan y se extrae FLAG-GPBP-1 incubando los lisados con agarosa-anti-FLAG. El material eluido muestra que las células incubadas con medio condicionado contienen FLAG-GPBP-1, sugiriendo que FLAG-GPBP-1 penetra en el interior de las células de modo similar al mutante puntual FLAG-GPBP-1S132A (Figura 25).

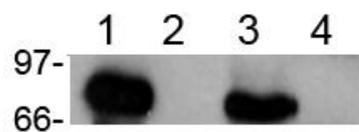


Figura 25. Captura de GPBP-1 recombinante a partir de un medio de cultivo condicionado. En la figura se muestra mediante la técnica de *Western blot* el lisado y las inmunoprecipitaciones de células HEK 293. En la calle 1 se observa un lisado celular que expresan de forma transitoria la isoforma de 77 kDa. En la calle 2 son las mismas células transfectadas con el vector vacío. En la calle 3 se muestra la inmunoprecipitación de células incubadas con medio condicionado. En la calle 4 se encuentra el control negativo, consiste en la inmunoprecipitación del lisado de las células procedentes de la calle 2.

La localización de FLAG-GPBP-1 en las células cultivadas con medio condicionándose analizó mediante inmunofluorescencia directa utilizando anti-FLAG-FITC. Las células cultivadas con medio condicionado se marcan con el anticuerpo, sugiriendo que FLAG-GPBP-1 alcanza el interior celular (Figura 26).

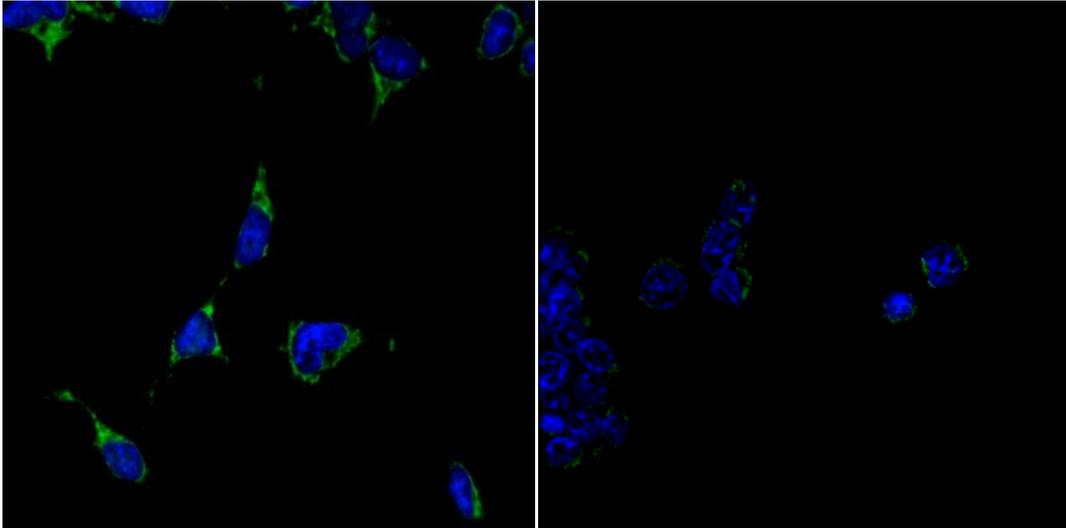


Figura 26. FLAG-GPBP-1 extracelular entra en las células HEK 293. En la figura se observa una inmunofluorescencia utilizando anti-FLAG-FITC (verde) y DAPI (azul) que marca el ADN (núcleos). En la imagen se muestra como FLAG-GPBP-1 procedente de medio de cultivo condicionado es capturada por células HEK 293 (izquierda), y a la derecha el control negativo en un medio de cultivo no condicionado. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia convencional, utilizando un objetivo 40x.

4.10 GPBP-1 no es sensible al tratamiento celular con esfingomielinasa.

GPBP-1 recombinante se distribuye por el retículo endoplasmático y se trasloca al aparato de Golgi cuando se muta el motivo FFAT que interacciona con VAP (Figura 22A). Considerando los resultados previos, nos preguntamos si GPBP-1 se comporta de modo similar a GPBP-2 en respuesta al tratamiento con esfingomielinasa, una enzima que añadida al medio de cultivo, degrada la esfingomielina a ceramida e induce la defosforilación de GPBP-2 y su traslocación al aparato de Golgi (Kumagai *et al.*, 2007). Para estos estudios, células HeLa que expresan de forma transitoria FLAG-GPBP-1 o FLAG-GPBP-2 se tratan con esfingomielinasa [*Bacillus cereus sphingomyelinase (bSMasa)*], y el grado de fosforilación de las proteínas recombinantes se analiza mediante inmunoprecipitación y *Western blot*, y su localización en la célula mediante inmunofluorescencia (Figura 27). Para determinar cómo influye el grado de fosforilación en la electroforesis, las proteínas recombinantes

inmunopurificadas se trataron con fosfatasa (λ PPasa; Raya *et al.*, 1999, Kumagai *et al.*, 2007). En los dos casos, el tratamiento con fosfatasa reduce su masa molecular aparente. Sin embargo, el tratamiento con bSMasa tuvo consecuencias diferentes: la forma parcialmente defosforilada de FLAG-GPBP-2 aumenta más que la de FLAG-GPBP-1 (Figura. 27A). Lo que sugiere que la reducción de los niveles de esfingomielina causados por el tratamiento con bSMasa induce una defosforilación parcial de GPBP-2 pero no afecta significativamente al estado de fosforilación de GPBP-1. Como era de esperar (Kumagai *et al.*, 2007) el tratamiento con bSMasa trasloca GPBP-2 al aparato de Golgi, mientras que no altera significativamente la distribución intracelular de GPBP-1 (Figura 27B).

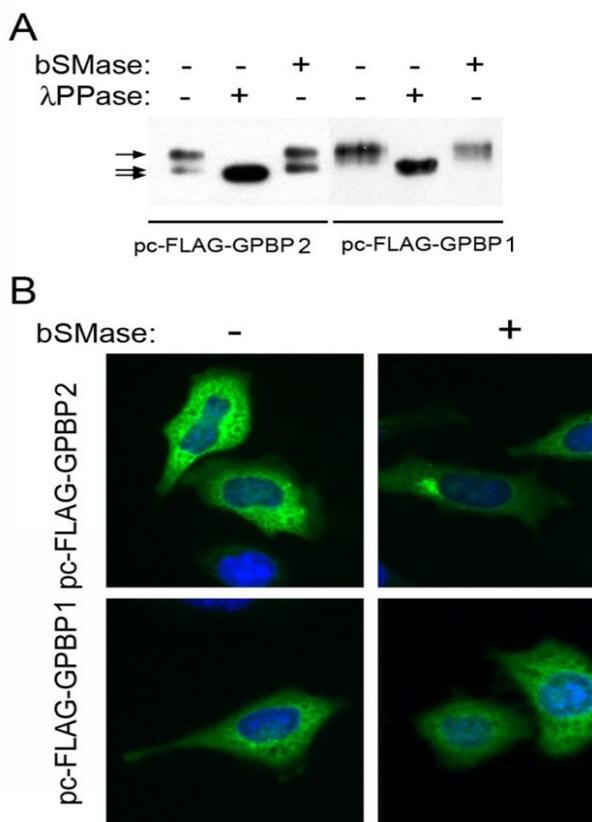


Figura 27. GPBP-2 es sensible al tratamiento con esfingomielinasa y GPBP-1 no. En **A**, las células HeLa fueron transfectadas con el plásmido que se indica y tratados o no, con esfingomielinasa, posteriormente fueron lisadas e inmunoprecipitadas para ser analizadas *Western blot* con el anticuerpo Antiflag. Se incubaron o no, con fosfatasa y analizados de manera similar con λ PPase. Se utilizó un gel en gradiente del 12% para separar de forma más resolutive los polipéptidos fosforilados de los desfosforilados y se estima su abundancia relativa, mediante *Western blot* y densitometría. En **B**, la las mismas células fueron estudiadas como en **A**, se fijaron con metanol / acetona, y se marcaron con anti-FLAG que es anticuerpo específico marcado con FITC (verde) y 4, 6-diamino-2-fenilindol (azul), y finalmente analizadas mediante inmunofluorescencia directa con un microscopio convencional utilizando un objetivo 40x.

4.11 GPBP-2 tiene una secuencia KDEL de retención en el RE que impide su exportación.

Cuando la Ser¹³² del motivo SR1 se muta a Ala, GPBP aumenta su afinidad por VAP y PI4P, y cambia su localización en la célula (Fugmann *et al.*, 2007, Kumagai *et al.*, 2007, Saito *et al.*, 2008) apareciendo en vesículas de secreción que el modelo de transportador de ceramida propuesto no describe (Figura 24 y Fugmann *et al.*, 2007). Esta característica sugiere que la defosforilación de GPBP-2 facilita su entrada en el RE de modo similar a GPBP-1, sin embargo no llega a completar la ruta secretora y queda retenida en el interior celular.

Las proteínas que llegan al Golgi procedentes del RE deben ser separadas entre las que deben seguir la ruta secretora y las que deben ser devueltas al RE por medio de vesículas COPI (Szul *et al.*, 2011). Un elemento común a varias proteínas que siguen este camino de vuelta es el motivo "KDEL". Las proteínas del RE (p.ej. chaperonas) que tienen esta secuencia en el extremo C-terminal interactúan con un receptor específico, el receptor de KDEL (KDEL_R) que facilita su retorno al RE (Raykhel *et al.*, 2007). En la estructura primaria de GPBP existe una secuencia KDEL de retención en el RE que no es canónica, al no encontrarse en el extremo C-terminal.

Para analizar si el motivo KDEL de GPBP-2 es funcional y retiene la proteína en el RE introducimos mutaciones puntuales: cuando el motivo KDEL se sustituye por la secuencia KDAA la proteína mutante cambia su localización acumulándose en el aparato de Golgi (Raykhel *et al.*, 2007), por lo que

introducimos esta mutación en FLAG-GPBP-2 y analizamos su patrón de distribución en la célula. FLAG-GPBP-2^{KDAA} tiene una distribución diferente a la proteína nativa, mostrando un patrón vesicular que se superpone con el patrón de RE propio de GPBP-2 (Figura 28), lo que sugiere que el motivo KDEL es funcional y retiene a GPBP-2 en el RE. Este patrón se puede encontrar en un número muy limitado de células que expresan FLAG-GPBP-2 indicando que es una localización natural de la proteína y que la secuencia KDEL, o bien dificulta que se alcance, o bien facilita el retorno al RE. Según el trabajo de Raykhel *et al.* de 2007 la mutación introducida permitiría que GPBP-2 se localizara en compartimentos posteriores de la ruta secretora y probablemente facilita su exportación.

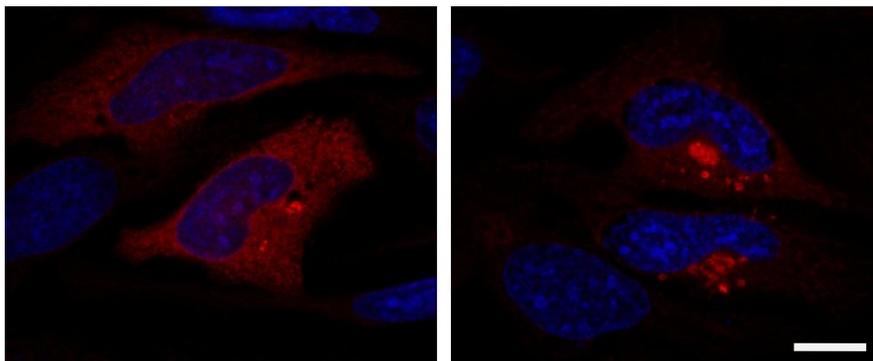


Figura 28. La secuencia KDEL de GPBP-2 condiciona su distribución intracelular. Se muestra imágenes del análisis mediante microscopía confocal de inmunofluorescencias de células HeLa que expresan transitoriamente FLAG-GPBP-2 (iz) o FLAG-GPBP-2^{KDAA} (de), que se detectan con anti-FLAG-TRITC (rojo). El ADN del núcleo se tiñe con DAPI (azul). La barra representa 10 μ m.

Esta hipótesis se confirmó al inmunoprecipitar FLAG-GPBP-2^{KDAA} a partir de medio de cultivo de células transfectadas transitoriamente (Figura 29).

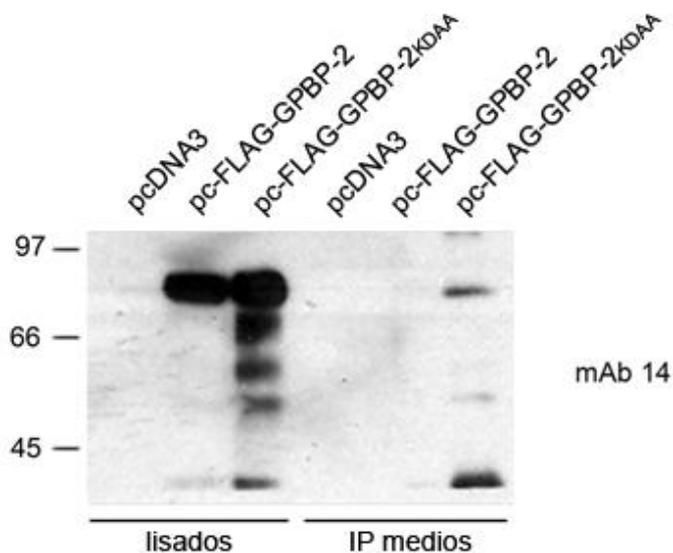


Figura 29. El motivo KDEL de GPBP-2 funciona como una secuencia de retención en el RE. Mediante *Western blot* con mAb 14 se muestra la expresión recombinante de FLAG-GPBP-2 o FLAG-GPBP-2KDAA en 10µg de lisados de células HEK-293 transfectadas transitoriamente con los plásmidos indicados, y su presencia en el material inmunoprecipitado con anti-FLAG a partir de los correspondientes medios de cultivo (I.P. Medios). Se señalan con barras las posiciones de los marcadores de peso molecular en kDa.

El comportamiento de la proteína mutante apoya la idea de que GPBP-2 se trasloca desde el RE al aparato de Golgi o a un compartimento intermedio, y regresa al RE de modo similar a otras proteínas con motivo KDEL. Recientemente se ha publicado que la interacción KDEL-KDEL_R activa la exportación de proteínas desde el aparato de Golgi (Pulvirenti *et al.*, 2007), una propiedad también descrita para GPBP-2 (Fugmann *et al.*, 2007). En conjunto, los datos sugieren que GPBP-2 podría estar regulando el tráfico de proteínas entre el RE y el aparato de Golgi y no sólo su exportación desde el cis-Golgi.

Para estudiar el papel de GPBP-2 en la vía exocítica la co-expresamos en células HeLa con VSVG-GFP, una quimera de la proteína G vesicular del virus de la estomatitis (VSVG) con la proteína fluorescente verde (GFP), muy utilizada como proteína *trazadora* para estudiar exportación de proteínas (Presley *et al.*, 1997). Analizamos el tráfico de VSVG-GFP entre el RE y el aparato de Golgi co-transfectando plásmidos que expresan VSVG-GFP y FLAG-GPBP-2 ó FLAG-GPBP-2KDAA (Figura 30). Cuando las células transfectadas se cultivan a 42 °C, VSVG-GFP se desnaturaliza y se retiene en el RE. Al bajar la temperatura a 37 °C o inferior (temperatura *permissiva*) se

inicia el paso de VSVG-GFP al aparato de Golgi. Utilizando este procedimiento comprobamos que a 42 °C tanto FLAG-GPBP-2 como VSVG-GFP tienen un patrón de RE, no así FLAG-GPBP-2_{KDAA} que muestra su característico patrón punteado. A los 15 minutos a 37 °C, VSVG-GFP muestra un patrón perinuclear que sugiere que ha alcanzado el aparato de Golgi, y FLAG-GPBP-2 se acumula en vesículas que colocalizan parcialmente con VSVG-GFP, de forma parecida a lo que se observa con FLAG-GPBP-2_{KDAA}. Después de 45 minutos VSVG-GFP sigue su ruta hacia el exterior de la célula apareciendo en lo que deben ser vesículas de secreción, que en algunos casos contienen FLAG-GPBP-2_{KDAA} pero no FLAG-GPBP-2, que vuelve a mostrar un patrón reticular. Las imágenes sugieren que a 42 °C GPBP-2 se localiza en el RE, y que a 37 °C se trasloca a un compartimento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi acompañando a VSVG-GFP. A 42 °C FLAG-GPBP-2_{KDAA} se localiza en el compartimento intermedio sugiriendo que el motivo KDEL de GPBP-2 facilita su retorno al RE.

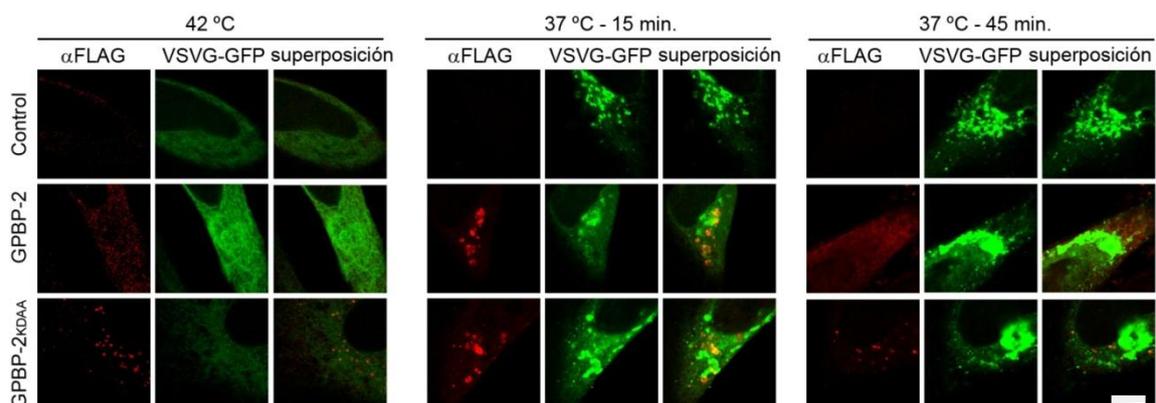


Figura 30. GPBP-2 circula entre el RE y un compartimento intermedio en la ruta secretora. Se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de secciones de células HeLa transfectadas transitoriamente con un plásmido vacío (Control) o con pc-FLAG-GPBP-2 o con pc-FLAG-GPBP-2_{KDAA}, y un plásmido que expresa VSVG-GFP. Las células se cultivan a 42 °C durante 14 h. Un pocillo de cada transfección se fija y otros dos se pasan a 37 °C y se fijan en los tiempos indicados. La barra representa 5 μ m.

Para estudiar cómo influye el motivo KDEL en la localización de GPBP-2 en este tipo de ensayos, repetimos el análisis a tiempo 0 y a los 5 y 15 minutos, estudiando la colocalización de VSVG-GFP y FLAG-GPBP-2 o FLAG-GPBP-2KDAA con Giantina (Figura 31), una proteína propia del cis-Golgi, la parte del aparato de Golgi por dónde llegan y se funden las vesículas que proceden del RE y compartimentos intermedios, como ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*, Ben-Tekaya *et al.*, 2004; Appenzeller-Herzog *et al.*, 2006).

El análisis mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal muestra que a los 5 minutos GPBP-2 aparece en vesículas en las que también se acumula VSVG-GFP, lo que es más evidente con FLAG-GPBP-2KDAA. A los 15 minutos VSVG-GFP ya ha alcanzado el cis-Golgi y se identifican vesículas dónde FLAG-GPBP-2KDAA colocaliza con Giantina y VSVG-GFP, mientras que las vesículas que contienen FLAG-GPBP-2 están más alejadas del cis-Golgi. El resultado muestra que GPBP-2 se localiza en vesículas por las que pasa VSVG-GFP en su ruta hacia el aparato de Golgi. Las vesículas pueden constituir un compartimento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi similar a ERGIC. Para determinar si FLAG-GPBP-2 alcanza este compartimento se hicieron estudios similares comparando la distribución de FLAG-GPBP-2KDAA y VSVG-GFP con ERGIC53, un marcador específico de ERGIC (Figura 32). Los resultados muestran que FLAG-GPBP-2^{KDAA} no alcanza el ERGIC y que VSVG-GFP colocaliza con los dos tipos de vesículas sugiriendo que son diferentes compartimentos intermedios entre el RE y el cis-Golgi.

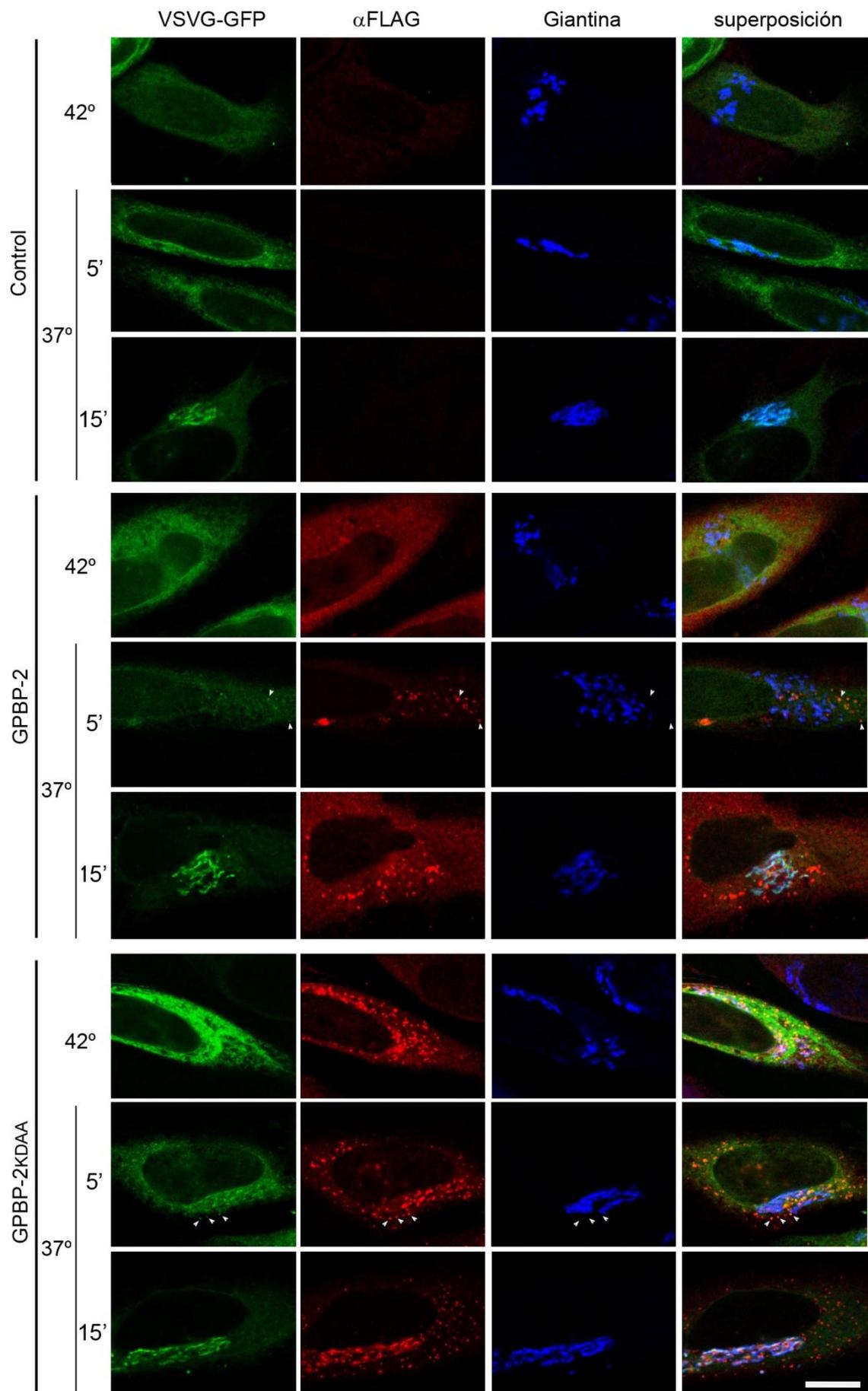


Figura 31. El motivo KDEL dificulta que GPBP-2 llegue al aparato de Golgi. Siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 30 se muestra la distribución de VSVG-GFP, FLAG-GPBP-2 y FLAG-GPBP-2KDAA en relación a Golgina. Las células HeLa transfectadas con los correspondientes plásmidos se cultivaron a 42 °C durante 14 h y el tiempo indicado de incubación a temperatura permisiva. Las flechas señalan vesículas en las que colocaliza VSVG-GFP y FLAG-GPBP-2 o FLAG-GPBP-2KDAA. La barra representa 15 μ m

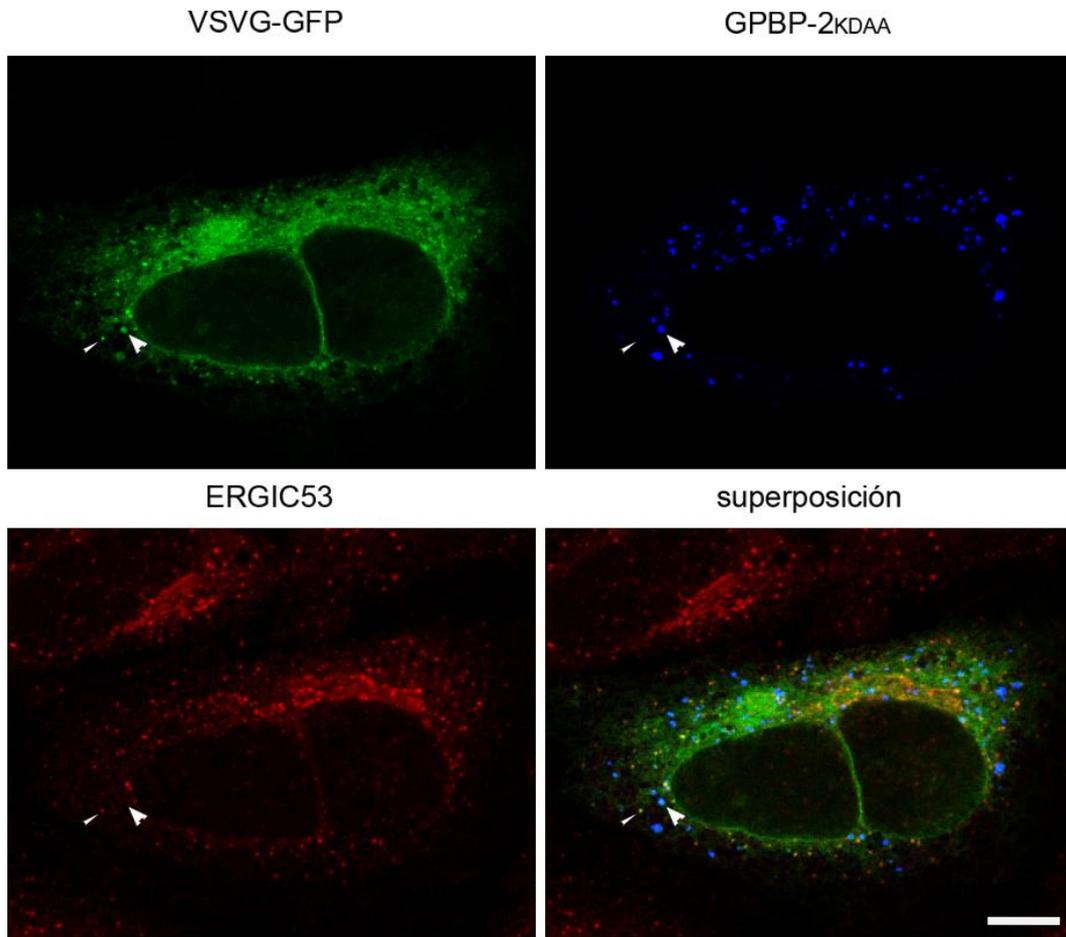


Figura 32. GPBP-2 y ERGIC ocupan compartimentos intermedios diferentes. Siguiendo el procedimiento descrito en las Figura 30 y 31 se muestra la distribución de VSVG-GFP y FLAG-GPBP-2KDAA en relación ERGIC53. Células HeLa transfectadas con los correspondientes plásmidos se cultivaron a 42 °C durante 14 h y 10 min a temperatura permisiva. Las puntas de flecha indican un ejemplo de vesículas con ERGIC53 (estrecha) y FLAG-GPBP-2KDAA (ancha) que contienen VSVG-GFP. FLAG-GPBP-2 tampoco colocaliza con ERGIC53 (no se muestra). La barra representa 8 μ m.

En ninguno de los experimentos realizados se aprecian diferencias en el tiempo que necesita VSVG-GFP para alcanzar el cis-Golgi. En cambio se observa que GPBP-2 se acumula en vesículas que transportan VSVG-GFP y que se forman en el RE antes de partir hacia el cis-Golgi, sugiriendo que podría tener un papel en este proceso. Para estudiar esta hipótesis repetimos los

mismos tipos de experimentos añadiendo nocodazol al medio de cultivo. El nocodazol despolimeriza los microtúbulos del citoesqueleto, y aunque no impide el tráfico de VSVG-GFP, sí cambia significativamente la morfología y distribución de los orgánulos de la ruta secretora (Presley *et al.*, 1997). Uno de los efectos más llamativos de la despolimerización de los microtúbulos es la redistribución del aparato de Golgi en “*mini-stacks*”, vesículas de pequeño tamaño que se distribuyen por toda la célula y que se sitúan próximas a los sitios de salida del RE (Cole *et al.*, 1996).

Al añadir nocodazol en células cultivadas a temperatura no permisiva se observa que la expresión de FLAG-GPBP-2 acumula VSVG-GFP en la periferia de las células, lo que no depende del motivo FFAT (Figura 33). A los 15 minutos de pasar a temperatura permisiva VSVG-GFP alcanza los mini-stacks del Golgi independientemente de la presencia de FLAG-GPBP-2 o FLAG-GPBP-2KDAA (no se muestra).

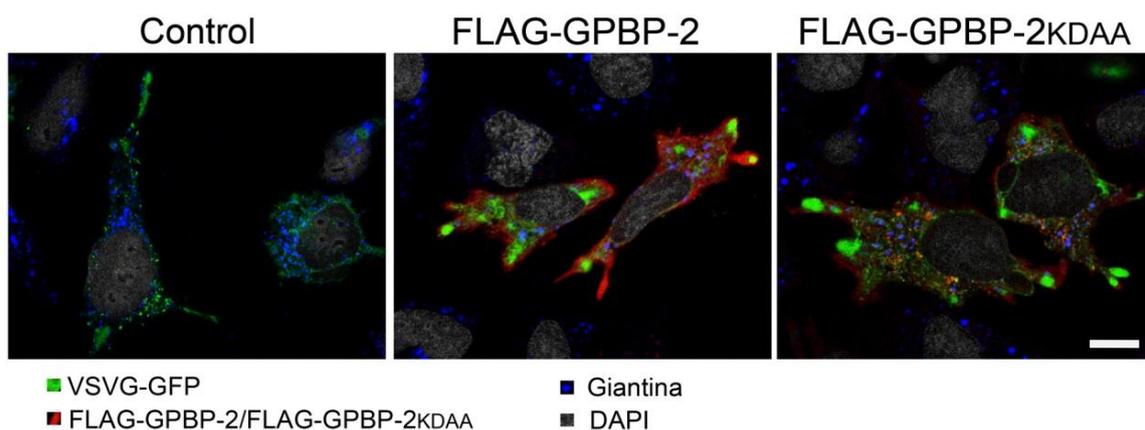


Figura 33. La expresión de GPBP-2 cambia la distribución de VSVG-GFP en el RE. Siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 30 se muestra la distribución de VSVG-GFP, FLAG-GPBP-2 y FLAG-GPBP-2KDAA en relación a la Giantina y al núcleo (DAPI). Las células HeLa transfectadas con los correspondientes plásmidos se cultivaron a 42 °C durante 14 h y se trataron con nocodazol. La expresión de GPBP-2 facilita que la proteína trazadora se acumule en la periferia de las células. En cambio la distribución de GPBP-2 no cambia, presentando su característico patrón de RE. La barra representa 10 μ m.

En conjunto los resultados sugieren que GPBP-2 circula entre el RE y el aparato de Golgi de forma cíclica, y que el motivo KDEL es determinante en su distribución. No hemos observado que haya diferencias apreciables en la velocidad con la que se desplaza una proteína trazadora como VSVG-GFP entre ambos compartimentos, sin embargo los resultados muestran que GPBP-2 forma parte de vesículas que transportan proteínas entre el RE y el cis-Golgi y que no forman parte de ERGIC, lo que sugiere que son otro compartimento de vesículas que podrían ser ricas en ceramidas de cadena corta.

4.12 GPBP-2 regula en el tráfico de proteínas en la ruta secretora.

Trabajos previos muestran que GPBP-2 facilita la exportación de proteínas mediante la activación de la PKD (Fugmann *et al.*, 2007). Los resultados previos sugieren que la velocidad a la que VSVG-GFP se mueve entre el RE y el cis-Golgi no está condicionada por los niveles de expresión de GPBP-2 ni por su motivo KDEL. Sin embargo se ha descrito que el motivo KDEL, cuando interacciona con su receptor en el aparato de Golgi, activa la exportación de proteínas (Pulvirenti, *et al.*, 2008), por lo que es posible que además del mecanismo descrito el motivo KDEL de GPBP-2 regule el tráfico de proteínas que alcanzan el trans-Golgi. Para estudiar esta posibilidad comparamos la exportación al medio de cultivo de FLAG- α 3(IV) en presencia de FLAG-GPBP-2 o FLAG-GPBP-2KDAA. Utilizamos un clon estable de HEK-293 que expresa constitutivamente FLAG- α 3(IV) y al que se le transfectan los plásmidos necesarios.

La expresión de FLAG-GPBP-2 retiene FLAG- α 3(IV) en el interior de la célula y disminuye la proteína que alcanza el medio de cultivo, lo que no se observa con FLAG-GPBP-2^{KDAA} (Figura 34), sugiriendo que el motivo KDEL media tal actividad.

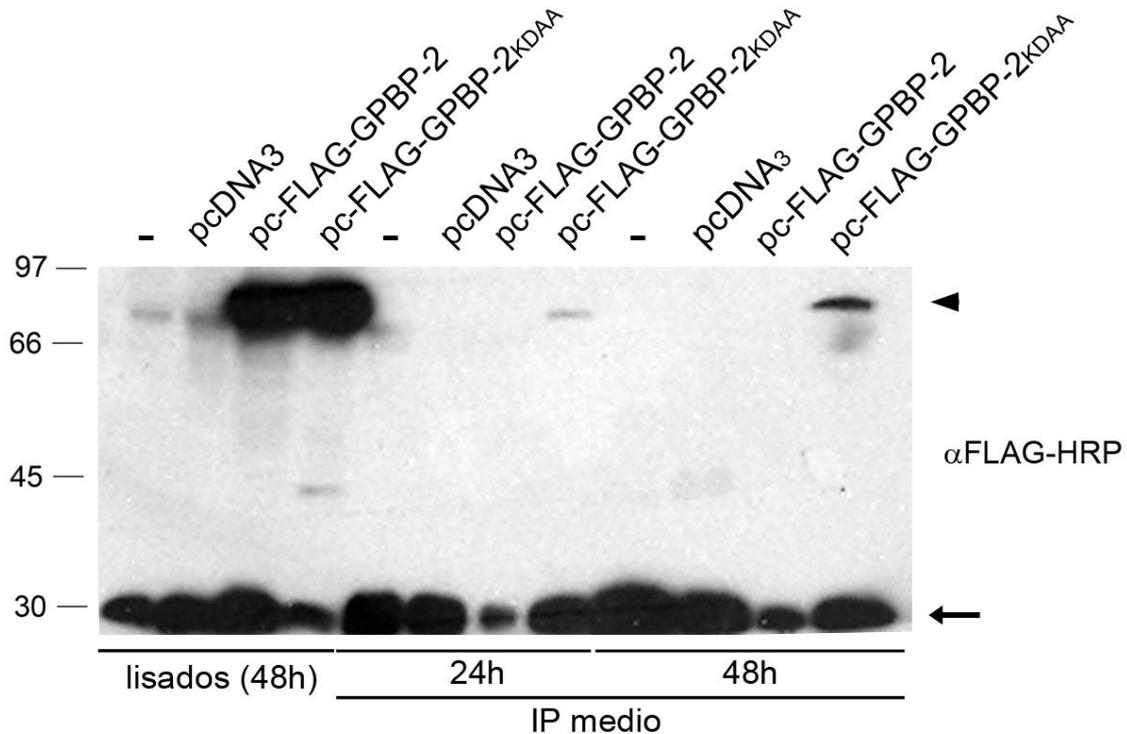


Figura 34. El motivo KDEL de GPBP-2 condiciona la exportación de FLAG- α 3. En la figura se muestra en análisis de mediante *Western blot* de 50 μ g de lisados de células HEK-293-FLAG- α 3 sin transfectar (-) o transfectadas con los plásmidos indicados, y del material eluido en inmunoprecipitaciones (IP) con anti-FLAG de los medios de cultivo correspondientes, coleccionados en los tiempos indicados desde la transfección. La expresión de FLAG-GPBP-2 reduce la exportación de FLAG- α 3 al medio de cultivo. La proteína mutante no reduce los niveles de FLAG- α 3 en el medio, lo que sugiere que el motivo KDEL juega un papel determinante en esta función. Se señalan con barras las posiciones de los marcadores de peso molecular que se expresan en kDa, con una cabeza de flecha la posición de FLAG-GPBP-2 y FLAG-GPBP-2^{KDAA}, y con una flecha la de FLAG- α 3.

Si el motivo KDEL de GPBP-2 regula la exportación de FLAG- α 3(IV) es muy probable que lo haga desde el interior de los orgánulos y no sólo desde el exterior. Para estudiar esta posibilidad analizamos la localización de FLAG-GPBP-2^{KDAA} y FLAG- α 3(IV) mediante microscopía confocal 4 π que tiene la misma resolución en los tres ejes del espacio (x , y , z), lo que permite obtener distinguir entre una superposición (x , y iguales pero diferente z) de una

verdadera colocalización al ocupar ambas proteínas el mismo espacio (x, y, z iguales). Los resultados obtenidos con esta técnica muestran que FLAG-GPBP-2KDAAs colocaliza en vesículas con FLAG- α 3(IV) en los tres ejes del espacio, mientras que Giantina y FLAG-GPBP-2KDAAs no comparten el mismo espacio (Figura 35), indicando que la técnica puede discriminar entre colocalización (en los tres ejes) y superposición (colocalización en dos ejes). Este resultado sugiere que GPBP-2 regula la exportación de proteínas desde dentro de vesículas de la ruta secretora.

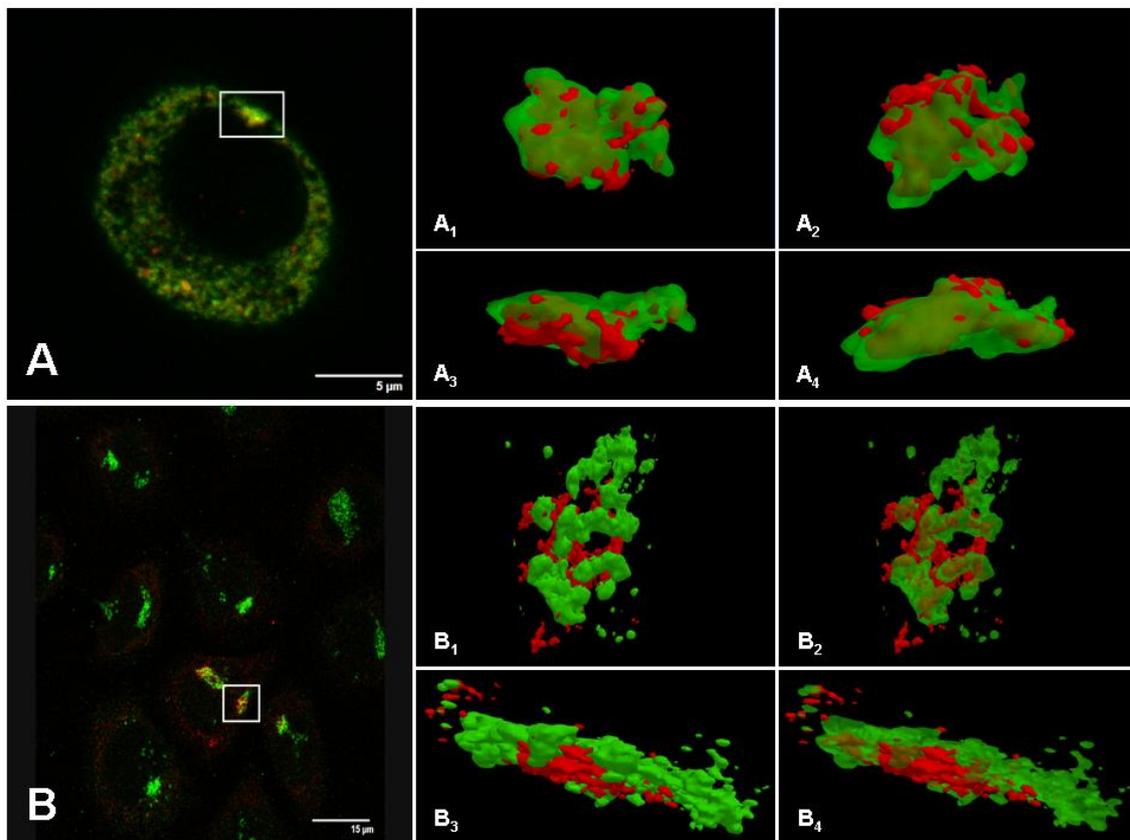


Figura 35. FLAG-GPBP-2 KDAAs comparte el mismo espacio que FLAG- α 3 en la ruta secretora.

En **A** se muestra la imagen de una inmunofluorescencia de una célula que expresa FLAG-GPBP-2KDAAs (verde) y FLAG- α 3 (rojo) analizada mediante microscopía confocal convencional. Con un recuadro se enmarca una región que se analiza mediante microscopía confocal 4 π (A₁-A₄) en la que se muestra una misma vesícula desde distintos puntos de observación, poniendo en evidencia que ambos polipéptidos ocupan el mismo espacio en el interior de la vesícula (color marrón). En **B** se muestra un análisis similar a **A** en el que se muestra FLAG-GPBP-2KDAAs (verde) y Giantina (rojo), en el que se observa que la colocalización de ambos polipéptidos (B₂ y B₄) en el espacio es más limitada que en **A**. En **A** y **B** las barras representan 5 y 15 μ m, respectivamente.

5 CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se presentan resultados concluyentes que muestran que el gen **COL4A3BP** expresa dos ARNm que se traducen en tres polipéptidos. El ARNm completo se traduce de forma canónica (AUG) expresando un polipéptido de 77 kDa (GPBP-1), y no canónica (ACG) expresando un polipéptido de 91 kDa (GPBP-3). Modificaciones post-traduccionales de GPBP-3 dan lugar a un polipéptido de 120 kDa. Además, mediante la eliminación (*splicing*) del exón 11 y la traducción canónica del ARNm se obtiene GPBP-2, que tiene un tamaño algo inferior a GPBP-1. Es posible que la diversidad de polipéptidos que proceden de la expresión de *COL4A3BP* sea mayor. En células endoteliales de arteria pulmonar humana se ha hallado un ADNc (*GenBank* número AK096854) que procedía de un ARNm con un primer exón adicional. El nuevo exón tiene una metionina canónica 45 codones antes del codón de inicio de GPBP-3. Sin embargo no hemos hallado evidencias de expresión significativa de este ARNm en varios tejidos humanos (Figura 10), por lo que es razonable pensar que las funciones biológicas de *COL4A3BP* se realizan mediante los polipéptidos GPBP-1, GPBP-2 y GPBP-3.

La localización celular de una proteína es determinante para su función biológica. Los resultados muestran que **GPBP-1, GPBP-2 y GPBP-3 entran en la ruta secretora**, y mientras que **GPBP-1 es exportado** al exterior celular y permanece de forma soluble, **una secuencia KDEL facilita el retorno de GPBP-2 al RE** y los polipéptidos de **GPBP-3 permanecen insolubles asociados a membranas celulares**. De forma similar se ha descrito que la traducción alternativa del ARNm de *fibroblast growth factor-2* y de *vascular*

endothelial growth factor cambia su actividad y localización celular (Touriol *et al.*, 2003).

Los resultados muestran que **la entrada de GPBP-1 en el RE depende de su unión a VAP**. VAP interacciona con la proteína-fosfatasa $2C\epsilon$ (PP2C ϵ) y permite que ésta defosforile el motivo SR1 de GPBP-2 (Saito *et al.*, 2008). La fosforilación de la Ser¹³² de SR1 es necesaria para que se fosforilen el resto de serinas del motivo, por lo que una mutación puntual que impida tal fosforilación (p.ej. Ala por Ser) evita que se fosforilen el resto de serinas (Kumagai *et al.*, 2007). Un dato relevante es que la defosforilación del motivo SR1 de GPBP-2 aumenta su afinidad por VAP y por PI4P lo que dio lugar a un cambio en el modelo inicialmente propuesto de transporte de ceramida, por el que GPBP-2/CERT dejaba de ser un transportador citosólico y pasaba a ser un “puente” que con el motivo SR1 defosforilado se une a la vez al RE y al aparato de Golgi. Esta propiedad requiere que GPBP-2 se sitúe en sitios en el que el RE prácticamente entra en contacto con el trans-Golgi, en una localización celular denominada ERES (de *endoplamic reticulum exit site*), pero no existe ninguna evidencia experimental que lo avale. Por el contrario, los resultados muestran GPBP-1S132A tiene un patrón vesicular que colocaliza en parte con el receptor de manosa, un marcador de endosomas, sugiriendo que la entrada de GPBP-1 en el RE está favorecida cuando aumenta su afinidad por VAP. Consistentemente GPBP-1S132A se exporta al medio extracelular en cantidades mayores que la proteína nativa. Todo lo anterior indica que **la unión a VAP facilita la entrada de GPBP-1 y GPBP-2 en el RE y que esta entrada precisa de la defosforilación de la Ser¹³²** mediada por PP2C ϵ que está unida a VAP en el RE. Resultados recientes avalan este modelo: el tamaño de

GPBP-1 nativo en el medio de cultivo es inferior a GPBP-1 intracelular sugiriendo se ha defosforilado en su proceso de exportación.

Por otro lado GPBP-3 (de 91 y 120 kDa) permanece unido a las membranas celulares. En este caso los datos sugieren que el sitio VAP se ha modificado, ya que mAb-14, cuyo epítipo solapa con el motivo FFAT, no reconoce estos polipéptidos. En este caso la entrada en el RE no estaría mediada por VAP y sí por la secuencia extra que aporta el RTA y que además permite que GPBP-3 se localice en las membranas celulares. **Una de las funciones de GPBP-3 es facilitar la exportación de GPBP-1.** Recientemente se ha comprobado que en la diferenciación de los miocitos para formar miotubos se precisa de un aumento de GPBP-1 intracelular que participa en el ensamblado de las complejas estructuras cuaternarias de la miosina. En estas células el aumento de GPBP-1 intracelular está acompañado de una disminución de GPBP-3 (Revert-Ros *et al.*, 2010), sugiriendo que es una de sus funciones *in vivo* y que en este caso se asocia a cambios fenotípicos profundos que llevan a una célula a dejar de dividirse, fusionarse con otras y formar grandes estructuras proteicas que permiten la contracción muscular.

Existen otras posibles modificaciones post-traduccionales además de las que afectan a los motivos SR1 y FFAT: la expresión recombinante de GPBP-1 acumula el polipéptido en el citosol indicando que su exportación es un proceso saturable; el polipéptido citosólico tiene una reactividad menor con mAb e26 que el que se localiza en la ruta secretora, sugiriendo que SR2 (que contiene el epítipo) también es una secuencia modificable y que esa modificación se produce tras entrar en el RE. El análisis de material recombinante expresado

en levadura muestra que SR2 está fosforilado, aunque la pobre reactividad con mAb e26 de la proteína extracelular tratada con fosfatasa alcalina sugiere que también se producen otras modificaciones covalentes (resultados no publicados).

La compleja estructura primaria de los polipéptidos GPBP y las posibles modificaciones post-traduccionales les permiten alcanzar virtualmente cualquier compartimento celular (Figura 36A). Este potencial se pone en evidencia cuando se analiza la expresión de GPBP en distintos tejidos. Además de en los sitios ya descritos, se observa GPBP en la membrana basal de túbulos, la membrana plasmática, núcleos, lisosomas y otras vesículas (Figura 36B).

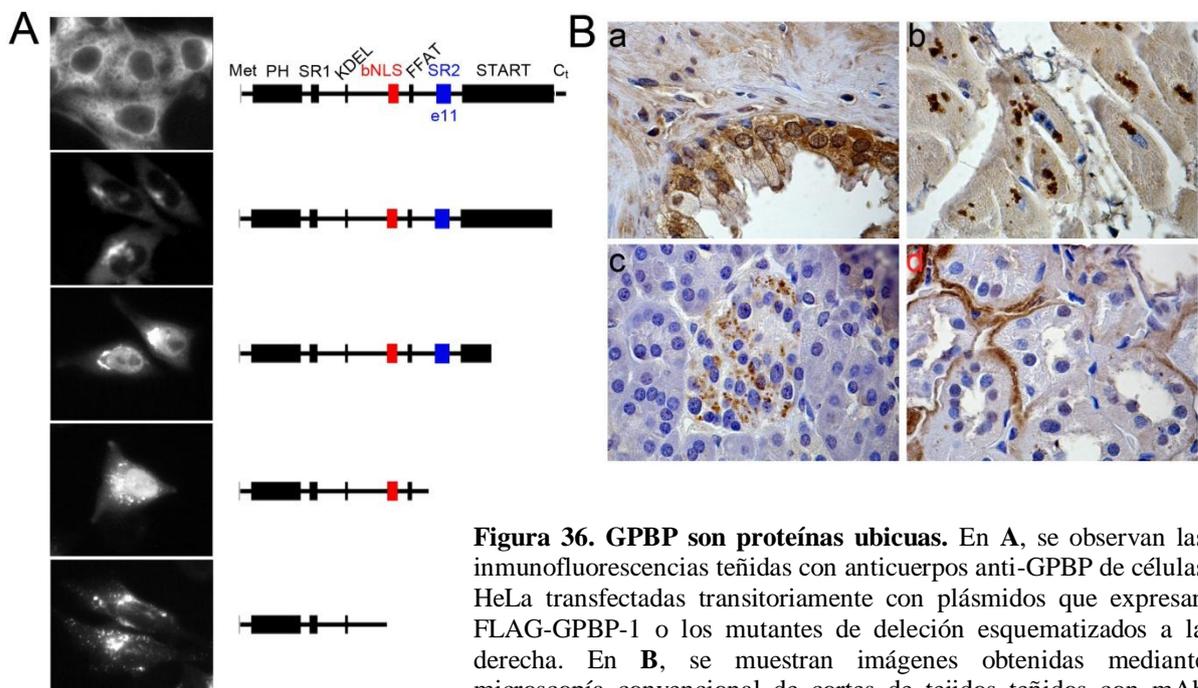


Figura 36. GPBP son proteínas ubicuas. En A, se observan las inmunofluorescencias teñidas con anticuerpos anti-GPBP de células HeLa transfectadas transitoriamente con plásmidos que expresan FLAG-GPBP-1 o los mutantes de delección esquematizados a la derecha. En B, se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía convencional de cortes de tejidos teñidos con mAb N26: a, próstata; b, músculo estriado; c, páncreas; d, túbulos renales. Se observa tinción reticular intracelular, en núcleos, membrana plasmática y en tejido fibroso (a), en pigmentos lipofuscínicos (lisosomas asociados al envejecimiento, b), en vesículas de secreción (c) y en membranas basales (d).

Existen suficientes evidencias que apoyan la idea de que **GPBP** no es meramente un transportador de ceramida entre el RE y el trans-Golgi, sino que **participa en el plegamiento de proteínas y la organización supramolecular de estructuras cuaternarias complejas como la red de colágeno IV de la MBG o el citoesqueleto de miosina de los miocitos**: 1) GPBP fosforila el antígeno GP en residuos fosforilados *in vivo* (Revert *et al.*, 1995); 2) GPBP-1 se exporta al exterior celular y GPBP-3 se asocia a la cara externa de la membrana plasmática; 3) GPBP-1 y GPBP-2 entran en el interior del RE a través de su interacción con VAP (Kumagai *et al.*, 2007), que es un factor crítico para mantener la homeostasis del RE y el plegamiento correcto de las proteínas en su seno (Kanekura *et al.*, 2006); 4) GPBP forma un complejo con el antígeno GP junto con Grp78 y Grp97, chaperonas del lumen del RE que participan en la respuesta celular a la acumulación de proteínas mal plegadas (*unfolded protein response* o UPR); 5) niveles altos de GPBP atenúan la UPR y la apoptosis mediada por la UPR (Swanton *et al.*, 2008); 6) GPBP-2 contiene un motivo KDEL funcional. Estos motivos regulan la exportación de proteínas que llegan al RE cuando están correctamente plegadas (Pulvirenti *et al.*, 2009); 7) el antígeno GP presenta al menos dos estructuras primarias diferentes (confórmeros) ensambladas en la MBG (Calvete *et al.*, 2006). La expresión recombinante de GPBP-1 altera la estructura cuaternaria del colágeno IV (Revert *et al.*, 2007), sugiriendo que los niveles elevados de GPBP interfieren con la correcta diversificación del antígeno GP; 8) la falta de expresión de GPBP-1 impide la formación correcta del citoesqueleto de miosina en el proceso de diferenciación de mioblastos a miotubos (Revert-Ros *et al.*, 2011).

Por tanto, a partir de lo expuesto anteriormente, el modelo celular propuesto de la biología celular de las diferentes isoformas de GPBP sería el siguiente:

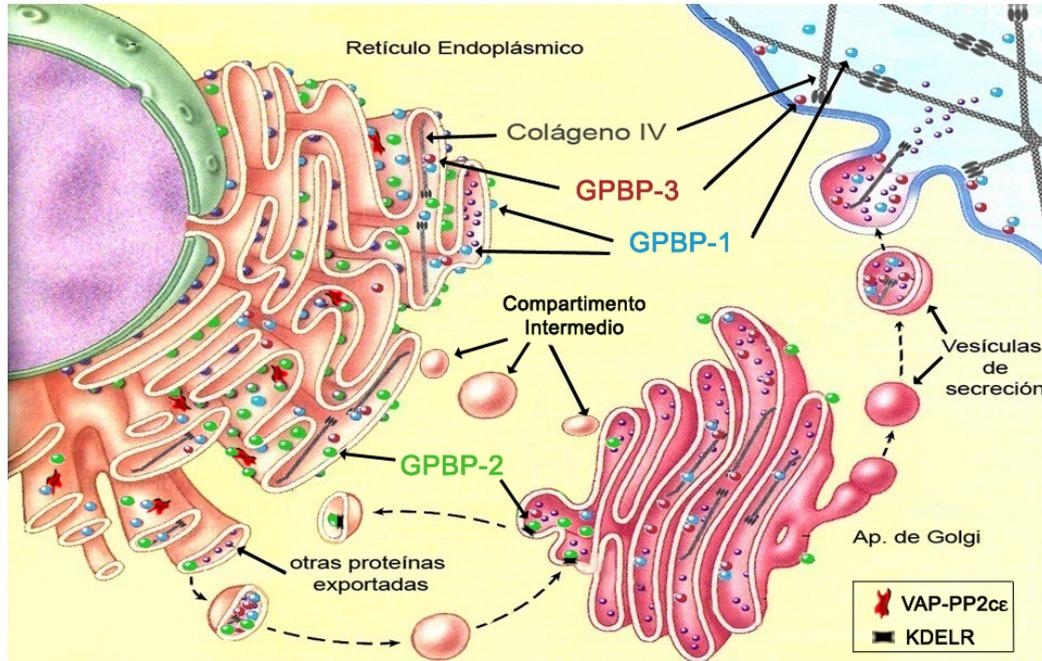


Figura 37. Modelo de la biología celular de las isoformas de GPBP. En la imagen se representa el trasiego de las diferentes isoformas de GPBP a lo largo de la ruta secretora y la interacción con la proteína VAP-PP2cε a través del motivo KDELR.

Finalmente el conjunto de resultados sugieren que **COL4A3BP** podría ser una diana terapéutica y/o un biomarcador en enfermedades mediadas por inmunocomplejos (Revert *et al.* 2007), o por mal-plegamiento de proteínas en el RE (Kanekura *et al.*, 2006, Swanton *et al.*, 2008), en inflamación (Lamour *et al.* 2007) y en quimiorresistencia en cáncer (Swanton *et al.*, 2008). Todo ello sólo es explicable si tenemos en cuenta el carácter ubicuo de la proteína cuya actividad biológica dependerá de dónde se encuentre y de las biomoléculas con las que interactúe.

6 BIBLIOGRAFÍA.

- Abraham, L., y Kierszenbaum, M.D. (2002). "Histology and Cell Biology. An introduction to Pathology": Mosby.
- Agarraberes, F. A., Terlecky, S. R., Dice, J. F. (1997). "An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation". *J. Cell Biol.* **137**: 825-834.
- Aggarwal, B. B., Samantha, A., and Feldmann, M. (2001). TNF α , In Oppenheim, J. J., and Feldmann, M. (Ed). Cytokine reference. A compendium of cytokines and another mediator of host defense. *Academies Press Ltd, London, Vol I*, pp 413-447.
- Alpy, F., and Tomasetto, C. (2005) "Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals" *J. Cell Sci.* **118**: 2791–2801.
- Appenzeller-Herzog, C., and Hans-Peter Hauri, H. (2006) "The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function" *Journal of Cell Science* **119**: 2173-2183.
- Ben-Tekaya, H., Miura, K., Pepperkok, R., Hauri, H. (2004) "Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC" *Journal of Cell Science* **118**: 357-367.
- Bendtsen, D. J., Jensen, J. L., Blom, N., von Heijne, G., Brunak, S. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.* **17**: 349–356.
- Bernal, D., Quinones, S., Saus, J. (1993). "The human encoding the Goodpasture antigen is alternatively spliced". *J. Biol. Chem.* **268**: 12090-12094.

- Boeck, R., Kolakofsky, D. (1994). "Positions +5 and +6 can be major determinants of the efficiency of non-AUG initiation codons for protein synthesis". *Embo J.* **13**: 3608-3617.
- Bona, C. A., Theofilopoulos, A. N. (2002). "The Molecular pathology of autoimmune diseases (2 ed.)" Taylor and Francis.
- Borza, D.B., *et al.* (2000). "The Goodpasture Autoantigen". *J. Biol. Chem.* **275**: 6030.
- Borza, D.B., *et al.* (2002) "Quaternary Organization of the Goodpasture Autoantigen, the α 3(IV) Collagen Chain". *J.Biol. Chem.* **277**: 40075-40083.
- Browning, J.L., Ngam-ek, A., Lawton, P., DeMarinis, J., Tizard, R., Chow, E.P., Hession, C., O'Brine-Greco, B., Foley, S.F., Ware, C.F. (Apr 1993). "Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface". *Cell* **72**: 847–56.
- Calvete, J. J., Revert, F., Blanco, M., Cervera, J., Tárrega, C., Sanz, L., Revert-Ros, F., Granero, F., Pérez-Payá, E., Hudson, B. G., Saus, J. (2006) "Conformational diversity of the Goodpasture antigen, the noncollagenous-1 domain of the α 3 chain of collagen IV". *Proteomics* **6**: S237–S244.
- Chiang, C.K. & Inagi, R. (2010) "Glomerular diseases: genetic causes and future therapeutics" *Nat. Rev. Nephrol.* **6**:539–554.
- Cole, N., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J., Lippincott-Schwartz, J. (1996) "Golgi Dispersal during Microtubule Disruption: Regeneration of Golgi

- Stacks at Peripheral Endoplasmic Reticulum Exit Sites” *Mol. Cell. Biol.* **7**: 631-650.
- Dowler, S., Currie, R. A., Campbell, D. G., Deak, M., Kular, G., Downes, C. P., and Alessi, D. R. (2000) “Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities” *Biochem. J.* **351**: 19–31
 - Ermann, J., Fathman, C. G. (2001) “Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation”. *Nat. Immunol.* **2**: 759-761.
 - Feng, L., Xia, Y., Wilson, C. B. (1994). “Alternative splicing of the NC1 domain of the human alpha 3(IV) collagen gene. Differential expression of ARNm transcripts that predict three protein variants with distinct carboxyl regions”. *J. Biol. Chem.* **269**: 2342-2348.
 - Fugmann, T., Hausser, A., Schöffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K., Olayioye, M. A. (2007). “Regulation of secretory transport by protein kinase D–mediated phosphorylation of the ceramida transfer protein”. *J. Cell Biol.* **178**: 15–22.
 - Galfre, G., y Milstein, C. (1981). “Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures”. *Methods Enzymol* **73**: 3-46.
 - Goodpasture., E. (1919). “The significance of certain pulmonary lesions in relation to the etiology of influenza”. *Am. J. Med. Sci.* **158**: 863.
 - Granero, F., Revert, F., Revert-Ros, F., Laínez, S., Martínez-Martínez, P., Saus, J. (2005) “A human-specific TNF-responsive promoter for Goodpasture antigen-binding protein”. *FEBS J.* **272**: 5291–5305.
 - Granero-Moltó, F., Sarmah, S., O’Rear, L., Spagnoli, A., Abrahamson, D., Saus, J., Hudson, B. G., Knapik, E. W. (2008) “Goodpasture Antigen-

- binding Protein and Its Spliced Variant, Ceramide Transfer Protein, Have Different Functions in the Modulation of Apoptosis during Zebrafish Development". *J. Biol. Chem.* **283**: 20495–20504.
- Gunwar, S., Saus, J., Noelken, M. E., Hudson, B. G. (1990). "Glomerular Basement Membrane". *J. Biol. Chem.* **266**: 5466-5469.
 - Haberern, C. L., Kupchik, H. Z. (1985). "Diversity of adhesion to basement membrane components of human pancreatic adenocarcinomas". *Cancer Res.* **45**: 5246-5251.
 - Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., Nishijima, M., (2003) "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramida". *Nature* **426**: 803–809.
 - Hanada K, Kumagai K, Tomishige N, Yamaji T. (2009) "CERT-mediated trafficking of ceramide". *Biochim. Biophys. Acta.* **1791**: 684–691.
 - Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., Neilson, E. G. (2003). "Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen". *N. Engl. J. Med.* **348**: 2543-2556.
 - Janeway, C., Travers. P. (1997). *Immunobiology: The immune system in health and disease* (3 Ed.). Garland Science.
 - Johansson, C., Hellmark, T., Wieslander, J. (1994). "Anti-type IV collagen antibodies in Goodpasture syndrome". *Contrib. Nephrol.* **107**: 188-193.
 - Kalluri, R., Gattone, V. H., Noelken, M. E., Hudson, B. G. (1994). "The alpha 3 chain of type IV collagen induces autoimmune Goodpasture syndrome" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**: 6201-6205.

- Kanekura, K., Nishimoto, I., Aiso, S., Matsuoka, M. (2006) "Characterization of Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked P56S Mutation of Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein B (VAPB/ALS8)". J. Biol. Chem. **281**: 30223–30233.
- Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., Hanada, K. (2006) "Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT". J. Biol. Chem. **281**: 30279– 288.
- Kumagai, K., Kawano, M., Shinkai-Ouchi, F., Nishijima, M., Hanada, K. (2007) "Interorganelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent cooperativity between the PH and START domains of CERT". J. Biol. Chem. **282**: 17758–17766.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature **227**: 680-685.
- Lamour, N. F., Stahelin, R. V., Wijesinghe, D. S., Maceyka, M., Wang, E., Allegood, J. C., Merrill, A. H. Jr., Cho, W., Chalfant, C. E. (2007) "Ceramide kinase uses ceramide provided by ceramide transport protein: localization to organelles of eicosanoid synthesis". J. Lipid Res. **48**: 1293–1304.
- Lerner, R. A., Glassock, R. J., Dixon, F. J. (1967). "The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis". J. Exp. Med. **126**: 989-1004.
- Levine, T.P., Munro, S. (2002) "Targeting of Golgi-specific *pleckstrin* homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and independent, components". Curr. Biol., **12**: 695-704.

- Lipsky, P. E., (2001) "Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity" *Nat. Immunol.* **2**: 764-766.
- Loewen, C. J. R., Roy, A., Levine, T. P. (2003) "A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP". *EMBO J.* **22**: 2025–2035.
- Michelle D, Borza, D.B., Leinonen, A., Belmont, J.M., Hudson, B.G. (2001). "Hydrophobic Amino Acid Residues Are Critical for the Immunodominant Epitope of the Goodpasture Autoantigen". *J. Biol. Chem.* Vol. **276**: 6370–6377.
- Male, D. K. (1998). *Immunology: an illustrated outline* (3 Ed.) Mosby Elsevier Science.
- McCarthy, J. B., Furcht, L. T. (1984). "Laminin and fibronectin promote the haptotactic migration of B16 mouse melanoma cells in vitro". *J. Cell Biol.* **98**: 1474-1480.
- Maruoka, Y., Harada, H., Mitsuyasu, T., Seta, Y., Kurokawa, H., Kajiyama, M., Toyoshima, K. (1997). "Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**: 886-890.
- Mencarelli, C., Hammers, C., Van Den Boeck, J., Loosen, M., Steinbusch, H., Revert, F., Saus, J., Hopkins, D., De Baets, M., Steinbusch, H., Martinez-Martinez, P. (2009) "The expression of the Goodpasture antigen-binding protein (ceramida transporter) in adult rat brain". *J.Chem. Neuroanat.* **38**: 97–105.

- Nakai, K., Horton, P. (1999). "PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization". *Trends Biochem. Sci.* **24**: 34-36.
- Netzer, K. O., Leinonen, A., Boutaud, A., Borza, D. B., Todd, P., Gunwar, S., Langeveld, J. P., and Hudson, B. G. (1999). "The Goodpasture autoantigen. Mapping the major conformational epitope(s) of alpha3(IV) collagen to residues 17-31 and 127-141 of the NC1 domain". *J. Biol. Chem.* **274**:11267–11274.
- Ni, M., and Lee, A. S. (2007). "ER chaperones in mammalian development and human diseases" *FEBS Lett.* **581**: 3641–3651.
- Paul, W. E. (1999). *Fundamental immunology* (4 Ed.) Lippincott-Raven.
- Peabody, D. S., (1989). "Translation initiation at *non-AUG triplets* in mammalian cells". *J. Biol. Chem.* **264**: 5031-5035.
- Penades, J. R., Bernal, D., Revert, F., Johansson, C., Fresquet, V. J., Cervera, J., Wieslander, J., Quinones, S., Saus, J. (1995). "Characterization and expression of multiple alternatively spliced transcripts of the Goodpasture antigen gene region. Goodpasture antibodies recognize recombinant proteins representing the autoantigen and one of its alternative forms". *Eur. J. Biochem.* **229**: 754-760.
- Perry, R. J., Ridgway, N. D. (2006) "Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein is required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein". *Mol. Biol. Cell* **17**: 2604–2616.

- Presley, F., Nelson B., Cole, N., Schroer, T., Hirschberg, K., Kristien, J., Lippincott-Schwartz., J. (1997) “ER-to-Golgi transport visualized in living cells” *Nature*. **389**: 81-85.
- Pulvirenti, T., Giannotta, M., Capestrano, M., Capitani, M., Pisanu, A., Polishchuk, R.S., San Pietro, E., Beznoussenko, G.V., Mironov, A.A., Turacchio, G., Hsu, V.W., Sallese, M., Luini, A. “A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway”. (2008) *Nat. Cell. Biol.***10**: 912-922.
- Quiñones, S., Bernal, D., Garcia-Sogo, M., Elena, S. F., Saus, J. (1992). “Exon/intron structure of the human alpha 3(IV) gene encompassing the Goodpasture antigen (alpha 3(IV) NC1). Identification of a potentially antigenic region at the triple helix/NC1 domain junction”. *J. Biol. Chem.* **267**: 19780-19784.
- Raya, A., Revert, F., Navarro, S., Saus, J. (1999). “Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human Goodpasture antigen”. *J. Biol. Chem.* **274**: 12642-12649.
- Raya, A., Revert-Ros, F., Martínez-Martínez, P., Navarro, S., Reselló, E., Vieites, B., Granero, F., Forteza, J., Saus, J. (2000). “Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the Goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis”. *J. Biol. Chem.* **275**: 40392-40399.
- Raya, A., Revert, F., Navarro, S., Saus, J. (1999) “Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human Goodpasture antigen”. *J. Biol. Chem.* **274**: 12642–12649.

- Raya, A., Revert-Ros, F., Martínez-Martínez, P., Navarro, S., Roselló, E., Vieites, B., Granero, F., Forteza, J., Saus, J. (2000). “Goodpasture Antigen-binding Protein, the Kinase That Phosphorylates the Goodpasture Antigen, Is an Alternatively Spliced Variant Implicated in Autoimmune Pathogenesis”. *J. Biol. Chem.* **275**: 40392–40399.
- Raykhel, I., Alanen, H., Salo, K., Jurvansuu, J., Nguyen, V.D., Latva-Ranta, M., Ruddock, L. (2007). “A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors”. *J. Cell Biol.* **179**: 1193–1204.
- Revert, F., Penades, J. R., Plana, M., Bernal, D., Johansson, C. E. Itarte, C., Cervera, J., Wieslander, J., Quinones, S., Saus, J. (1995). “Phosphorylation of the Goodpasture antigen by type A protein kinase”. *J. Biol. Chem.* **270**: 13254-13261.
- Revert, F., Merino, R., Monteagudo, C., Macías, J., Peydró, A., Alcacer, J., Muniesa, P., Marquina, R., Blanco, M., Iglesias, M., Revert-Ros, F., Merino, J., Saus, J. (2007) “Increased Goodpasture Antigen-Binding Protein Expression Induces Type IV Collagen Disorganization and Deposit of Immunoglobulin A in Glomerular Basement Membrane”. *Am. J. Pathol.* **171**: 1419–1430.
- Revert, F., Penadés, J. R., Plana, M., Bernal, D., Johansson, C., Itarte, E., Cervera, J., Wieslander, J., Quinones, S., Saus, J. (1995) “Phosphorylation of the Goodpasture antigen by type A protein kinase”. *J. Biol. Chem.* **270**: 13254–13261.
- Revert, F., Ventura, I., Martinez-Martinez, P., Granero, F., Revert-Ros, F., Macias, J., Saus, J., (2008) “Goodpasture Antigen-binding Protein Is

- a Soluble Exportable Protein That Interacts with Type IV Collagen” *J. Biol. Chem.* **283**: 30246–30255.
- Revert-Ros, F., López-Pascual, E., Granero-Moltó, F., Macias, J., Breyer, R., Zent, R., Hudson, B.G., Saadeddin, A., Revert, F., Blasco, R., Navarro, C., Burks, D., Saus, J. (2011) “Goodpasture Antigen-binding Protein (GPBP) Directs Myofibril Formation” *J. Biol. Chem.* **286**: 35030–35043.
 - Roitt, I. M. (1994). *Essential immunology* (8 Ed.). Oxford. Blackwell Scientific Publications.
 - Rual, J. F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G. F., Gibbons, F. D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D. S., Zhang, L. V., Wong, S. L., Franklin, G., Li, S., Albala, J. S., Lim, J., Fraughton, C., Llamasas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R. S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H. Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M. E., Hill, D. E., Roth, F. P., Vidal, M. (2005) “Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network”. *Nature* **437**: 1173–1178.
 - Saus, J. (2000). “Goodpasture antigen binding protein” EEUU PCT/IB00/00324 y WO 00/50607, 24.2.1999. 60/121,483
 - Saus, J. (2001). “TNF-inducible promoters and methods for using” EEUU, PCT/EP 01/14412, WO 02/46433, 8.12.2000. 60/254,649
 - Saus, J. (2002). “Methods and reagents for treating autoimmune disorders” EEUU, PCT/EP02/01010 and WO 02/061430, 31-1-2001. 60/265,249.

- Saus, J., Wieslander, J., Langeveld, J. P., Quinones, S., Hudson, B. G. (1988). "Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV". *J. Biol. Chem.* **263**: 13374-13380.
- Saus, J. (1998) in *Goodpasture's Syndrome: Encyclopedia of Immunology* 2nd Ed. vol. 2, eds. Delves, P.J., Roitt, I.M., (Academic Press Ltd., London), pp. 1005-1011.
- Scheer, R., Grossman, M. (1964). "Immune aspects of the glomerulonephritis associated with pulmonary hemorrhage". *Ann. Int. Med.* **60**: 1009.
- Soccio, R. E., Breslow, J. L. (2003). "StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism". *J. Biol. Chem.* **278**: 22183–22186.
- Shlomchik, M. J., Marshak-Rothstein, A., Wolfowicz, C. B., Rothstein, T. L. Weigert, M. G. (1987). "The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity". *Nature* **328**: 805-811.
- Stanton, M. C., Tange, J. D., (1958). "Goodpasture's syndrome (pulmonary hemorrhage associated with glomerulonephritis)" *Austral Ann. Med.* **7**: 132-144.
- Szul, T y Sztul, E. (2011). "COPII and COPI Traffic at the ER-Golgi Interface" *physiol.* **26**: 348–364.
- Swanton, C., Marani, M., Pardo, O., Warne, P. H., Kelly, G., Sahai, E., Elustondo, F., Chang, J., Temple, J., Ahmed, A. A., Brenton, J. D., Downward, J., Nicke, B. (2008) "Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs". *Cancer Cell* **11**: 498–512.

- Thiomir, M., Gibbs, P., Revert, F., Saus, J., Maines, M. (2010) "Human biliverdin reductase suppresses Goodpasture antigen-binding protein (GPBP) kinase activity: the reductase regulates tumor necrosis factor- α -NF- κ B-dependent GPBP expression" *J.Biol.Chem.* **285**: 12551–12558,
- Timpl, R., H. Wiedemann, V. van Delden, H. Furthmayr, Kuhn, K. (1981). "A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes". *Eur. J. Biochem.* **120**: 203-211.
- Tomoo, O., Lehmann, AR. (2006). "The Y-family DNA polymerase κ ($\text{pol } \kappa$) functions in mammalian nucleotide-excision repair" *Nat. Cell Biol.* **8**: 640-642.
- Touriol, C., Bornes, S., Bonnal, S., Audigier, S., Prats, H., Prats, A. C., Vagner, S. (2003) "Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons". *Biol. Cell.* **95**: 169–178.
- Tsilibary, E. C., Charonis, A. S. (1986). "The role of the main noncollagenous domain (NC1) in type IV collagen self-assembly". *J. Cell Biol.* **103**: 2467-2473.
- Tsujishita, Y., Hurley, J. H. (2000). "Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain". *Nat. Struct. Biol.* **7**: 408-414.
- Utz, P.J., Anderson, P., (1998). "Posttranslational protein modifications, apoptosis, and the bypass of tolerance to auto-antigens". *Arthritis Rheum.* **41**: 1152 – 1160.
- Vanacore, R., Ham, A-J., Vohler, M., Sanders, C., Conrads, T., Veenstra, T.D., Sharpless, K., Dawson, P., Hudson, B.G. (2009). "A Sulfilimine Bond Identified in Collagen IV". *Science* **325**: 1230–1234.

- Wieslander, J., Barr, J. F., Butkowski, R. J., Edwards, S. J., Bygren, P. Heinegard, D., Hudson, B. G. (1984a). "Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: localization to noncollagenous regions of type IV collagen". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **81**: 3838-3842.
- Wieslander, J., Bygren, P., Heinegard, D. (1984b). "Isolation of the specific glomerular basement membrane antigen involved in Goodpasture syndrome". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **81**: 1544-1548.
- Wyles, J. P., McMaster, C. R., Ridgway, N. D. (2002) "Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein-A (VAP-A) Interacts with the Oxysterol-binding Protein to Modify Export from the Endoplasmic Reticulum". *J. Biol. Chem.* **277**: 29908–29918.
- Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Xiao, M., Zhou, Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M., Fischer, G., Cantley, L., Lu, K.P. (1997) "Sequence-Specific and Phosphorylation-Dependent Proline Isomerization: A Potential Mitotic Regulatory Mechanism" *Science*. **278**: 1957-1960.
- Yang, Y., Li, Z. (2005) "Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function?" *Mol. Cell Biol.* **20**: 173–182.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. (2001) "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor". *Cell* **107**: 881–891.
- Yurchenco, P. D., Ruben, G. C., (1987). "Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network". *J. Cell Biol.* **105**: 2559-2568.

7 ABREVIATURAS

ATP: adenosina 5'-trifosfato.

RTA: región traducida de forma alternativa.

°C: grado Celsius

ADNc: ADN copia

C terminal: carboxi-terminal

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco's.

DMEM F12: medio Eagle modificado por *Dulbecco* con suplemento F12.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

F(ab)₂: "Fragment antigen-binding".

FBS/SBF: suero bovino fetal.

FFAT: "*Phenlalanine Phenlalanine in an Acidic Tract*" dos fenilalaninas contiguas dentro de una región ácida.

FPLC: "*Fast protein liquid chromatography*" Cromatografía rápida en fase líquida para proteínas.

GAPDH: gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.

GP: antígeno Goodpasture.

GPBP: "Goodpasture-antigen binding protein".

h: horas.

HEK 293: "Human Embryonic Kidney 293 cells".

HSP: "*heat shock protein*". Proteína de choque térmico.

kDa: kilodaltons.

M: Molar.

MBG: Membrana Basal Glomerular.

mAb: anticuerpo monoclonal.

mm: milímetros.

ARNm: ARN mensajero.

NC1: dominio no colagenoso 1.

N-terminal: amino terminal.

ON: oligonucleótido.

ORF: "Open Reading *Frame*" o pauta abierta de lectura.

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.

pb: pares de bases.

PBS: tampón fosfato salino.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PH: homología de *pleckstrina*.

PKA: proteína cinasa dependiente de AMPc.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PSer: fosfoserina.

PThr: fosfotreonina.

PTyr: fosfotirosina.

rGPBP: GPBP recombinante.

ARN: ácido ribonucleico.

RT-PCR: retrotranscripción acoplada a PCR

SDS: sodio dodecil sulfato

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

START: "*steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer*".

TBST: "*Tris-Buffered Saline Tween-20*".

TNF: factor de necrosis tumoral

Tris: Tris-hidroximetil-aminometano

UTR: Región no traducida (Untranslated Region)

U: unidades

x g: fuerza centrífuga relativa.

8 AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en el desarrollo de esta tesis:

A Juan Saus por haberme ofrecido la oportunidad de realizar la tesis bajo su dirección. Agradecerle su ayuda y comprensión en los momentos difíciles personales y profesionales.

A Fernando Revert porque él me ha dedicado todo el tiempo del que disponía enseñándome de forma desinteresada todos los conocimientos científicos que poseo. Y como no, también a Paco Revert por el tiempo dedicado a mi formación científica y humana.

A todos mis compañeros del laboratorio:

Filo, Zahara, Andreu, Natalia, Eva e Irene, por su valiosa asistencia técnica. Agradecerles también a mis compañeros predoctorales, Mario, Ernesto, Jesús, Carlos, Sergio, Annas y a todas las nuevas incorporaciones, las horas que hemos pasado juntos trabajando, así como a los compañeros de Fibrostatin.

También quiero agradecer a toda la gente del Instituto de Investigaciones Citológicas su colaboración. Agradecer a la Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas la oportunidad que me brindó al otorgarme una Beca de Formación como Técnico Superior de investigación y posteriormente al centro de investigación Príncipe Felipe que finalmente me concedió el contrato de colaboración para finalizar mis estudios de doctorado.

Agradecer a mi esposa Marinela la comprensión y paciencia que ha tenido durante todos los momentos difíciles por los que hemos pasado, sus sabios consejos y amor incondicional. En ella he tenido todo el apoyo y aliento necesarios para el día a día. A mis padres Miguel y Regina porque ellos han sido los que me han permitido llegar hasta aquí. Enseñándome desde pequeño que la perseverancia, la voluntad y el sacrificio son las cualidades más importantes en el ser humano. Sobretudo dedicarle a mi padre la tesis doctoral porque en él he tenido el modelo a seguir durante toda mi vida.

Manuel aunque tú no sepas leer todavía, algún día lo harás, y podrás leer esto. Gracias por alegrarme la vida y darme impulso para seguir adelante.