

Tesis Doctoral

Estudio de la endocitosis y señalización mitogénica y metabólica de las dos variantes de splicing del receptor de insulina

Giudice, Jimena

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Giudice, Jimena. (2011). Estudio de la endocitosis y señalización mitogénica y metabólica de las dos variantes de splicing del receptor de insulina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Giudice, Jimena. "Estudio de la endocitosis y señalización mitogénica y metabólica de las dos variantes de splicing del receptor de insulina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

*ESTUDIO DE LA ENDOCITOSIS Y SEÑALIZACIÓN
MITOGÉNICA Y METABÓLICA DE LAS DOS
VARIANTES DE SPLICING DEL RECEPTOR DE
INSULINA*

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Jimena Giudice

Directores de Tesis: **Dra. Elizabeth Jares-Erijman**

 Dr. Federico Coluccio Leskow

Consejera de Estudios: **Dra. Silvia Moreno de Colonna**

Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR).
CONICET. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2011

Enmienda Tesis Doctoral Jimena Giudice

La presente tesis posee un error debido a no haber secuenciado la totalidad de los insertos en los plásmidos generados por técnicas de biología molecular. Por lo tanto siempre trabajé, sin saberlo, con la isoforma B del receptor de insulina (IR). Al notar este error con posterioridad a la defensa de mi tesis, reanalicé todos los datos considerando que siempre había trabajado con el IR-B. Como producto de este re-análisis se publicaron tres manuscritos:

a) Giudice J, Jares-Erijman EA, Leskow FC. Endocytosis and intracellular dissociation rates of human insulin-insulin receptor complexes by quantum dots in living cells. *Bioconjugate Chemistry*, 2013; **24** (3): 431-442.

b) Giudice J, Jares-Erijman EA, Leskow FC. Insulin receptor membrane retention by a traceable chimeric mutant. *Cell Communication and Signaling*, 2013; **11**(1): 45.

c) Giudice J, Barcos LS, Guaimas FF, Penas-Steinhardt A, Giordano L, Jares-Erijman EA, Leskow FC. Insulin and insulin like growth factor II endocytosis and signaling via insulin receptor B. *Cell Communication and Signaling*, 2013; **11** (1): 18. De esta publicación, resultado de mi escritura a partir del re-análisis que hice del trabajo de Tesis Doctoral, corresponden directamente a mi tesis las figuras 1 a 6 y los archivos suplementarios 2 a 7.

Asimismo, como consecuencia del error detectado en los plásmidos se retractó el trabajo publicado en *Journal of Cell Science* mediante la nota publicada en *J Cell Sci.* 2012 Jun 1; 125 (Pt 11): 2786: "The authors wish to retract this paper after it has come to their attention that the constructs of insulin receptor (IR) isoform A were of isoform B. This was discovered when the constructs were subcloned into retroviral vectors to be used in a different study. Thus the significant differences reported between IR-A and IR-B must be assumed to be erroneous and, in agreement with the *Journal of Cell Science* editorial policies, the paper must be retracted. A detailed comparison between certified IR-A and IR-B is being conducted and will be reported". Traducida la misma asegura lo siguiente: "Los autores deseamos retractar este manuscrito dado que hemos notado que los plásmidos conteniendo la isoforma A del receptor de inulina (IR) eran la isoforma B. Esto ha sido descubierto cuando las construcciones fueron subclonadas en vectores retrovirales utilizados en un estudio diferente. Por lo tanto, las diferencias significativas reportadas entre IR-A e IR-B debemos asumir son erróneas y, de acuerdo a las políticas editoriales de *Journal of Cell Science*, el manuscrito debe ser retractado. Una comparación detallada entre IR-A e IR-B certificados se está llevando a cabo y será informada".

Jimena Giudice, 24/12/2013

Estudio de la endocitosis y señalización mitogénica y metabólica de las dos variantes de splicing del receptor de insulina

La señalización por insulina comprende una compleja cascada de eventos que llevan a la regulación del metabolismo de la glucosa y al crecimiento celular. Fallas en la respuesta a insulina conducen a diabetes mientras que en ciertos tipos de cáncer se encontraron aumentos en la actividad de esta vía de señalización. En mamíferos el gen del receptor de insulina (IR) adquirió un exón adicional junto con la capacidad de procesarlo alternativamente originando dos isoformas, IR-A e IR-B. En esta tesis se presenta el desarrollo de herramientas que permitieron visualizar procesos celulares *in vivo* por técnicas de microscopía. Esto permitió estudiar la endocitosis de las dos isoformas del IR en células individuales en respuesta a insulina y al factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II). Una mayor internalización para el IR-A que para el IR-B en respuesta a ambos ligandos fue demostrada. Esto condujo a estudiar la señalización río abajo del receptor observando que la insulina desencadena una cascada mitogénica a través del IR-A y una predominantemente metabólica a través del IR-B. Cuando el estudio se extendió al IGF-II, pudo mostrarse que un mismo receptor sea mitogénico (IR-A) o metabólico (IR-B) se comporta diferente en respuesta a un ligando mitogénico (IGF-II) o metabólico (insulina). La existencia de los híbridos IR-A/IR-B en la membrana fue estudiada generando una quimera del IR capaz de ser modificada extracelularmente y que actúa como dominante negativo selectivo del efecto mitogénico. Esto permitió detectar los dímeros en membrana, analizar su formación y estudiar la señalización diferencial de cada isoforma. Por microscopía de fuerza atómica se midió la interacción molecular entre la insulina y cada IR mostrando que la misma es mayor para el IR-A. Se propone a la dinámica de internalización como el mecanismo responsable de la señalización diferencial de las dos isoformas del IR en respuesta a un mismo ligando. Se plantea un modelo de activación diferencial donde el IR-A se activa más y de forma más sostenida internalizándose más rápido, activando así la vía mitogénica desde los endosomas. Por otro lado, la isoforma B se internaliza de forma más lenta, permitiendo mayor señalización desde la membrana, reclutando moléculas efectoras de esta vía, gatillando la fosforilación de Akt, regulando la actividad de enzimas metabólicas.

Palabras claves: Insulina, Receptor de insulina, Isoformas, Endocitosis, Señalización metabólica, Señalización mitogénica, Microscopía confocal, Quantum dots, Microscopía de fuerza atómica.

Study of the endocytosis and metabolic and mitogenic signaling of the insulin receptor splice variants

Insulin signalling comprises a complex cascade of events playing a key role in the regulation of glucose metabolism and cellular growth. Failures in its function lead to diabetes and dysregulations of these pathways were described in many cancer types. In mammals, the insulin receptor (IR) gene acquired an additional exon together with the ability to alternatively skip it in a developmental and tissue-specific manner leading to two isoforms, IR-A and IR-B. This thesis presents the design and development of different tools which allow the visualization of cellular processes *in vivo* by microscopy. This strategy allowed the study of endocytosis in individual cells after insulin and insulin like growth factor II (IGF-II) binding. The quantitative study revealed a higher rate of endocytosis of IR-A than IR-B induced by both ligands. These differences led to study the downstream signaling. It was possible to demonstrate that insulin triggers a mitogenic cascade via IR-A and a more metabolic signaling through IR-B. The study of IGF-II showed that each receptor behaves differently upon activation by a mitogenic ligand (IGF-II) or a metabolic one (insulin). The existence of IR-A/IR-B hybrids in the plasma membrane was studied in this thesis by the generation of an IR chimera that could be modified at the cell surface. This chimera showed behaviour of a selective dominant negative of the mitogenic effect. It was possible to detect the dimers in the plasma membrane, analyze their formation and study the isoform differential signaling. Atomic force microscopy was used to measure the molecular interaction between each IR and insulin. Single molecule force spectroscopy showed that interaction of insulin with IR-A is stronger than with IR-B. This thesis proposes the internalization dynamics as a responsible mechanism for the differential signaling of IR isoforms. By this model, IR-A gets activated and internalized faster triggering mitogenic cascade from the endosomes. On the other hand, IR-B is internalized in a slower manner allowing a higher signaling from the membrane, recruiting effector molecules, triggering Akt phosphorylation, regulating metabolic enzymes and GLUT4 translocation to the plasma membrane.

Keywords: Insulin, Insulin receptor, Isoforms, Endocytosis, Metabolic signaling, Mitogenic signaling, Confocal microscopy, Quantum dots, Atomic force spectroscopy.

Esta parte de la tesis es la última que escribí pero, fiel a su lugar, ocupa las primeras páginas de la misma. Quizás porque fueron las que primero se “escribieron” en la realidad y dentro mío aunque hayan sido las últimas en plasmarse en el papel y las palabras. Fueron las que se escribieron cada día, en cada encuentro, en cada diálogo, en cada alegría, en cada dificultad y en cada oportunidad de aprender.

Quiero recordar y agradecer en estas páginas a las personas que me han mostrado que lo esencial no se ve con los ojos. Ustedes me enseñaron a intentar siempre mirar más allá de lo que simplemente veo. Gracias por enseñarme esto que ha sido y será fundamental y esencial para mí. Gracias por acompañarme con su cariño y paciencia, por haber sabido estar cerca con la generosidad de los que quieren lo mejor para uno, y con la capacidad de comprender y perdonar mis errores e inexperiencia. Gracias por mostrarme que lo más importante es siempre la verdad, que los errores así se pueden solucionar. De todo corazón, muchas gracias. Todo lo que aprendí de ustedes será siempre esencial para mí.

Quiero comenzar agradeciendo a este país que me dio todo, me permitió crecer y aprender. Quiero agradecer la educación que he recibido y en este lugar debo reconocer que más de la mitad de mi vida ha transcurrido en aulas y espacios de la Universidad de Buenos Aires. Al principio, por elección de mis padres en el colegio (y miren que lo pongo con minúscula... aunque ya sé que harán sus comentarios)... yo dentro mío se bien cuánto valoro lo aprendido allí. Luego, por propia elección, he recibido dentro de la UBA una educación que me ha permitido pensar en libertad, hacer preguntas, ser capaz de que las cosas no me cierren y así ponerme en movimiento para encontrar respuestas que cierren mejor o me abran a nuevas preguntas. En este aspecto agradezco a los que han sabido guiar este aprendizaje sin asustarse de mis tantas preguntas. Gracias por enseñarme a no asustarme yo, sino al contrario, mostrarme todo su valor. Y tan importante como lo formal ha sido el ámbito donde he crecido entre personas parecidas y diferentes a mí. Quizás, es en este aspecto donde más he aprendido que lo esencial no se ve y siempre es un punto de encuentro y respeto primordial. En particular, quiero decirle gracias a esta Facultad de Ciencias Exactas y Naturales que me brindó una formación académica de alta calidad. Ha sido el espacio donde aprendí y descubrí que disfruto en lo que me pregunto y al principio no entiendo. Aquí muchas personas me han mostrado lo importante de buscar lo noble y lo verdadero. Gracias especiales a Guillermo Boido, Lydia Galagovsky y María Laura Eder. Quiero decirles gracias a las dos primeras personas que me han ayudado: Lelia Di Celio y Ceci Bonazzola. Gracias, son muy importantes.

En esta etapa que originó la tesis quiero agradecer a Eli Jares por brindarme la posibilidad de llevar adelante este trabajo en su grupo de investigación. Gracias por la oportunidad de comenzar esta línea de insulina dentro del laboratorio que me ha permitido desarrollar mi creatividad y crecer. Gracias por enseñarme a buscar siempre la manera de ser precisa y rigurosa en los resultados, y a valorar cada etapa de un experimento desde la preparación leyendo la bibliografía hasta su cuantificación al final y la manera de describirlo e interpretarlo. Gracias por haberme permitido ir buscando y proponer los experimentos apoyándome, creyendo en mis ideas y esperando mis tiempos de tener los resultados, y alegrarte con los logros. Gracias.

También deseo agradecerle a Fede Coluccio Leskow por su ayuda. Gracias por lo que me enseñaste de biología. Gracias por cada vez que pudimos pensar experimentos juntos, discutir los resultados, planear y escribir. Gracias por cada corrección y la paciencia de corregirme y ayudarme a repensar una y mil veces las cosas que escribí. Gracias por animarme a ver siempre el valor de mis logros y por empujarme a estar segura de mí misma. Gracias también por las veces que en las diferencias supimos buscar la manera de rescatar el proyecto común y sacarlo adelante. Gracias por mostrarme que esa etapa de comenzar una línea de investigación y un grupo de trabajo es linda si nos apasiona lo que hacemos.

Quiero agradecer al CIHIDECAR y al CM1 porque han sido mi lugar de trabajo durante estos años y a CONICET por haberme otorgado una Beca Tipo I que permitió dedicarme de

manera exclusiva a mi tesis. Gracias a las instituciones que con becas me brindado la posibilidad de participar en cursos y congresos dentro y fuera del país. Han sido oportunidades de crecimiento e intercambio con investigadores de primer nivel que han enriquecido mi formación académica y humana. Gracias a EMBO, al ICGB, a DAAD, a GRC, a Carl Storm Internacional Diversity Fellowship y a SISTAM; y a las personas que han sido puente.

Deseo decirle gracias a Tom Jovin por su dirección durante mi estadía en su laboratorio en el Instituto Max Planck de Química Biofísica en Goettingen. Siempre me acompañará la formación que he recibido esos 5 meses allí, así como las oportunidades en las discutimos resultados y experimentos en Buenos Aires. Me enseñaste muchas cosas, quizás, la que más valoro es la vez que me dijiste *“siempre que hagas un experimento lo tenés que hacer como para un paper”*. Eso me mostró un marco de cómo trabajar.

Dear Donna, thanks a lot for all your help. I learned a lot from you, about cell biology, microscopy and how to design experiments and to interpret them. I will always remember the opportunities you gave me in your office to discuss experiments, results, images and ideas. Thanks specially for your words: *“you should have self confidence”*. Thanks.

Gracias a Lía Pietrasanta, codirectora de mi beca, porque aprendí mucho trabajando en el CMA con vos y Cata. Fueron oportunidades de crecer en la interdisciplinariedad y en el trabajo en conjunto. Gracias por acompañarme en la búsqueda de la etapa siguiente, por preguntarme siempre cómo iban las decisiones, por interesarte.

Quiero agradecer al Departamento de Química Biológica por recibirme como estudiante de doctorado. Siempre me he sentido “en casa” y es una alegría que mi tesis esté en este departamento ahora.

Durante estos años he compartido el trabajo de todos los días con muchos que son parte de las personas que agradezco. Gracias Jime, Fede Fuentes, Sebas, María Etcheon, Flor, Jorge, Lautaro, Martín, Soledad, Jéscica, Jonathan, Valeria, Carla, María. Fran ha sido lindo para mí que comenzarás tu primera experiencia de laboratorio conmigo y verte contento hoy. Lucía, he disfrutado pasándote toda esta línea para que la puedas seguir, toda la suerte del mundo. Guille, miles de gracias, por cada ayuda con el AKTA y la química.... Pero por sobre todo, gracias por tu modo simple de ser. Marce y Pau, muchas gracias por ser ambas tan buenas. Gracias Cata por el tiempo haciendo experimentos juntas, ha sido lindísimo para mí. Querida Doris, fuiste mi JTP en FQ, ahora nos tocó ser compañeras y eso nos fue haciendo amigas. Gracias por tu amistad. Querida Juli!!! Gracias, gracias. Comenzaste enseñándome el *abc* del microscopio cuando le tenía pánico, en el medio me mostraste (quizás sin darte cuenta) la manera de hacer experimentos con solidez y consistencia. Gracias por cada almuerzo, cada merienda juntas! Gracias por tu amistad y cariño; de mi parte sabés que tenés lo mismo. Quiero agradecer a los otros grupos del CM1, por hacer de cada día un día agradable, por ayudarnos mutuamente. Gracias por cada sonrisa y por cada “buen día”. Gracias Pao, Belén, Mechi, Cristian, Javi, Pao B, Nati, Luciana, Mariano, Fernanda, Gisela, Alejandro, Sabri, Charly, Noe, Vicky, Diego, Geraldine, Andrés, Angie, Dai. Gracias Sol por cada mano brindada.

Gracias Matías Blaustein por enseñarme todo para hacer los Western de Akt! Aprendí mucho y sobre todo por tu predisposición para enseñarme, muchas gracias. Gracias a vos, Flor Zalazar, porque el día a día nos hizo amigas. Gracias por haber estado siempre, por tu apoyo y cariño. Un gracias muy especial es para vos, Betina, gracias por estar siempre con una sonrisa y un recibimiento lindo cada mañana. Gracias por ayudarme siempre. Guille Noriega, gracias por haber estado cerca en el transcurso de los años y en las distintas etapas. Quiero agradecer también a dos personas a las que siempre pude recurrir y pedirles ayuda: Martín Monte y Adriana Di Siervi. Y a Omar Coso por las oportunidades para discutir experimentos: gracias. Gracias a las personas con quienes he compartido en Alemania, thanks Wouter, Anthony, Peter, Achim, Caludio, Atul, Ana, Veronika, Dimma and Michelle.

Quiero agradecerles a Mercedes Goin, Florencia Trejo, Fede Carrizo y Diego de Laboratorios Beta por haberme ayudado al comienzo con la insulina. Gracias por cada reunión y cada oportunidad de discutir ideas.

Quiero agradecer a las personas que han sido parte de los primeros pasos que he dado en investigación. Gracias María Victoria por esos años que trabajamos juntas, gracias porque me enseñaste a trabajar en la mesada y eso me va a acompañar siempre. Te quiero mucho. Querida Marina Romanato, tenés un lugar especial porque con vos entré por primera vez a un flujo, di vueltas detrás tuyo en el IByME. Tu pasión por lo que hacés me encantó

Han sido tres años y un poquito más donde además de los experimentos he pasado muchas horas en ayudantías. Tuve la oportunidad de dar clase en muchas materias y departamentos y he confirmado que me apasiona enseñar y que aprendo más de lo que enseño. Gracias a Qca Biológica, Qca Orgánica, Qca Inorgánica y al FBMC. Gracias a las personas con quienes he compartido las clases. Gracias en particular a Horacio Corti, José Hodak y Galo Soler porque aprendí al lado de ustedes y por toda su confianza y ayuda.

Si bien, fueron tres años de ausencia en las aulas del secundario... y las extrañé, he agradecido cuánto he recibido de mis alumnos del jardín, la primaria y de las clases de química en el secundario. Es muy gratificante saber de varios de ustedes, verlos contentos, siendo buenas personas y creciendo. En especial, gracias a Martín, Norberto, Fede, Vicky, Ignacio. Verlos me hace feliz. Gracias también a las personas que han confiado en mí en el cole: gracias Alejandro Mazzoni, Mirta, María Butti, Adela, Carina, Liliana, Marta y Mariel. El principio del doctorado ha sido parte aquí y parte despidiéndome de allí. He sido muy feliz entre ustedes.

Un lugar importante ha tenido alguien que la vida y él me han regalado conocer. Querido Tito Baralle, ¿cómo agradecerte esas horas en Trieste y aquí hablando de lo que me apasiona y ver que es parecido a lo que a vos te ha puesto en movimiento siempre? He aprendido mucho de la interacción contigo. Tito, como me ocurre con Silvia Moreno, siento que parte de mi modo de proceder y encarar las decisiones en este ámbito es algo en lo que sorprendentemente ustedes dos me ayudaron a crecer, aunque no entienda mucho cómo. Siempre me dijiste que tuviera la mente abierta. Esa es la generosidad que me han mostrado

ambos y por la que les estaré por siempre agradecida. Como me dijiste emprendo esta nueva etapa con la mente abierta, vos sabés mi sueño para el futuro.

Casi entro en esa parte de la gratitud a mis seres más queridos, mi familia y amigos entrañables que son como mi familia. Pero hay tres personas que se encuentran en la transición. Juan Carlos Calvo, Silvia Rossi y Silvia Moreno. Tres personas que admiro y quiero mucho. Sil Rossi, gracias por tu aprecio, tu verme especial y transmitirme toda esa pasión y alegría por lo que hacés. Te admiro por eso. Gracias, te quiero mucho. Juan Carlos, ¡cuánto me acompañaste! Pero, sobre todo, me encontré con una persona buena, correcta y que disfruta cada cosa que hace. Siempre me animaste a actuar así. Tu pasión por dar clase me admira, ojalá yo aprenda a ser así. Esa dedicación y bondad son la base de toda mi confianza y cariño por vos. Gracias por cada consejo, por cada orientación, por cada palabra de confianza desde casi la primer materia de la carrera!. Tu laboratorio fue donde conocí cómo se hacían experimentos y me di cuenta que es lo que me gusta. Y querida Sil! Como decirte algo que ya no te haya dicho. Admiro tu manera de vivir centrada, dándole a cada cosa el lugar que debe tener. Gracias por tu ternura y a la vez fortaleza conmigo. Gracias por cada vez que me dijiste que tenés toda la confianza puesta en mí. Gracias por tu ayuda para la próxima etapa. Gracias por haber tenido siempre tiempo para recibirme, por aconsejarme con coherencia y también marcarme mis errores. Y a la vez, nunca dejaste de hacerme sentir todo tu cariño y calidez. Te quiero mucho. Aprovecho además para agradecerles el lindo grupo que tienen que siempre han sido buenos conmigo.

Y bueno, llego a esas personas que son incondicionales en mi vida y que, como no podía ser de otro modo, lo han sido durante estos años. Son las personas que me han enseñado que lo esencial no se ve con los ojos, se ve de otras maneras, más hondas y nobles. Nunca podré dejar de agradecerles a ustedes que con su amistad me hacen la persona que soy: gracias Pato Araujo, María Gracia, Vir y Ale, Adela, Flor Ferrero y Flor Colombo, Carina y Ale, Lau y Mariano, Juli Granata, Marina, Sofi Delorme, Lili, Yani, Jose, Gaby, Sofi Salas, Fernando, Santi Larralde, Juan Medrano, Georgi. Querida Cami, sos mucho más que una amiga, sos como mi hermana, gracias por estar siempre, gracias por acompañarnos y vivir tantas cosas juntas ayudándonos y estando cerca cuando nos necesitamos. Gracias por poder compartir las alegrías más lindas, así como esas tristezas inexplicables de la vida. Gracias por compartir los silencios y la belleza. Querido Diego Fares, gracias por haberme acompañado en momentos lindos y otros difíciles. Gracias por tu ternura y fortaleza conmigo.

Gracias a los chicos, Lalo, Eze, Lucas y Maqui. Los quiero, son como a mis hermanos y creo que siempre será así. Gracias Lucho, Yoly y Richy por ser personas a quienes siempre podemos recurrir. Gracias Abue por sacar lo más lindo de todos. Te quiero! Gracias porque me enseñás que lo importante en la vida es ser buena. Carola, sos muy importante. Gracias por ser mi hermana, por crecer juntas durante estos 15 años. Te quiero mucho. Querido Dam, Gracias por este tiempo de ser parte de la familia. Sos una gran persona.

Paty, sos la persona que querré toda mi vida, siempre estaré pendiente de que estés bien. Soy feliz viéndote feliz, y sufro cuando te veo llorar como si las cosas me pasaran a mí. Siempre será así, me hace feliz que sea así. Sos la persona que amé desde que nació. Y ahora tenés a mi sobri dentro, te quiero x 2. Igual cuando nazca te seguiré queriendo x2.

Y mis padres, ellos me dieron lo más lindo y más valioso: la vida. La han cuidado, la han defendido siempre. Me han mostrado con su vida lo importante, lo noble, lo justo, lo verdadero. Gracias, Pá por tu amor por nuestro país, nuestra gente de los diferentes lugares de este país tan grande y lindo. Gracias por tu fortaleza, tu capacidad de ponerte de pie siempre con grandeza. Gracias por enseñarme a que de todo se sale, de todo se aprende, de todo hay que ponerse de pie y caminar. Te quiero mucho. Y Má, sos la persona más tierna que conozco. Gracias por TODO. Gracias por ser esa persona que me mostró siempre el valor de la libertad y la verdad a cualquier precio. Incluso esa libertad que me condujo a decisiones que no te gustaron pero que acompañaste porque *“vos me enseñaste a ser libre”*... como siempre te acordás que te dije una vez (yo también me acuerdo). Gracias por enseñarme que lo más importante es siempre la verdad y el respeto por la verdad del otro. Gracias porque sos para mí un ejemplo y siempre lo serás. Te quiero mucho.

Gracias a todos porque lo esencial lo descubro en ustedes.

A mi familia y mis amigos

I- INTRODUCCIÓN	1
<i>I.1. Estructura del IR y su señalización</i>	4
<i>I.1.1. Estructura del gen Ir</i>	4
<i>I.1.2. Evolución de las dos isoformas del IR en vertebrados</i>	4
<i>I.1.3. Filogenia del Ir</i>	6
<i>I.1.4. Expresión del IR</i>	8
<i>I.1.5. Estructura del IR y unión de insulina</i>	9
<i>I.1.6. Activación del IR</i>	13
<i>I.1.7. Señalización del IR</i>	14
<i>I.1.8. Modulación de la actividad del IR</i>	16
<i>I.2. Biología de las isoformas del IR</i>	18
<i>I.2.1. Generación del IR-A y del IR-B</i>	18
<i>I.2.2. Propiedades de unión y de internalización del IR-A y del IR-B</i>	19
<i>I.2.3. Señalización del IR-A y del IR-B</i>	20
<i>I.3. Receptores híbridos</i>	24
<i>I.3.1. Híbridos IR-A/IR-B</i>	24
<i>I.3.2. Híbridos IR/IGF-IR</i>	25
<i>I.4. Estudio de procesos celulares in vivo</i>	26
<i>I.5. Objetivos de la tesis</i>	29

II- MATERIALES Y MÉTODOS	31
II.1. Materiales	33
II.1.1. Reactivos	33
II.1.2. Cepas bacterianas	34
II.1.3. Líneas celulares	34
II.1.4. Kits	35
II.1.5. Oligonucleótidos	35
II.1.6. Plásmidos	36
II.2. Métodos	37
II.2. A. Química	37
II.2. A.1. Síntesis y purificación de derivados de CoA biotinilados o fluorescentes	37
II.2. A.2. Biotinilación de insulina humana recombinante	39
II.2. B. Biología molecular	40
II.2. B.1. Preparación de bacterias DH5α ultra competentes	40
II.2. B.2. Transformación de bacterias competentes	41
II.2. B.3. Preparación de gliceroles	41
II.2. B.4. Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala	41
II.2. B.5. Preparación de ADN plasmídico en mediana y gran escala	42
II.2. B.6. Digestiones con enzimas de restricción	43
II.2. B.7. Ligaciones	43
II.2. B.8. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	43
II.2. B.9. Cuantificación de ADN	43
II.2. B.10. Generación de vectores de expresión del IR y del IR-VFP	44
II.2. B.11. Generación de vectores de expresión del IR fusionado a pequeños tags	46
II.2. B.12. Secuenciación de ADN	49
II.2. B.13. Expresión y purificación de la enzima ACPwt-S	49

<i>II.2. C. Biología celular</i>	51
<i>II.2. C.1. Cultivo celular y criopreservación</i>	51
<i>II.2. C.2. Transfecciones</i>	52
<i>II.2. C.3. SDS-PAGE y Western blot</i>	53
<i>II.2. C.4. Cuantificación de proteínas</i>	55
<i>II.2. C.5. Ensayos de actividad de luciferasa</i>	55
<i>II.2. C.6. Experimentos de inmunofluorescencia</i>	56
<i>II.2. C.7. Marcación de células con ligandos biotinilados y QD y análisis de internalización</i>	56
<i>II.2. C.8. Ensayos de unión e internalización de FITC-Ins por microscopía</i>	57
<i>II.2. C.9. Ensayos de unión de ligandos al IR e internalización por citometría de flujo</i>	57
<i>II.2. C.10. Marcación del dominio extracelular del IR en células vivas</i>	58
<i>II.2. C.11. Experimentos de pull down</i>	58
<i>II.2. D. Microscopía de fluorescencia</i>	59
<i>II.2. D.1. Microscopía confocal</i>	59
<i>II.2. D.2. Microscopía de fluorescencia de campo amplio</i>	60
<i>II.2. D.3. Microscopía de fluorescencia basada en un arreglo programable del seccionado óptico</i>	60
<i>II.2. D.4. Procesamiento de imágenes</i>	61
<i>II.2. D.5. Análisis de colocalización</i>	61
<i>II.2. D.6. Análisis de colocalización durante el tráfico</i>	62
<i>II.2. D.7. Cuantificación de QD unidos por microscopía</i>	63
<i>II.2. D.8. Análisis cuantitativo de la internalización por microscopía</i>	63
<i>II.2. D.9. Análisis cuantitativo de la translocación a membrana de Akt</i>	65
<i>II.2. E. Microscopía de fuerza atómica</i>	65
<i>II.2. E.1. Preparación de las células</i>	65
<i>II.2. E.2. Modificación del sensor de fuerza</i>	66
<i>II.2. E.3. Medición de mapas de fuerza</i>	66

III- RESULTADOS

CAPÍTULO 1. QUANTUM DOTS Y PROTEÍNAS FLUORESCENTES PARA ESTUDIAR EL IR EN CÉLULAS

1.1. Introducción	73
1.2. Resultados	76
1.2.1. <i>Generación de vectores de expresión del IR y evaluación de las construcciones</i>	76
1.2.2. <i>Visualización de la insulina humana unida al IR en células vivas</i>	79
1.2.3. <i>BAC-Ins y los QD se unen al IR y al IR-VFP en membranas y filopodias</i>	85
1.2.4. <i>Las herramientas generadas desencadenan la señalización en células</i>	88
1.3. Discusión	90

CAPÍTULO 2. DINÁMICA DIFERENCIAL DE LA ENDOCITOSIS Y LA SEÑALIZACIÓN DEL IR-A Y EL IR-B

2.1. Introducción	95
2.2. Resultados	97
2.2.1. <i>Endocitosis del complejo insulina-IR</i>	97
2.3.2. <i>La presencia de QD y VFP no interfiere en la endocitosis</i>	101
2.3.3. <i>La colocalización del IR-GFP e Ins-QD disminuye durante el tráfico intracelular</i>	105
2.3.4. <i>El grado de internalización depende del nivel de expresión del IR</i>	107
2.3.5. <i>La isoforma A del IR se internaliza antes que la isoforma B</i>	108
2.3.6. <i>La insulina activa diferencialmente a las isoformas del IR</i>	109
2.3.7. <i>El IR-A activa ERK 1/2 de forma más rápida y sostenida que el IR-B</i>	110
2.3.8. <i>El IR-A estimula más la transcripción génica mediada por AP-1 que el IR-B</i>	111
2.3.9. <i>El IR-B activa la vía de Akt en mayor medida que el IR-A</i>	112
2.3. Discusión	113

CAPÍTULO 3. MARCACIÓN DEL DOMINIO EXTRACELULAR DEL IR EN CÉLULAS VIVAS

3.1. Introducción	119
3.2. Resultados	121
3.2.1. <i>Generación de IR recombinantes fusionados a diversos tags</i>	121
3.2.2. <i>Marcación del IR con el ACP</i>	123
3.2.3. <i>Marcación de la porción N-terminal del IR</i>	128
3.2.4. <i>Marcación extracelular del IR introduciendo un pequeño tag en el dominio FnIII-1</i>	133
3.3. Discusión	136

CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LOS HETERODÍMEROS IR-A/IR-B EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

4.1. Introducción	141
4.2. Resultados	142
4.2.1. <i>Caracterización funcional del IR-B-A1x3 y del IR-B-A1x3-GFP</i>	142
4.2.2. <i>El IR-B-A1x3 es un dominante negativo del IR</i>	144
4.2.3. <i>El IR-B-A1x3 es un dominante negativo del IR endógeno en células HEK 293</i>	145
4.2.4. <i>El IR-B-A1x3 afecta diferencialmente la activación del IR-A y del IR-B y sus cascadas río abajo</i>	146
4.2.5. <i>El IR-B-A1x3 retiene a ambas isoformas del IR en membrana</i>	148
4.2.6. <i>La localización de Akt en membrana en respuesta a insulina es mayor para el IR-B</i>	152
4.2.7. <i>Los receptores híbridos IR-A/IR-B en la membrana plasmática se forman pero no de manera aleatoria</i>	155
4.3. Discusión	159

CAPÍTULO 5. ENDOCITOSIS Y SEÑALIZACIÓN DIFERENCIAL DEL IGF-II A TRAVÉS DEL IR

5.1. Introducción	169
5.2. Resultados	172
5.2.1. <i>El IR responde a IGF-II</i>	172
5.2.2. <i>El IGF-II activa al IR-A más que del IR-B</i>	174
5.2.3. <i>Visualización del IGF-II unido al IR y su endocitosis</i>	175
5.2.4. <i>Análisis cuantitativo de la internalización del IGF-II vía el IR-A y el IR-B</i>	178
5.2.5. <i>Diferencias en la endocitosis del IR-A y del IR-B con diversos ligandos reveladas por citometría de flujo</i>	180
5.2.6. <i>El IGF-II induce más la actividad del factor de transcripción AP-1 a través del IR-A que a través del IR-B</i>	184
5.3. Discusión	186

CAPÍTULO 6. INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

6.1. Introducción	193
6.2. Resultados	199
6.2.1. <i>Visualización de células HeLa por AFM</i>	199
6.2.2. <i>Funcionalización de los sensores de fuerza del AFM con insulina</i>	200
6.2.3. <i>Medición de la interacción insulina-IR</i>	201
6.2.4. <i>El IR-A interactúa más fuertemente con la insulina que el IR-B</i>	202
6.2.5. <i>La interacción ligando-receptor disminuye en presencia de insulina libre</i>	204
6.2.6. <i>La interacción ligando-receptor medida depende de la tasa de carga</i>	204
6.3. Discusión	207

IV- CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS 211

V- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 219

Publicaciones 243

ABREVIATURAS

2xYT	2 x Yeast extract and tryptone broth / Medio de cultivo 2 x extracto de levadura y triptona
A1	Tag de 12 aminoácidos para marcación con sistema ACP
A _{xxx}	Absorbancia a xxx nm
ACP	Acyl carrier protein / Proteína transportadora de acilos
ACPwt-S	ACP sintasa salvaje
Akt-HA	Akt fusionado a HA
Akt _m	Akt en membrana
Akt _i	Akt en el interior
Akt _t	Akt total
AN	Apertura numérica
Anti-p	anticuerpo contra grupo fosfato
AP-1	Proteína activadora 1
APS	Associated substrate proteins / Proteínas asociadas a sustratos
ATP	Adenosine triphosphate / Trifosfato de adenosina
BAC-Ins	Insulina biotina amido caproyl
β-Gal	β-Galactosidasa
BP	Filtro pasabanda
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer / Transferencia de energía de resonancia bioluminiscente
BSA	Bovine serum albumine / Albúmina sérica bovina
CFM	Chemical force microscopy / Microscopía de fuerzas químicas
CoA	Coenzima A
CR	Dominio rico en cisteínas
CT	Dominio C-terminal
cts	Cuentas
Cy3	Cianina 3

Abreviaturas

Da	Dalton
DAF-2	<i>DAuer Formation-2</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIC	Differential interference contrast / Contraste de interferencia diferencial
DM	Dicroic mirror / Espejo dicroico
DMEM	Dubelcco's modified Eagle medium / Medio basal de Eagle modificado
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
dNTP	Deoxiribonucleotide triphosphate / Desoxirribonucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamin-tetracético
EEA1	Early endosomes / Endosomas tempranos
EGF	Epidermal growth factor / Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Epidermal growth factor receptor / Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicol-tetracético
emCCD	Electron multiplying, charged-coupled device / Dispositivo de carga acoplada a multiplicado de electrones
eq	equivalente
ERK	Extracellular signal regulated kinase / Quinasa regulada por señales extracelulares
EV	Empty vector / Vector vacío
F	Fuerza
Fab	Fragmento de unión a antígeno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FITC-Ins	FITC-Insulina
FnIII	Dominio de tipo fibronectina III

Abreviaturas

FPLC	Fast protein liquid chromatography / Cromatografía líquida rápida de proteínas
FRET	Förster resonance energy transfer / Transferencia de energía resonante de Förster
GFP	Green fluorescent protein / Proteína verde fluorescente
GLUT4	Transportador de glucosa 4
HAc	Ácido acético
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
HPA	Hidroxipicolinic acid / Ácido hidroxipicolínico
HPLC	High pressure liquid chromatography / Cromatografía líquida de alta presión
HRP	Horseradish peroxidase / Peroxidasa de rábano
ID	Insert domain / Dominio inserto
IGF-I	Insulin like growth factor I / Factor de crecimiento similar a insulina I
IGF-II	Insulin like growth factor II / Factor de crecimiento similar a insulina II
IGF-II-biot	IGF-II-biotina
IGF-IR	Insulin like growth factor receptor / Receptor del factor de crecimiento similar a insulina
IGF-IIR	Insulin like growth factor II receptor / Receptor del factor de crecimiento similar a insulina II
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside / Isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido
IR	Receptor de insulina
IR-A	Receptor de insulina, isoforma A
IR-B	Receptor de insulina, isoforma B
IRR	Insulin receptor-related receptor / Receptor relacionado al receptor de insulina
IRS	Insulin receptor substrate / Sustrato del receptor de insulina
JM	Juxtamembrane domain / Dominio yuxtamembrana
kb	Kilobases

Abreviaturas

L1	Dominio rico en leucinas 1
L2	Dominio rico en leucinas 2
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LFBM	Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular
LP	Filtro de corte
Luc	Luciferasa
M	Coefficiente de Manders
mA	miliamperios
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization / Ionización y desorción asistida por la matriz
MES	Ácido 2 morfolinoetansulfónico
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-propansulfónico
MPIbpc	Max Planck Insitute for Biophysical Chemistry
mQ	mili Q
MR-AFM	Molecular recognition atomic force microscopy / Microscopía de fuerza atómica basada en el reconocimiento molecular
MRM	Molecular recognition mapping / Mapeo de reconocimiento molecular
mTOR	Mammalian target of rapamycin / Blanco de rapamicina en mamíferos
<i>n</i>	Tamaño de la muestra del análisis estadístico
N	Newton
NHS	N-hidroxisuccinimida
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis / Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAM	Programmable array microscopy / Microscopía de arreglo programable
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffer saline / Solución reguladora fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDM	Product of the differences from the mean / Producto de las diferencias de la media

Abreviaturas

PEI	Polietilenimina
Peo	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
PH	Pleckstrin homolgy domain / Dominio de homología a pleckstrina
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase / Fosfatidil inositol 3 quinasa
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate / Fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate / Fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato
PIPES	Ácido piperazin-N,N'-bis(2-etansulfónico)
p/v	peso/volumen
PVDF	Polyvinylidene fluoride / Fluoruro de polivinilo
QD	Quantum dot / Nanopartícula
QD _m	QD en membrana
QD _i	QD en el interior
QD _t	QD totales unidos
QMLE	Quick maximum likelihood estimation / Estimación rápida de máxima probabilidad
RE	Retículo endoplasmático
rhIns	Insulina humana recombinante
rhIns-biot	Insulina humana recombinante biotinilada
rpm	Revoluciones por minuto
R _r	Coefficiente de Pearson
RTK	Receptor tirosina quinasa
SA	Streptavidina
SAP	Shrimp alkaline phosphatase / Fosfatasa alcalina de camarón
SCFP	Super cyan fluorescent protein / Proteína cian fluorescente súper
SCFS	Single cell force spectroscopy / Espectroscopía de fuerza de células individuales
SDS	Dodecilsulfato de sodio

Abreviaturas

SEM	Standard deviation of the sample / Desviación estándar de la muestra
SFB	Suero fetal bovino
SH2	Src homology 2 domains / dominios de homología 2 a Src
SMFS	Single molecule force spectroscopy / Espectroscopía de fuerza de moléculas individuales
SOB	Super optimal broth / Medio de cultivo súper óptimo
SOC	Super optimal broth with catabolic repressor / Medio de cultivo súper óptimo con represor catabólico
SYFP	Super yellow fluorescent protein / Proteína amarilla fluorescente súper
T4 PNK	T4 polinucleótido quinasa
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris acetato-EDTA
TBS	Tris buffer saline / Solución salina regulada con Tris-HCl
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TK	Tyrosin kinase domain / Dominio tirosina quinasa
TLC	Thin layer chromatography / Cromatografía en capa delgada
T _m	Melting temperature / Temperatura de hibridación
TM	Transmembrane domain / Dominio transmembrana
TOF	Time of flight / Tiempo de vuelo
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TTBS	Solución reguladora TBS / 0.1 % Tween
U	Unidades enzimáticas
u.a	Unidades arbitrarias
V	Voltios
VFP	Visible fluorescent protein / Proteína fluorescente en el visible
v/v	volumen/volumen
YbbR13	Tag de 13 aminoácidos para marcación con sistema ACP

I. INTRODUCCIÓN

I Introducción

En 1985, dos grupos de manera independiente informaron el clonado del ADNc del receptor de insulina (IR). Estos ADNc eran levemente diferentes en longitud (Ebina *et al.*, 1985; Ullrich *et al.*, 1985), lo cual indicaba la existencia de dos isoformas del IR: la isoforma A (IR-A) más corta y la isoforma B (IR-B) más larga.

Estudios posteriores mostraron leves diferencias entre estas isoformas en lo que respecta a la activación del receptor y su señalización, sugiriendo distintas funciones para cada una (Mosthaf *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1991 y 1993). Esto fue confirmado por la observación de que el IR-A, a diferencia del IR-B, es un receptor que une al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF, por sus siglas en inglés, *Insulin like growth factor*) II con alta afinidad (Frasca *et al.*, 1999). Estos estudios confirman al IR-A como receptor de IGF, el cual regula muchos procesos tanto de la fisiología normal como patológica incluyendo el cáncer, el envejecimiento y la diabetes (Stewart y Rotwein, 1996; Bartke *et al.*, 2003; Frasca *et al.*, 2008). En diferentes procesos de transformación maligna se produce la desregulación de la señalización por IGF observándose una sobreactivación del receptor del IGF-I (IGF-IR) tanto por sobreexpresión del receptor como por una sobreproducción autócrina/parácrina de IGF-I e IGF-II (Baserga *et al.*, 2003; Samani *et al.*, 2007). En este contexto, la sobreexpresión del IR-A puede contribuir a la modulación de la respuesta a insulina y a IGF-I e IGF-II de cada tejido (Belfiore, 2007; Frasca *et al.*, 2008).

Las dos isoformas del IR son el producto del procesamiento (*splicing*) alternativo del gen *Ir*. Este proceso es un mecanismo finamente regulado y conservado en mamíferos y es el responsable de la especificidad de la señalización de insulina e IGF. Mientras que la sobrerregulación del IR-A se asocia con una disminución de la señalización metabólica de la insulina y un incremento de la señalización del IGF, la sobrerregulación del IR-B está asociada con una predominancia de la señalización metabólica de la insulina. La expresión de la isoforma A del IR es importante en tejidos embrionarios para el crecimiento y desarrollo. Por otra parte, la expresión del IR-B posee un papel clave en la acción metabólica de la insulina en la vida adulta. Cuando el *splicing* del *Ir* se desregula se desencadenan patologías como el cáncer o el envejecimiento acelerado (Pezzino *et al.*, 1989; Papa *et al.*, 1990; Fritita *et al.*, 1993).

I.1. ESTRUCTURA DEL IR Y SU SEÑALIZACIÓN

I.1.1. Estructura del gen *Ir*

El IR humano es codificado por el gen *Ir* que posee 22 exones localizado en el cromosoma 19. Los trabajos reportados en 1985 por los grupos de Axel Ullrich y Bill Rutter revelaron la existencia del pro-receptor de insulina con un tamaño de 1343 y 1355 aminoácidos respectivamente. La diferencia en los tamaños se demostró que se debe a la exclusión/inclusión de un segmento de 12 aminoácidos en el extremo C-terminal de la subunidad α del IR. Este segmento es codificado por el exón 11 (constituido por 36 pares de bases, pb) que puede sufrir *splicing* alternativo generando las dos isoformas del IR (**Figura I.1**): el IR-A cuando es excluido y el IR-B cuando es incluido (Seino y Bell, 1989; Seino *et al.*, 1989).

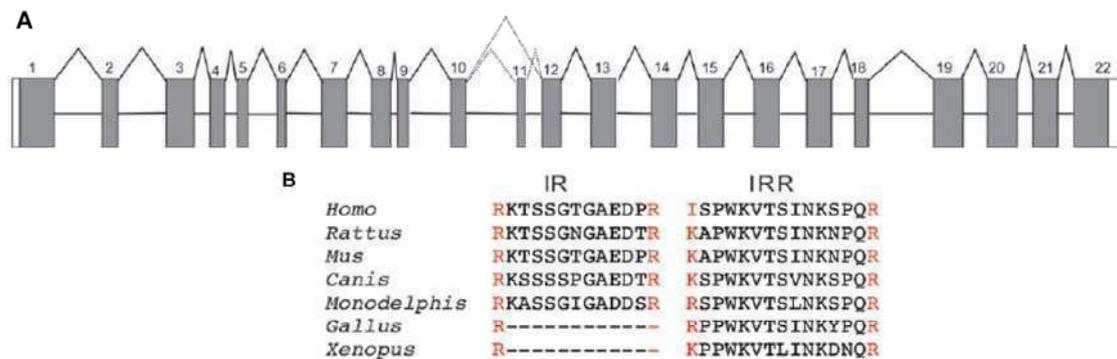


Figura I.1. El procesamiento alternativo del gen *Ir*. **A.** Representación esquemática del gen *Ir*. Las cajas blancas indican regiones no codificantes mientras que las grises representan los exones codificantes numerados. Las líneas sólidas muestran los eventos de *splicing* constitutivo y las punteadas representan el procesamiento alternativo. **B.** Alineación de la secuencia de aminoácidos codificados por el exón 11 en el IR y el IRR. Sus regiones flanqueantes se muestran en rojo (tomado de Hernández-Sánchez *et al.*, 2008).

I.1.2. Evolución de las dos isoformas del IR en vertebrados

El IR y el IGF-IR comparten un 45-65 % de identidad de secuencia en los dominios de unión a ligando y un 60-85 % en los dominios tirosina quinasa y de reclutamiento de moléculas que son sustratos de la actividad quinasa de estos receptores (Ullrich *et al.*, 1986; Whittaker *et al.*, 2001). La insulina y los IGF constituyen una familia de hormonas polipeptídicas comunes a todos los metazoos. Estas hormonas controlan funciones celulares esenciales tales como el crecimiento, el metabolismo, la reproducción o la longevidad (Kimura *et al.*, 1997; Efstratiadis, 1998; Tissenbaum y Ruvkun, 1998; Brogiolo *et al.*, 2001; Nakae *et al.*, 2001; Saltiel y Kahn, 2001; Holzenberger *et al.*, 2003; Nef *et al.*, 2003).

Si bien en invertebrados existen varios péptidos similares a la insulina, sólo un receptor de insulina ha sido descrito (en *C. elegans*, DAF-2, por sus siglas en inglés, *DAuer Formation-2*) (Fernández *et al.*, 1995; Pashmforoush *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997; Ruvkun y Hobert, 1998). Sin embargo, en vertebrados, tres receptores distintos que pueden unir insulina o IGF fueron descritos basados en diferencias en su estructura primaria y funcional. Estos receptores son el IR (Ebina *et al.*, 1985; Ullrich *et al.*, 1985), el receptor del IGF-I (IGF-IR) (Ullrich *et al.*, 1986), y el receptor del IGF-II (IGF-IIR) (Morgan *et al.*, 1987). De todos, el IGF-IIR es en realidad un receptor de manosa-6-fosfato que únicamente en mamíferos adquirió un dominio de unión a IGF-II, y no es un receptor capaz de señalar (Morgan *et al.*, 1987). Además, un receptor huérfano (del que no se conoce ligando) denominado receptor relacionado al receptor de insulina (IRR, por sus siglas en inglés, *Insulin receptor-related receptor*) también ha sido descrito como miembro de la familia del IR por su similitud de secuencia (Shier y Watt, 1989; Di Pirro *et al.*, 1991).

En el caso de los vertebrados, luego del nacimiento las funciones de proliferación celular están restringidas al IGF-I y al IGF-II, mientras que la insulina actúa como una hormona reguladora del metabolismo controlando principalmente la homeostasis de diferentes metabolitos, fundamentalmente la glucosa (Chan y Steiner, 2000). Sin embargo, durante el desarrollo embrionario en vertebrados la insulina parece mostrar ciertas reminiscencias de su acción y regulación en los invertebrados (Hernández-Sánchez *et al.*, 2006). Las funciones fisiológicas de la insulina y los IGF requieren que éstos interactúen con receptores específicos localizados en la superficie celular. Pequeñas diferencias en la estructura y función de estos receptores pueden generar importantes variaciones en la actividad biológica de estas hormonas polipeptídicas.

La **Figura 1.2** muestra de manera esquemática la diversificación de los receptores de la familia del IR a lo largo de la evolución. En invertebrados DAF-2 podía ejercer tanto las funciones de crecimiento como las metabólicas y reproductivas dada la disponibilidad de nutrientes. En vertebrados, en cambio, la presencia de dos receptores diferentes conduce a una diversificación funcional: mientras que el IR-A regula el metabolismo de la glucosa, el IGF-IR regula el crecimiento y la supervivencia. Los receptores híbridos IGF-IR/IR-A pueden tener funciones superpuestas incluyendo las funciones proliferativas de la insulina y la pro-insulina. En los mamíferos, la aparición del IR-B separa las funciones metabólicas de las mitogénicas. Esto coincide con la aparición de la viviparidad y la necesidad de separar la regulación metabólica

de la madre de la mitogénica del embrión. De esta forma, cuando se sobreexpresa o se sobreactiva el IR-A se reduce el efecto metabólico de la insulina y se incrementa la señalización del IGF-II. Por lo tanto, se promueve la proliferación celular y pueden darse procesos tumorales y de arteroesclerosis. En contraposición, la disminución de la señalización del IR-A está asociada con una señalización de IGF-II menor y un aumento de los efectos metabólicos de la insulina (**Figura I.2**).

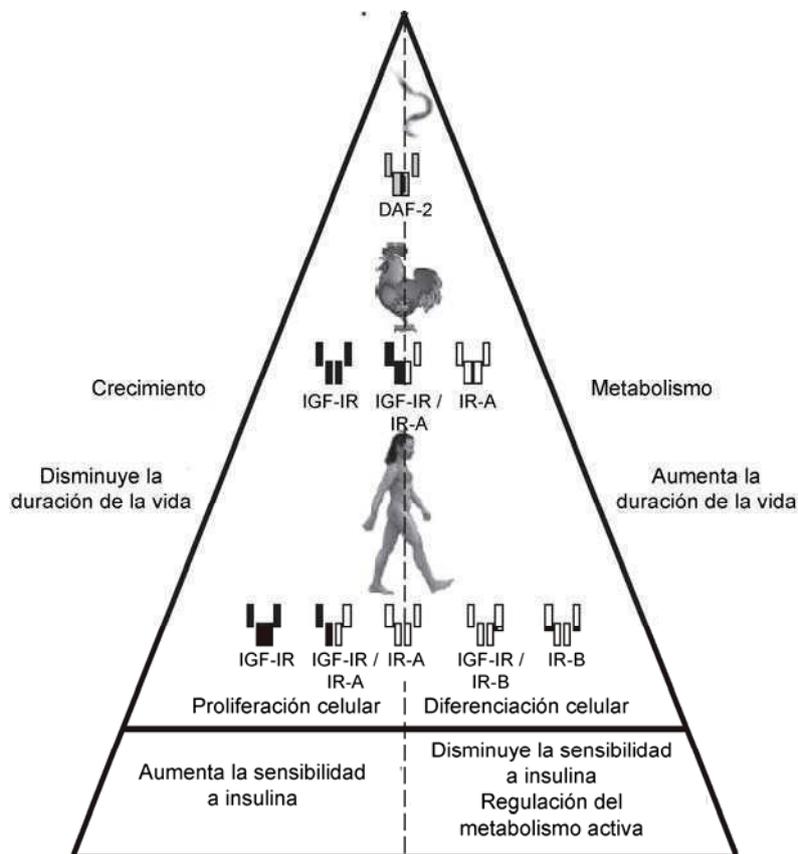


Figura I.2. Diversificación de los receptores de la familia del IR. Tomado de Belfiore et al., 2009.

I.1.3. Filogenia del *Ir*

Los genes que codifican para el IR, el IGF-IR y el IRR poseen una organización genómica similar. Ambas cadenas (α y β) se sintetizan a partir de un único ARN mensajero (ARNm) compuesto por 22 exones en el IR (**Figura I.1.A**) y el IRR y por 21 exones en el IGF-IR (Rosenfeld y Roberts, 1999). Tanto en el *Ir* como en el *Irr*, el exón adicional es el exón 11. Sorprendentemente, el exón 11 es un exón constitutivo en el *Irr* mientras que en el *Ir* humano y murino este exón sufre *splicing* alternativo generando dos proteínas isoformas (IR-A e IR-B) (Ebina et al., 1985; Ullrich et al., 1985; Seino y Bell, 1989; Seino et al., 1989).

Los genes *Ir* e *Igf1r* evolucionaron a partir de un ancestro común y regulan funciones altamente conservadas en vertebrados e invertebrados como ser el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación (Brogiolo *et al.*, 2001; Drakas *et al.*, 2004). Según predicciones filogenéticas, la primera duplicación del gen ancestral *Ir/Igf1r* (*Daf-2*) condujo al parálogo *Ir* y al gen ancestral común del *Igf1r* y el *Irr*, el cual en una segunda ronda de duplicación generó el *Igf1r* y el *Irr* (Ullrich *et al.*, 1986; Shier y Watt, 1989; Hernández-Sánchez *et al.*, 2008) (**Figura I.3**). En anfibios, el *Irr* adquiere un exón adicional (exón 11). Por último, en mamíferos el gen *Ir* adquiere el exón 11 junto con la capacidad de procesarlo alternativamente incluyéndolo o no de manera tejido específica y según la etapa del desarrollo.

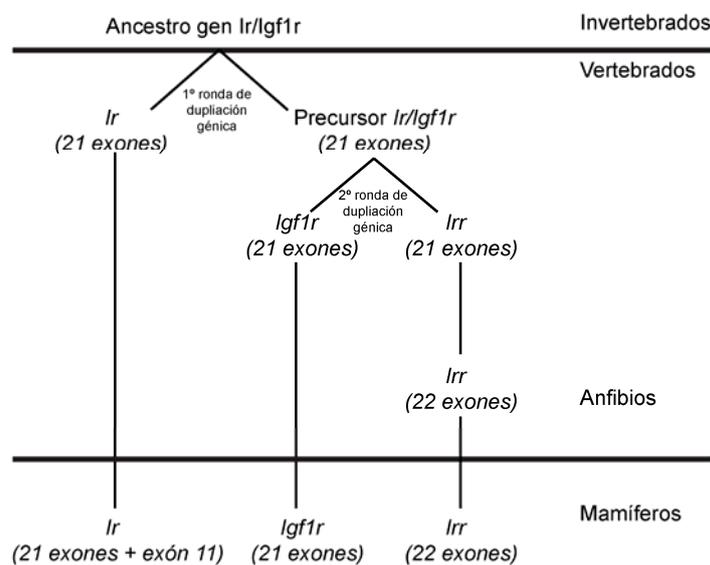


Figura I.3. Representación esquemática de la filogenia del *Ir*. Tomado de Belfiore *et al.*, 2009.

Aproximadamente el 20 % de la secuencia de nucleótidos del mensajero del IR está conservado a lo largo de los vertebrados, estándolo más en el dominio tirosina quinasa (Hubbard y Till, 2000; Hernández-Sánchez *et al.*, 2008). Esto indica que este dominio está sujeto a una fuerte presión de selección para mantener funciones generales de señalización del IR. En cambio, sitios específicos están fundamentalmente localizados en la porción extracelular del IR sugiriendo que las diferencias en las funciones de los parálogos en esta familia fueron adquiridas evolutivamente más a través de cambios en la afinidad por los ligandos (Brandt *et al.*, 2001) que por modificaciones en el dominio tirosina quinasa intracelular (Hernández-Sánchez *et al.*, 2008).

El exón 11 del *Irr* aparece ya en anfibios, mientras que el exón 11 del *Ir* es una adquisición del linaje de los mamíferos. La secuencia de ambos exones (**Figura I.1.B**) y la filogenia reconstruida recientemente de la familia del IR en vertebrados

(Hernández-Sánchez *et al.*, 2008) indican que ambos exones fueron adquiridos de manera independiente por cada parólogo. El hecho de que el exón 11 del *Ir* sea una novedad exclusiva de mamíferos implica que la diversificación funcional del *Ir* fue adquirida a través del *splicing* alternativo. Por lo tanto, las diversificaciones funcionales de la familia del IR en el linaje de los vertebrados fueron adquiridas por duplicación de genes, mientras que en mamíferos el *splicing* alternativo es el mecanismo que genera la diversificación funcional del IR.

I.1.4. Expresión del IR

Si bien los tejidos mayormente sensibles a insulina son el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético, el IR se expresa también en el cerebro, riñón, corazón, el endotelio vascular de la placenta, acinos pancreáticos, alvéolos pulmonares, los monocitos, granulocitos, eritrocitos y fibroblastos (Kaplan, 1984).

Los mayores niveles de expresión de la proteína se encontraron en tejido adiposo. En corazón, hígado y pulmones la expresión es de aproximadamente del 30 % del encontrado en tejido adiposo. En músculo, placenta y riñón estos niveles son cercanos al 10 %. En cerebro y páncreas los niveles de expresión son mucho más bajos que en tejidos sensibles a insulina. Además en estos órganos los efectos de la insulina son típicamente no metabólicos.

Mientras que el 80 % del IR presente en el hígado es IR-B, este porcentaje es del 60 % para tejido adiposo y músculo, del 40 % en placenta y del 0 % en linfocitos. En el cerebro de los mamíferos, existen dos tipos de IR. Mientras que el clásico IR se encuentra presente en las células gliales, un IR específico del cerebro se encuentra en neuronas (Park, 2001). Este IR es fundamentalmente IR-A con un peso molecular ligeramente menor producto de una glicosilación diferente. Se postula que la insulina en el cerebro juega un papel en la supervivencia neuronal, el aprendizaje, la memoria, la regulación de la homeostasis energética y la reproducción (Plum *et al.*, 2006). Se ha demostrado que en pacientes con Alzheimer la actividad del IR en cerebro está reducida (Stockhorst, 2004).

En las células β del páncreas se expresan tanto el IR como el IGF-IR. El IGF-IR actúa como un regulador negativo de la secreción de insulina (Van Schravendijk *et al.*, 1985). La isoforma B del IR es la que se expresa predominantemente en estas células (Muller *et al.*, 2007) sugiriendo que la interacción IGF-IR/IR-A no juega un papel relevante en la fisiología del páncreas y que los efectos del IGF-II en las células β están mediados por el IGF-IR.

En células malignas se observa un aumento en la expresión del IR que no se traduce en mayores efectos en el metabolismo celular pero sí en mayor sensibilidad a los efectos no metabólicos de la insulina. Numerosos estudios sugieren que la sobreexpresión del IR en diversos tipos de cáncer (colon, mama, pulmón, ovario, tiroides) juega un papel clave en la progresión tumoral (Frasca *et al.*, 1999; Vella *et al.*, 2001 y 2002).

I.1.5. Estructura del IR y unión de insulina

El IR es sintetizado inicialmente como un pre-pro-receptor de cadena única. Un péptido de treinta residuos lo dirige al retículo endoplasmático (RE) donde es clivado cotraduccionalmente (Ullrich *et al.*, 1985). En el RE el precursor es glicosilado, se pliega y dimeriza con la asistencia de proteínas chaperonas (Bass *et al.*, 1998) antes de ser transportado al aparato de Golgi. Una vez en el Golgi, el receptor es clivado dando origen al $\alpha_2\beta_2$ heterotetrámero que luego es transportado a la membrana plasmática.

El IR, el IGF-IR y el IRR presentan una estructura proteica modular conservada (ver **Figura I.4**) (Ullrich *et al.*, 1986; De Meyts, 2004) y pertenecen a la gran superfamilia de receptores de tipo tirosina quinasa (RTK) (Hubbard y Till, 2000).

El heterotetrámero del IR consiste en dos subunidades α extracelulares (130 kDa) y dos subunidades β (95 kDa) unidas entre ellas por puentes disulfuro (Lawrence *et al.*, 2007; De Meyts, 2008). La porción extracelular está constituida por la cadena α y por 194 residuos de la cadena β . En la cadena β hay un único segmento transmembrana (TM) y luego el dominio citoplasmático que contiene el dominio tirosina quinasa (TK). La unión de insulina a la subunidad α estimula la actividad de tirosina quinasa intrínseca de la subunidad β (Cohen, 2006; Taniguchi *et al.*, 2006; De Meyts, 2008).

Los miembros de la familia del IR están compuestos por unidades estructurales: el extremo N-terminal del ectodominio consiste en dos dominios homólogos ricos en leucinas (L1 y L2) de aproximadamente 150 aminoácidos cada uno, separados por una región rica en cisteínas (CR) también de unos 150 aminoácidos. La mitad C-terminal de cada monómero del ectodominio está conformada por tres dominios de tipo fibronectina III (FnIII-1, FnIII-2 y FnIII-3) relativamente pequeños (aproximadamente 100 aminoácidos). El dominio FnIII-2 contiene un segmento más largo (120 residuos) denominado dominio inserto (ID, por sus siglas en inglés, *insert domain*). La isoforma B difiere de la A en la presencia de 12

aminoácidos codificados por el exón 11 que se insertan entre los residuos 716 y 717 del IR-A, tres residuos antes del extremo C-terminal de la subunidad α (Lawrence *et al.*, 2007; De Meyts, 2008). La porción intracelular contiene al dominio TK flanqueado por dos regiones regulatorias, la región yuxtamembrana (JM) y el extremo C-terminal (CT), que contienen sitios de unión para las moléculas señalizadoras.

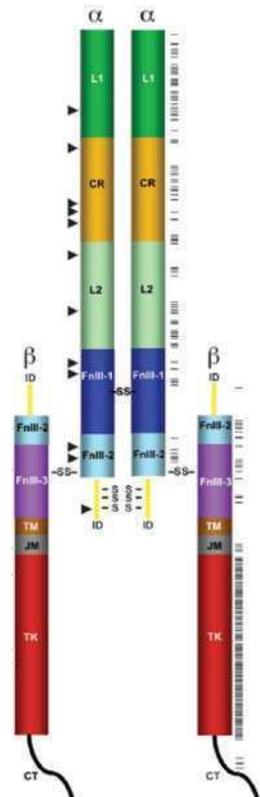


Figura I.4. Estructura del IR. Diagrama de la estructura del IR mostrando la organización en los siguientes dominios: dos dominios largos ricos en leucina (L1 y L2), un dominio rico en cisteínas (CR), tres dominios ricos en fibronectina III (FnIII-1, FnIII-2 y FnIII-3), un dominio inserto (ID) dentro del dominio FnIII-2, el dominio transmembrana (TM), el dominio yuxtamembrana (JM), el dominio tirosina quinasa (TK) y el extremo C-terminal (CT). Se muestran los puentes disulfuro. Las líneas en la parte derecha del diagrama indican aminoácidos conservados en los tres miembros de la familia del IR (IR, IRR e IGF-IR) Tomado de Hernández-Sánchez *et al.*, 2008.

A diferencia de otros miembros de la súper familia de RTK, los tres receptores mencionados forman dímeros de dímeros $\alpha_2+\beta_2$ unidos de manera covalente en la membrana celular independientemente del ligando. Estos dímeros pueden ser homodímeros, compuestos por dos monómeros $\alpha+\beta$ idénticos, o bien heterodímeros formados por dos monómeros $\alpha+\beta$ diferentes (Moxham *et al.*, 1989; Soos y Siddle, 1989; Schlessinger, 2000; Fernández *et al.*, 2001). La unión del ligando al IR y al IGF-IR induce un cambio conformacional que posibilita la autofosforilación de ciertas tirosinas en el dominio citoplasmático y que inicia la cascada de señalización intracelular que conduce a diferentes respuestas biológicas (metabolismo, proliferación y diferenciación celular, crecimiento, expresión génica, síntesis de lípidos, proteínas), dependiendo del tipo celular y la etapa del desarrollo (Saltiel y Kahn, 2001).

El dominio tirosina quinasa del IR fue cristalizado en sus estados fosforilado y no fosforilado (Hubbard *et al.*, 1994; Hubbard, 1997) evidenciando cambios conformacionales por activación del receptor. Por otra parte, el ectodominio completo del IR fue cristalizado en presencia de un péptido sintético mimético de la insulina y dos fragmentos de unión a antígeno (Fab) (Soos *et al.*, 1986; McKern *et al.*, 2006).

La estructura cristalográfica del ectodominio completo muestra que cada monómero adopta la conformación de “V invertida” respecto a la membrana celular (**Figura I.5.A**) (McKern *et al.*, 2006). Una de las mitades de la V está formada por el fragmento L1-CR-L2 y la otra mitad por los tres dominios FnIII. Los extremos C-terminales de los dominios FnIII se encuentran en la base de la estructura de la “V invertida” (**Figura I.5.A**). En los receptores intactos estos extremos se extienden sobre la membrana celular (**Figura I.5.B**).

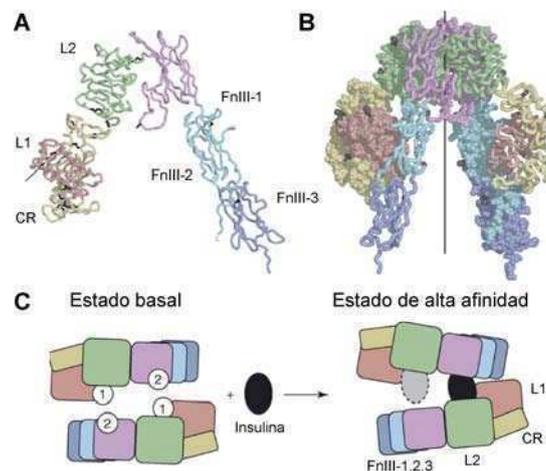


Figura I.5. El ectodominio del IR y la unión de insulina. **A.** Arreglo espacial del ectodominio del monómero del IR. Los dominios se muestran en diferentes colores: L1, rosa; CR, amarillo; L2, verde; FnIII-1, violeta; FnIII-2, celeste; FnIII-3, azul. **B.** Homodímero del IR. Uno de los monómeros se muestra con la representación de tubos y el otro con la de esferas. La localización de sitios potencialmente N-glicosilados se muestra en negro en cada monómero. **C.** Modelo de unión de la insulina al IR. Se indica la ubicación aproximada de los sitios 1 y 2 de cada monómero. En el estado basal tanto el sitio de alta afinidad como el de baja están igualmente accesibles. Pero en el estado de alta afinidad, una molécula de insulina actúa de puente entre el sitio 1 y el 2 de un lado del dímero causando que los dos monómeros se cierren de un lado, generando la apertura del lado opuesto. Tomado de McKern *et al.*, 2006.

El modelo de unión a insulina (De Meyts y Whittaker, 2002; De Meyts, 2004; McKern *et al.*, 2006) propone que cada monómero del dímero del IR contiene dos sitios de unión diferentes (sitio 1 y sitio 2) localizados en dos regiones del monómero. La unión de insulina al primero en cualquiera de las dos subunidades α , que es de baja afinidad (sitio 1), provoca un cambio conformacional que confiere alta afinidad al segundo sitio de la otra subunidad (Taniguchi *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2007; De Meyts, 2008) (**Figura I.5.C**). Se da una cooperatividad negativa porque la unión de alta afinidad solo puede ocurrir entre el par de sitios (sitio 1 y 2') de un lado del dímero o

en el correspondiente par de sitios (1' y 2) del otro lado (De Meyts, 2008). De este modo, el puente ligando-receptor puede oscilar de un lado al otro del receptor (**Figura I.5.C**). Dos moléculas de insulina no pueden unirse a un sitio 1-sitio 2' y al sitio 1'-sitio 2 de manera simultánea. Este modelo sugiere que la unión de alta afinidad está asociada a algún movimiento del módulo L1-CR de un monómero respecto del dominio FnIII-1 del otro, inhibiendo, al mismo tiempo, la capacidad de unión del otro par de sitios 1-2. El sitio 1 está compuesto fundamentalmente por el dominio L1 y por el CR. El gran tamaño de este dominio sería en parte responsable de la menor afinidad del IR por el IGF-I e IGF-II que son moléculas más grandes que la insulina. El sitio 2, a su vez, está formado por el extremo C-terminal del dominio FnIII-1 y el N-terminal del dominio FnIII-2. Resulta razonable suponer que el péptido de 12 aminoácido codificado por el exón 11 presente en el IR-B debe contribuir, junto con el módulo CR, a disminuir la afinidad del IR-B por el IGF-II fundamentalmente restringiendo el tamaño del bolsillo correspondiente al sitio 1 (**Figura I.6**).

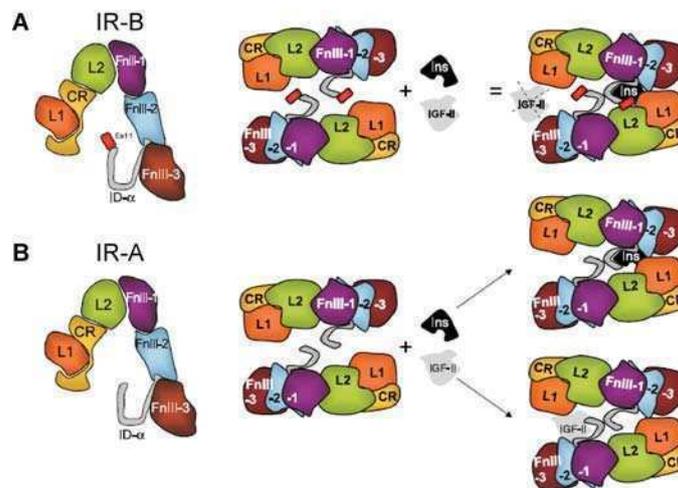


Figura I.6. Unión de insulina o IGF-II al IR-A y al IR-B. Esquema del ambas isoformas del IR uniendo insulina o IGF-II. **A.** IR-B. **B.** IR-A. Tomado de Belfiore *et al.*, 2009.

El ligando también sufre cambios en el proceso de unión al receptor. El extremo C-terminal de la cadena B de la insulina (residuos 21 a 30, denominados B₂₁-B₃₀) se alejan de los residuos 1 y 2 de la cadena A (A₁ y A₂) exponiendo la superficie hidrofóbica compuesta por los residuos A₁-A₃, A₁₉-A₂₀, B₁₁-B₁₂, B₁₅ y B₁₉ (Derewenda *et al.*, 1991; Schäffer, 1994; Xu *et al.*, 2004). El extremo N-terminal de la cadena también sufre alteraciones pasando desde el estado T extendido, más estable pero menos activo (estructura clásica), a un estado R menos estable pero más activo. Para esto utiliza la glicina B₈ como un interruptor o *switch* estructural y la hélice de la cadena B se extiende incluyendo los residuos B₁-B₈ (Nakagawa *et al.*, 2005).

Se sugiere que el sitio de baja afinidad del IR controla la especificidad de la unión del ligando. Este sitio tiene contribuciones de diferentes regiones del receptor: el dominio L1, el péptido CT y posiblemente una porción periférica de la región ID (Wan *et al.*, 2004 y 2005). La importancia de las regiones L1, CT y CR en la unión de baja afinidad se evidenció por estudios de los receptores de pacientes con una señalización de insulina deficiente así como de estudios de mutagénesis, de receptores quiméricos y de experimentos de *cross-linking* (Whittaker *et al.*, 2001 y 2002; De Meyts, 2004).

Un modelo previo basado en la reconstrucción del IR por microscopía electrónica mostró un arreglo diferente a la “V invertida” de McKern y colaboradores (Ottensmeyer *et al.*, 2000). Este modelo sugiere que en el estado de alta afinidad la insulina hace contacto con los dominios L1 y L2 de un monómero y los módulos L1 y CR del otro. Como se muestra en las **Figuras I.5.B** y **I.6** la estructura cristalográfica muestra que los dos dominios L1 se encuentran en lados opuestos del dímero, demasiado lejos para que la unión de insulina sea a los dos dominios L1 simultáneamente. En el modelo de McKern uno de los sitios de unión (el de baja afinidad) tiene las contribuciones de las regiones L1, CT y CR de un monómero. Los dominios FnIII-1 del otro monómero están involucrados en el otro sitio de unión (el de alta afinidad). Por esto se postula que el IR utiliza dos principios de unión al ligando: i) el contacto con el dominio rico en leucinas como se vio en la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y los receptores acoplados a proteína G (Fan y Hendrickson, 2005) y ii) el contacto con las regiones FnIII como se ha descrito para el receptor de la hormona de crecimiento y de interleuquina (Kossiakoff, 2004).

I.1.6. Activación del IR

La unión de insulina al IR conduce a la fosforilación de varios sitios en el dominio citoplasmático del receptor. En total siete residuos de tirosina se han identificado fosforilados en respuesta a insulina (Youngren, 2007): dos tirosinas (Tyr965 y Tyr972) se encuentran en la porción yuxtamembrana, tres tirosinas (Tyr1158, Tyr1162 y Tyr1163) se localizan en la región de activación del dominio quinasa y las dos restantes (Tyr1328 y Tyr1334) están ubicadas cerca del extremo C-terminal (la numeración corresponde a la secuencia aminoacídica del IR-B).

El modelo actualmente aceptado sostiene que la unión de la insulina conduce a un cambio conformacional que genera que los dominios quinasa citoplasmáticos se acerquen permitiendo la autofosforilación de los residuos de tirosina en la subunidad β del IR. Se han demostrado fosforilaciones tanto en *cis* como en *trans*. Las tirosinas en el

dominio yuxtamembrana son fosforiladas por la actividad de fosfotransferasa de la misma subunidad (fosforilación en *cis*), mientras que las tirosinas en la región de activación son fosforiladas en *trans* por la otra subunidad β luego de la unión del ligando (Cann y Kohanski, 1997). Esta fosforilación conduce al desbloqueo del sitio catalítico con actividad quinasa dando libre acceso al ATP y sustratos como el sustrato de IR (IRS, por sus siglas en inglés, *insulin receptor substrate*) y la proteína adaptadora Shc (Hubbard y Miller, 2007).

I.1.7. Señalización del IR

La insulina desencadena una compleja cascada de transducción de señales a través del IR (**Figura I.7**). El IR activado es capaz de fosforilar una gran variedad de moléculas intracelulares entre las cuales se encuentran los IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4, Shc, Gab1, Cbl, proteínas asociadas a sustratos (APS, por sus siglas en inglés, *associated substrate proteins*) y miembros de la familia de las proteínas reguladoras de señales. Cada una de estas proteínas fosforiladas provee sitios que son reconocidos por otras moléculas efectoras. Entre ellas se encuentran aquellas que contienen dominios SH2 como la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K); la proteína fosfatasa de tirosinas SHP2; la proteína adaptadora Grb2 y Ras entre otras. Algunas de estas moléculas contienen dominios SH3 los cuales unen regiones ricas en prolina brindando sitios adicionales de interacción proteína-proteína con efectores adicionales en la cascada río abajo.

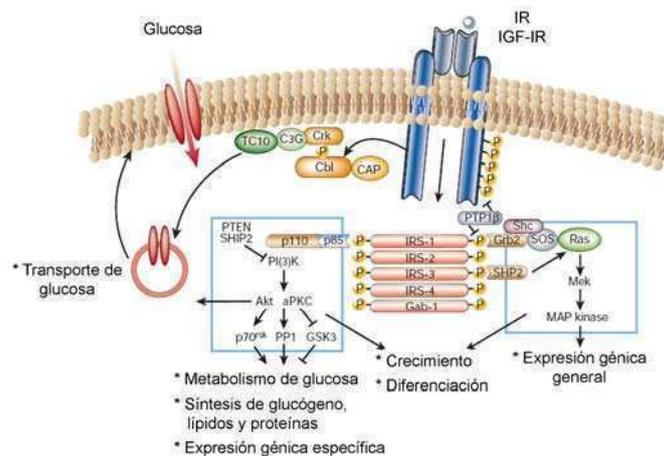


Figura I.7. Esquema de la señalización a través del IR. Tomado de Saltiel y Kahn, 2001.

En esta compleja cascada es posible reconocer dos grandes vías: una que media los efectos metabólicos a través de PI3K/Akt, y la otra que es responsable de las respuestas mitogénicas activando Ras/MAPK.

La vía de PI3K/Akt

La PI3K está compuesta por una subunidad regulatoria p85 y una catalítica p110 que fosforila al fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato (PIP2, por sus siglas en inglés, *Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate*) generando así el fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3, por sus siglas en inglés, *Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate*). A su vez el PIP3 recluta y activa proteínas que poseen dominios homólogos a pleckstrina (PH). Entre ellas la quinasa dependiente de fosfoinositidos PDK1, fosforila y activa varias enzimas río abajo incluyendo la serina/treonina quinasa Akt (o proteína quinasa B) y la proteína quinasa C (Mora *et al.*, 2004). Asimismo, PIP3 facilita directamente la activación de Akt mediando su translocación a la membrana a través del dominio PH. La activación de Akt, a su vez, regula varias enzimas metabólicas y está involucrada en el metabolismo de la glucosa dado que activa e induce la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) a la membrana plasmática (Taguchi y White, 2008).

La vía de PI3K/Akt regula también a la proteína mTOR (por sus siglas en inglés, *Mammalian target of rapamycin*) la cual está tanto involucrada en la regulación del crecimiento como del metabolismo celular (Taniguchi *et al.*, 2006). Río abajo de este complejo se encuentran dos cascadas que controlan la transcripción génica: la vía de la quinasa p70S6 (p70S6K) y la vía de de la proteína 1 de unión a eIF4E (4E-BP1) (Wang y Proud, 2006).

La vía de Ras/MAPK

Grb2 es una proteína adaptadora que se une a las proteínas IRS fosforiladas a través de su dominio SH2. A través de su dominio SH3 Grb2 activa al factor intercambiado de GTP (GEF) mSos el cual a su vez activa a p21ras (Ras), una proteína de unión a GTP con actividad de GTP-asa. El IR fosforilado activa a Ras a través de las proteínas Shc las cuales se unen a Grb2. Esto lleva a la activación sostenida de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2, por sus siglas en inglés, *Extracellular signal regulated kinase 1/2*) en respuesta a insulina.

Ras activa recluta y activa a la serina/treonina quinasa Raf, que desencadena una cascada de fosforilaciones. Raf fosforila a MEK1 activándola, luego MEK1 fosforila a ERK 1/2, una quinasa de la familia de las MAPK. En su forma inactiva ERK 1/2 se localiza fundamentalmente en el citosol donde se une a MEK1 formando un heterodímero MEK1/ERK 1/2 (Cohen, 2006; Taguchi y White, 2008). Cuando se fosforila ERK 1/2 se disocia de MEK1 y transloca al núcleo donde fosforila a numerosos sustratos (SRC-1, Pax6, NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc y STAT3)

involucrados en un complejo programa transcripcional (Ceresa y Pessin, 1998; Roux y Blenis, 2004). Además, ERK 1/2 activo fosforila numerosos sustratos en el citoplasma. Dado que ERK 1/2 oscila entre ambos compartimentos su localización subcelular resulta crucial para determinar su respuesta biológica.

Otras MAPK, como la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) y la quinasa p38, también se activan por insulina y contribuyen a la complejidad de la respuesta biológica (Roux y Blenis, 2004).

I.1.8. Modulación de la actividad del IR

La señalización a través del IR se encuentra modulada por diversos factores, algunos conocidos y otros desconocidos hasta el momento. Entre los conocidos se pueden enumerar: los patrones de fosforilación, otras modificaciones post-traduccionales del IR y su localización subcelular (Jensen y De Meyts, 2009).

Modulación de la señalización por los patrones de fosforilación en tirosina del IR

Los niveles y sitios específicos de autofosforilación regulan de manera distintiva y coordinada diversos aspectos de las funciones del IR. Los tres residuos tirosinas (Tyr1158, Tyr1162 y Tyr1163) de la región regulatoria serían fundamentalmente responsables de la activación de la fosforilación de sustratos (White *et al.*, 1988 a; Wilden *et al.*, 1992). La triple fosforilación del dominio quinasa resulta esencial para la completa activación de la quinasa y para la internalización del receptor, sin embargo no es necesaria para la señalización metabólica y los efectos de crecimiento. Esto sugiere que la señalización del IR estaría modulada en parte por el grado de autofosforilación.

Con respecto a las tirosinas del extremo C-terminal (Tyr1328 y Tyr1334), no parecen jugar un papel clave en la activación de la quinasa ni en la internalización (Maegawa *et al.*, 1988; Backer *et al.*, 1992).

Las tirosinas 965 y 972 en la región yuxtamembrana median la selección de sustratos (Gustafson *et al.*, 1995; Kaburagi *et al.*, 1995; Sawka-Verhelle *et al.*, 1997; Chaika *et al.*, 1999). Mientras que la tirosina 972 une a IRS1, Shc y STAT5B, el IRS2 no es dependiente de esta tirosina para ser fosforilado (Chaika *et al.*, 1999) y probablemente interactúa con las tirosinas 1158, 1162 y 1163 del dominio de activación.

La fosforilación de la subunidad β del IR contribuye así a la especificidad de la señalización debido a su influencia sobre toda la actividad quinasa (White *et al.*, 1988b) y por la interacción directa con sustratos individuales (Sun *et al.*, 1991).

Por otro lado, la actividad de fosfatasas también influye sobre los niveles de activación del IR. Otras proteínas que también reducen la actividad del IR son aquellas que bloquean estéricamente su interacción con las proteínas IRS o que modifican su actividad quinasa (Bandyopadhyay *et al.*, 1997; Ueki *et al.*, 2004; Holt y Siddle, 2005; Youngren, 2007).

Efecto de otras modificaciones post-traduccionales del IR

Otros mecanismos de regulación negativa son la fosforilación de residuos serina y/o treonina y la O-glicosilación (Koshio *et al.*, 1989; Ahn *et al.*, 1993; Chin *et al.*, 1993; Liu y Roth, 1994; Al-Hasani *et al.*, 1997; Bossenmaier *et al.*, 1997; Strack *et al.*, 2000; Schmitz-Peiffer, 2002; Coba *et al.*, 2004). Las N-glicosilaciones se demostraron que juegan un papel importante en el plegamiento y procesamiento del IR, incluyendo la formación de los dímeros y el clivado en las cadenas α y β , así como en la correcta localización en la membrana plasmática (Bass *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2000).

Modulación de la señalización por la localización subcelular del IR

Un importante mecanismo de regulación negativa de la actividad del IR que se discutirá con mayor detalle en el **Capítulo 2** es la baja de los niveles de IR en membrana por procesos de internalización y degradación del receptor que se inducen luego de la unión del ligando. Cuando el complejo insulina-IR es internalizado, la insulina se disocia del receptor y es degradada conduciendo al apagado de la señalización. El IR libre es en parte reciclado nuevamente a la superficie (Carpentier *et al.*, 1986) y en parte degradado.

Dentro de los endosomas el IR aún unido a la insulina se mantiene activo con capacidad de fosforilar moléculas efectoras (Sorkin *et al.*, 1993; Bergeron *et al.*, 1995; Grimes *et al.*, 1996). Moléculas involucradas en la vía mitogénica se ha visto que colocan con membranas endosomales (Di Guglielmo *et al.*, 1994; Pol *et al.*, 1998; Rizzo *et al.*, 2000; Sorkin *et al.*, 2000). Por lo tanto, los efectos mitogénicos de la insulina podrían estar siendo señalizados por receptores desde los endosomas. La internalización aparece entonces como un evento clave en la modulación de la señalización del IR: mientras la vía de las MAPK se ve afectada cuando se inhibe la endocitosis, no se detectan efectos en la autofosforilación del receptor ni del IRS ni de

Akt en estos casos (Biener *et al.*, 1996; Ceresa *et al.*, 1998; Hamer *et al.*, 2002). Esto sugiere que la respuesta metabólica de la insulina está siendo totalmente activada a través de los IR localizados en la superficie celular.

Otro trabajo que apoya la hipótesis de la señalización regulada por la localización demuestra que en células β del páncreas la insulina activa la transcripción del gen de la glucoquinasa desde la membrana plasmática (por la vía de PI3K/Akt), mientras que el gen *c-fos* es activado desde los endosomas tempranos (por la vía de Shc/ERK 1/2) (Uhles *et al.* 2007). Esta conexión entre la internalización y el tipo de señalización desencadenada se ha visto también en el caso del EGFR (Di Guglielmo *et al.*, 1994; Vieira *et al.*, 1996) y del receptor del factor α de necrosis tumoral (Wiegmann *et al.*, 1994).

Asimismo, hay trabajos que sugieren un potencial antagonismo de los microdominios de la membrana en la señalización de la insulina. Cuando se sustrae el colesterol a hepatocitos, se desarman los dominios ricos en caveolina y se inhibe la activación de Akt y la síntesis de glucógeno (Parpal *et al.*, 2001).

Sin embargo, la importancia de estos microdominios así como de los dominios ricos en caveolina en la señalización de la insulina y su especificidad continúa en debate.

I.2. BIOLOGÍA DE LAS ISOFORMAS DEL IR

I.2.1. Generación del IR-A y del IR-B

La inclusión/exclusión del exón 11 se encuentra regulada diferencialmente en diversos tejidos. Mientras que en los tejidos adultos el IR-A se expresa de manera ubicua, la isoforma B se expresa predominantemente en tejidos altamente sensibles a la insulina como el hígado, el tejido adiposo, el músculo y el riñón donde es responsable de la respuesta metabólica a insulina (Moller *et al.*, 1989; Mosthaf *et al.*, 1990). El IR-A se expresa predominantemente en tejidos fetales y tumorales. Una relación IR-A:IR-B elevada está implicada en la resistencia a la insulina que muestran los pacientes con distrofia miotónica y posiblemente en aquellos con Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) (Denley *et al.*, 2003).

Las secuencias y mecanismos involucrados en el *splicing* alternativo del exón 11 se conocen sólo parcialmente. Se han identificado secuencias ricas en purinas en el extremo 5' del exón 10 que funcionarían como moduladores positivos (*splicing*

enhancer) incrementando la inclusión del exón 11 (Kosaki *et al.*, 1998). Se han encontrado también regiones dentro del exón 11 que determinan el grado de inclusión tanto de manera positiva como negativa.

Más recientemente, se describió un mecanismo que favorece la relación IR-A:IR-B que se encuentra presente en pacientes con distrofia miotónica tipo 1. La expansión propia de esta enfermedad en la región 3' no transcrita el gen del proteína quinasa de la distrofia miotónica (*dmpk*) genera que este ARNm se concentre en el núcleo secuestrando ciertos factores de *splicing* (MBNL1, *muscleblind 1 protein*) que son necesarios para la inclusión del exón 11 en el mensajero del IR (Miller *et al.*, 2000; Fardaei *et al.*, 2002). Asimismo, otros se encuentran expresados de manera anormalmente elevada, incluyendo la proteína de unión a repeticiones CUG (CUG-BP1, perteneciente a la familia de proteínas CELF) y las proteínas de unión a ARN, hnRNP H (Ladd *et al.*, 2001). Los elevados niveles de estas dos proteínas conducen a la formación de un complejo dependiente de ARN que inhibe la inclusión del exón 11, lo cual genera que predomine la isoforma A del IR. Todo esto sugiere que la expresión de las isoformas del IR se encuentra muy finamente regulada por el balance entre las proteínas MBLN, CELF y hnRNP H.

I.2.2. Propiedades de unión y de internalización del IR-A y del IR-B

El IR-A une insulina con una afinidad mayor que el IR-B (Mothaf *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1993). Asimismo se ha demostrado con diversas aproximaciones bioquímicas que la isoforma A se internaliza y recicla más rápidamente que el IR-B (Yamaguchi *et al.*, 1991; Vogt *et al.*, 1991).

Resulta interesante que este receptor puede unir otros ligandos: IGF-I e IGF-II. Por lo tanto, un mismo receptor puede desencadenar respuestas diferentes en función del ligando unido y a la vez un mismo ligando produce cascadas diferenciales a través de las dos isoformas del IR las cuáles solo difieren en 12 aminoácidos. Numerosos estudios mostraron que el IGF-II y la insulina se unen al IR-A con similar afinidad, pero, mientras la insulina desencadena la respuesta metabólica, el IGF-II conduce a la aparición de efectos mitogénicos (Morrione *et al.*, 1997; Frasca *et al.*, 1999; Sciacca *et al.*, 2002; Pandini *et al.*, 2003). Mientras tanto, el IR-B une IGF-II con baja afinidad. En el caso del IGF-I no se ven estas diferencias de afinidad entre isoformas si bien resulta menor que la insulina (Yamaguchi *et al.*, 1993; Frasca *et al.*, 1999; Pandini *et al.*, 2002; Benyoucef *et al.*, 2007).

Estudios con mutantes de los IR y quimeras de los ligandos han permitido concluir que los sitios de unión del IR-A y del IR-B son levemente diferentes (Whittaker *et al.*, 2002; Denley *et al.*, 2004). Se cree que existe una interacción directa de la insulina y el IGF-II con el péptido codificado por el exón 11 aunque aún no ha podido ser demostrada.

La activación del IR por diversos ligandos conduce a efectos biológicos distintos probablemente por diferencias en la interacción ligando-receptor, en las tasas de internalización y en los patrones de fosforilación del receptor. Esta temática se abordará en mayor detalle en el **Capítulo 5**.

I.2.3. Señalización del IR-A y del IR-B

Muy poco se sabe acerca de los detalles moleculares que subyacen a la señalización diferencial del IR por distintos ligandos. Se sugiere que estas diferencias pueden estar asociadas a un reclutamiento y activación diferencial de moléculas que son sustrato del IR así como con cambios en la expresión génica. Varios trabajos utilizaron análogos de la insulina, péptidos miméticos y anticuerpos contra el IR con el objeto de estudiar cómo es la interacción entre el ligando y el receptor a nivel molecular estableciendo correlaciones con la señalización. Asimismo, la acción del IR puede estar modulada por su grado de fosforilación: la vía de Akt puede ser activada completamente con niveles de fosforilación menores a los necesarios para activar totalmente la vía de las MAPK (Jensen *et al.*, 2007). Por lo tanto las diferencias en las respuestas biológicas estimuladas por diversos ligandos a través del IR pueden estar reflejando: i) diferentes grados de fosforilación del IR o bien ii) localizaciones distintas (superficie celular versus compartimentos endosomales) del receptor lo cual influye en las moléculas señalizadoras disponibles para ser fosforiladas por el IR.

La localización en diferentes microdominios de la membrana plasmática del IR-A y del IR-B sólo ha sido informada en células β del páncreas (Uhles *et al.*, 2003). En este mismo modelo se ha demostrado que, mientras la transcripción del gen de la insulina es promovida por el IR-A a través de la vía de PI3K clase 1A y de p70S6K, la del gen de la β -glucoquinasa está regulada por la vía IR-B/PI3K clase II/Akt (Leibiger *et al.*, 2001). Si bien la localización diferencial del IR-A y del IR-B no fue confirmada en otros modelos, sí han sido reportados numerosos estudios que confirman la señalización diferencial de ambas isoformas (Wu *et al.*, 2003; Nevado *et al.*, 2006 y 2008).

Además de las diferencias entre el IR-A y el IR-B, existen diferencias en la señalización del mismo receptor (IR-A) en respuesta a dos ligandos diferentes, insulina o IGF-II. El IGF-II induce a través de esta isoforma la respuesta proliferativa, mientras que la insulina activa preferentemente el transporte de la glucosa (Morrione *et al.*, 1997; Frasca *et al.*, 1999). Estas diferencias coinciden con diferencias cuantitativas y temporales en la fosforilación de sustratos intracelulares en respuesta a la unión de insulina e IGF-II (Frasca *et al.*, 1999; Sciacca *et al.*, 2002). La diferencia en la señalización de la insulina y del IGF-II a través del IR-A finalmente se refleja en distintos patrones globales de expresión génica (Pandini *et al.*, 2003).

Las isoformas del IR en el desarrollo

La insulina y los IGF son importantes durante el desarrollo tanto de vertebrados como de invertebrados. En mamíferos en particular, el IR y el IGF-IR se expresan tempranamente en los tejidos fetales (Kaplan, 1984). El IR-A se expresa predominantemente en estos tejidos, mientras que el IR-B aparece luego del nacimiento en los tejidos sensibles a la insulina. El IR-A juega entonces un papel en la mediación de algunos de los efectos del IGF-II que promueven el crecimiento embrionario (Louvi *et al.*, 1997).

Por su parte, la expresión del IGF-II disminuye luego del nacimiento en ratones, por lo tanto los efectos del IR que promueven el crecimiento son mediados por la insulina a partir de entonces (DeChiara *et al.*, 1990). En cambio en humanos, los niveles de IGF-II persisten en la vida adulta (Nakae *et al.*, 2001).

El IGF-I y el IGF-II desempeñan diferentes funciones en el desarrollo de la placenta. Los datos indican que el IGF-I regula la diferenciación de determinadas células, en cambio el IGF-II regularía el intercambio de nutrientes. Estas diferencias en el desarrollo placentario son compatibles con la posibilidad de que el IGF-II actúe a través del IR-A y el IGF-I a través del IGF-IR.

Función de las isoformas del IR en la diferenciación celular

La expresión relativa del IR-A y del IR-B cambia durante el proceso de diferenciación celular. Mientras que la isoforma A es predominante en estadios no diferenciados, la expresión predominante del IR-B está asociada a la diferenciación celular en numerosos modelos. La diferenciación de pre-adipocitos en adipocitos está asociada con un incremento importante del contenido total de IR y con un marcado cambio de expresión de la isoforma A a la B (Entingh *et al.*, 2003). Este cambio

también se produce en células 3T3-L1 cuando se las diferencia a adipocitos en presencia de dexametasona (Kosaki y Webster, 1993). Por lo tanto, es lógico pensar que el incremento de la relación IR-A:IR-B así como el aumento de la relación IR:IGF-IR es importante para la diferenciación de los adipocitos.

Un cambio en los perfiles de expresión similar se observa en hepatocitos. Cuando células HepG2 se crecen en condiciones estándar expresan aproximadamente 80 % de IR-A mostrando un fenotipo fetal (incluyendo la síntesis de α -fetoproteína). En cambio, cuando se las cultiva con bajos niveles de suero y en presencia de dexametasona, las mismas se diferencian y muestran niveles de expresión del IR-B cercanos al 80 %, porcentaje similar al observado en hepatocitos adultos (Kosaki y Webster, 1993; Pandini *et al.*, 2002).

Expresión de las isoformas del IR y cáncer

Una gran cantidad de evidencia se ha acumulado en los últimos años indicando que el IR se encuentra expresado de manera anormal en las células tumorales, donde actúa mediando tanto los efectos metabólicos como los no metabólicos de la insulina. Más recientemente, fue posible confirmar que el *splicing* del exón 11 del *Ir* se encuentra alterado en células cancerosas aumentando la relación IR-A:IR-B. Esto afecta la respuesta celular a los niveles circulantes de insulina e IGF.

El IR se encuentra sobreexpresado en tumores de mama, generando una mayor sensibilidad de los mismos a la insulina (Pezzino *et al.*, 1989; Papa *et al.*, 1990; Fritita *et al.*, 1993). Y además se observa que la isoforma A se encuentra expresada en mayor proporción que la B (Sciacca *et al.*, 1999). Las células tumorales de mama producen además IGF-II de manera autócrina, por lo tanto el crecimiento celular se estimula a través del IR-A (Sciacca *et al.*, 1999).

Por otro lado, en células de tumores de tiroides también se observa una expresión predominante de la isoforma A del IR la cual, además, está relacionada con el grado de diferenciación del tumor (Vella *et al.*, 2002). En este tipo de tumores también el IGF-II se produce autócrinamente y de este modo la señalización mitogénica a través del IR-A se ve considerablemente aumentada. Similar situación se da en células tumorales de ovario (Kalli *et al.*, 2002).

Los mecanismos responsables de la expresión anormal del IR así como los que favorecen a la isoforma A en las células tumorales no se conocen totalmente. Se hipotetiza que son similares a los mecanismos que operan durante el desarrollo

embrionario que también está caracterizado por el incremento en la relación IR-A:IR-B. El *splicing* alternativo del exón 11 y los factores que lo modulan se presentan como candidatos. Por otro lado, la proteína p53, que actúa fisiológicamente como un represor del promotor del IR, se encuentra inactivada en un alto porcentaje de tumores, siendo así otro candidato posible (Webster *et al.*, 1996).

La expresión aberrante del IR-A contribuye a la desregulación de la respuesta a insulina y a IGF-II que presentan las células tumorales por diversos mecanismos. En primer lugar, la sobreexpresión del IR sensibiliza las células a efectos pleiotrópicos de la insulina circulante, especialmente en pacientes con hiperinsulinemia. Un segundo mecanismo consiste en que la sobreexpresión del IR-A aumenta la cantidad de sitios de unión a IGF-I ya que se forman más híbridos con el IGF-IR (IGF-IR/IR-A). Estos híbridos unen insulina pero con menor afinidad (Pandini *et al.*, 2002; Beyounef *et al.*, 2007). El tercer mecanismo es la alta afinidad del IR-A por el IGF-II el cual se produce en altas cantidades en las células tumorales. El cuarto mecanismo es que la expresión desregulada del IR-A induce altas relaciones IR-A:IR-B e IR-A:IGF-IR causando pequeñas pero significativas diferencias biológicas en la señalización inducida por ligando. La unión de IGF-II al IR-A estimula el crecimiento y la proliferación celular, mientras que el IR-B no une IGF-II con afinidad comparable, estando este receptor asociado con la señalización metabólica y de diferenciación. Por el otro lado, una alta relación IR-A:IGF-IR favorece los efectos del IGF-II por sobre los del IGF-I

Función de las isoformas del IR en la Diabetes Mellitus Tipo 2

La DMT2 es una patología en la cual existe resistencia a la insulina en tejidos musculares, hepáticos y adiposos junto con un impedimento creciente en la secreción de insulina. Si el balance de isoformas está involucrado en la resistencia a insulina y en la DMT2 no está del todo claro actualmente.

Se ha encontrado reducida la expresión del IR-A en músculo esquelético de pacientes con DMT2 en comparación con individuos control y se ha sugerido que esto puede explicar la menor respuesta a insulina en la DMT2 ya que se trata de la isoforma con mayor afinidad por esta hormona (Mosthaf *et al.*, 1991). Por otro lado, algunos trabajos demuestran una reducción en la relación IR-A:IR-B en pacientes con DMT2 (Sesti *et al.*, 1991; Kellerer *et al.*, 1993, Norgren *et al.*, 1993), mientras que otros afirman lo contrario (Bencke *et al.* 1992; Anderson *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1993). Las relaciones altas IR-A:IR-B también pueden explicarse dado que la isoforma A si bien une con más afinidad la insulina señala menos la vía metabólica que la isoforma

B (Kellerer *et al.*, 1992; Kosaki *et al.*, 1995). Además, se postula que si aumenta la proporción de IR-A, el IR-B se encontraría heterodimerizando con el IR-A disminuyendo entonces los homodímeros IR-B/IR-B que señalizan más eficientemente hacia la vía metabólica, aumentando así los dímeros que pueden señalizar en respuesta al IGF-II activando la vía mitogénica (Huang *et al.*, 1994; Blanquart *et al.*, 2008)

La gran cantidad de trabajos publicados tanto en modelos animales como de estudios clínicos resulta de difícil interpretación dada las diferencias entre modelos y aproximaciones experimentales utilizadas. Pero también esta dificultad reside en que la DMT2 en sí misma es un síndrome heterogéneo y complejo. Esta etiología hace que el *splicing* del *Ir* pueda estar alterado por diversos factores, incluyendo la hiperinsulinemia, la hiperglucemia, la edad, la etapa de la enfermedad y alteraciones genéticas.

I.3. RECEPTORES HÍBRIDOS

I.3.1. Híbridos IR-A/IR-B

Ambas isoformas del IR se coexpresan en la mayoría de las células; por lo tanto, es esperable que homodimericen (IR-A/IR-A o IR-B/IR-B) o puedan heterodimerizar (IR-A/IR-B). La mayoría de los estudios abordaron esta temática de bioquímicamente sobreexpresando una isoforma, la otra o ambas conjuntamente y analizando diferentes propiedades: afinidad, internalización, señalización.

Más recientemente, el grupo de Leibiger ha publicado una serie de trabajos en células β del páncreas mostrando que existe una señalización diferencial de las isoformas IR-A e IR-B que modula los niveles de transcripción de distintos genes (Leibiger *et al.*, 2001). Además, han encontrado que estas dos isoformas se localizarían en microdominios distintos de la membrana plasmática (Uhles *et al.*, 2003) permitiendo esto una señalización distinta. Hasta el momento esto sólo se informa en este tipo celular y no ha sido confirmado de manera independiente ni en otros tejidos.

Por otro lado, dos trabajos recientes utilizando la técnica de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET, por sus siglas en inglés, *Bioluminescence resonance energy transfer*) muestran que los dímeros IR-A/IR-B existen pero en ambos casos las mediciones se realizan sobre lisados celulares con lo cual se están midiendo los dímeros presentes en la membrana pero también aquellos

que aún están siendo procesados en el RE y el Golgi (Benyoucef *et al.*, 2007; Blanquart *et al.*, 2008).

Uno de estos trabajos (Benyoucef *et al.*, 2007) aborda esta discrepancia reconociendo el estudio de Uhles y colaboradores (2003) como específico del modelo utilizado pero no de relevancia general. Este trabajo plantea que la dimerización de pro-receptores y la formación de puentes disulfuro son eventos inmediatamente post-traduccionales en el RE (Olson *et al.*, 1988). Si existiera una segregación de las isoformas para prevenir la heterodimerización debería ocurrir en este compartimento y actualmente no existen pruebas de que esto ocurra ni hay evidencias de intercambio de puentes disulfuro en etapas posteriores a la maduración y al tráfico del receptor. Por lo tanto, concluyen que si existen los mecanismos que previenen la heterodimerización de las isoformas del IR y que las localizan en regiones diferentes de la membrana plasmática, estos deben ser específicos de ciertos tipos celulares (Benyoucef *et al.*, 2007).

I.3.2. Híbridos IR/IGF-IR

Cuando el IR y el IGF-IR se coexpresan, estos receptores pueden heterodimerizar formando receptores híbridos IR-A/IGF-IR e IR-B/IGF-IR. La existencia de estos receptores fue hipotetizada primeramente en 1983 (Kasuga *et al.*, 1983) y luego fue confirmada en membranas de placenta humana en distintos trabajos (Soos *et al.*, 1989, 1990 y 1993; Yamaguchi *et al.*, 1993). La heterodimerización se debe al alto grado de homología entre los dos receptores y se cree que ocurre con similar eficiencia que la homodimerización dependiendo de los niveles de expresión de cada receptor. Sin embargo, en ciertos cánceres el contenido de receptores híbridos IR/IGF-IR es mayor que el predicho si la formación fuera aleatoria (Pandini *et al.*, 1999) sugiriendo, entonces, que otros factores aún no conocidos deben estar modulando el ensamblado tanto de homodímero como de heterodímeros.

Las funciones fisiológicas de estos receptores híbridos son objeto de estudio de múltiples grupos de investigación. En muchos casos los resultados son discrepantes y esto puede deberse a la gran variedad de modelos y técnicas experimentales utilizadas (Pandini *et al.*, 2002; Slaaby *et al.*, 2006; Benyoucef *et al.*, 2007).

La mayoría de los tumores humanos sobreexpresan ambos receptores, el IR y el IGF-IR (Papa *et al.*, 1993; Pandini *et al.*, 1999; Vella *et al.*, 2001), por lo tanto es esperable una sobreexpresión de receptores híbridos IR/IGF-IR. Dado que el IR-A se

expresa más en células tumorales estos híbridos están formados mayoritariamente por la isoforma A del IR (IR-A/IGF-IR).

Existen estudios coevolutivos basados en el análisis de la cascada de señalización de la insulina/IGF-I en diversas especies de vertebrados. Se examinó la relación coevolutiva entre diferentes proteínas de la vía cuantificando las similitudes de los árboles filogenéticos. Estos estudios indican que el IR tiene una relación coevolutiva mayor con la insulina que con el IGF-I o IGF-II. Del mismo modo, el IGF-IR presenta una relación coevolutiva mayor con el IGF-I que con la insulina. Pero es interesante notar que tanto el IR como el IGF-IR comparten una similar y baja relación evolutiva con el IGF-II (Dou *et al.*, 2006). Estos estudios sugieren entonces que a lo largo de la evolución las cascadas de señalización metabólica (insulina/IR) y del crecimiento (IGF-I/IGF-IR), se separaron conservando interacciones entre las dos vías (IGF-II/IR-A; IGF-II/IGF-IR).

Todos estos datos en conjunto indican que la exclusión del exón 11 del *Ir* y el incremento de la abundancia relativa del IR-A proveen un mecanismo por el cual se incrementa la señalización del IGF-II y a la vez se favorece la interconexión (*crosstalk*) entre las vías de señalización del IR y del IGF-IR. Estos mecanismos resultan claves durante la embriogénesis y el desarrollo fetal así como en procesos tumorales. En cambio, la inclusión del exón 11 del *Ir* y la consecuente elevación de la abundancia relativa del IR-B conducen a una disminución de la respuesta a IGF-II y favorecen los efectos metabólicos de la insulina en tejidos diferenciados.

El hecho de que los mamíferos hayan adquirido un nuevo exón en el gen *Ir* y la capacidad de procesarlo de manera alternativa incluyéndolo o excluyéndolo de manera temporal y tejido específico sugiere al *splicing* alternativo como un nuevo mecanismo de regulación de la señalización del IR.

I.4. Estudio de procesos celulares *in vivo*

En los últimos años distintas estrategias de marcación de biomoléculas han dado una visión espacial y temporal de la dinámica de proteínas en células vivas (Jares-Erijman y Jovin, 2003; George *et al.*, 2004; Marks y Nolan, 2006). Si bien las proteínas de fusión con proteínas fluorescentes (VFP) han revolucionado estos estudios, las mismas presentan desventajas que han llevado a buscar nuevas alternativas. Para ciertas aplicaciones resultan demasiado grandes pudiendo interferir con la localización, la estructura o la actividad de las proteínas a las que se las fusiona. Por otra parte, no son sensibles al medio (pH, hidrofobicidad, concentración

de iones), ni lo suficientemente brillantes ni fotoestables para estudios *in vivo* prolongados. Existen en cambio, gran cantidad de sondas que permiten mayor flexibilidad a la hora de estudiar procesos celulares en tiempo real.

El uso de nanopartículas semiconductoras luminiscentes, denominadas quantum dots (QD) unidos a ligandos naturales provee una herramienta para la visualización *in vivo* y en tiempo real de las múltiples etapas de los mecanismos de señalización en células vivas. Entre las ventajas de los QD es posible mencionar su amplio espectro de excitación que favorece la excitación simultánea de estos con VFP. Además, presentan una banda de emisión angosta, emitiendo a distintas longitudes de onda en función de su tamaño (**Figura I.8**).

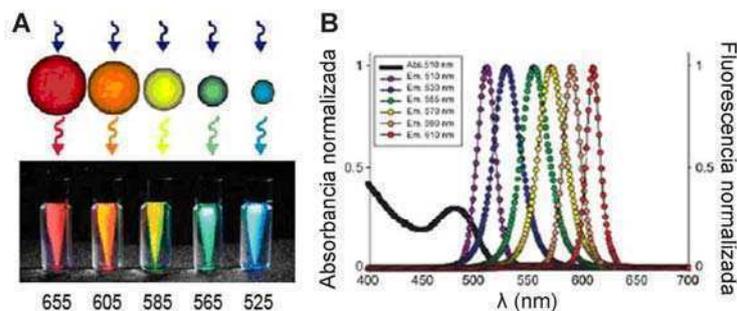


Figura I.8. Quantum Dots. **A.** Diversos QD absorbiendo en la región ultravioleta del espectro electromagnético y emitiendo entre 525 nm y 655 nm en función del tamaño (tomado de Invitrogen). **B.** Propiedades espectrales de los QD. Absorción normalizada de QD con una banda de emisión en 510 nm (QD-510, curva negra), y emisión normalizada de diferentes QD en solución. Tomado de Medintz *et al.*, 2005.

Por otra parte, el brillo de los QD es intenso y uniforme lo que permite la detección al nivel de partículas individuales y la cuantificación de fenómenos de unión y transporte. Su alta especificidad y estabilidad bioquímica y la posibilidad de trabajar con estequiometrías ajustables hacen de los QD herramientas óptimas para los estudios de dinámicas celulares *in vivo*. Así, los ligandos unidos a QD en combinación con proteínas de membrana marcadas con sondas fluorescentes o sensibles al medio han sido una excelente herramienta para estudios *in vivo* de fenómenos de señalización y transporte (Lidke *et al.*, 2004, 2005 y 2007; Cambi *et al.*, 2007; Echarte *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2009). Durante el trabajo de esta tesis se recurrió al uso de ambas herramientas: las proteínas fluorescentes y las nanopartículas para visualizar a los ligandos y a los receptores.

Existen además otras tecnologías que permiten modificar proteínas de membrana en sus porciones extracelulares a través de la introducción de pequeños *tags* (desde 77 aminoácidos hasta tan sólo 11 residuos) (George *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2005 a; Jacquier *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2006 a y b; Zhou *et al.*, 2007). Estas

secuencias pueden ser reconocidas específicamente por enzimas que transfieren un grupo fosfopanteteinilo de la Coenzima A (CoA) a una serina conservada dentro de esa secuencia. Cuando la CoA está modificada a través de su grupo sulfhidrilo con un grupo fluorescente pequeño o con una biotina esa modificación es entonces introducida por la enzima en la proteína de membrana en cuestión. En el caso de CoA fluorescentes esto ya permite poder visualizar *in vivo* la proteína de interés y cuando la CoA presenta una biotina permite su marcación posterior con fluoróforos unidos a estreptavidina (SA) o bien con QD conjugados a SA.

Las grandes ventajas de este método que se presentará con mayor detalle en los **Capítulos 3 y 4** son: i) permite modificar las proteínas de interés con sondas pequeñas, o bien con QD introduciendo secuencias mucho más pequeñas que las VFP en la proteína de interés; ii) permite modificar exclusivamente la proteína presente en la membrana plasmática pudiendo entonces diferenciarla de aquella que aún no fue localizada en la superficie celular; iii) permite una modificación covalente; iv) la marcación puede realizarse *in vivo* y luego estudiar procesos dinámicos en tiempo real y, finalmente, v) es posible combinar *tags* y enzimas que permiten modificar ortogonalmente isoformas de un mismo receptor o bien subunidades de una misma proteína (Kropf *et al.*, 2009).

Por otra parte, existen diversas espectroscopías de fuerza que posibilitan medir interacciones entre moléculas en la superficie de las células al nivel molecular (Chen *et al.*, 2008; Moffitt *et al.*, 2008; Neuman *et al.*, 2008). Entre ellas, la microscopía de fuerza atómica (AFM) es la única que permite medir y localizar interacciones específicas en las superficies celulares con alta resolución, del orden de los 10 nm (Bining *et al.*, 1986; Gerber y Lang, 2006). Esto convierte al AFM en la herramienta ideal para detectar fuerzas de unión receptor-ligando individual (~ 60-80 pN) *in vivo*. La utilización del AFM en combinación con las herramientas biológicas generadas en la tesis se desarrollará en detalle en el **Capítulo 6** con el objetivo de estudiar la interacción ligando-receptor para cada isoforma del IR al nivel de moléculas individuales.

I.5. OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general de esta tesis es estudiar la dinámica espacial y temporal del IR y su(s) ligando(s), centrando la atención en los procesos de interacción ligando-receptor, de endocitosis de ambas isoformas y su efecto en la señalización desencadenada por cada una. Se diseñaron y generaron entonces un conjunto de herramientas que permitieran “mirar en la superficie y dentro” de las células vivas (**Capítulo 1**) y fueron utilizadas para estudiar la unión del ligando a su receptor y su internalización poniendo la atención en la comparación entre isoformas. Esta parte de la tesis se presenta en el **Capítulo 2**.

Otro objetivo central de esta tesis es el desarrollo de una estrategia que permita modificar el IR en su porción extracelular con el objeto de distinguir el receptor ya localizado en membrana del que aún está siendo procesado en el RE y en el aparato de Golgi. Este desarrollo se presenta en el **Capítulo 3**. Los objetivos iniciales de este capítulo abrieron nuevos interrogantes: explorar con estas herramientas la existencia de los receptores híbridos IR-A/IR-B exclusivamente en la membrana y estudiar sus propiedades. Este es un tema controvertido en la literatura debido fundamentalmente a la no accesibilidad a técnicas que permitan distinguir estas dos isoformas (no existen anticuerpos dirigidos específicamente contra cada una de ellas) y a su vez diferenciar el IR en membrana del que está siendo procesado. El abordaje de estos objetivos y los resultados se encuentran en el **Capítulo 4**.

La posibilidad de visualizar la endocitosis por microscopía confocal y cuantificarla célula por célula permitió revelar una mayor internalización para el IR-A que para el IR-B en respuesta a insulina en concordancia con otros trabajos basados en aproximaciones bioquímicas (Vogt *et al.*, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1991). Este resultado condujo entonces a tres nuevos objetivos: i) explorar las potenciales influencias de esta dinámica de endocitosis diferente en la cascada de señalización de cada IR (**Capítulo 2**); ii) ampliar la estrategia al estudio del IGF-II el cual posee propiedades distintas de unión a las isoformas del IR (**Capítulo 5**) y iii) estudiar la interacción ligando-receptor de cada isoforma a nivel de moléculas individuales por espectroscopía de fuerza atómica (**Capítulo 6**).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. Materiales y métodos

En esta sección se describen los materiales y métodos utilizados en la tesis.

II.1. MATERIALES

II.1.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Las sales fueron de Anedra (Estados Unidos (EEUU) o Argentina), Biopack (Argentina), o Ciccarelli (Argentina). El bromuro de etidio, la agarosa y Tris Base fueron de Promega (Madison, EEUU). El β -mercaptoetanol, L-(+)-arabinosa, dodecilsulfato de sodio (SDS), paraformaldehído (PFA), archilamida, bis-acrilamida, ortovanadato de sodio, así como el luminol, el ácido p-cumárico, y los colorantes *Coomassie Brilliant Blue R-250* y azul de bromofenol fueron de SIGMA-Aldrich (Steinheim, Alemania).

La insulina humana recombinante (rhIns) fue cedida por Laboratorios BETA S.A. (Argentina). La insulina biotina y la insulina biotina amido caproyl (BAC-Ins) ambas bovinas (páncreas) y la insulina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-Ins) fueron SIGMA (Munich, Alemania). El IGF-II biotinilado (IGF-II-biot) fue de IBT system (Reutlingen, Alemania), mientras que el IGF-II recombinante humano fue adquirido a Gro Pep (Adelaide, Australia). Los quantum dots 655 conjugados con SA y modificados con grupos de polietilenglicol (Peo) (denotados a partir de ahora QD655) así como los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados a Alexa flúor 555 fueron de Molecular Probes, Invitrogen (Eugene, Oregon, EEUU). La Lipofectamine Reagent 2000 de Invitrogen (Carlsbad, EEUU).

El fluoróforo atto488 derivatizado como maleimido (atto488-maleimido) fue de AttoTec GmbH (Siegen, Alemania). La CoA como sal trilitio fue de FLUKA y la biotina unida a dos grupos Peo como maleimido fue de Pierce (Rockford, EEUU). La biotina-Peo₄ como ácido fue de QUANTA Biodesign LTD (Ohio, EEUU). Los derivados fluorescentes CoA-atto532 y CoA-atto550 fueron cedidos generosamente por la Dra. Donna J. Arndt-Jovin y el Dr. Thomas M. Jovin (Instituto Max Planck de Química Biofísica (MPIbpc), Goettingen, Alemania).

II. Materiales y métodos

Los marcadores de peso molecular fueron: para ADN, 1 kb Plus DNA Ladder de Invitrogen (Carlsbad, EEUU); para proteínas, Prestained SDS-PAGE standard high range, low range o broad range de Bio-Rad (Filadelfia, EEUU), o Full Range Rainbow Molecular Weight Marker de GE, Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido).

Para los experimentos de biología molecular se utilizaron las soluciones reguladoras y enzimas T4 DNA ligasa, T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK), fosfatasa alcalina de camarón (SAP, por sus siglas en inglés, *Shrimp alkaline phosphatase*), Pfu DNA polimerasa, Klenow y enzimas de restricción que fueron de New England Biolabs (Ipswich, EEUU), Promega (Madison, EEUU) e Invitrogen (Carlsbad, EEUU).

La resina Ni-NTA utilizada para la purificación de la proteína ACP sintasa salvaje (ACPwt-S) fue de QIAGEN (Hilden, Alemania). La SA conjugada a esferas de agarosa fue de Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia).

II.1.2. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas empleadas fueron las siguientes:

- *Escherichia coli* DH5 α . F-endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) λ^- : para transformación y obtención de plásmidos.
- *E. coli* TOP10. F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 nupG (notar que esta cepa es araBAD⁻, está repletada de araBA y también de araC y el gen para araD posee una mutación puntual que lo hace inactivo): para expresión de proteína ACPwt-S *in vitro* con el fin de ser purificada.

II.1.3. Líneas celulares

Las células utilizadas durante los experimentos fueron HeLa (línea celular de tipo epitelial derivada de un carcinoma cervical humano), HEK 293 (línea fibroblástica transformada derivada de riñón embrionario humano), A431 (línea celular derivada de carcinoma epidérmico) estable para el EGFR fusionado al tag ACP (por sus siglas en inglés, *Acyl carrier protein*), HepG2 (línea celular de carcinoma hepático humano) y CHO (células de ovario de hámster chino).

Los medios de cultivo DMEM glutamax, suero fetal bovino (SFB), los antibióticos penicilina y estreptomicina, el piruvato de sodio, el suplemento de

II. Materiales y métodos

aminoácidos no esenciales MEM y la tripsina utilizados para cultivo celular fueron GIBCO, Invitrogen (Grand Island, EEUU).

II.1.4. Kits

Ciertas etapas de los experimentos de biología molecular requirieron los siguientes *kits* comercializados por QIAGEN (Hilden, Alemania): QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit. Por otra parte, el *kit* de transfección Effectene Transfection Reagent utilizado también fue de QIAGEN (Hilden, Alemania).

II.1.5. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados durante el trabajo de esta tesis fueron sintetizados por Metabion (Alemania) o por Invitrogen (Argentina). En la **Tabla II.1** se presenta la secuencia de cada oligonucleótido, su temperatura de hibridación (T_m por sus siglas en inglés, *melting temperature*) y el objetivo de su uso.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	T_m °C	Objetivo
A1BamHI-3'	gatcaccatcagactccactccagatgctccagagagtcaccaa	72	Clonado del <i>tag</i> A1 en sitio <i>BamHI</i> .
A1BamHI-5'	gatcttggtgactctctggacatgctggagtgaggatctgatgggt	72	Clonado del <i>tag</i> A1 en sitio <i>BamHI</i>
A1EcoRV-3'	ccccatcagactccactccagatgctccagagagtc	72	Clonado del <i>tag</i> A1 en sitio <i>EcoRV</i>
A1EcoRV-5'	ggtagactctctggacatgctggagtgaggatctgatgggg	72	Clonado del <i>tag</i> A1 en sitio <i>EcoRV</i>
ACP-F	atcatgagcactatcgaagaacgcg	57	Inserción del <i>tag</i> ACP en el IR
ACP-R	cgcttggtggccgttgatg	58	Inserción del <i>tag</i> ACP en el IR
Interno reverse	tagtgggtgatgtgccatt	50	Secuenciación del IR en la región cercana al sitio <i>BamHI</i>
IR-F2	gtttcaagcggagctacgagg	61	Secuenciación del extremo 3' del IR
IR-Forward	<u>aagctt</u> atggccaccggggccgg	62	Amplificación por PCR de la secuencia codificante del IR
IR-Reverse	<u>tctagagctagc</u> gaaggattggaccgaggcaaggtc	61	Amplificación por PCR de la secuencia codificante del IR.
SP6	attaggtgacactatag	41	Secuenciación del extremo 3' del inserto en el pcDNA3
T7	taatacgcactactataggg	48	Secuenciación del extremo 5' del IR
YbbR13-3'	ccctgccagcttactcgcaataaactccagagagtc	72	Clonado del <i>tag</i> YbbR13 en sitio <i>EcoRV</i>
YbbR13-5'	gactctctggagttattgtagtaagctggcaggg	72	Clonado del <i>tag</i> YbbR13 en sitio <i>EcoRV</i>

Tabla II.1. Oligonucleótidos utilizados. Se presentan las secuencias de cada uno así como su T_m y el uso.

II.1.6. Plásmidos

Los plásmidos comerciales así como aquellos cedidos generosamente para este trabajo de tesis se detallan en la **Tabla II.2.**

Nombre	Secuencias/proteína de interés	Proveniencia
pAP1-Luc (Monje <i>et al.</i> , 2006)	(AP-1) x 7-Luc	Dr. Omar Coso (Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular y Celular (LFBM). Argentina)
pBAD-ACPwt-S	ACPwt-S	Dr. Thomas Jovin y Dra. Donna Arndt-Jovin (MPIbpc. Alemania)
pcDNA3	vector de expresión en células de mamífero	Dr. Martín Monte (FCEN. UBA. Argentina)
p-CMV-β-Gal	β-Gal	Dr. Omar Coso (LFBM. Argentina)
pCMV-HA-Akt	Akt-HA	Dra. Anabella Srebrow (LFBM. Argentina)
pCR.2.1.TOPO	vector de clonado	Invitrogen (Carlsbad, EEUU)
peGFP-C3	eGFP	Clontech (Mountain View, EEUU)
pNTK2-hIR	IR-A humano	Dr. Axel Ullrich (MPIbpc. Alemania)
pNTK2-IR/B	IR-B humano	Dr. Axel Ullrich (MPIbpc. Alemania)
pSCFP-3AC (Kremers <i>et al.</i> , 2006)	SCFP	Dr. Dorus Gadella Jr.
pSEMXT-ACPO-GPI	ACP	Dr. Thomas Jovin y Dra. Donna Arndt-Jovin (MPIbpc. Alemania)
pSYFP-2F (Kremers <i>et al.</i> , 2006)	SYFP	Dr. Theodorus W. Gadella Jr, Universidad de Amsterdam, Holanda.

Tabla II.2. Plásmidos utilizados para los experimentos así como aquellos que fueron necesarios para diferentes etapas de los clonados.

II.2. MÉTODOS

II.2. A. Química

II.2. A.1. Síntesis y purificación de derivados de CoA biotinilados o fluorescentes

- ***CoA-Peo₂-biotina***

La reacción de biotinilación de la CoA se realizó de dos modos diferentes: por un lado introduciendo algunas modificaciones en las condiciones reportadas previamente (George *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2005). En el primer caso (George *et al.*, 2004), se partió de sal trilitio de CoA (1 equivalente, eq) disuelta en 50 mM Tris-HCl pH 7.5 agregándose luego 10 volúmenes de dimetil sulfóxido (DMSO) siendo la concentración de CoA en esta solución 21.2 nM. La misma se hizo reaccionar con Biotina-Peo₂-maleimido (1 eq) disuelto en DMSO (concentración Biotina-Peo₂-maleimido: 12.6 nM) a temperatura ambiente (TA) durante 4 h con agitación. Para el segundo caso (Yin *et al.*, 2005), la sal trilitio de CoA se disolvió en 50 mM MES acetato pH 6 (concentración de CoA en esta solución: 11.6 nM), haciéndola reaccionar con Biotina-Peo₂-maleimido disuelto en DMSO (1 eq, concentración Biotina-Peo₂-maleimido: 32.3 nM) a TA con agitación durante toda la noche. El producto de reacción se purificó en ambos casos por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, por sus siglas en inglés, *Fast protein liquid chromatography*) en un equipo ÄKTA Purifier 100, GE Healthcare Life Science, con una columna de fase reversa C18 Kromasil MZ refill 100 (tamaño de partícula: 5 µm) de dimensiones 150 mm x 4 mm. La elusión se realizó con un gradiente acetonitrilo: agua / 0.1 % ácido trifluoroacético (TFA) desde 0:100 a 60:40 en 45 min. Se detectó absorbancia a 215 nm (A_{215}) y A_{260} durante la cromatografía. Estas longitudes de onda corresponden a los máximos del espectro de absorción de la CoA (ver **Figura II.1**). Las alícuotas correspondientes a los picos mayoritarios se llevaron a *speed vac* (Thermosavant SPD 121P con trampa de vapor RVT4104 Thermosavant) con el fin de evaporar el solvente orgánico, se congelaron en nitrógeno líquido y fueron liofilizadas.

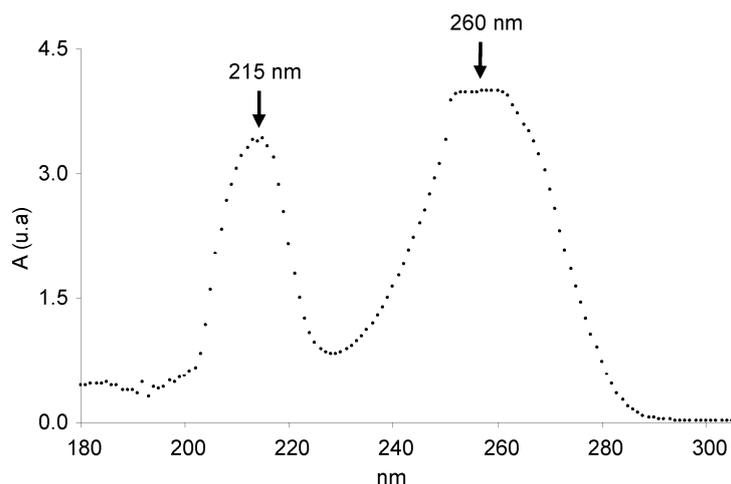


Figura II.1. Espectro de absorción de la sal trilitio de la CoA disuelta en una solución reguladora 100 mM fosfato de sodio pH 7.9. Se muestran los dos máximos, siendo estas longitudes de onda las elegidas para monitorear la purificación por FPLC.

Los productos de la purificación (picos mayoritarios) se caracterizaron por Espectrometría de masa MALDI-TOF (por sus siglas en inglés, *Matrix-assisted laser desorption ionization*) en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría MALDI-TOF (CEQUIBIEM) (FCEN, UBA, Argentina). El CEQUIBIEM cuenta con un espectrómetro de masas UV-MALDI-TOF/TOF modelo Ultraflex II de Bruker Daltonics. Se utilizó ácido 3-hidroxipicolínico (HPA, cedido por Dr. Francisco Baralle, ICGEB, Trieste, Italia) como matriz (Schlüter, *et al.*, 1995) en una concentración de 36.6 mg/ml, en agua. Se ensayaron distintas relaciones matriz-muestra (1:1, 1:5, 1:25, 1:125) siendo 1:1 la más adecuada, de modo que la concentración final de matriz fue 15.3 mg/ml. Finalmente, la cuantificación se realizó por espectrofotometría ($\epsilon_{\text{adenina}260\text{nm}} = 15300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

El producto deseado (CoA-Pe_o₂-biotina) una vez liofilizado se resuspendió en DMSO en una concentración 1 mM guardándose a -20 °C hasta su uso.

- **CoA-atto488**

Por un lado, se disolvió el atto488-maleimido (1 mg, 2 eq) en DMSO (100 μ l); por otro lado, la sal trilitio de la CoA (0.37 mg, 1 eq) se solubilizó en MES pH 7 (50 μ l) agregándose luego igual volumen de DMSO. Se pusieron en contacto ambas soluciones y se dejó que la reacción procediera a 20 °C con agitación durante toda la noche.

El producto de reacción se purificó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés, *High pressure liquid chromatography*) con una

columna C18 Kromasil MZ semipreparativa 100 (tamaño de partícula: 5 μm) de dimensiones 250 mm x 8 mm y el siguiente gradiente de elusión:

1. 2 min acetato de amonio: acetonitrilo (97:3)
2. 20 min de 97:3 a 40:60
3. 5 min de 40:60 a 0:100

Se colectaron los picos mayoritarios, se los llevó a *speed vac* durante toda la noche y luego se los congeló en nitrógeno líquido.

La presencia del producto esperado se evaluó, por un lado, por espectrofotometría midiendo A_{501} y A_{260} calculando luego el cociente entre ambas absorbancias. Por otro lado, las fracciones mayoritarias de la cromatografía se analizaron marcando células A431 vivas expresando establemente el EGFR fusionado al *tag* ACP (utilizando como control positivo CoA-atto488 comercializado por Covalys). La fracción que permitió ver marcación se consideró la que contenía el derivado fluorescente de CoA (CoA-atto488). Esta fracción fue la que presentó un valor A_{501}/A_{260} coincidente con el estimado teóricamente. Esta fracción se diluyó en DMSO hasta una concentración final 1 mM guardándose a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser usada.

II.2. A.2. Biotinilación de insulina humana recombinante

La biotinilación de la rhIns se realizó en dos etapas. En la primera se sintetizó el Peo₄-biotin-NHS (éster N-hidroxisuccinimida de Peo₄-biotina) a partir del ácido correspondiente. Para esto se hizo reaccionar 1 eq (0.0042 mmol) de ácido Peo₄-biotina con 2 eq de N-hidroxisuccinimida (NHS) en dimetilformamida (DMF), agregando luego dicitohexilcarbodiimida (2.5 eq), dejando proceder la reacción durante 4 h a TA. La misma se monitoreó por cromatografía en placa delgada (TLC por sus siglas en inglés, *Thin layer chromatography*) en fase reversa utilizando una mezcla metanol-agua (3:1 y 1:2) como solvente. El revelador utilizado en la TLC fue una solución de Cerio-Molibdeno constituida por 50 g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 1 g/l $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ en 10 % H_2SO_4 .

A continuación se siguieron, con leves modificaciones, las condiciones informadas por Jensen y Wilkinson (1989) para unir covalentemente la biotina a la rhIns. Se hizo reaccionar el producto obtenido anteriormente con 0.0045 mmol de rhIns disuelta en una mezcla DMF / trietilamina (TEA). La reacción continuó durante 6 h a TA con agitación siendo monitoreada por TLC en fase reversa, utilizando una

mezcla metanol-agua (3:1) como solvente. Como revelador se utilizó una solución etanólica 0.2 % *p*-dimetil amino cinamaldehído y 1 % H₂SO₄. La reacción se detuvo por agregado de 1 M ácido acético (HAc), se dializó 3 días contra agua miliQ (mQ), renovándola cada 12 h, utilizando una membrana de diálisis de corte < 3500 Da (Cellu Sep, Seguin, EE.UU). Luego la muestra se liofilizó y se evaluó por espectrometría de masa MALDI-TOF (CEQUIBIEM, FCEN, UBA, Argentina) en las siguientes condiciones: i) sin tratamiento previo; ii) tratada con ditioneitol (DTT); iii) tratada con tripsina; y iv) tratada con tripsina y DTT consecutivamente (Tsai *et al.*, 1997). Para esto la muestra sólida se disolvió en 2 M urea, 15 mM Tris-HCl pH 8, diluyéndola luego en 50 mM (NH₄)₂HCO₃. En el caso del tratamiento con DTT se utilizó una concentración final de 20 mM del agente reductor y se dejó la mezcla 15 min a TA. Cuando el tratamiento fue con tripsina se dejó 1-2 h a 37 °C. En el caso de los dos tratamientos se realizó primero la tripsinización y luego la reducción con DTT. La matriz utilizada en la espectrometría de masas fue ácido sinapínico (10 mg/ml) disuelto en 70 % acetonitrilo / 0.125 % TFA. A esta insulina modificada se la denominará rhIns-biot.

II.2. B. Biología molecular

II.2. B.1. Preparación de bacterias DH5α ultra competentes

Para la preparación de bacterias ultra competentes se siguió el protocolo de Sambrook y Russell (2006). Se picó una colonia y se inoculó un cultivo de 25 ml de medio SOB (*Super optimal broth*: 2 % peptona, 0.5 % extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) al que en el momento se le agregó MgCl₂ hasta una concentración final 10 mM, dejándolo crecer a 37 °C durante 8 h con agitación (300 rpm). Este cultivo se diluyó en 250 ml de SOB (10 mM MgCl₂) 1/25, 1/50 y 1/125. Los cultivos se dejaron crecer a 18 °C hasta una densidad óptica (DO) de 0.55 unidades arbitrarias (u.a). En este momento se dejó el cultivo en agua-hielo durante 10 min y luego se cosecharon las bacterias por centrifugación a 3900 rpm a 4 °C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido cuidadosamente en 80 ml de solución de transformación Inoue estéril y helado (*Inoue transformation buffer*: 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 10 mM PIPES pH 6.7) en hielo. A continuación, se centrifugó a 3900 rpm a 4 °C nuevamente 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 20 ml de la solución Inoue, agregando 1.5 ml de DMSO. Se mezcló por inversión, se dejó en hielo 10 min, se alicuotó y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Las bacterias ultra competentes se guardaron a -80 °C hasta el momento de ser usadas. Se cuantificó la eficiencia siendo esta entre 7 x 10⁶ y 7 x 10⁷ unidades formadoras de colonias/μg ADN.

II.2. B.2. Transformación de bacterias competentes

- ***Transformación química***

Se mezclaron 50 µl de células ultra competentes con el ADN plasmídico (~1 µg) o los productos de ligación (~5 µl). Se incubó durante 30 min en hielo, luego 45 s a 42 °C y nuevamente 5 min en hielo. A continuación se agregaron 950 µl de medio LB (Luria Bertani: 1 % peptona, 0.5 % extracto de levadura, 1 % NaCl) y se dejaron recuperar las bacterias durante 1 h a 37 °C. Se sembró en placas de ágar LB-ampicilina (0.1 mg/ml) que se crecieron durante toda la noche a 37 °C. En algunos casos se sembró la totalidad de bacterias luego de centrifugarlas a baja velocidad y resuspenderlas en un pequeño volumen de medio; en otros casos se sembró una alícuota de la suspensión de bacterias transformadas.

- ***Transformación por electroporación***

Se mezclaron 40 µl de células TOP10 electrocompetentes con el ADN plasmídico en cubeta para electroporación. Los parámetros utilizados fueron los siguientes: 25 µF y 2.2 kv, controlador de pulso a 200 Ω. Luego de la electroporación se dejaron recuperar las bacterias agregando 0.5 ml de medio SOC sin antibiótico (*Super optimal broth with catabolic repressor*: SOB + 20 mM glucosa) incubándolas a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se sembró en placas de ágar LB-ampicilina (0.1 mg/ml) que se crecieron durante toda la noche a 37 °C.

II.2. B.3. Preparación de gliceroles

Se prepararon gliceroles de las bacterias transformadas con los diferentes plásmidos en LB-glicerol (25 %) y se guardaron a -80 °C. hasta el momento de ser usadas.

II.2. B.4. Preparación de ADN plasmídico en pequeña escala (*mini-prep*)

Para preparar ADN se picó una colonia y se inoculó un cultivo de 3 ml de LB-ampicilina (0.1 mg/ml) durante toda la noche a 37 °C con agitación (~300 rpm). Este cultivo se centrifugó a 6000 x g durante 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 0.3 ml de solución P1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasa A). Luego se agregaron 0.3 ml de solución de lisis P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS (p/v)), se mezcló por inversión 6 veces y se incubó a TA durante 5 min. Posteriormente se agregaron 0.3 ml de solución P3 (3 M acetato de potasio pH 5.5) fría y se mezcló por inversión nuevamente 6 veces incubando en hielo

durante 5 min. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 min a 4 °C, se removió el sobrenadante que se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se incubó con 0.6 ml de isopropanol a TA para precipitar el ADN. Luego de mezclar se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min, se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 70 % etanol y se volvió a centrifugar 15 min a 10000 rpm descartando el sobrenadante y dejando secar el precipitado durante 5 min. Finalmente, se resuspendió el ADN en agua mQ y la concentración de ADN se cuantificó por espectrofotometría.

II.2. B.5. Preparación de ADN plasmídico en mediana y gran escala (*midi-prep* y *maxi-prep*)

Para preparar ADN para experimentos en células se siguieron protocolos similares pero en mayor escala utilizando para la purificación columnas QIAGEN-tip 200 (*midi-prep*) y QIAGEN-tip 500 (*maxi-prep*). Se inoculó un cultivo de 3 ml de LB-ampicilina (0.1 mg/ml) durante 8 h a 37 °C con agitación (~300 rpm). Este cultivo se diluyó luego en 300 ml de LB-ampicilina (0.1 mg/ml) y se creció durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se centrifugó a 6000 x g durante 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 20 ml de solución P1. Luego se agregaron 20 ml de solución de lisis P2, se mezcló por inversión 6 veces y se incubó a TA durante 5 min. Posteriormente se agregaron 20 ml de solución P3 fría y se mezcló por inversión nuevamente 6 veces incubando en hielo durante 30 min. Se centrifugó a 20000 x g por 30 min a 4 °C, se removió el sobrenadante para una nueva centrifugación de 15 min. El sobrenadante se sembró en la columna previamente equilibrada con la solución QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanol (v/v), 0.15 % Triton X-100 (v/v)). Se realizaron lavados (2 x 30 ml) con la solución QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanol (v/v)), se eluyó con 5 ml de solución QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 15 % isopropanol (v/v)) y finalmente el ADN se precipitó agregando 10.5 ml de isopropanol. Luego de mezclar se centrifugó a 15000 x g durante 30 min a 4 °C. El precipitado conteniendo el ADN se lavó con 70 % etanol y se centrifugó a 15000 x g durante 15 min, luego de descartar el sobrenadante el precipitado se dejó secar 5 min y se lo resuspendió en agua mQ. Se analizaron los distintos pasos de la purificación por geles de agarosa (pureza, calidad y rendimiento) y se cuantificó la concentración de ADN por espectrofotometría.

II.2. B.6. Digestiones con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron a la temperatura óptima de cada una de ellas durante toda la noche. Se utilizaron las soluciones reguladoras adecuadas para cada enzima o par de enzimas según el fabricante.

II.2. B.7. Ligaciones

Antes de realizar las ligaciones se removieron los grupos fosfato del extremo 5' de los vectores tratando el ADN con SAP durante 30 min a 37 °C, inactivándose luego la enzima durante 15 min a 60 °C. Para las reacciones de ligación se utilizaron los vectores digeridos y desfosforilados incubándolos durante toda la noche a 14 °C con el inserto deseado en relaciones 5:1, 3:1 ó 1:1 (inserto:vector) y con la enzima T4 DNA ligasa en presencia de 1 mM ATP en la solución reguladora provista con la enzima. Para cada ligación se hicieron los controles correspondientes: sin enzima y con enzima pero sin inserto. Con el producto de dichas ligaciones se transformaron bacterias DH5α ultra competentes, se plaqueó en agar LB-ampicilina (0.1 mg/ml) y se dejó crecer toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se picaron las colonias, y se realizaron preparaciones de ADN en pequeña escala. Se analizaron clones positivos por medio de digestiones con enzimas de restricción y geles de agarosa. Finalmente algunos de los clones positivos fueron secuenciados con los primers adecuados.

II.2. B.8. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los geles de agarosa para ADN fueron del porcentaje adecuado para el análisis que se deseaba en cada caso, se utilizó 0.4 µg/ml bromuro de etidio y la electroforesis fue realizada en solución reguladora Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 90 V.

II.2. B.9. Cuantificación de ADN

Para cuantificar las preparaciones de ADN se midió A_{260} en cubeta de cuarzo con paso óptico de 1 cm utilizando un espectrofotómetro Gene Quant Pro de Amersham Biosciences. Se utilizó la Ley de Lambert-Beer para calcular la concentración de ADN según la **ecuación II.1**:

$$A_{260} = a \times l \times [\text{ADN}] \quad \text{[ec. II.1]}$$

donde a es el coeficiente de absortividad de ácidos nucleicos ($50 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l el paso óptico (cm) y $[\text{ADN}]$ la concentración de ADN ($\mu\text{g/ml}$). A su vez, se midió A_{280} y se

calculó el cociente A_{260}/A_{280} siendo este un indicador de la pureza y calidad de la preparación (> 1.5).

II.2. B.10. Generación de vectores de expresión del IR y del IR-VFP

Los clonados para obtener los vectores de expresión de ambas isoformas del IR salvajes así como fusionadas a la proteína fluorescente verde eGFP (a partir de ahora, por simplicidad, se la denotará GFP), o a nuevas variantes de las proteínas fluorescentes cian (SCFP) o amarilla (SYFP) (Kremers *et al.*, 2006) se realizaron como se detalla a continuación:

- ***pcDNA3-IR-A* y *pcDNA3-IR-B***

Se amplificó por PCR la secuencia codificante para el IR-A e IR-B a partir de los vectores pNTK2-hIR y pNTK2-IR/B con oligonucleótidos específicamente diseñados (IR-*Forward* e IR-*Reverse*) introduciendo en el extremo 5' un sitio de restricción para la enzima *Hind* III y un sitio *Nhe* I y otro *Xba* I en el extremo 3' (los sitios de restricción se muestran subrayados en la **Tabla II.1**). La reacción de PCR se realizó en un ciclador Minicycler de MJ Research utilizando 40 ng/μl templado, 1 μM de cada oligonucleótido, 0.2 μM dNTPs y 0.02 U/μl Pfu DNA polimerasa con la siguiente secuencia de amplificación:

Un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 2 min, seguido por 20 ciclos de:

Desnaturalización: 94 °C durante 30 s

Apareamiento: 56 °C durante 30 s

Elongación: 72 °C durante 8 min

Un paso de elongación final a 72 °C durante 10 min

Los productos de PCR se sembraron en un gel de agarosa 1.8 % y luego de la electroforesis se purificaron con QIAquick Gel Extraction Kit. Posteriormente se agregó una adenina con la enzima Taq DNA polimerasa (0.02 U/μl) en presencia de 1.5 mM MgSO₄ y 0.3 mM dNTPs durante 5 min a 72 °C, subclonándose luego en el vector pCR.2.1.TOPO en una solución salina 0.2 M NaCl y 0.01 M MgCl₂ a TA por 30 min. Se transformaron químicamente bacterias ultra competentes y se sembraron en placas de agar LB-ampicilina (0.1 mg/ml) suplementadas con 0.2 mg/ml X-galactosidasa y 2 mM

IPTG (por sus siglas en inglés, *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) dejándolas crecer toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se picaron colonias positivas, se hicieron preparaciones de ADN en pequeña escala y se analizaron digiriendo con la enzima de restricción *EcoR* I y realizando una electroforesis en un gel 0.7 % agarosa. Clones positivos a este análisis (aquellos que mostraron tres bandas, 1 kb, 3 kb y 4 kb) se secuenciaron utilizando el oligonucleótido T7. Una vez confirmada la secuencia se digirió el pCR.2.1.TOPO-IR-A o pCR.2.1.TOPO-IR-B con las enzimas *Hind* III, *Xba* I y *Sph* I, purificándose de un gel 0.7 % agarosa el fragmento de aproximadamente 4.2 kb correspondiente a la secuencia codificante de cada IR con QIAquick Gel Extraction Kit. El producto obtenido se ligó con el vector pcDNA3 digerido con *Hind* III y *Xba* I y previamente desfosforilado. El análisis de los clones se realizó con *Hind* III y *Xba* I (clones positivos generaron una banda de 4.2 kb y otra de 5.3 kb) o bien con *Hind* III y *EcoR* I (clones positivos generaron una banda de 0.9 kb y otra de 8.5 kb). Se secuenciaron algunos de dichos clones utilizando los oligonucleótidos T7 y SP6. Se realizaron glicerol y preparaciones de ADN en gran escala para experimentos de biología celular del pcDNA3-IR-A y del pcDNA3-IR-B.

- ***pcDNA3-IR-A-GFP y pcDNA3-IR-B-GFP***

El vector peGFP-C3 (Clontech) fue digerido con las enzimas *Nhe* I y *Apa* I liberándose la secuencia codificante de GFP, el producto de digestión se corrió en un gel 1 % agarosa purificándose la banda de 0.7 kb con QIAquick Gel Extraction Kit. Esta secuencia se ligó a los pcDNA3-IR (A y B) previamente digeridos con el mismo par de enzimas y desfosforilados. El análisis de restricción se realizó con las mismas enzimas permitiendo identificar clones positivos al detectar una banda de 0.7 kb correspondiente a la proteína fluorescente junto con la banda de 9.5 kb correspondiente al IR dentro del vector. De este modo se fusionó la secuencia codificante de GFP al extremo 3' de ambas isoformas del IR introduciendo un pequeño *linker* codificante de 7 aminoácidos (LALPVAT) entre el final del IR y el comienzo de la secuencia de GFP.

- ***pcDNA3-IR-A-SCFP y pcDNA3-IR-B-SCFP***

Se procedió del mismo modo que el descrito anteriormente, pero la secuencia codificante de la proteína fluorescente SCFP se obtuvo del plásmido pSCFP-3AC (Kremers *et al.*, 2006).

II. Materiales y métodos

Un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 2 min, seguido por 35 ciclos de:

Desnaturalización: 95 °C durante 30 s

Apareamiento: 53 °C durante 30 s

Elongación: 72 °C durante 1 h

Un paso de elongación final a 72 °C durante 10 min

El producto de PCR se corrió en un gel 1.8 % agarosa, purificándose la banda de aproximadamente 230 pb con QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). El producto purificado se analizó en un gel 1.8 % agarosa sin digerir y digerido con enzimas de restricción (*Mlu* I y *Pvu* II) con el fin de determinar si se trataba de la secuencia esperada. Para la primera enzima se esperaban bandas de 18 pb y 216 pb, mientras que para la segunda las bandas debían ser de 43 pb y 183 pb. En la **Figura II.2.A** se muestran los sitios de corte para dichas enzimas dentro de la secuencia ACP levantada por PCR.

Luego de confirmar que la secuencia era la buscada, se agregaron los grupos fosfato 5' al producto de PCR incubándolo con la enzima T4 PNK durante 30 min a 37 °C, inactivándose posteriormente por 20 min a 65 °C.

Los vectores pcDNA3-IR-A, pcDNA3-IR-B y pcDNA3-IR-B-GFP se digirieron con la enzima de restricción *EcoR* V, se desfosforilaron los extremos 5' y se ligaron con el *tag* ACP obtenido por PCR. Los clones positivos se analizaron por medio de digestiones con enzimas de restricción y geles 1.5 % agarosa. Se utilizaron las enzimas *Bgl* II y *EcoR* V: para el pcDNA3-IR-A-ACP y pcDNA3-IR-B-ACP, las bandas esperadas para clones positivos eran de 1 kb, 1.6 kb y 7 kb para clones positivos; para el pcDNA3-IR-B-ACP-GFP, las bandas esperadas eran de 1 kb, 1.6 kb, 3.3 kb y 4.4 kb. Algunos de los clones positivos al análisis con enzimas de restricción se secuenciaron utilizando el oligonucleótido T7. De este modo se obtuvieron los vectores de expresión buscados, de los cuales se hicieron glicerol y preparaciones de ADN en gran escala para experimentos de biología celular.

- ***pcDNA3-IR-A-A1-GFP, pcDNA3-IR-B-A1x3-GFP y pcDNA3-IR-B-A1x3:***

Se diseñaron oligonucleótidos conteniendo la secuencia del *tag* A1 (*A1BamHI*-5' y *A1BamHI*-3'). Estos oligonucleótidos se pusieron en contacto en una solución de

II. Materiales y métodos

apareamiento conteniendo 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7.5 durante 5 min en un baño de agua hirviendo, dejándose luego enfriar en el mismo baño hasta temperatura ambiente. Se realizó un espectro de absorción antes y después de este proceso con el objeto de confirmar la obtención del ADN doble cadena (**Figura II.3.A**). Se agregaron los grupos fosfato en la posición 5' con T4 PNK inactivándose luego la enzima como se describió previamente. De este modo se obtuvo la secuencia del *tag* A1 con extremos compatibles con sitios *BamH* I (**Figura II.3.B**).

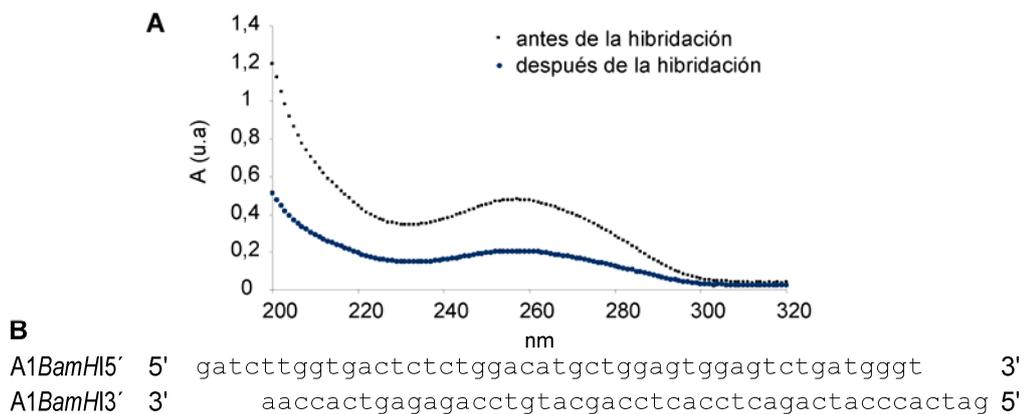


Figura II.3. Hibridación de los oligonucleótidos A1BamHI-5' y A1BamHI-3'. A. Espectro de absorción antes y después de la hibridación de los oligonucleótidos A1BamHI-5' y A1BamHI-3'. B. Alineamiento de los oligonucleótidos que muestra los sitios compatibles con la enzima de restricción *BamH* I.

Los vectores pcDNA3-IR-GFP (A y B) fueron digeridos con la enzima de restricción *BamH* I, desfosforilados y ligados con la preparación del *tag* A1 en una relación 3:1 (inserto:vector) del mismo modo que lo ya descrito (se incluyeron los controles correspondientes). Se transformaron bacterias plaqueándose posteriormente en agar LB-ampicilina (0.1 mg/ml). Se seleccionaron colonias para preparar ADN y se analizaron los clones por medio de digestiones con enzimas de restricción *EcoR* I y *BamH* I (bandas esperadas para clones positivos: 4 kb y 6.2 kb). Clones positivos a este análisis fueron secuenciados con el oligonucleótido Interno *reverse*.

Para obtener el vector pcDNA3-IR-B-A1x3 se digirió el pcDNA3-IR-B-A1x3-GFP con *Apa* I y *Nhe* I de modo de extraer la región codificante de la proteína fluorescente. Este producto de digestión se purificó por gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) y los extremos 3' y 5' fueron rellenados con las enzimas Klenow y T4 DNA polimerasa. Posteriormente se transformaron bacterias, se plaqueó en agar LB-ampicilina (0.1 mg/ml) a 37 °C durante toda la noche, se picaron colonias y se preparó ADN. Se analizaron nuevamente los clones por digestiones con enzimas de restricción, secuenciándose algunos de los positivos con el oligonucleótido IR-F2 y

el Interno *reverse*. De este modo se obtuvieron los vectores de expresión buscados, realizándose gliceroles y preparaciones de ADN en gran escala para experimentos de biología celular.

- ***pcDNA3-IR-A-A1EcoRV-GFP, pcDNA3-IR-B-A1EcoRV-GFP:***

Se diseñaron oligonucleótidos conteniendo la secuencia del *tag* A1 (A1*EcoRV*-5' y A1*EcoRV*-3'). El clonado se realizó siguiendo el mismo esquema que el indicado previamente pero en el sitio *EcoRV* del IR (110 pb río abajo del atg inicial, es decir, en la posición 36 de la secuencia de aminoácidos). En este caso los clones positivos al análisis con enzimas de restricción se secuenciaron con el oligonucleótido T7.

- ***pcDNA3-IR-A-YbbR13, pcDNA3-IR-B-YbbR13, pcDNA3-IR-A-YbbR13-GFP y pcDNA3-IR-B-YbbR13-GFP:***

Se diseñaron oligonucleótidos conteniendo la secuencia del *tag* YbbR13 (A1*EcoRV*-5' y A1*EcoRV*-3'). El clonado se realizó siguiendo el mismo esquema que el indicado previamente para el *tag* A1. Los clones positivos al análisis con enzimas de restricción se secuenciaron con el oligonucleótido T7.

II.2. B.12. Secuenciación de ADN

Las secuenciaciones de ADN fueron realizadas por SeqLab, Sequence Laboratories Goettingen (Alemania), o por el Servicio de Secuenciación y Genotipificado del Departamento de Ecología, Genética y Evolución, FCEN, UBA (Argentina).

II.2. B.13. Expresión y purificación de la enzima ACPwt-S

- ***Transformación de bacterias y curva de crecimiento***

Se transformaron por electroporación células *E. coli* TOP10 (araBAD⁻ y araEFGH⁺) electrocompetentes con el plásmido pBAD-ACPwt-S. Las células se plaquearon en agar LB-ampicilina (0.1 mg/ml) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se inoculó un cultivo de 3 ml de medio 2xYT (2 x *Yeast extract and tryptone*: 1.6 % peptona, 1 % extracto de levadura, 0.5 % NaCl) suplementado con 0.1 mg/ml ampicilina y se dejó agitando a 200 rpm a 37 °C durante toda la noche. Se utilizaron 150 µl para inocular 30 ml de 2xYT con 0.1 mg/ml ampicilina, midiéndose la DO a diversos tiempos. De este modo se determinó la DO a la cual inducir la expresión de ACPwt-S.

- **Expresión de la enzima ACPwt-S**

A partir de 150 µl de un cultivo de partida se inocularon 30 ml de medio 2xYT con 0.1 mg/ml ampicilina. Este cultivo se dejó crecer a 37 °C hasta alcanzar una DO de 0.8 u.a. En ese momento, se indujo la expresión de la enzima ACPwt-S con diversas concentraciones de L-(+)-arabinosa (0.2 %, 0.1 % y 0.05 % p/v) con el fin de determinar la concentración óptima de inductor. Se incubó a 30 °C toda la noche colectándose las células por centrifugación a 4 °C durante 15 min a 5400 rpm. Cuando se realizaron experimentos de producción de la proteína habiendo ya determinado la concentración de L-(+)-arabinosa a utilizar se trabajó inoculando cultivos de 100 ml de 2xYT con 0.1 mg/ml ampicilina con 200 µl de un cultivo inicial.

- **Lisis de las bacterias**

El precipitado se resuspendió en una solución de lisis (BL₁ o BL₂, **Tabla II.3**) y se sonicó 3 veces durante 15 s (10 ml de solución de lisis por gramo de *pellet* bacteriano). A continuación se agregó Triton X-100 (concentración final 1 %), la suspensión se mezcló a 4 °C durante 15 min. Finalmente, el lisado se centrifugó a 9500 rpm por 30 min a 4 °C colectándose el sobrenadante.

- **Purificación de la proteína por cromatografía de afinidad Ni-NTA**

El lisado se incubó con una resina de Ni-NTA utilizando 10 ml de resina (volumen del lecho, *bed volume*) por cada 250 ml de lisado. La incubación fue realizada a 4 °C durante 1 h con agitación suave. Durante los pasos siguientes de la purificación se utilizaron las soluciones que se detallan en la **Tabla II.3**.

Solución	Composición
Solución de lisis 1 (BL ₁)	80 mM imidazol, 250 mM NaCl pH 8, inhibidores de proteasas
Solución de lisis 2 (BL ₂)	10 mM imidazol, 250 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8, inhibidores de proteasas
Solución de lavado I 1 (BLal ₁)	500 mM NaCl, 100 mM imidazol pH 8
Solución de lavado I 2 (BLal ₂)	500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8
Solución de lavado II 1 (BLall ₁)	100 mM NaCl, 100 mM imidazol pH 8
Solución de lavado II 2 (BLall ₂)	100 mM NaCl, 20 mM imidazol, 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8, 20 % glicerol
Solución de elusión (BE)	100 mM NaCl, 400 mM imidazol pH 8, 20% glicerol

Tabla II.3. Soluciones utilizados para la purificación de la enzima ACPwt-S por cromatografía de afinidad Ni-NTA.

Luego de la incubación la resina con el lisado se colocó en una jeringa de 10 ml lavándose con 10 volúmenes de solución de lavado I (BLaI₁ o BLaI₂, **Tabla II.3**) y posteriormente con 5 volúmenes de solución de lavado II (BLaII₁ o BLaII₂, **Tabla II.3**). Finalmente, la elusión se realizó con 10 alícuotas de 500 µl cada una de solución de elusión (BE, **Tabla II.3**). Las fracciones eluidas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés, *Polyacrylamide gel electrophoresis*) en presencia de SDS (SDS-PAGE) 10 % revelando por tinción con el colorante *Coomassie Blue* utilizando además patrones de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés, *Bovine serum albumine*) para cuantificar. Se cuantificó también por espectrofotometría, midiendo A₂₈₀. Las fracciones que contenían proteína se combinaron, se les agregó DTT (concentración final: 1 mM), luego de alicuotarse se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80° C hasta ser usadas.

II.2. C. Biología celular

II.2. C.1. Cultivo celular y crio-preservación

- ***Mantenimiento de cultivos celulares***

Las células se mantuvieron en medio DMEM Glutamax suplementado con penicilina (10 UI/ml), estreptomycin (10 µg/ml) y 10 % (v/v) SFB a 37 °C en 5 % CO₂ y 98 % de humedad. Cuando las células alcanzaban una confluencia aproximada del 90-95 % fueron lavadas con PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) y tratadas con 0.25 % tripsina / 0.53 mM EDTA a 37 °C hasta observar en el microscopio que se despegaran de la superficie de la placa. En este momento se las resuspendió en medio fresco realizándose la dilución deseada. Las células HEK 293 se mantuvieron de modo similar suplementando el medio con 1 mM piruvato de sodio y las HepG2 con un suplemento de aminoácidos no esenciales en una concentración final de 0.1 mM.

- ***Crio-preservación***

Cuando los cultivos celulares alcanzaron el 90 % de confluencia, las células fueron colectadas como se describió anteriormente, centrifugadas durante 4 min a 800 rpm y luego resuspendidas en medio de cultivo con 20 % SFB (v/v), agregándole luego el mismo volumen de medio con 20 % SFB (v/v) y 20 % DMSO (v/v). Las células fueron fraccionadas en alícuotas de 1 ml en crio-tubos y colocadas en un dispositivo “*cryo-cooler*” a -80 °C. Luego de por lo menos 24 h las células fueron transferidas a nitrógeno líquido.

II.2. C.2. Transfecciones

- ***Transfecciones para microscopía***

Las células se plaquearon sobre cubreobjetos de 12 mm en placas de 24 pocillos (1×10^5 células/pocillo) en DMEM suplementado con 10 % SFB sin antibióticos. Al día siguiente se lavaron con PBS agregando luego 250 μ l de DMEM. Se prepararon por otro lado dos soluciones (por pocillo): A) 25 μ l opti-mem + 1 μ l de Lipofectamina y B) 25 μ l opti-mem + 0.4 μ g de ADN. Las soluciones A y B se incubaron 5 min a TA y luego se combinaron incubándolas 20 min a TA, agregándolas finalmente al pocillo con células y medio de cultivo de a gotas. Las células se mantuvieron a 37 °C con esta mezcla durante 5 h, posteriormente se las lavó con PBS y se las dejó en DMEM suplementado con 10 % SFB (y los suplementos correspondientes para cada tipo celular, sin antibióticos) durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron nuevamente con PBS y se renovó el medio dejándolas aproximadamente 40 h antes realizar los experimentos.

En el caso de las transfecciones con Effectene Reagent (QIAGEN) se utilizaron 0.2 μ g (HeLa y CHO) ó 0.4 μ g (HepG2) de ADN y una relación 1:25 (ADN: reactivo) en medio completo.

Estas condiciones se determinaron como óptimas para cada tipo celular y para cada método de transfección utilizando el plásmido pcDNA3-IR-B-GFP para evaluar la eficiencia de transfección por microscopía de fluorescencia observando la presencia de IR-GFP en la célula y mayoritariamente en la membrana. Se cuantificó la eficiencia de transfección como el cociente entre el número de células transfectadas (presencia de GFP en membrana) y el número de células totales (por tinción de los núcleos con DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol).

- ***Transfecciones para experimentos de Western blot y ensayos de luciferasa***

Las transfecciones para experimentos de Western blot y para ensayos de luciferasa se realizaron en placas de 12 ó 24 pocillos. Se describe a continuación el método cuando se utilizaron placas de 12 pocillos, en el caso de placas de 24 pocillos las condiciones fueron similares pero todas las cantidades deben dividirse a la mitad. Células HeLa se colocaron en placas de 12 pocillos (2.5×10^5 células/pocillo) el día anterior a la transfección. Se prepararon dos soluciones. A) 50 μ l opti-mem + 2 μ l lipofectamina y B) 50 μ l opti-mem + 0.8 μ g ADN total. Se las incubó por separado

durante 5 min a TA y luego se las combinó durante 20 min a TA. Las células se lavaron con PBS y se les agregó 500 µl de medio sin aditivos y la mezcla de las soluciones A y B. En el caso de experimentos de cotransfección de plásmidos la cantidad total de ADN fue 0.8 µg.

En algunos experimentos las células crecidas en placas de 24 pocillos se transfectaron con polietilenimina (PEI). Para esto se preparó por pocillo una mezcla conteniendo 17 µl de optimem con 0.8 µg de ADN a la que se le agregó 5 µl de PEI y se la incubó 10 min a TA. Luego se adicionaron 250 µl de DMEM y con esta mezcla se incubaron las células durante 4 h. A continuación se lavaron con PBS y se reemplazó el medio por DMEM completo.

II.2. C.3. SDS-PAGE y Western blot

Para los experimentos de Western blot (salvo que se indique) las células se lavaron con PBS frío dos veces y se lisaron con una solución de lisis conteniendo 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 % NP40, 1 mM MgCl₂, 0.1 % SDS, 2 mM Na₃VO₄, 40 mM β-glicerofosfato, 1 mM DTT, 1 mM NaF y un preparado comercial de inhibidores de proteasas (Roche). Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 10 min a 13000 g a 4 °C. Alternativamente el lisado se realizó directamente en la solución de siembra dos veces concentrada.

Para realizar las electroforesis se utilizó el sistema Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System de Laboratorios Bio-Rad. Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se realizaron con geles Tris-glicina 10 % poliacrilamida y concentradores 4 % poliacrilamida. La solución de corrida fue 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0.1% SDS (v/v). Las muestras se incubaron con la solución de siembra (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS (p/v), 0.1 % azul de bromofenol (p/v), 10 % glicerol, 100 mM β-mercaptoetanol) durante 5 min a 100 °C y luego se sembraron en el gel. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a 30 mA/gel, por aproximadamente 75 min. Las bandas de proteína se revelaron con 0.15 % *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 8 % metanol y 7 % ácido acético en el caso de la purificación de ACPwt-S.

Para los experimentos de Western blot se transfirieron de modo semiseco los geles a membranas de fluoruro de polivinilo (PVDF, por sus siglas en inglés, *Polyvinylidene fluoride*) a 10 V durante aproximadamente 90 min en 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20 % metanol (v/v) y 0.1 % SDS (v/v). Luego se tiñeron las

II. Materiales y métodos

membranas con 0.1 % Rojo Ponceau / 5 % ácido acético para confirmar la correcta transferencia y se lavaron con TBS (150 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 24.7 mM Tris, pH 7.4), 0.1 % Tween (TTBS). Luego se bloquearon con 5 % leche descremada en TTBS durante 1 h a TA, se lavaron con TTBS y se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios diluidos convenientemente (**Tabla II.4**).

Anticuerpo Primario	Fuente	Concentración/dilución		Compañía
		Inmunofluorescencia	Western blot	
IR-subunidad α (N20)	Policlonal conejo	0.2 μ g/ml	-	Santa Cruz Biotechnology
IR-subunidad α (H78)	Policlonal conejo	0.2 μ g/ml	-	Santa Cruz Biotechnology
IR-subunidad β	Monoclonal ratón	-	1/500 (1)	Cell Signaling Technology
p-IR-subunidad β (Tyr1361)	Monoclonal conejo	0.3 μ g/ml	-	Cell Signaling Technology
PY99	Monoclonal ratón	1 μ g/ml	-	Santa Cruz Biotechnology
PY20	Monoclonal ratón	-	2 μ g/ml (2)	Signal Transduction Laboratories
p-Akt (Ser473)	Policlonal conejo	-	0.4 μ g/ml (2)	Santa Cruz Biotechnology
p-Akt (Ser473)	Monoclonal conejo	1/200	1/1000 (2)	Cell Signaling Technology
Akt	Monoclonal conejo	1/400	1/1000 (2)	Cell Signaling Technology
HA	Monoclonal ratón	-	1/1000 (1)	Covance
ERK 1/2	Policlonal conejo	-	0.4 μ g/ml (1)	Santa Cruz Biotechnology
p-p44/42 (Thr202/Tyr204)	Monoclonal conejo	-	1/500 (1)	Cell Signaling Technology
Caveolina (caveolae marker)	Policlonal conejo	6 μ g/ml	-	Abcam
Endosomas tempranos (EEA1)	Policlonal conejo	1.5 μ g/ml	-	Abcam
CD63	Policlonal conejo	4 μ g/ml	-	Santa Cruz Biotechnology

Tabla II.4. Anticuerpos primarios utilizados en experimentos de microscopía y de Western blot. Se indica la fuente de cada uno, la compañía que lo comercializa y las diluciones usadas (1 indica que la dilución se realizó en 5 % BSA / TTBS, y 2 significa que la misma fue en 2 % BSA / TTBS).

Al día siguiente las membranas se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios (anti-conejo o anti-ratón, diluciones: 1:5000 ó 1:10000 en 2 % BSA / TTBS cuando los primarios se habían diluido en esta solución y en el resto de los casos en 5

% leche / TTBS) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés, *Horseradish peroxidase*) durante 1 h a TA. Finalmente, se lavaron las membranas con TTBS (3 x 15 min). El revelado se realizó incubando las membranas durante 1 min con dos soluciones combinadas en el momento: A) 2.5 mM luminol, 400 mM ácido *p*-cumárico en 100 mM Tris-HCl pH 8.5 y B) 0.54 mM H₂O₂ en 100 mM Tris-HCl pH 8.5. Se utilizó un equipo Bio-Imaging Analyzer Bas-1800II e Image Gauge 3.12, FUJIFILM, perteneciente al Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA (Argentina). La cuantificación se realizó por densitometría utilizando el programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov>, NIH, EEUU). Los resultados se expresaron como la media de por lo menos tres experimentos independientes \pm la desviación estándar de la muestra (SEM), indicándose en cada caso el número de experimentos considerados (*n*).

II.2. C.4. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976) en placas de 96 pocillos. Se preparó el reactivo de Bradford conteniendo 0.1 % *Coomassie Blue G-250* (p/v), 5 % etanol (v/v), 8.5 % ácido fosfórico. Las mediciones de A₆₀₀ se llevaron a cabo por duplicado en un equipo Glomax multi detection system (Promega) facilitado por las Dras. Elba Vázquez y Adriana De Siervi (Departamento de Química Biológica, FCEN. UBA). La realización de una curva de calibración con diversas concentraciones de BSA permitió la cuantificación de las muestras de interés.

En el caso de la ACPwt-S la cuantificación se realizó sembrando diferentes concentraciones de BSA en geles SDS-PAGE, comparando las bandas de interés con las de los patrones. En algunos casos se estimó la concentración proteica también por espectrofotometría midiendo A₂₈₀.

II.2. C.5. Ensayos de actividad de luciferasa

Luego de ser transfectadas con los ADN de interés y los plásmidos reporteros (pAP-1-Luc y pCMV- β -Gal) las células se crecieron 24 h, se hambreadon un día en DMEM sin aditivos y se estimularon durante 16 h con rhIns, EGF (factor de crecimiento epidérmico) o IGF-II humanos (en las concentraciones indicadas en cada experimento). La actividad de luciferasa se determinó sobre los lisados preparados utilizando una solución de lisis de Promega (Reporter Lysis Buffer 5X, Madison, EEUU). Para esto se utilizaron 20 μ l de lisado y 20 μ l del reactivo de luciferasa (Promega, Madison, EEUU). Paralelamente, se determinó el contenido de proteína de cada muestra por el método de Bradford ya descrito y la actividad de β -Galactosidasa (β -Gal) como controles. Las mediciones obtenidas se normalizaron a los

correspondientes controles calculándose así las veces de inducción. Los resultados se expresan como el promedio de por lo menos tres experimentos independientes \pm SEM. Para la medición de la actividad de β -Gal se utilizó un lector de microplaca modelo 680 de Bio-Rad perteneciente al LFBM, FCEN, UBA, y para la de luciferasa un equipo Glomax multi detection system.

II.2. C.6. Experimentos de inmunofluorescencia

Las células crecidas sobre cubreobjetos de 12 mm se lavaron con PBS y se fijaron en 3.7 % PFA durante 20 min en hielo o en metanol frío durante 30 min a -20 °C. Luego de ser rehidratadas, las células se bloquearon en PBS / 1 % BSA cuando no se requería permeabilización (inmunofluorescencias para el IR) o con PBS / 0.3 % Triton X-100 / 1 % BSA cuando se requería permeabilización (en todos los demás casos) durante 1 h a 37 °C y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios adecuados diluidos en la misma solución de bloqueo como se detalla en la **Tabla II.4**. Al día siguiente las muestras se lavaron exhaustivamente con la misma solución y se incubaron durante 1 h a 37 °C con los anticuerpos secundarios adecuados. Luego de sucesivos lavados las muestras se visualizaron por microscopía en PBS o en Mowiol.

II.2. C.7. Marcación de células con ligandos biotinilados y QD y análisis de internalización

Las células expresando el IR o el IR-VFP o los IR fusionados a los *tags* pequeños se crecieron sobre cubreobjetos de 12 mm y luego de 36-40 h de expresión fueron deprivadas de SFB durante toda una noche. Al día siguiente se lavaron con una solución reguladora denominada *Tyrode's* (135 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 10 mM HEPES pH 7.2, 0.1 % BSA) a TA y se incubaron con 50 nM insulina biotinilada, BAC-Ins, rhIns-biot o IGF-II-biot durante 15 min a TA ó 15 °C, luego se lavaron tres veces con la misma solución y se incubaron con diversas concentraciones de QD655 (50 pM, 1, 2, 3 ó 4 nM) durante 10 min a TA ó 15 °C. A continuación las células fueron lavadas y en algunos casos visualizadas vivas por microscopía en *Tyrode's* o bien previamente fijadas en 3.7 % PFA en hielo por 20 min. Después de la fijación las células se lavaron con 10 mM Tris-HCl pH 7 y tres veces con PBS. En algunos casos, además, se tiñeron los núcleos con 1 μ M DAPI. Las muestras fueron visualizadas en PBS por microscopía confocal o de epifluorescencia.

En los experimentos de internalización, luego de la marcación las células fueron incubadas a 37 °C en DMEM con 5 % CO₂ durante diferentes períodos de

tiempo. Luego fueron o bien directamente visualizadas (vivas o fijadas en 3.7 % PFA) o bien incubadas con una solución ácida de 0.1 M Na-glicina pH 3, 0.5 M NaCl a TA durante 5 min antes de su visualización o fijación.

Cuando los ensayos implicaron los IR con *tags* las marcaciones con ACPwt-S y derivados de CoA se llevaron adelante primero como se detallará en el **apartado II.2. C.10** y luego se procedió a la marcación con BAC-Ins y QD655 y el experimento de endocitosis.

II.2. C.8. Ensayos de unión e internalización de FITC-Ins por microscopía

Células HeLa expresando transientemente el IR-B fueron crecidas sobre cubreobjetos de 12 mm y deprivadas de SFB durante toda la noche. Al día siguiente se marcaron vivas con 50 nM FITC-Ins durante 15 min a TA, luego incubadas a 37 °C durante distintos períodos de tiempo en DMEM y finalmente fijadas en metanol a -20°C durante 30 min. Las muestras fueron rehidratadas en PBS y se visualizaron en Mowiol en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta utilizando un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 63x 1.4 apertura numérica (AN).

II.2. C.9. Ensayos de unión de ligandos al IR e internalización por citometría de flujo

Células HeLa expresando transientemente diversas construcciones del IR o bien células no transfectadas (*control*) se crecieron en placas de 12 ó 24 pocillos y luego de 36-40 h de expresión fueron deprivadas de SFB durante toda una noche. Al día siguiente se las marcó de modo similar al que se describió anteriormente con 50 nM BAC-Ins o IGF-II-biot y 1 nM QD655 (el control de pegado inespecífico de QDs se hizo incubando las células con QD655 sin el paso previo de unión de BAC-Ins o IGF-II-biot). Luego de ser lavadas las células se incubaron a 37 °C en DMEM (en los experimentos de internalización) durante diferentes períodos de tiempo. A continuación las células se colectaron con 0.5 mM EDTA / PBS, fueron centrifugadas 4 min a 800 rpm resuspendiéndolas en PBS para ser evaluadas vivas por citometría. En los casos en los que se utilizó un tratamiento ácido previamente a colectar las células, el mismo consistió en una incubación de 2 min a TA con 0.1 M Na-glicina pH 3, 0.5 M NaCl, realizando posteriormente sucesivos lavados con PBS.

Estos experimentos fueron realizados en un citómetro BD FACSAriaII de la FCEN, UBA. En la **Tabla II.5** se indican los filtros, espejos dicróicos y láseres elegidos para cada uno de los fluoróforos utilizados.

El análisis de resultados y la cuantificación se realizó con el programa WinMDI Versión 2.9.

Fluoróforo	Láser (nm)	Espejo	Filtro de emisión
SYFP	488	LP 502	BP 530/30
QD655	488	LP 655	BP 660/20

Tabla II.5. Láseres, filtros de emisión y dicróicos utilizados en los experimentos de citometría de flujo. Se detallan el tipo de filtro (BP: pasabanda, LP: filtro de corte), seguido por la longitud de onda y el ancho de banda correspondiente (en nm) o longitud de onda de corte (en nm).

II.2. C.10. Marcación del dominio extracelular del IR en células vivas

Las células se crecieron en medio completo sobre cubreobjetos de 12 mm. Se lavaron con solución reguladora *Tyrode's*, y se marcaron vivas en dicha solución con 0.2 ó 2 μ M ACPwt-S y CoA-atto488, CoA-atto532, CoA-atto550 o CoA-Peo₂-biotina en una concentración final de 1 ó 2 μ M durante 30 min a TA, en oscuridad. En el caso de la CoA-Peo₂-biotina, luego de 3 lavados de 5 min cada uno con *Tyrode's*, las células se incubaron con 1 nM SA-atto550 durante 15 min a TA en oscuridad. Luego de la marcación con los respectivos fluoróforos, las células se lavaron 3 veces durante 5 min cada una con *Tyrode's* y otras 3 veces con PBS, se fijaron en metanol frío durante 30 min a -20 °C, luego se rehidrataron con PBS, se marcaron con 1 μ M DAPI y se visualizaron en Mowiol por microscopía de campo amplio y/o confocal.

II.2. C.11. Experimentos de pull down

Las células expresando transientemente el IR-B-A1x3 solo o en conjunto con el IR-A-SCFP o IR-B-SCFP o bien el IR-B-A1x3-GFP solo o en conjunto con el IR-A o el IR-B fueron crecidas en placas de 6 pocillos. Al día siguiente fueron incubadas con 2 μ M ACPwt-S y 5 μ M CoA-biotina en *Tyrode's* durante 30 min a TA. Luego de varios lavados en PBS se lisaron en una solución conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 1 mM MgCl₂, 0.1 % SDS y e inhibidores de proteasas. Cuando se analizó la fosforilación, luego de la modificación con CoA-biotina y ACPwt-S las células se incubaron a 37 °C con 100 nM rhIns en DMEM durante 5 min y luego se procedió al lisado en la misma solución de lisis pero agregando 2 mM Na₃VO₄, 40 mM β -glicerofosfato, 1 mM DTT y 1 mM NaF para inhibir la actividad de fosfatasa.

A continuación se incubaron los lisados con esferas de agarosa conjugadas a SA durante 1 h a 4 °C, centrifugando luego a máxima velocidad durante 1 min. Se

descartó el sobrenadante y se lavó con la misma solución de lisis centrifugando 1 min a máxima velocidad a 4 °C descartando nuevamente el sobrenadante. Esto se repitió una vez más y luego de descartar el sobrenadante se resuspendió el precipitado en solución de siembra conteniendo 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS (p/v), 0.2 % azul de bromofenol (p/v), 20 % glicerol (v/v), 200 mM β -mercaptoetanol y 1mM DTT. Se reservó antes del *pull down* una alícuota (4 % del volumen del lisado) a la que se le agregó un volumen igual de solución de siembra dos veces concentrada para analizar como fracción total.

Las muestras fueron hervidas durante 5 min, se sembraron en geles 10 % de poliacrilamida realizando una electroforesis SDS-PAGE. El análisis fue realizado por Western blot con anticuerpos contra la subunidad β del IR o contra tirosinas fosforiladas (anti-PY20) y contra ERK 1/2 total o fosforilado.

II.2. D. Microscopía de fluorescencia

II.2. D.1. Microscopía confocal

Las imágenes de microscopía confocal fueron adquiridas en un microscopio Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss, Alemania) provisto con un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 63 \times 1.4 AN y un objetivo de inmersión en agua C-Apochromat 63 \times 1.2 AN (ambos Zeiss) equipado con un láser de Argón multilínea (líneas de emisión: 458, 488 y 514 nm), un láser de estado sólido (ES, línea de emisión: 532 nm) y un láser Helio - Neón (línea de emisión: 633 nm).

Asimismo, se ha utilizado un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 provisto con un objetivo de inmersión en aceite PLSAPO 60 \times 1.35 AN (Olympus) y equipado con láseres similares a los indicados (Centro de Microscopías Avanzadas, FCEN, UBA).

Se han adquirido imágenes también en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 que cuenta con un objetivo de inmersión en agua UPLSAPO 60x 1.2 AN (Olympus) y está equipado con un láser de argón multilínea (líneas de emisión: 488 y 515 nm) y un láser de diodo (405 nm).

Las longitudes de onda de excitación y filtros utilizados se detallan en cada experimento según la combinación de fluoróforos utilizados y el microscopio donde se adquirieron las imágenes.

II.2. D.2. Microscopía de fluorescencia de campo amplio

Para los experimentos de microscopía de epifluorescencia se utilizó un microscopio Zeiss Axiovert S100 con un objetivo de inmersión en aceite 63× 1.25 AN (Zeiss) o bien un microscopio Olympus IX71 con objetivos de inmersión en aceite PlanApo 60× 1.42 AN y de inmersión en agua UApo 40× 1.15 AN (ambos Olympus). Ambos microscopios están provistos con una cámara Hamamatsu Orca CCD (C4742-95, Japón). Los filtros se eligieron en función del fluoróforo de interés (**Tabla II.6**).

Fluoróforo	Filtro de excitación	Filtro dicroico	Filtro de emisión
DAPI	BP 330-385	DM 400	LP 420
GFP	BP 447/40	DM 495	BP 520/50
Cy3	BP 546/12	DM 480	LP 590
atto532	BP 540/25	DM 565	BP 605/55
atto547	BP 540/25	DM 565	BP 605/55
atto488	BP 447/40	DM 495	BP 520/50
atto550	BP 530-555	DM 560	BP 570-620
SYFP	BP 490-500	DM 505	BP 515-560
SCFP	BP 420-450	DM 455	BP 460-500
QD655	BP 415/100	DM 475	BP 655/20

Tabla II.6. Filtros de excitación, emisión y dicroicos utilizados en experimentos de microscopía de fluorescencia convencional. Se detallan el tipo de filtro (BP: pasabanda, LP: filtro de corte, DM: espejo dicroico), seguido por la longitud de onda y el ancho de banda correspondiente (en nm) o longitud de onda de corte (en nm).

II.2. D.3. Microscopía de fluorescencia basada en un arreglo programable del seccionado óptico

Los experimentos realizados en un microscopio de seccionado óptico de alta velocidad (PAM, por sus siglas en inglés, *Programmable array microscope*) (Heintzmann *et al.*, 2001; Hagen *et al.*, 2007 y 2009) se realizaron con un sistema desarrollado en MPIIbpc basado en un modulador espacial de la luz ubicado en el plano de la imagen. Este modulador es de tipo LCoS (por sus siglas en inglés, *ferroelectric liquid-crystal-on-silicon*) (Hagen *et al.*, 2009). El microscopio cuenta con fuente de luz de argón-ión 488 nm y una cámara Andor iXon emCCD. Se adquirieron imágenes de 512 × 512 píxeles. Se utilizó un objetivo de inmersión en agua 60× 1.2 AN. Los filtros de emisión empleados fueron los siguientes: GFP, BP: 525/50 nm y QD655, BP: 655/40 nm.

II.2. D.4. Procesamiento de imágenes

El procesamiento de imágenes se realizó utilizando los programas Image J (<http://rsb.info.nih.gov>, NIH, EEUU) y el paquete DIPimage para Matlab (TU Delft, Holanda, <http://www.ph.tn.tudelft.nl/DIPIlib/index.html>). Las deconvoluciones se realizaron con el programa Scientific Volume Imaging Huygens Professional Versión 3.6, aplicándose el algoritmo de estimación rápida de máxima probabilidad (QMLE, por sus siglas en inglés, *Quick maximum likelihood estimation*). La resolución de las imágenes a los fines de presentación e impresión se fijó en 600 dpi utilizando el programa Adobe Photoshop CS2 versión 9.0.

II.2. D.5. Análisis de colocalización

El análisis de colocalización se realizó con el paquete DIPimage para Matlab. Se diseñó una rutina que permitió calcular los coeficientes de Pearson (R_r) y de Manders (M) y los correspondientes mapas utilizando las **ecuaciones II.2 a II.5**:

$$R_r = \frac{\sum (I_{ma} - \overline{I_{ma}}) \times (I_{mb} - \overline{I_{mb}})}{\sqrt{\sum (I_{ma} - \overline{I_{ma}})^2 \times \sum (I_{mb} - \overline{I_{mb}})^2}} \quad [\text{ec. II.2}]$$

$$M = \frac{\sum (I_{ma} \times I_{mb})}{\sqrt{\sum (I_{ma})^2 \times \sum (I_{mb})^2}} \quad [\text{ec. II.3}]$$

$$\text{PearsonMap} = \frac{(I_{ma} - \overline{I_{ma}}) \times (I_{mb} - \overline{I_{mb}}) \times 100}{R_r \times \sqrt{\sum (I_{ma} - \overline{I_{ma}})^2 \times \sum (I_{mb} - \overline{I_{mb}})^2}} \quad [\text{ec. II.4}]$$

$$\text{MandersMap} = \frac{(I_{ma} \times I_{mb}) \times 100}{M \times \sqrt{\sum (I_{ma})^2 \times \sum (I_{mb})^2}} \quad [\text{ec. II.5}]$$

donde I_{ma} es la imagen en el canal rojo e I_{mb} la imagen en el canal verde, $\overline{I_{ma}}$ e $\overline{I_{mb}}$ las medias de la imagen a y de la imagen b respectivamente. En los mapas de Pearson y Manders se incluye una escala de intensidad que indica en rojo los píxeles de máxima contribución al coeficiente de colocalización y en azul los píxeles que menos contribuyen.

Asimismo para el análisis de colocalización entre SYFP y SCFP se calcularon los coeficientes de Manders en los píxeles colocalizantes, M_{SCFP} y M_{SYFP} , utilizando las **ecuaciones II.6 y II.7**:

$$M_{SCFP} = \frac{\sum_i I_{mscfpicoloc}}{\sum_i I_{mscfpi}} \quad [\text{ec. II.6}]$$

$$M_{SYFP} = \frac{\sum_i I_{msyfpicoloc}}{\sum_i I_{mscfpi}} \quad [\text{ec. II.7}]$$

donde $I_{mscfpicoloc}$ son los píxeles colocalizantes de I_{mscfp} e $I_{msyfpicoloc}$ los píxeles colocalizantes de I_{msyfp} . Se consideraron “píxeles colocalizantes” a aquellos cuya intensidad resultó mayor que la media de la señal de SYFP o SCFP.

El producto de las diferencias con respecto a la media (PDM, por sus siglas en inglés, *Product of the differences from the mean*) para cada píxel se representó en un gráfico PDM aplicando un *plugin* del programa Image J (*intensity correlation analysis plugin*) el cuál utiliza la **ecuación II.8** para cada píxel:

$$PDM = (I_{mscfp} - \overline{I_{mscfp}}) \times (I_{msyfp} - \overline{I_{msyfp}}) \quad [\text{ec. II.8}]$$

Finalmente, se realizaron gráficos de dispersión de frecuencias para correlacionar las señales de ambos canales utilizando un *plugin* del programa Image J.

II.2. D.6. Análisis de colocalización durante el tráfico

Las células fueron clasificadas en 4 grupos de acuerdo al grado de internalización evidenciado por microscopía: S0 (la internalización no se inició, es decir, la señal de QD655 se encuentra exclusivamente en la membrana plasmática); S1 (la señal de QD655 es detectada muy cerca de la membrana probablemente en endosomas tempranos); S2 (la señal roja es más interna pero aún no se encuentra en la región perinuclear); y S3 (la señal de QD655 se encuentra predominantemente en las regiones perinucleares de la célula).

La colocalización durante el tráfico se analizó diseñando una rutina en el Matlab. Luego de restar el fondo (*back-ground*) se creó una máscara definida como el conjunto de los píxeles en los cuáles la señal de QD655 fuera mayor al doble de la media de la señal de QD655 en toda la célula. Luego de esto se calcularon los coeficientes de Manders como ya se describió. Sólo se consideraron en el análisis estadístico las células cuya media en la señal de GFP estuviera entre 500 y 5500 cuentas (cts). Todas las imágenes fueron tomadas con los mismos parámetros de

adquisición (potencia de láseres de excitación, ganancia de los fotomultiplicadores, factor de ampliación, tamaño del *pinhole*).

II.2. D.7. Cuantificación de QD unidos por microscopía

Para la cuantificación se diseñó nuevamente una rutina en el programa Matlab. Primero se restó el fondo (mediana) para cada canal, además en el caso del canal de QD se restó la contribución de la señal verde en dicho canal (*bleed-through*). Para esto último se cuantificó la señal de fluorescencia en muestras sin QD, solo con fluorescencia verde, y se calculó el porcentaje detectado de esta señal en el canal rojo. Posteriormente se segmentó cada célula utilizando la señal de GFP, dando origen a la región denominada *célula*. Luego se definió una máscara de QD (QD_{mask}) en la cual se incluyeron todos los píxeles con fluorescencia roja. Se sumaron los valores de fluorescencia detectados en el canal rojo dentro de la máscara (suma rojo) y en el verde (suma verde) en toda la *célula*. Asimismo se midió el tamaño de cada *célula*. Para la cuantificación de los QD unidos para cada una de las concentraciones utilizadas se consideraron células con similares niveles de expresión, es decir con similares valores de GFP/tamaño celular.

II.2. D.8. Análisis cuantitativo de la internalización por microscopía

Para los experimentos en los que se cuantificó la internalización el tiempo 0 min o “inicio” se definió como el momento en el que se terminaron los lavados posteriores a la marcación y los tiempos 10, 20, 30, 40, 90 y 150 min se consideraron como los intervalos en los que las células fueron incubadas a 37 °C. Las imágenes de microscopía se procesaron con el programa Matlab como se detalla a continuación:

Segmentación (célula, membrana e interior): primero se restó el *back-ground* (mediana) de cada canal. En el caso de las imágenes correspondientes a los QD655 se restó además la contribución del *bleed-through* de la señal de VFP en el canal rojo. La segmentación se llevó a cabo para cada célula utilizando la señal de VFP (para experimentos con IR-VFP) o la de atto488 (cuando se utilizó el IR-B-A1x3 marcado con CoA-atto488) o bien con la imagen DIC para el caso de experimentos con el IR salvaje (*célula*). Luego de la segmentación de la célula se definió la región *pre-membrana* como la imagen diferencia entre la *célula* y la erosión binaria (entre 5 y 20 iteraciones; conectividad alternada) evaluándose el resultado por inspección visual. La región *pre-interior* se definió como la imagen diferencia entre la *célula* y la *pre-membrana*. Se generó a continuación una máscara de QD (QD_{mask}) marcando los píxeles con fluorescencia roja. Con esta máscara se redefinió la *membrana* como el

producto de QD_{mask} y *pre-membrana*, y la región *interior* como el producto entre QD_{mask} y *pre-interior*.

De modo equivalente se procedió en los experimentos con FITC-Ins, generando una máscara ($FITC_{\text{mask}}$) conteniendo los píxeles con fluorescencia verde mayor a un valor que se evaluó como convenientemente diferente del inespecífico analizando 100 células marcadas. Con esta máscara se redefinió la *membrana* y la región *interior* en estos experimentos de modo similar que para los QD.

Clasificación de las células según los niveles de expresión de IR: la clasificación se realizó luego de la segmentación de cada célula teniendo en cuenta el valor medio de la señal de VFP. Para esto se midió la suma de la señal de VFP en toda la célula, se midió el tamaño celular (en píxeles) y se calculó el cociente entre la suma VFP y el tamaño celular. Las células con este cociente mayor a 25 cts/píxel se consideraron con altos niveles de expresión del IR (*alta expresión*), células cuyo cociente fue menor de 20 cts/píxel fueron clasificadas como células con bajos niveles de expresión del IR (*baja expresión*). En el caso del IR-B-A1x3 la clasificación en *alto* y *bajo* se realizó cuantificando la señal de atto488 proveniente de la marcación con CoA-atto488 y ACPwt-S. Células con esta señal > 1600 cts fueron consideradas dentro del grupo *alto* y aquellas con esta medida < 900 cts se incluyeron en el grupo *bajo*. Es importante aclarar que todas las imágenes fueron tomadas con los mismos parámetros de adquisición y con el mismo factor de ampliación en el microscopio confocal.

Estimación del grado de internalización: Se sumaron los píxeles dentro de la *membrana* y dentro de *interior* por un lado para el canal rojo y por otro para el canal verde, midiéndose además el tamaño de dichas regiones. Para calcular el porcentaje de internalización se estimó la cantidad de QD totales unidos (QD_t) como la suma de QD en la *membrana* (QD_m) y QD en la región *interior* (QD_i) calculándose para cada célula el cociente QD_i/QD_t . Esta “calibración interna” fue elegida para no depender del efecto de la ganancia del amplificador y el factor de ampliación utilizado durante la adquisición de cada imagen. Los niveles de expresión de los IR considerados se estimaron como se indicó en el párrafo anterior y sólo se incluyeron en los análisis células con niveles de expresión similares con el objeto de poder comparar comportamientos en muestras homogéneas en lo que a niveles de expresión del receptor se refiere.

II.2. D.9. Análisis cuantitativo de la translocación a membrana de Akt

Se segmentó cada célula en la región *membrana* e *interior* utilizando la señal de SCFP para la segmentación de modo equivalente a lo descrito anteriormente. Se sumaron los píxeles dentro de la *membrana* y dentro de *interior* para cada canal. Para calcular la proporción de Akt en membrana se estimó la cantidad de Akt total (Akt_t) como la suma de Akt en la *membrana* (Akt_m) y Akt en la región *interior* (Akt_i). Con estos datos se calculó $Akt_t = Akt_m + Akt_i$ y se calculó para cada célula el cociente Akt_m/Akt_t . De modo equivalente se procedió con Akt fosforilado obteniendo así una relación $pAkt_m/pAkt_t$ indicativa de su distribución dentro de la célula.

II.2. E. Microscopía de fuerza atómica

Los experimentos de microscopía de fuerza atómica se realizaron en el Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) de la FCEN, UBA, en colaboración con la Dra. Lía Pietrasanta (CMA-FCEN, UBA. CONICET). Los mismos fueron realizados en conjunto con la Lic. Catalina von Bilderling (CMA).

El CMA cuenta con un microscopio de fuerza atómica modelo Multimode de la firma Veeco, con un controlador Nanoscope IIIa, equipado con una unidad Quadrex y módulo de acceso a señales. Las imágenes de AFM fueron analizadas con el programa Nanoscope 5.30r3sr3 (Veeco).

II.2. E.1. Preparación de las células

Para los experimentos microscopía de fuerza atómica las células crecidas en placas de 12 pocillos fueron transfectadas con el pcDNA3-IR-A o el pcDNA3-IR-B con lipofectamina como ya se describió. Al día siguiente, fueron plaquedas sobre cubreobjetos de 12 mm previamente tratados con una solución 5 μ g/ml fibronectina en PBS durante 30 min. Al día siguiente fueron deprivadas de SFB durante la noche anterior al experimento, el cual fue realizado en DMEM. En los controles, una vez que se detectó interacción se le agregó a la muestra en el AFM 8 μ M rhIns con el objeto de saturar los receptores y poder detectar la pérdida o disminución de la fuerza de unión ligando-receptor en la misma región donde la interacción había sido medida.

En el caso de las células que fueron visualizadas por AFM, las mismas fueron fijadas en 3.7 % PFA durante 20 min en hielo, rehidratadas en 10 mM Tris-HCl pH 7 y posteriormente en PBS. La visualización se realizó en PBS.

II.2. E.2. Modificación del sensor de fuerza

Se utilizó un sensor de fuerza para AFM recubierto con una capa de oro modificado con una cadena de polietilenglicol como espaciador con una biotina en el extremo de Novascan Technologies, Inc. (Ames, EEUU). El sensor de fuerza se incubó durante 1-2 h a TA con 1 μM SA en PBS. Luego de sucesivos lavados se incubó el sensor así modificado con 2 μM BAC-Ins en una solución denominada Rab (135 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 10 mM HEPES pH 7.2) durante 1 h a TA. Los lavados se realizaron con la solución Rab y luego con PBS.

II.2. E.3. Medición de mapas de fuerza

La constante elástica nominal (0.05-0.1 N/m) de los sensores de fuerza comerciales tiene una incerteza del 50 % lo que hace necesario calibrar el *cantilever* para que las mediciones de fuerza sean precisas. Se utilizó el método de ajuste térmico (Hutter y Bechhoefer, 1993) en el cuál se mide la deflexión generada por ruido térmico, analizando los datos de los movimientos de vibración libres del *cantilever* con una rutina realizada en el Matlab. El método de ajuste térmico considera al *cantilever* como un oscilador armónico simple y utiliza el teorema de equipartición para relacionar la energía del oscilador con la energía térmica. De este modo es posible calcular la constante elástica (k) a partir de la temperatura (T), la constante de Boltzmann (K_B) y el valor medio del cuadrado de la deflexión del *cantilever* libre $\langle x^2 \rangle$ por medio de la

ecuación II.9:

$$k = \frac{K_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad \text{[ec. II.9]}$$

donde $\langle x^2 \rangle$ es el área debajo de la curva de densidad de potencia espectral correspondiente a la serie temporal de la señal de deflexión de la oscilación libre del *cantilever*. La incerteza típica de este método de calibración es del 10 %. Este método desarrollado en el CMA por la Lic. Catalina von Bilderling permitió calibrar los *cantilevers* en el microscopio utilizado y resolver el problema de la considerable incerteza que presentan las constantes nominales de los sensores de fuerza.

La medición de mapas de fuerza se realizó con las células en DMEM a TA. Se analizaron 10 células para cada IR y para células no transfectadas utilizadas como control. En regiones de 10 μm x 10 μm se realizaron curvas de fuerza de 16 píxeles x 16 píxeles (256 curvas/región). La velocidad de retracción de la punta con la que se

II. Materiales y métodos

adquirieron estas curvas de fuerza (salvo en los experimentos donde se varió el *loading rate*) fue de 1.2 $\mu\text{m/s}$. Estos datos se representaron en mapas de fuerza donde cada píxel muestra en una escala de grises la magnitud de la fuerza de adhesión medida: blanco indica alta adhesión y negro representa baja adhesión. Posteriormente se graficó la distribución de las fuerzas de interacción en histogramas que se ajustaron a una distribución de tipo Gaussiana.

III. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

**Quantum dots y proteínas fluorescentes
para estudiar el IR en células**

1. Quantum dots y proteínas fluorescentes para el estudio del IR

3.1. INTRODUCCIÓN

La combinación de proteínas fluorescentes fusionadas a moléculas de interés y los QD unidos a diversos ligandos naturales ha permitido, como se mencionó en la **Introducción**, el estudio *in vivo* de fenómenos celulares a nivel de células individuales utilizando diversas técnicas de microscopía.

Varios trabajos han aplicado estas herramientas a diversos sistemas biológicos. Fue posible visualizar de este modo el inicio de la transducción de señales desencadenada por los receptores del factor de crecimiento epidérmico (erbB/HER) en células vivas (Lidke *et al.*, 2004 y 2005). La familia de erbB incluye a los receptores erbB1 (el clásico EGFR), erbB2, erbB3 y erbB4. La unión del ligando conduce a la dimerización del receptor y a la autofosforilación del dominio quinasa citoplasmático (Gadella y Jovin, 1995; Schlessinger, *et al.*, 2002) desencadenando cascadas de señalización que controlan numerosos procesos tales como la división celular y la replicación del ADN (Yarden y Sliwkowski, 2001; Jorissen *et al.*, 2003). El uso de QD conjugados a SA permitió visualizar la unión ligando-receptor, el transporte en filopodias y la endocitosis de los complejos QD-EGF-EGFR (**Figura 1.1.A**).

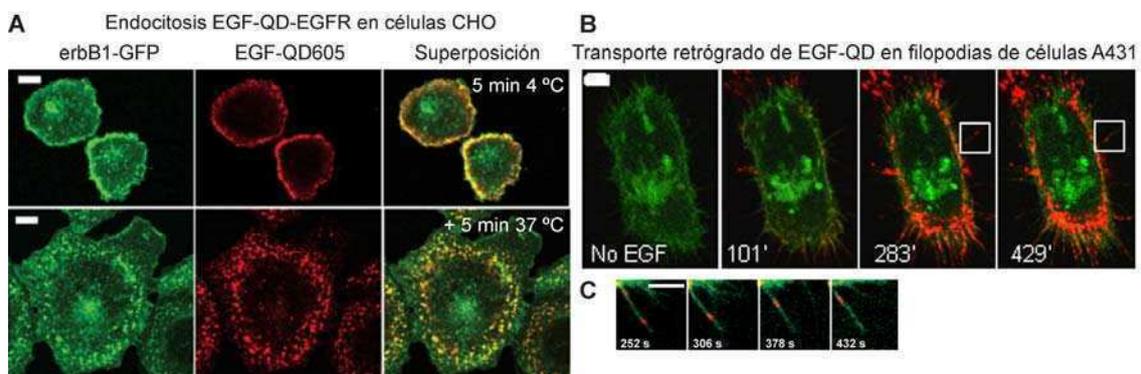


Figura 1.1. Unión de EGF y transporte retrógrado en células CHO y A431. A. Células CHO expresando erbB1-GFP incubadas con 7 nM EGF biotinilado durante 10 min a 4 °C y luego marcadas con QD605. Panel de abajo: visualización luego de 5 min a 37 °C. Barras de escala: 20 µm. **B.** Transporte retrógrado de EGF-QD en filopodias de células A431 expresando erbB3-mCitrina (proyección de máxima intensidad de 4 secciones confocales de 0.5 µm en función del tiempo). Recuadro: complejo individual de EGF-QD transportado. **C.** Imagen ampliada de la región recuadrada en B mostrando el transporte retrógrado en filopodia. Barras de escala: 5 µm. Tomado de Lidke *et al.*, 2004.

Estos trabajos permitieron además demostrar que erbB2, y no así erbB3, dimeriza con erbB1 luego de la estimulación con EGF (Lidke *et al.*, 2004) y que receptores erbB1 localizados en filopodias de células A431 muestran un sistemático movimiento retrógrado luego de la unión del ligando (**Figura 1.1.B-C**) (Lidke *et al.*, 2004, 2005 y 2007).

El transporte retrógrado del factor de crecimiento neuronal (NGF) también fue estudiado en células PC12 diferenciadas utilizando QD conjugados a SA unidos a NGF biotinilado (Echarte *et al.*, 2007). Fue posible visualizar el NGF unido a células vivas estudiando la dinámica de internalización en tiempo real (**Figura 1.2**). El seguimiento cuantitativo de las nanopartículas individuales unidas al factor de crecimiento demostró que el movimiento retrógrado del NGF requería la integridad de los microtúbulos. La fotoestabilidad y la intensidad del brillo de los QD hizo factible el estudio en tiempo real de los complejos formados por los QD-NGF y el receptor de NGF (NGFR) dentro de neuritas vivas durante períodos de tiempo prolongados que otro tipo de marcaciones (VFP o anticuerpos + fluoróforos) no hubieran posibilitado.

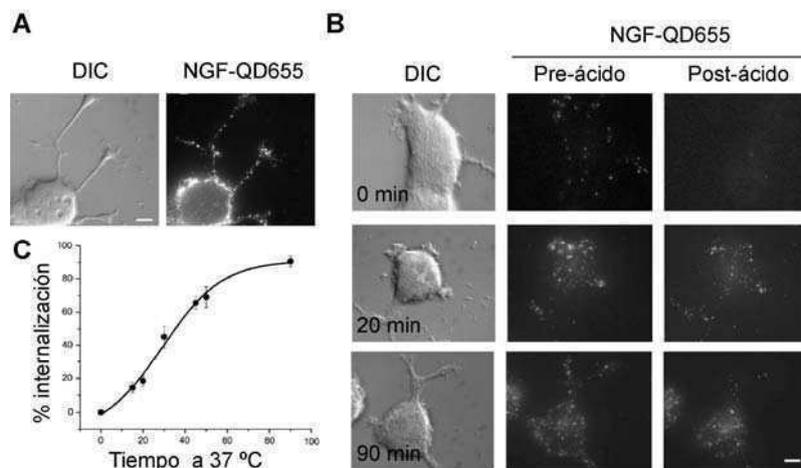


Figura 1.2. Unión de NGF e internalización en células PC12. **A.** Visualización de células PC12 con NGF biotinilado y 50 μM QD. **B.** Internalización de complejos NGF-QD a 37 °C. Imágenes de DIC y de fluorescencia de células marcadas en dos etapas con NGF biotinilado y QD655, incubadas por diferentes períodos de tiempo a 37 °C antes de ser lavadas con ácido (panel del medio) y después de ser lavadas con ácido (1 min a TA con una solución 0.1 M ácido acético, 150 mM cloruro de colina y 0.1 % suero fetal de ternero, panel derecho). Barras de escala: 10 μm . **C.** Cinética de internalización. Los porcentajes de internalización se calcularon como la relación entre la señal de QD-NGF antes y después del tratamiento con ácido. Tomado de Echarte *et al.*, 2007.

Más recientemente, los QD permitieron marcar el EGFR que se encuentra sobreexpresado en varios gliomas distinguiendo así células tumorales de tejidos provenientes de biopsias de tumores tanto de bajo grado de avance como de alto grado respecto de cerebros normales en un nivel macroscópico y de células individuales en experimentos *ex vivo* (Kantelhardt *et al.*, 2010). La fluorescencia intensa y fotoestable así como la rápida unión diferencial de estas sondas cumplen

con los criterios que serían requeridos en cirugías para distinguir células normales de aquellas tumorales en una cavidad de dónde se extirpó el tumor, abriendo de este modo un interesante y novedoso posible campo de aplicación.

En este capítulo se presenta entonces la generación de vectores de expresión de las dos variantes de *splicing* del IR fusionadas a distintas VFP con el primer objetivo de estudiar la localización celular de estas isoformas por microscopía. Se desarrolla también la estrategia para marcar insulina con QD con el segundo objetivo de seguir por microscopía o citometría de flujo, la unión de insulina al IR-A y al IR-B en células vivas o fijadas y, como se verá más adelante, la internalización del complejo ligando-receptor (**Capítulo 2**). La utilización de un microscopio de seccionado óptico de alta velocidad (PAM, por sus siglas en inglés, *Programmable array microscope*) (Heintzmann *et al.*, 2001; Hagen *et al.*, 2007 y 2009) permitió a su vez, visualizar la marcación en tiempo real así como la insulina unida a la membrana y filopodias sin producir daño en las células dada su alta velocidad de escaneo y el seccionamiento de la iluminación.

En las páginas siguientes se detalla la obtención de las herramientas y la evaluación de su funcionalidad corroborando que las mismas desencadenaran la cascada de señalización del IR. El objetivo será entonces estudiar el sistema IR-insulina y otros ligandos con una nueva aproximación experimental que permite el análisis en células individuales y durante períodos prolongados de tiempo. El estudio del comportamiento de cada una de las variantes de *splicing* del receptor, sus similitudes y diferencias se abordará en el **Capítulo 2** una vez evaluadas las herramientas a utilizar.

Objetivos

1. Generar vectores de expresión de las dos variantes de *splicing* del IR fusionado a diversas VFP
2. Biotinilar insulina humana recombinante
3. Evaluar la funcionalidad celular de las herramientas generadas
4. Estudiar la localización y colocalización del IR-A e IR-B en células HeLa
5. Visualizar la unión ligando-receptor en células vivas

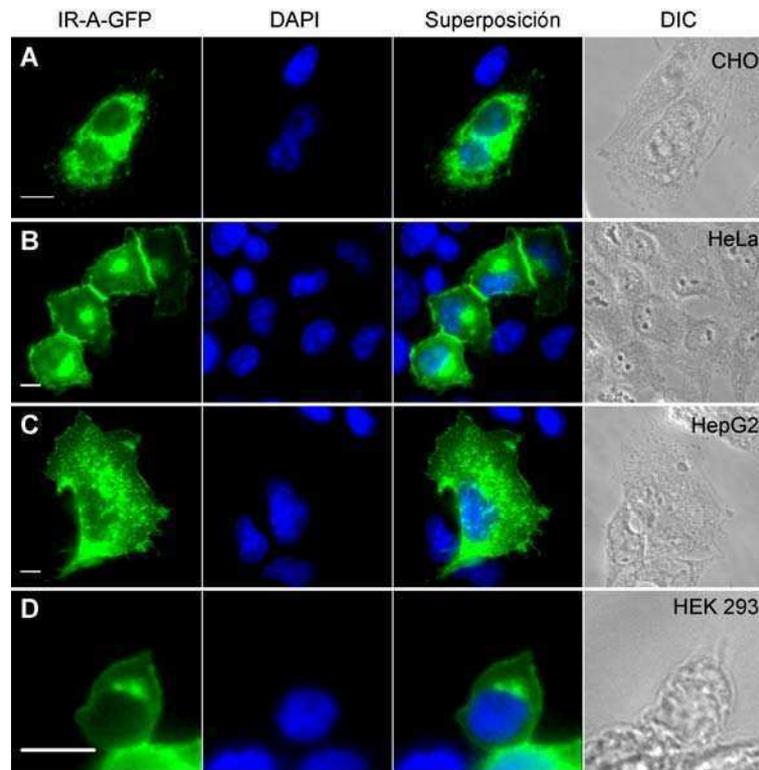


Figura 1.4. Expresión del IR-A-GFP en diversas líneas celulares. Células CHO (A), HeLa (B), HepG2 (C) y HEK 293 (D) expresando el IR-A-GFP. La visualización se realizó por microscopía de epifluorescencia en un microscopio Zeiss Axiovert S100. Barras de escala: 10 μ m.

Anticuerpos específicos contra el extremo N-terminal (N20) o contra los aminoácidos 128-205 (H78) de la subunidad α del IR permitieron corroborar la identidad de las proteínas expresadas con ambos anticuerpos evaluando también su localización (**Figura 1.5**). La señal de GFP revelando el IR sobreexpresado mostró colocalización con la señal roja correspondiente al anticuerpo secundario (Cy3). Ambas señales se detectaron sólo en algunas células, permitiendo concluir que en las células transfectadas la GFP está fusionada al IR (es decir, se expresa correctamente la fusión IR-GFP) y que estas quimeras se localizan fundamentalmente en la membrana plasmática como se esperaba. Asimismo, el análisis por Western blot mostró el peso molecular correcto para las proteínas sobreexpresadas en células HeLa. En la **Figura 1.12.C**, se puede ver un gel representativo para el IR-A, el IR-B y las quimeras con SCFP, mostrando la banda correspondiente a la subunidad β de 97 kDa y otra banda más pesada para el caso del IR-VFP que difiere en aproximadamente 25 kDa, el tamaño de GFP.

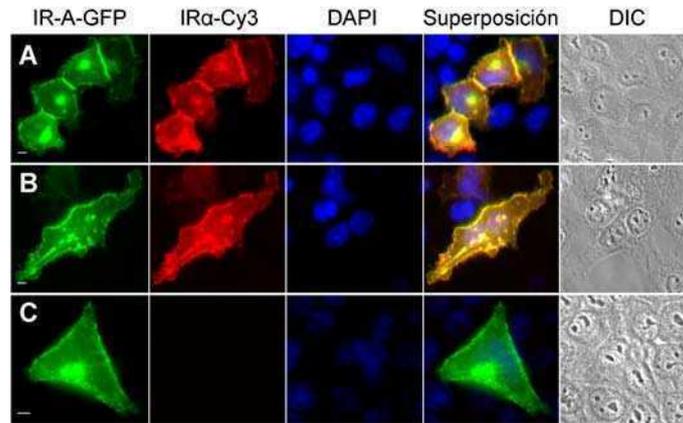


Figura 1.5. Inmunofluorescencia del IR-GFP. Células HeLa expresando el IR-A-GFP fueron incubadas con anticuerpos específicos contra el extremo N-terminal del IR: N20 (A) y H78 (B) y un anticuerpo secundario conjugado a Cy3. C. El control son células incubadas solamente con el anticuerpo secundario. La visualización se realizó en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert S100. Barras de escala: 5 μm.

Luego de corroborar la correcta expresión y localización se analizó si ambas isoformas colocalizan en la membrana celular. Para esto se cotransfectaron células con el pcDNA3-IR-A-SCFP y el pcDNA3-IR-B-SYFP o bien con el pcDNA3-IR-A-SCFP y el pcDNA3-IR-A-SYFP en cantidades equivalentes de ADN (Figura 1.6.A-B).

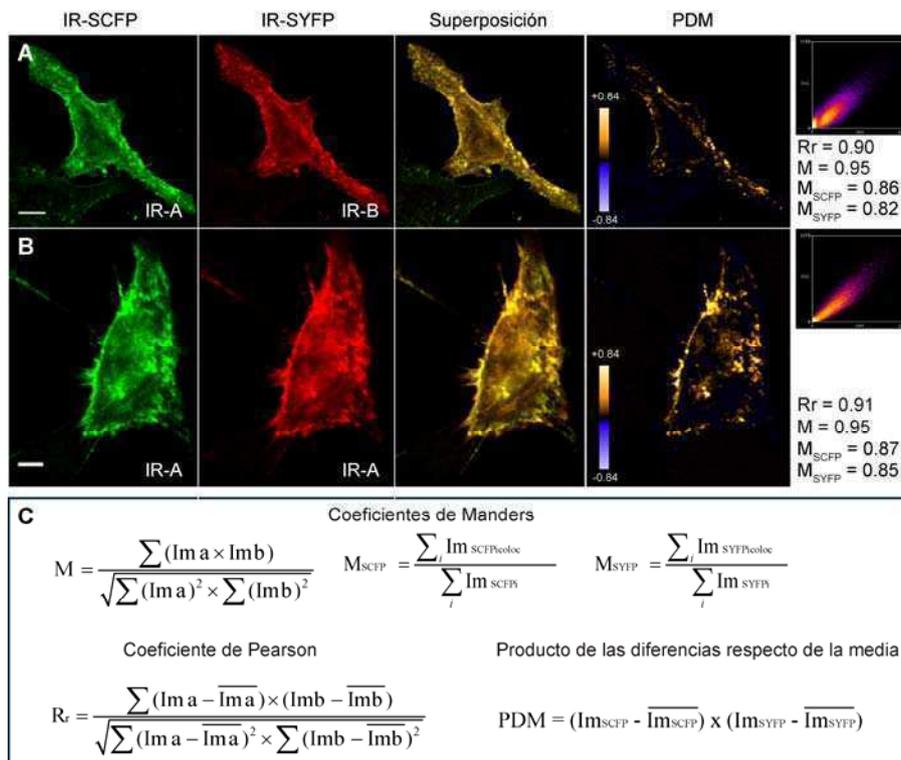


Figura 1.6. Colocalización del IR-A y del IR-B. A. Células HeLa coexpresando el IR-A-SCFP y el IR-B-SYFP. Barra de escala: 10 μm. B. Experimento similar coexpresando el IR-A-SCFP y el IR-A-SYFP. Barra de escala: 5 μm. La visualización se realizó en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación SCFP, 458 nm; excitación SYFP, 515 nm; emisión SCFP, BP: 475/25 nm; emisión SYFP, BP: 530/10 nm; modo secuencial). Los gráficos PDM y de dispersión de intensidades (SCFP en ordenadas; SYFP en abscisas) se muestran en el cuarto y quinto panel respectivamente. SCFP se muestra en verde y SYFP en rojo. C. Cálculo de los coeficientes de colocalización M, R_r, M_{SCFP} y M_{SYFP} y ecuación utilizada para graficar el PDM.

La colocalización, observada cualitativamente en las imágenes de superposición (amarillo), se analizó cuantitativamente calculando los coeficientes de Manders (M) y Pearson (Rr) como se detalló en **Materiales y métodos (Figura 1.6.C)**. Estos resultados además se muestran en gráficos PDM, para lo cual se aplicó el *plugin* de análisis de correlación de intensidades del Image J (**Figuras 1.6.A-B**, cuarto panel) y en gráficos de dispersión de frecuencias (**Figuras 1.6.A-B**, quinto panel). No se observaron diferencias significativas entre los coeficientes del par IR-A-SCFP/IR-A-SYFP y del par IR-A-SCFP/IR-B-SYFP, permitiendo entonces concluir que ambas isoformas del IR colocalizan en la membrana celular.

Los coeficientes calculados se presentan en la **Tabla 1.1** para células sobreexpresando el par IR-A-SCFP/IR-A-SYFP o el par IR-A-SCFP/IR-B-SYFP.

Coeficiente/Par IR	IR-A-SCFP/IR-A-SYFP	IR-A-SCFP IR-B-SYFP
Rr	0.91 ± 0.05	0.90 ± 0.10
M	0.95 ± 0.04	0.95 ± 0.04
M _{SCFP}	0.87 ± 0.06	0.86 ± 0.04
M _{SYFP}	0.85 ± 0.04	0.82 ± 0.04
n	16	26

Tabla 1.1. Colocalización de las isoformas del IR. Coeficientes de colocalización (Rr, M, M_{SCFP} y M_{SYFP}) calculados para células coexpresando el par IR-A-SCFP/IR-A-SYFP o el par IR-A-SCFP/IR-B-SYFP a partir de imágenes de microscopía confocal. n indica el número de células analizadas. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM.

1.2.2. Visualización de la insulina humana unida al IR en células vivas

Se marcó insulina recombinante con el objeto de poder visualizar el complejo insulina-IR completo en células vivas. Para esto se trabajó con insulina bovina biotinilada, BAC-Ins también bovina y se modificó asimismo insulina humana recombinante comparando su funcionalidad.

La reacción de modificación (esquemática en la **Figura 1.7.A**) permitió obtener insulina humana biotinilada con un *linker* de aproximadamente 18.2 Å entre la biotina y la hormona dado por los cuatro grupos Peo.

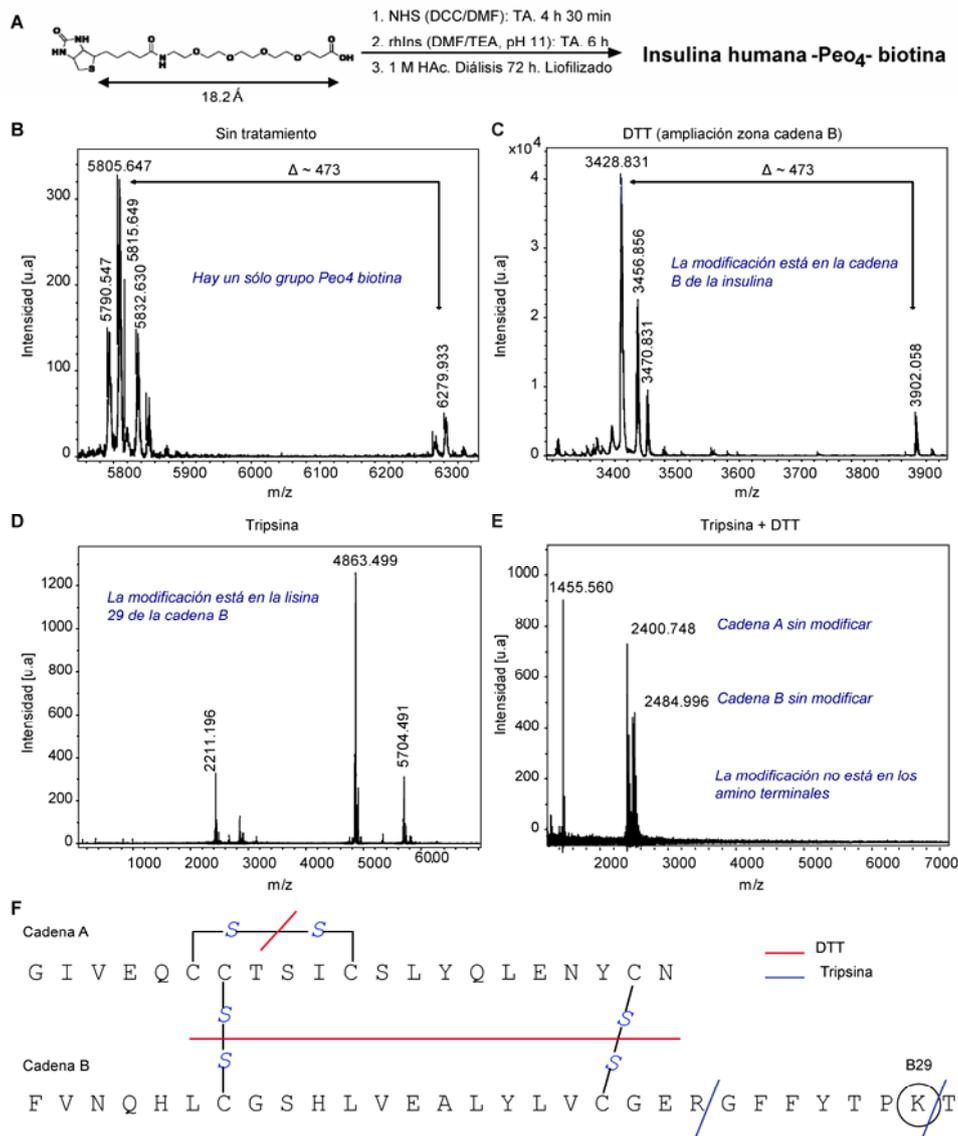


Figura 1.7. Biotinilación de rhIns. **A.** Estrategia de biotinylación de la rhIns. **B-E.** Espectrometría de masa MALDI-TOFF (modo positivo) del producto de reacción sin tratamiento (**B**), luego de la reducción con DTT (**C**), luego del tratamiento con tripsina 1-2 h (**D**) o bien con DTT (20 mM, 15 min) y seguidamente con tripsina 1-2 h (**E**). La matriz utilizada en la espectrometría de masas fue ácido sinapínico (10 mg/ml) en 70 % acetonitrilo, 0.125 % TFA. **F.** Secuencia aminoacídica de la insulina humana y esquema de las consecuencias de los tratamientos realizados para el análisis por espectrometría de masas. S-S simboliza puentes disulfuro.

La caracterización fue realizada por espectrometría de masa MALDI-TOF (modo positivo) con las siguientes muestras: i) la muestra tal cual; ii) la muestra tratada con DTT (obteniendo las cadenas A y B por separado, por reducción de puentes disulfuro); iii) la muestra tratada con tripsina (enzima que cliva luego de la última arginina 22 de la cadena B y en algunos casos además digiere luego de la lisina 29 de la cadena B); o iv) la muestra tratada primero con DTT y luego con tripsina (**Figura 1.7.B-F**).

La **Tabla 1.2** muestra los picos teóricos esperados para las cadenas A ó B de la insulina humana, el dipéptido con los puentes disulfuro y los fragmentos obtenidos luego del tratamiento con tripsina.

	Secuencia	Pico teórico (Da)
Cadena A	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN	2383.0073
Cadena B	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT	3428.6918
Suma	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN + FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT	5811.6991
Dipéptido menos 6H (puentes disulfuro)	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN + FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT – H ₂ O	5805.6889
Péptido que se separa con tripsina	GFFYTPK y T	859.4348 y 120.0655
	ó	ó
	GFFYTPKT	979.005
Insulina sin GFFYTPKT	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN + FVNQHLCGSHLVEALYLVCGER	4826.1886
Insulina sin T	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN + FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK	5685.6234

Tabla 1.2. Cálculo de los picos teóricos (Da) para las cadenas A y B de la insulina humana, del dipéptido con los puentes disulfuro, de los péptidos que se separan luego del tratamiento con tripsina (GFFYTPK y T ó GFFYTPKT) y el resto de la molécula de insulina (insulina sin GFFYTPKT ó insulina sin T). Estos cálculos fueron utilizados para la confección de la **Tabla 1.3**.

Según los cálculos realizados para la **Tabla 1.2** y la masa que se adiciona por cada grupo Peo₄-biotina (473.22 Da) se estimaron los picos teóricos esperados para cada uno de los tratamientos. Los productos esperados en la biotilación son: i) insulina sin modificar (*insulina*); ii) insulina mono-biotinilada en el amino terminal de la cadena A (se denominará *A₁*), en el amino terminal de la cadena B (*B₁*) o bien en la lisina 29 de la cadena B (*B₂₉*); iii) insulina di-biotinilada en los dos amino terminales (*A₁B₁*), o bien en cada uno de los aminos terminales y la lisina B₂₉ (*A₁B₂₉* ó *B₁B₂₉*); o iv) insulina tri-biotinilada en todos los grupos amino de la molécula (*A₁B₁B₂₉*). De este modo se confeccionó la **Tabla 1.3**.

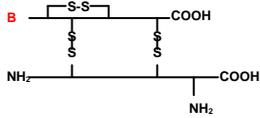
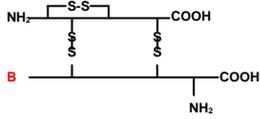
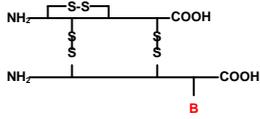
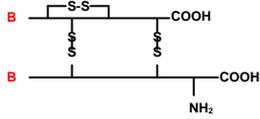
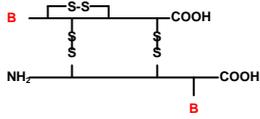
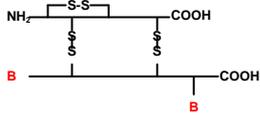
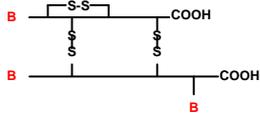
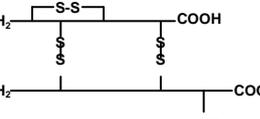
	COMPUESTO	Tal Cual	DTT Cadena A	DTT Cadena B	Tripsina	Tripsina + DTT
A₁		6278.9	2856.2	3428.7	5299.9 979.0 859.4	2856.2 2449.7 979.0 859.4
B₁		6278.9	2383.0	3901.9	5299.9 979.0 859.4	2383.0 2922.9 979.0 859.4
B₂₉		6278.9	2383.0	3901.9	4826.7 1452.2 1332.6	2383.0 2449.7 1452.2 1332.6
A₁B₁		6752.1	2856.2	3901.9	5773.1 979.0 859.4	2856.2 2922.9 979.0 859.4
A₁B₂₉		6752.1	2856.2	3901.9	5299.9 1452.2 1332.6	2856.2 2449.7 1452.2 1332.6
B₁B₂₉		6752.1	2383.0	4375.1	5299.9 1452.2 1332.6	2383.0 2922.9 1452.2 1332.6
A₁B₁B₂₉		7225.4	2856.2	4375.1	5773.1 1452.2 1332.6	2856.2 2922.9 1452.2 1332.6
Insulina		5805.7	2383.0	3428.7	4826.7 979.0 859.4	2383.0 2449.7 979.0 859.4

Tabla 1.3. Picos esperados (Da) para cada uno de los tratamientos realizados sobre las muestras en el MALDI para los posibles productos obtenidos de la biotinylación de la insulina humana: insulina sin modificar, insulina mono-biotinylada (A₁, B₁ y B₂₉), insulina di-biotinylada (A₁B₁, A₁B₂₉ y B₁B₂₉) o insulina tri-biotinylada (A₁B₁B₂₉). **B** simboliza Peo₄-biotina.

La **Figura 1.7.B-E** muestra espectros obtenidos para cada uno de los tratamientos. Dado que la muestra sin ningún tratamiento (**Figura 1.7.B**) permitió detectar un pico mayoritario correspondiente a la insulina sin modificar (m/z = 5805.6

Da) y uno minoritario con $m/z = 6279.9$ Da (correspondiente a insulina mono-biotinilada, ver asignación de picos y picos experimentales y teóricos en **Tabla 1.4**) se pudo concluir que la modificación introducida fue de sólo un grupo Peo_4 -biotina por molécula de insulina. A su vez del análisis se desprende que no se obtuvo insulina modificada en el extremo amino terminal de la cadena A: el tratamiento con DTT + tripsina (**Figura 1.7.E**) mostró que la cadena A no se encontraba modificada ya que sólo se detectó el pico con $m/z = 2400.8$ Da (correspondiente a la cadena A + ión Na^+). Asimismo el tratamiento con DTT permitió detectar un pico minoritario con $m/z = 3902.1$ Da correspondiente a la cadena B modificada por la introducción de un grupo Peo_4 -biotina (**Figura 1.7.C**). Cuando luego de la reducción se trató la muestra con tripsina (**Figura 1.7.E**), el pico $m/z = 2485.0$ Da se asignó a la cadena B no modificada sin el extremo C-terminal (GFFYTPKT). De este modo, se concluye que el grupo Peo_4 -biotina se encuentra en la lisina 29 de la cadena B, sin haberse modificado el extremo N-terminal de la cadena A. Esto es importante ya que dicho extremo es relevante en la unión al IR *in vivo* (Pullen *et al.*, 1976; Markussen *et al.*, 1991). El rendimiento de la reacción resultó de aproximadamente 15 %, estimado a partir de los espectros MALDI-TOFF.

Tratamiento	Pico exp (Da) (mayor)	Pico teórico (Da)	Asignación	Pico exp (Da) (menor)	Pico teórico (Da) (B29)	Asignación
-	5805.6	5805.7	Insulina	6279.9	6278.9	A ₁ , B ₁ , B ₂₉
DTT (cadena A)	2405,0	2383.0+23	Insulina (cadena A)+Na	-	2383+23	B ₂₉ , B ₁ B ₂₉
	2383.0	2383.0	Insulina (cadena A)	-	2383.0	
DTT (cadena B)	3428.8	3428.7	Insulina	3902.1	3901.9	B ₁ , B ₂₉ , A ₁ B ₂₉ , B ₁ B ₂₉
Tripsina	4863.5	4826.7+23	Insulina sin GFFYTPKT+Na	-	4826.7+23	B ₂₉
	5704.5	5686.1+23	Insulina sin T+Na	-	5686.1+23	
Tripsina + DTT	881.4	859.4+23	GFFYTPK+Na	1455.6	1452.2	B ₂₉ , A ₁ B ₂₉ , B ₁ B ₂₉ , A ₁ B ₁ B ₂₉
	2400.8	2383.0+23	Insulina (cadena A)+Na	-	2383+23	
	2485.0	2449.7+23	Insulina (cadena B. sin GFFYTPK)+Na	-	2449.7+23	

Tabla 1.4. Picos más importantes (Da) obtenidos para cada tratamiento del producto de la reacción luego de la liofilización. El pico mayoritario permite concluir que se tiene en mayor proporción insulina no modificada y el pico minoritario muestra que la modificación se encuentra en la lisina ubicada en la posición 29 de la cadena B. Se muestran los picos teóricos calculados y los picos experimentales así como la asignación de cada uno de ellos.

Para evaluar la unión de la rhIns-biot al IR en células vivas se siguió la estrategia resumida en la **Figura 1.8.A** y detallada en **Materiales y métodos**. Células HeLa transfectadas con el pcDNA3-IR o el pcDNA3-IR-VFP se incubaron con rhIns-biot en una primera etapa a TA durante 15 min y luego de sucesivos lavados se procedió a una segunda etapa de incubación con QD655 conjugados a SA durante 10 min realizando finalmente los correspondientes lavados.

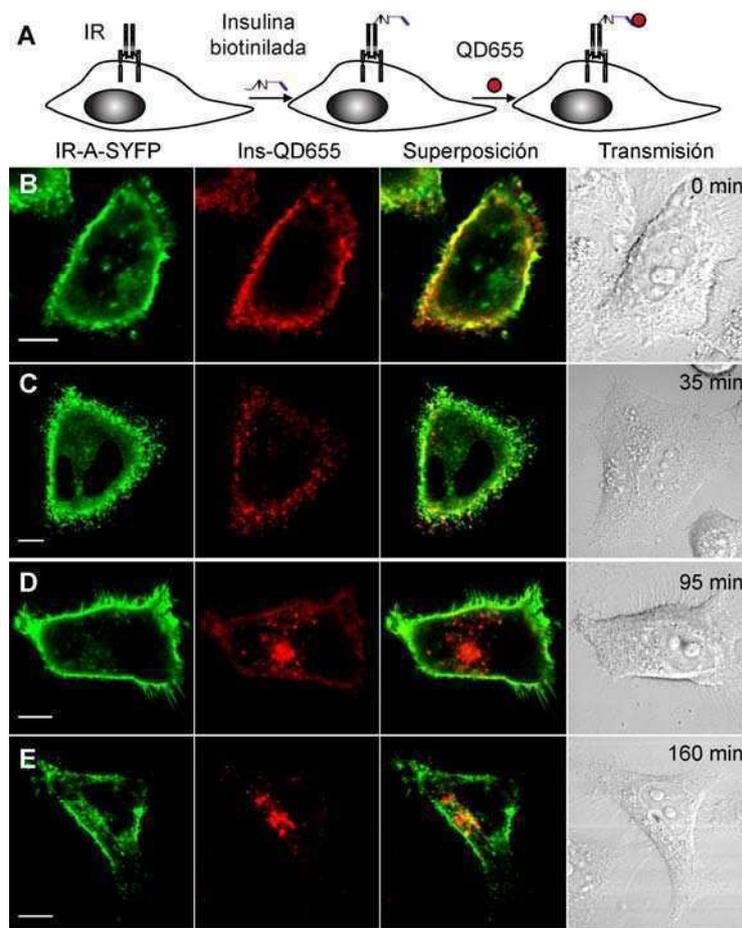


Figura 1.8. Visualización de la insulina humana unida al IR en células. A. Esquema de marcación. B-E. Células HeLa expresando el IR-A-SYFP marcadas con 50 nM rhIns-biot y 1 nM QD655 visualizadas vivas en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación SYFP, 515 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión SYFP, BP: 535-565 nm; emisión QD655, BP: 585-685 nm). Los tiempos de incubación a 37 °C se indican en la esquina superior derecha de cada figura. Barras de escala: 10 μ m.

En la **Figura 1.8.B-E** se muestra una secuencia de visualización de células vivas expresando el IR-A-SYFP marcadas con la rhIns-biot y los QD655 al concluir la marcación (0 min, **Figura 1.8.B**) o bien luego de incubaciones a 37 °C durante diferentes períodos de tiempo: 35 min, 95 min y 160 min (**Figuras 1.8.C-E**). Mientras que en la etapa inicial la señal de QD655 se localiza exclusivamente en la membrana plasmática, a medida que la internalización avanza la señal roja se detecta en mayor proporción en el interior y en menor medida en la superficie celular, finalizando en la región perinuclear.

1.2.3. BAC-Ins y los QD se unen al IR y al IR-VFP en membranas y filopodias

La misma aproximación utilizada con la rhIns-biot se aplicó con la BAC-Ins comercial tanto en células vivas como fijadas pudiendo ver marcación en la membrana celular y en las filopodias (**Figura 1.9**).

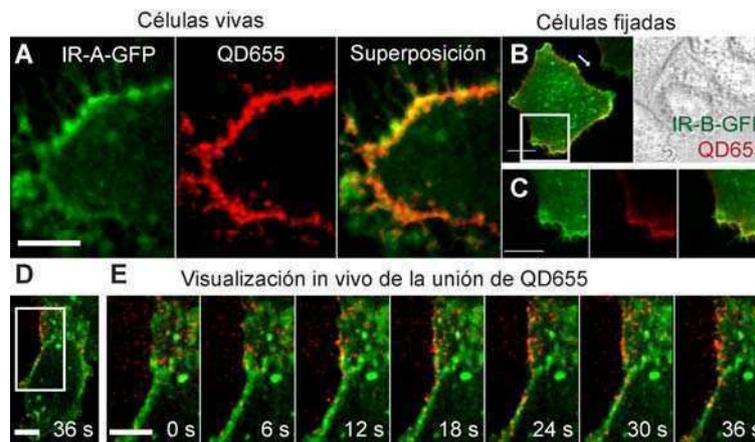


Figura 1.9. Visualización del IR en membranas y filopodias. **A.** Células HeLa expresando el IR-A-GFP marcadas con 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655 visualizadas vivas en el PAM (excitación GFP y QD655, 488 nm; emisión GFP, BP: 525/50 nm, emisión QD655, BP: 655/40 nm). Proyección de máxima intensidad proveniente de 25 planos en z con 0.5 μ m de distancia entre ellos. **B.** Células expresando el IR-B-GFP, marcadas del mismo modo pero fijadas en 3.7% PFA antes de ser visualizadas por microscopía confocal (Zeiss LSM 510 Meta; excitación GFP, 488 nm; excitación QD655, 488 nm y 458 nm; emisión GFP, BP: 500/20 nm; emisión QD655, LP: 650 nm). **C.** Ampliación de la región recuadrada en B. **D.** Célula expresando el IR-A-GFP marcada con 50 nM BAC-Ins y durante la adquisición de las imágenes en el PAM se adicionaron 50 pM QD655 a TA (excitación GFP y QD655, 488 nm; emisión GFP, BP: 525/50 nm, emisión QD655, BP: 655/40 nm). Ver la unión de QD en tiempo real en la **Película Suplementaria 1.1**. **E.** Ampliación de la región recuadrada en el panel D. Proyección de máxima intensidad de 15 planos en z para cada tiempo. La distancia entre planos fue de 0.5 μ m y el tiempo de exposición de 50 ms/imagen. Barras de escala: 10 μ m.

La unión de QD resultó específica ya que, por un lado, solo fue detectada en células transfectadas como se esperaba dado que las células HeLa expresan menos de 5000 moléculas de IR endógeno por célula (McKeon *et al.*, 1990; ver células no transfectadas dentro del mismo campo visualizado en cada experimento); y por el otro, no se detectó unión inespecífica en células incubadas con QD en ausencia de BAC-Ins como se verá más adelante.

En combinación con la expresión de las quimeras IR-VFP, la BAC-Ins permitió seguir la unión de los QD en las filopodias y membranas de células HeLa vivas. El PAM asimismo brindó la sensibilidad y velocidad necesarias para visualizar QD individuales unidos o uniéndose a la BAC-Ins en la membrana plasmática de células vivas expresando el IR-A-GFP (**Figuras 1.9.A y 1.9.D-E**). En el caso de células fijadas expresando el IR-B-GFP la visualización se realizó por microscopía confocal permitiendo observar también la unión de insulina al receptor en la membrana y en filopodias (**Figuras 1.9.B-C**). En los experimentos en tiempo real (**Figuras 1.9.D-E**) se

utilizó una concentración de 50 pM QD655 de modo tal de poder visualizar QD655 individuales uniéndose a la membrana celular (ver **Película Suplementaria 1.1**). En todos los casos fue posible detectar la presencia del IR en la membrana y en filopodias (revelado por la señal de la VFP utilizada) y la unión de insulina (revelada por los QD655).

A continuación se realizó una curva con concentraciones crecientes de QD655 entre 0.5 y 4 nM (iguales parámetros de adquisición durante la visualización por microscopía confocal) con el fin de asegurar que los experimentos posteriores fueran realizados en presencia de concentraciones no saturantes de QD655 (**Figuras 1.10**).

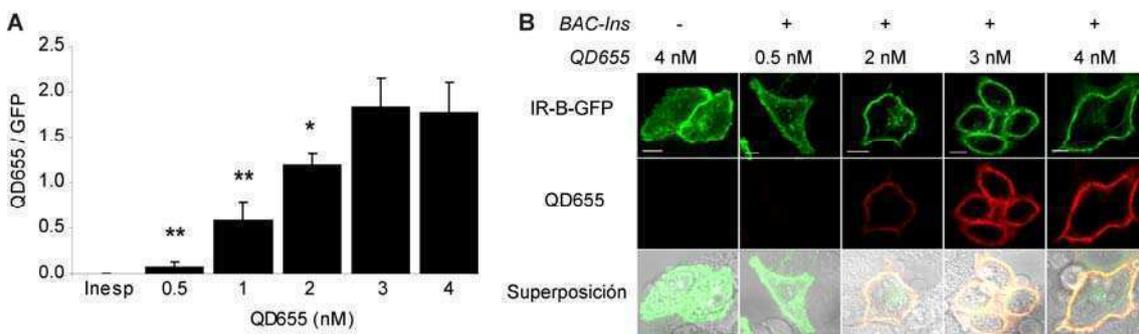


Figura 1.10. Curva de saturación de QD655. A. Cuantificación de la relación QD655/GFP para células expresando el IR-B-GFP marcadas con 50 nM BAC-Ins y QD655 (de 0.5 a 4 nM). Inesp: refiere al control de unión inespecífica de 4 nM QD655 (sin BAC-Ins). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la concentración anterior y posterior. Dos asteriscos indican $p < 0.0001$ y un asterisco $p = 0.01$. **B.** Ejemplos de los experimentos cuantificados en A, realizados en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación GFP, 488 nm; excitación QD655, 488 nm y 458 nm; emisión GFP, BP: 500/20 nm; emisión QD655, LP: 650 nm). Barras de escala: 10 μ m.

Se calcularon los cocientes entre la señal de QD655 y la de GFP para cada una de las concentraciones de nanopartículas utilizada observando una curva dependiente de la misma. Los cocientes QD655/GFP para 0.5 nM QD655 (0.1 ± 0.1 , $n = 10$), 1 nM QD655 (0.6 ± 0.2 , $n = 6$) y 2 nM QD655 (1.2 ± 0.1 , $n = 7$) resultaron significativamente diferentes de los anteriores y posteriores puntos (0.5 nM QD655 versus 1 nM QD655: $p < 0.0001$; 1 nM QD655 versus 2 nM QD655: $p < 0.0001$; 2 nM QD655 versus 3 nM QD655: $p = 0.01$). Esto es importante ya que sino podrían enmascarse diferencias entre las isoformas del IR dado que se sabe poseen afinidades diferentes por la insulina (Mosthaf *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1991, 1993; Pandini *et al.*, 2002; Benyoucef *et al.*, 2007). Se estableció que 1 nM QD655 era una concentración no saturante. La saturación se alcanza con 3 nM QD655 (1.8 ± 0.3 , $n = 8$) dado que el cociente QD655/GFP a esta concentración no difiere significativamente ($p = 0.89$) del obtenido cuando se utiliza 4 nM QD655 (1.3 ± 0.3 , $n = 11$). Por lo tanto, y dado que la insulina biotinilada se encuentra siempre en exceso (50 nM), solo una parte de estas moléculas estará siendo marcada con 1 nM QD655,

siendo la misma cantidad para ambas isoformas independientemente de eventuales diferencias de afinidad entre ellas.

Los resultados obtenidos por microscopía fueron confirmados por citometría de flujo. Células transfectadas con el IR salvaje o bien con el IR-SYFP se marcaron de igual modo que para experimentos de microscopía y luego de ser colectadas con 0.5 mM EDTA en PBS (de modo de no remover los QD unidos a la superficie celular como podría suceder en caso de utilizar tripsina), centrifugadas y lavadas se pasaron vivas por el citómetro detectándose la señal correspondiente a los QD655 indicativa de la presencia de ligando unido. En el caso del IR-SYFP también se recogió la señal de SYFP. La cuantificación se realizó con el programa WinMDI Versión 2.9 definiendo cuatro cuadrantes, como se muestra en la **Figura 1.11.A**, y determinando el porcentaje de células en cada uno de ellos. Luego se relativizó el valor calculado en el cuadrante superior derecho (correspondiente a mayores niveles de SYFP y de QD655) a las células control (es decir, aquellas no tratadas ni con BAC-Ins ni con QD655).

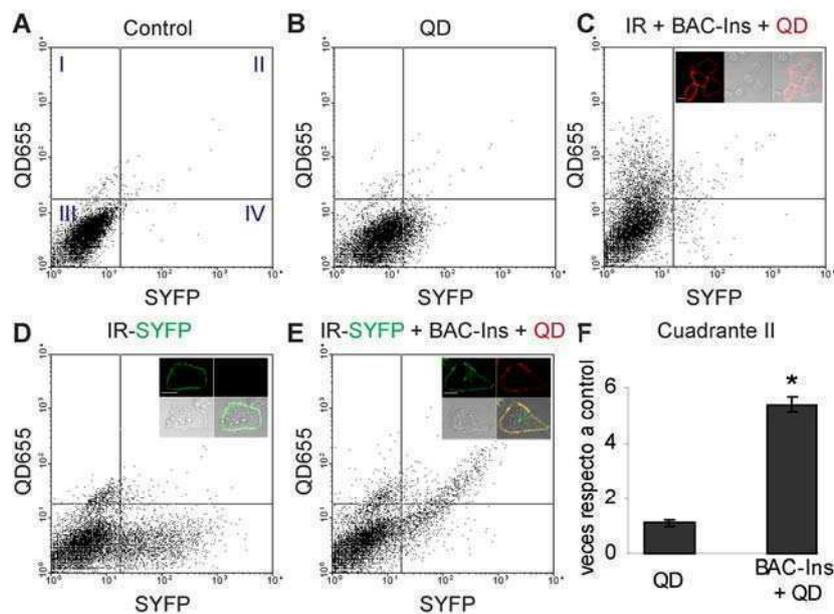


Figura 1.11. Unión de insulina al IR en células vivas por citometría de flujo. Se pasaron por el citómetro de flujo detectándose la señal de SYFP y de QD655: células HeLa sin transfectar o expresando el IR-A-SYFP sin marcar (**A** y **D** respectivamente), células incubadas sólo con 1 nM QD655 (10 min a TA) sin BAC-Ins (**B**), células expresando el IR-A o el IR-A-SYFP y marcadas con 50 nM BAC-Ins (15 min a TA) y 1 nM QD655 (10 min a TA) (**C** y **E** respectivamente). Las imágenes que se muestran dentro de los gráficos corresponden a experimentos similares obtenidas por microscopía confocal. **F.** Cuantificación de la proporción de eventos en el cuadrante numerado como II en el panel **A** con alta señal de SYFP (células transfectadas) y alta señal de QD655 (unión de insulina). Se relativizó dicha proporción a la obtenida para células solo incubadas con QD655 sin BAC-Ins previamente ($n = 3$ experimentos independientes). El asterisco indica $p < 0.0005$.

Las **Figuras 1.11.C** y **1.11.E** muestran los resultados para un experimento representativo en el cual células expresando el IR o el IR-SYFP respectivamente permitieron detectar señal de QD655 significativamente más alta que en el caso de

células que se incubaron con los QD655 sin BAC-Ins como control. En ambos casos la señal en los cuadrantes superiores (I y II) es mayor que en los controles. Dado que la señal de SYFP permite discriminar las células efectivamente transfectadas, se cuantificó en estos experimentos la proporción de eventos dentro del cuadrante II (alta señal de SYFP y alta señal de QD655). Esto se hizo para las muestras provenientes de células transfectadas e incubadas con BAC-Ins, las muestras de células control sin transfectar y las de células incubadas sólo con QD655. Luego se relativizaron estos datos a las células sin transfectar (veces respecto del control: 1.1 ± 0.1 para células sólo incubadas con QD655 sin BAC-Ins; y 5.4 ± 0.3 para células transfectadas incubadas con BAC-Ins y QD655, $n = 3$ experimentos independientes) observándose diferencias significativas entre la presencia y la ausencia de BAC-Ins previamente a la incubación con QD655 ($p < 0.0005$). Esto confirma que la marcación es específica, que las células transfectadas unen insulina biotínilada y que ambas aproximaciones (microscopía y citometría) resultan válidas para estudiar la unión de insulina al IR a nivel de células vivas individuales.

1.2.4. Las herramientas generadas desencadenan la señalización en células

Células HeLa expresando el IR-GFP (isoformas A y B) o el IR-B fueron estimuladas durante 10 min con 100 nM rhIns o BAC-Ins luego de ser hambreadas durante toda la noche en DMEM suplementado con 0.1 % BSA. La activación por autofosforilación de los receptores se estudió en primera instancia por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico contra la subunidad β del IR fosforilada en su tirosina 1361 como se muestra en las **Figuras 1.12.A-B** y **1.13.A**.

El receptor fosforilado se detectó en membrana para células transfectadas con las diversas construcciones. Células expresando el IR-A-GFP, IR-B-GFP o IR-B y estimuladas con rhIns presentaron señal en la membrana mientras que células no transfectadas o no estimuladas fueron negativas a la inmunofluorescencia. La fluorescencia en membrana correspondiente al anticuerpo secundario conjugado a Cy3 (reportero de los niveles de activación del IR) se cuantificó en células individuales para el IR-B (**Figura 1.13.B**). La activación inducida por BAC-Ins no fue significativamente diferente de la inducida por rhIns ($n = 5-7$; $p > 0.05$; **Figura 1.13.B**). Estos resultados se confirmaron por experimentos de Western blot con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (PY20) mostrando que tanto los IR salvajes como los IR-VFP pueden ser activados por rhIns (**Figuras 1.12.C-D**) y por BAC-Ins (**Figura 1.13.C-D**). La activación inducida por ambas insulinas no fue diferente confirmando así los resultados obtenidos por microscopía confocal cuantitativa.

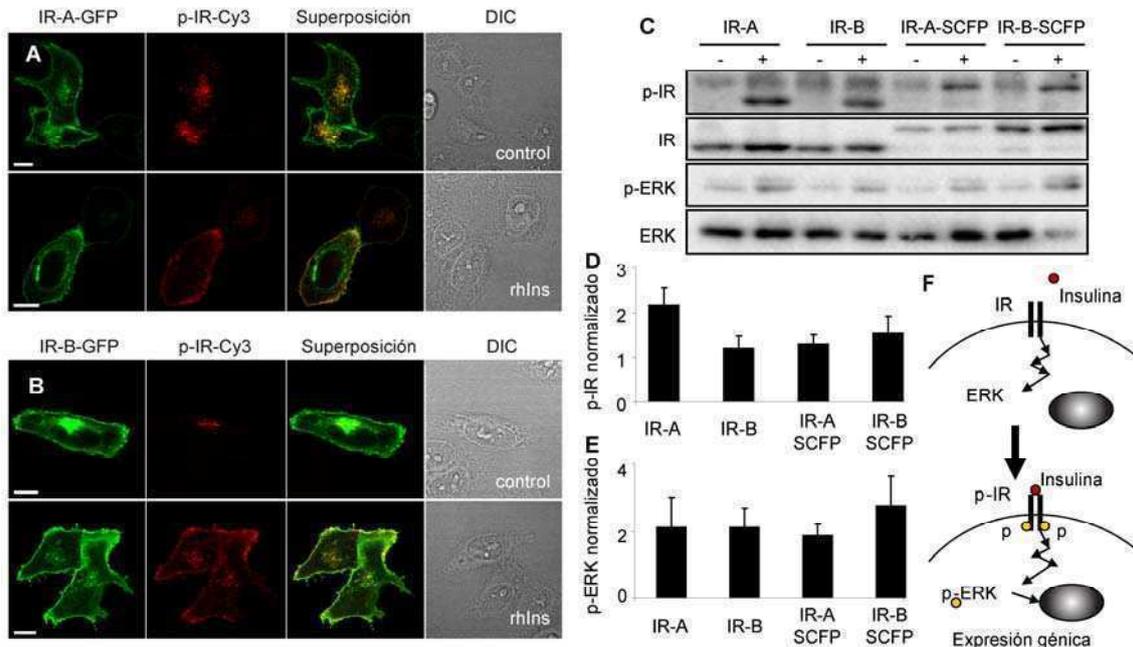


Figura 1.12. Expresión y activación de los IR-VFP por rhIns. Células HeLa expresando el IR-A-GFP (A) o el IR-B-GFP (B) fueron hambreadas durante 16 h, y luego estimuladas o no con 100 nM rhIns durante 10 min a 37 °C, fijadas en metanol y analizadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra la subunidad β del IR fosforilada (Tyr1361) y un anticuerpo secundario conjugado a Cy3. La visualización fue realizada en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación GFP, 488 nm; excitación Cy3, 532 nm; emisión GFP, 500-520 nm; emisión Cy3, 563-606 nm; modo Meta). Barras de escala: 10 μ m. C. Células HeLa expresando el IR salvaje o el IR-SCFP hambreadas toda la noche en DMEM suplementado con 0.1 % BSA fueron estimuladas con 100 nM rhIns durante 10 min y los lisados fueron analizados por Western blot con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (PY20) y luego contra la subunidad β del IR o bien contra ERK 1/2 fosforilado y posteriormente contra ERK 1/2. D. Cuantificación de la activación del IR. Los valores de estimulación para cada construcción (+) se normalizaron al correspondiente sin estimulación (-). Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de por lo menos 3 experimentos independientes. E. Cuantificación similar para la fosforilación de ERK 1/2 ($n \geq 4$ experimentos independientes). F. Esquema de parte de la vía de señalización del IR (p indica fosforilación).

A continuación se evaluó un evento río abajo en la cascada de señalización del IR (Figura 1.12.F). Está descrito que la unión de insulina y la posterior autofosforilación del IR desencadena la movilización de proteínas adaptadoras a la membrana celular (White, 1998; Sebastian *et al.*, 2006). De este modo, las señales inducidas por la insulina se propagan a través de numerosas vías interconectadas que incluyen la de PI3K/Akt y la cascada de las MAPK río abajo de Ras (Borisov *et al.*, 2009). La activación de ERK 1/2 se analizó entonces por Western blot con el objeto de evaluar la correcta funcionalidad de las herramientas generadas río abajo del receptor. Células expresando las diferentes quimeras del IR mostraron que la estimulación con 100 nM rhIns o BAC-Ins desencadena la fosforilación de ERK 1/2 de manera normal (Figuras 1.12.C y 1.12.E, 1.13.C y 1.13.E).

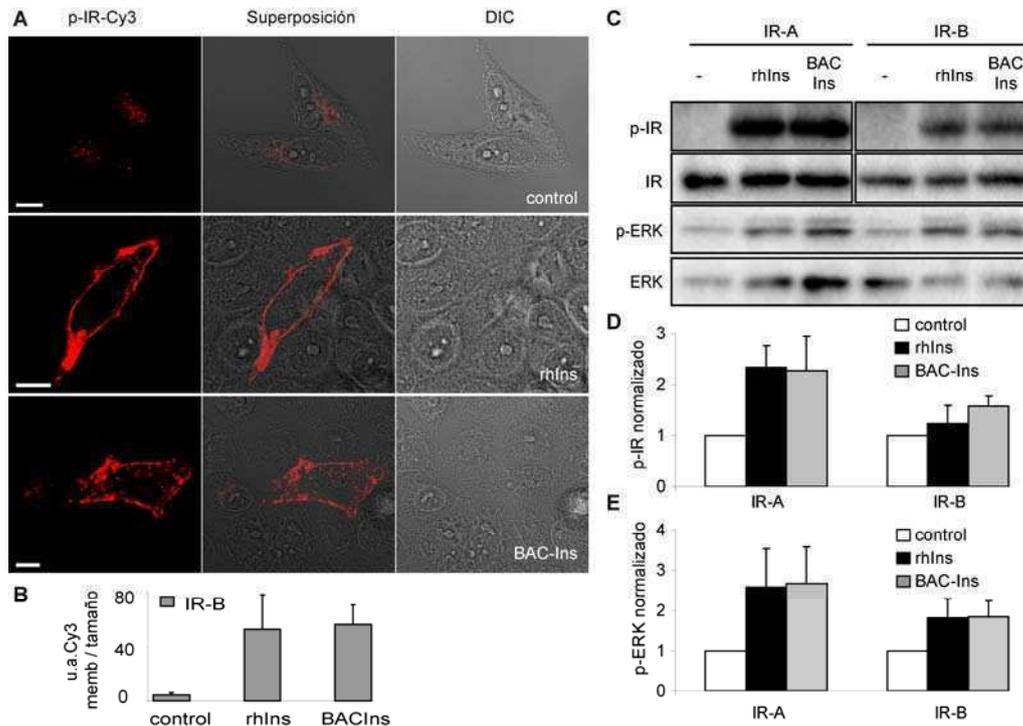


Figura 1.13. Activación del IR-A e IR-B salvajes por rhIns y BAC-Ins. **A.** Células expresando el IR-B sin estimular o estimuladas durante 10 min a 37 °C con 100 nM rhIns o BAC-Ins, fijadas y analizadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra la subunidad β del IR fosforilada (Tyr1361) y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3. La visualización fue realizada en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación, 532 nm; emisión, LP: 560 nm). Barras de escala: 10 μm. **B.** Cuantificación de la señal correspondiente a la fosforilación en la membrana. **C-E.** Evaluación por Western blot de la activación del IR y de la fosforilación de ERK 1/2 inducidas por 100 nM rhIns o BAC-Ins durante 10 min en células expresando el IR-A o el IR-B hambreadas toda la noche en DMEM suplementado con 0.1 % BSA. El análisis se realizó con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (PY20) y luego contra la subunidad β del IR o bien contra ERK 1/2 fosforilado y posteriormente contra ERK 1/2. Los resultados se muestran como el promedio ± SEM de por lo menos 3 experimentos independientes.

1.3. DISCUSIÓN

La generación de los vectores de expresión que codifican para las dos isoformas del receptor de insulina fusionadas a GFP, SCFP o SYFP en combinación con el ligando biotinilado y QD conjugados con SA permitió visualizar el IR y la insulina humana en membranas y filopodias de células vivas. Por inmunofluorescencia, marcación de insulina biotinilada con QD conjugados a SA y por medio de experimentos de Western blot con anticuerpos específicos se corroboró que todas las quimeras generadas son funcionales ya que se expresan y localizan correctamente, unen insulina, se internalizan, se autofosforilan y desencadenan la señalización propia inducida por esta hormona.

Con respecto al ligando, se modificó covalentemente la rhIns con una biotina unida al espaciador Peo₄. Es importante que la modificación se introduzca o bien en el extremo N-terminal de la cadena B o bien en la lisina ubicada en la posición 29 de la misma cadena ya que el amino terminal de la cadena liviana se encuentra involucrado

en la unión al receptor *in vivo* y por lo tanto en su actividad biológica (Levy *et al.*, 1967, 1973; Glieman *et al.*, 1974; Pullen *et al.*, 1976; Markussen *et al.*, 1991; Tsai *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2005). Si bien el rendimiento resultó de aproximadamente un 15 %, se confirmó que la insulina modificada se une al IR en células vivas y se internaliza normalmente. Entre la hormona y la biotina se introdujo un espaciador (*linker*) de aproximadamente 18.2 Å constituido por cuatro grupos Peo, dado que experimentos realizados con insulina biotinilada comercial (sin espaciador) no permitieron detectar marcación con QD conjugados a SA. A su vez, al preformar el complejo BAC-Ins-QD655 antes de incubar las células tampoco fue posible observar marcación. Se probaron para esto diversos tiempos de incubación del complejo preformado con las células (15, 30 ó 60 min), diferentes temperaturas (15 °C o TA), diversas concentraciones de complejo y distintas relaciones BAC-Ins/QD655. Estos resultados son consistentes con el modelo que propone una conformación de “V invertida” para el ectodominio del IR con un ángulo de apertura tal que partículas del tamaño de los QD no podrían acceder (McKern *et al.*, 2006). De este modo, la presencia del espaciador permite la conjugación de la insulina (rhIns-biotinilada o BAC-Ins) unida al IR dentro de la “V invertida” con los QD conjugados a SA fuera de dicha “V invertida”. Asimismo, se confirmó que la BAC-Ins (bovina y comercial) se comporta como la rhIns (activando el IR y gatillando la fosforilación de ERK 1/2) conduciendo esto a la posibilidad de utilizarla en los experimentos que se presentarán en el **Capítulo 2**.

Los experimentos coexpresando ambas isoformas fusionadas a diferentes VFP en los cuales se calcularon los coeficientes de Manders y Pearson mostraron que el IR-A y el IR-B colocalizan en la membrana plasmática. Si bien estos resultados no nos permiten concluir nada acerca de la interacción entre isoformas, están de acuerdo con los reportes que sostienen o suponen la existencia de los heterodímeros IR-A/IR-B (Pandini *et al.*, 1999; Benyoucef *et al.*, 2007; Blanquart *et al.*, 2008). En contraposición, Uhles y colaboradores (2003) muestran mediante experimentos de transferencia de energía (FRET, por sus siglas en inglés, *Förster resonance energy transfer*) en células pancreáticas β que las dos isoformas del IR localizan en diferentes dominios de la membrana plasmática impidiendo la formación de heterodímeros, justificando entonces, desde su punto de vista, la señalización diferencial de cada isoforma. Sin embargo, está reportado (Olson *et al.*, 1988) y aceptado que la dimerización de estos pro-receptores y la formación de sus puentes disulfuro entre las subunidades α tiene lugar post-traduccionalmente en el RE. En consecuencia, la segregación de las isoformas del IR para formar homodímeros o heterodímeros (IR-A/IR-A e IR-B/IR-B o IR-A/IR-B, respectivamente) debería ocurrir en el RE, dado que no existen evidencias

de intercambio de puentes disulfuro en pasos subsiguientes del proceso de maduración y tráfico del receptor, apoyando entonces a la mayoría de los trabajos publicados.

Las herramientas generadas mostraron ser biológicamente funcionales. Las mismas permitieron seguir la unión del ligando al IR con una estrategia novedosa, aplicada en otros sistemas biológicos como el del EGF y el NGF y sus respectivos receptores (Lidke *et al.*, 2004, 2005 y 2007; Echarte *et al.*, 2007; Kantelhardt *et al.*, 2010). De este modo, fue posible visualizar el ligando y el receptor diferencialmente con el objetivo de seguir procesos de endocitosis en células individuales vivas o fijadas (**Capítulos 2, 4 y 5**). La puesta a punto del sistema generado abre las puertas a otro tipo de experimentos que aprovechen sus características. El hecho de que estas herramientas hayan permitido la marcación específica sin afectar la señalización normal en células vivas condujo al diseño de estudios a nivel de moléculas únicas enfocados en la interacción ligando-receptor. Como se discutirá en el **Capítulo 6**, la microscopía de fuerza atómica con ligandos biotinilados unidos a un *cantilever* modificado con SA es una herramienta apropiada para medir fuerzas de interacción ligando-receptor a nivel de moléculas individuales en células vivas.

En conclusión, las herramientas desarrolladas posibilitan el diseño de experimentos para responder preguntas abiertas de un modo novedoso: ¿qué sucede durante la internalización del receptor de insulina y su ligando en células vivas?, ¿existen diferencias en la endocitosis de las dos variantes de *splicing* del IR?, ¿qué relación puede establecerse entre el proceso de endocitosis y las cascadas de señalización río abajo del IR? (**Capítulo 2**); ¿es posible marcar extracelularmente el IR para diferenciar el receptor que está siendo procesado del que ya se localizó en membrana y/o fue endocitado, así como para eventualmente distinguir ambas isoformas? (**Capítulo 3**); ¿es posible estudiar la formación de heterodímeros entre isoformas del IR formados exclusivamente en la membrana plasmática? (**Capítulo 4**); ¿pueden extenderse estos estudios a otro ligando que se sabe posee afinidad por el IR como es el IGF-II? (**Capítulo 5**); ¿es posible medir la fuerza de interacción entre el receptor y el ligando al nivel de moléculas individuales? (**Capítulo 6**).

Película Suplementaria 1.1. Visualización en tiempo real de la unión de QD655 a la BAC-Ins en células vivas en el PAM. Células HeLa expresando el IR-A-GFP marcadas con 50 nM BAC-Ins durante 15 min a TA y durante la adquisición de las imágenes se adicionaron 50 pM QD655 a TA. Se adquirieron, para 48 tiempos, 5 planos en z con una separación de 0.5 μ m entre ellos y un tiempo de exposición de 50 ms/imagen (excitación GFP y QD655, 488 nm; emisión GFP, BP: 525/50 nm; emisión QD655, BP: 655/40 nm). GFP se muestra en verde y QD655 en rojo.

CAPÍTULO 2

Dinámica diferencial de la endocitosis y la señalización del IR α y el IR β

2. Dinámica diferencial de la endocitosis y la señalización del IR A e IR B

2.1. INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de la existencia de las dos variantes de splicing del IR publicado en 1985 simultáneamente por dos grupos en las revistas Cell y Nature (Ebina *et al.*, 1985 y Ullrich *et al.*, 1985) hubo un importante número de trabajos mostrando diferentes e interesantes aspectos del comportamiento de ambas isoformas. Dado que la abundancia relativa de los ARNm que codifican para los dos IR es un fenómeno finamente regulado que se encuentra conservado en mamíferos (Goldstein *et al.*, 1990), resulta razonable considerar que las diferencias funcionales de las dos isoformas son relevantes para la acción tejido específica de la insulina *in vivo*.

Las propiedades de unión del IR-A y el IR-B fueron estudiadas en los últimos treinta años por numerosos grupos reportando en algunos casos resultados controversiales. La mayoría de ellos concluyen que la isoforma A muestra una afinidad de aproximadamente el doble por insulina que la isoforma B (Mosthaf *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1991 y 1993; Pandini *et al.*, 2002; Benyoucef *et al.*, 2007). Si bien la significancia fisiológica de esta diferencia no es clara ni se encuentra aún bien establecida, se especula que la predominancia de la isoforma de menor afinidad (IR-B) en el hígado por ejemplo puede tener como objeto compensar la alta concentración portal de insulina *in vivo* a la que se encuentra expuesto el hígado (Mosthaf *et al.*, 1990).

También se presentan controversias en lo que se refiere a la tasa de internalización de ambas isoformas del IR. Mientras McClain y colaboradores (1991) informan que no existirían diferencias entre el IR-A y el IR-B, Yamaguchi y colaboradores, durante el mismo año, concluyen lo opuesto con una aproximación experimental muy similar. En particular, demuestran una diferencia en la internalización del receptor inducida por insulina donde la endocitosis del IR-A se encuentra favorecida. Esta diferencia, discuten, no es un artefacto de la mayor afinidad de esta isoforma por el ligando ya que todos los datos de internalización fueron normalizados a la cantidad de ligando unido a la superficie celular. Hasta el momento,

solo alteraciones que involucran la autofosforilación del receptor (Wilden *et al.*, 1990; Reynet *et al.*, 1990 y 1994) o la estructura intracelular de la subunidad β del receptor, en particular la región yuxtamembrana (Backer *et al.*, 1990; Thies *et al.*, 1989) o el sitio de unión a ATP (McClain, 1987; Hari y Roth, 1987; Russell *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1990) mostraron tener efecto en el bloqueo de la internalización del receptor.

Durante el mismo año en el que los grupos de Yamaguchi y McClain publicaron sus trabajos controversiales, se reportan estudios cinéticos de la internalización del IR-A y el IR-B en fibroblastos de ratón utilizando insulina marcada radiactivamente con resultados concordantes a los de Yamaguchi. Mientras la isoforma A alcanzó el máximo de internalización (aproximadamente 65 % del total) a los 10 min con una tasa de reciclado cercana al 80 % de los receptores internalizados luego de 20 min, la internalización del IR-B presentó el máximo de 60 % luego de 15 min sin reciclado detectable dentro de los 30 min (Vogt *et al.*, 1991). El mecanismo molecular por el cual la presencia del segmento de 12 amino ácidos en el extremo C-terminal de la subunidad α codificado por el exón 11 influye en la tasa de internalización no se conoce hasta el momento.

Todos estos estudios publicados en el lapso de los últimos 30 años permitió tener un conocimiento profundo desde el punto de vista bioquímico del sistema insulina-IR. Sin embargo, poco se ha avanzado en el estudio a nivel de células individuales y de dinámica de las dos isoformas del IR *in vivo*. Esto motivó esta parte del trabajo cuyo objetivo fue estudiar la dinámica espacio-temporal del IR y su ligando, centrando la atención en el proceso de endocitosis de ambas isoformas y su efecto en ciertas etapas de la cascada de señalización desencadenada por cada una. Se diseñaron y generaron un conjunto de herramientas (descritas en el **Capítulo 1**) que permitieran “mirar en la superficie y dentro” de las células vivas, estudiar la unión del ligando al receptor y su internalización poniendo el interés en comparar el comportamiento de ambas isoformas del IR.

Objetivos

1. Visualizar la internalización del complejo insulina-IR
2. Estudiar cualitativa y cuantitativamente la dinámica de endocitosis de las isoformas del IR en células vivas e individuales
3. Correlacionar las diferencias en la internalización con la señalización metabólica y mitogénica del IR-A e IR-B

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Endocitosis del complejo insulina-IR

Como se mencionó en el capítulo anterior, es posible visualizar la endocitosis de QD-insulina mediada por el IR por microscopía confocal en células vivas. En la **Figura 2.1** se muestra una secuencia de internalización para células expresando cada una de las isoformas del IR (IR-A-GFP e IR-B-GFP) marcadas con BAC-Ins y QD655 e incubadas a 37 °C durante diferentes períodos de tiempo. Nuevamente, mientras los QD655 se localizan exclusivamente en la membrana plasmática en las células no incubadas a 37 °C, la proporción de QD655 presente en el citoplasma aumenta al incrementar el tiempo de incubación a 37 °C en el caso de las dos isoformas del IR.

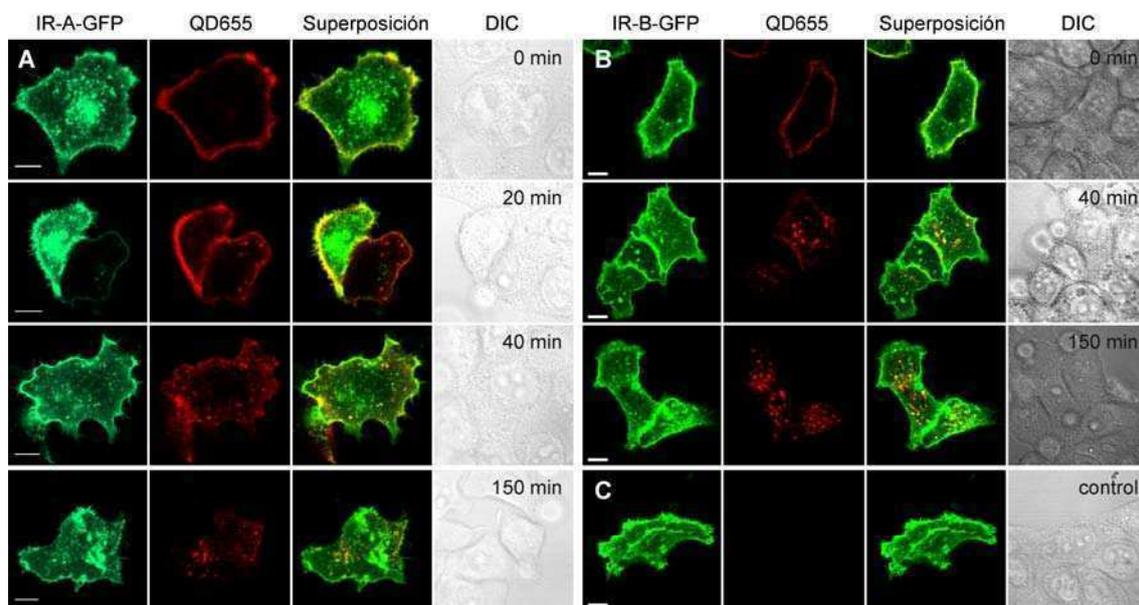


Figura 2.1. Internalización del complejo insulina-IR. Células HeLa expresando el IR-A-GFP (A) o el IR-B-GFP (B) se marcaron vivas con 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655 a 15 °C, se incubaron a 37 °C los tiempos indicados y fueron fijadas en 3.7 % PFA. C. Control del pegado inespecífico de QD655, es decir, las células se incubaron sólo con QD655 sin BAC-Ins previamente. La visualización se realizó en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación GFP, 488 nm; excitación QD655, 488 nm y 458 nm; emisión GFP, BP: 500/20 nm; emisión QD655, LP: 650 nm). Barras de escala: 10 μ m.

La información cualitativa que hasta el momento se obtuvo sobre la endocitosis se analizó de modo cuantitativo en células individuales. Para esto se diseñó una rutina en el Matlab que permitió segmentar cada una de las células en una región denominada *interior* y una región denominada *membrana* como se muestra en la **Figura 2.2.E**. Luego de dicha segmentación se cuantificó la señal de QD dentro de cada una de las regiones (QD_i y QD_m) y los QD_t ($QD_i + QD_m$) pudiendo así establecer el grado de internalización como QD_i/QD_t (ver **Materiales y métodos**). En la **Figura 2.2.F** se muestran estos resultados en células expresando el IR-B (se muestran

ejemplos de estas imágenes en los paneles **A-D**): 20 min, 48 % ± 7 % ($n = 17$); 40 min, 64 % ± 18 % ($n = 39$); y 150 min 81 % ± 10 % ($n = 23$). El porcentaje de internalización luego de cada tiempo de incubación a 37 °C resultó estadísticamente diferente ($p < 0.001$), definiendo entonces un patrón temporal de endocitosis.

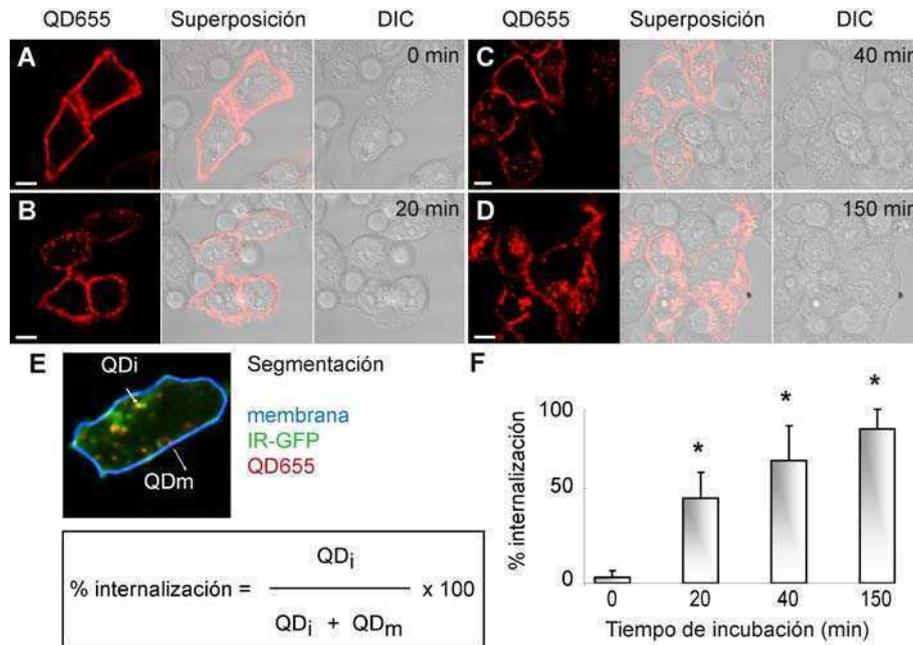


Figura 2.2. Cuantificación de la internalización del complejo insulina- receptor. A-D. Células HeLa expresando el IR-B se marcaron vivas con 50 nM BAC-Ins y 1nM QD655 a 15 °C, se incubaron a 37 °C durante 0 (**A**), 20 (**B**), 40 (**C**) ó 150 min (**D**) y luego de ser fijadas en 3.7 % PFA se visualizaron por microscopía confocal (Zeiss LSM 510 Meta, excitación QD655, 488 nm y 458 nm; emisión QD655, LP: 650 nm.). Barras de escala: 10 µm. **E.** Segmentación realizada con el Matlab sobre cada célula. **F.** Cuantificación de la internalización en células expresando el IR-B. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p \leq 0.001$; $n = 17-39$ células).

Para confirmar la endocitosis, luego de la incubación las células se pusieron en contacto breve con una solución ácida con el objeto de remover el ligando unido a los receptores de la superficie pudiendo entonces diferenciarlos del realmente internalizado (Haft *et al.*, 1998; Lidke *et al.*, 2004). Células expresando el IR-VFP o el IR salvaje marcadas con 50 nM BAC-Ins durante 15 min y luego con 1 nM QD655 durante 10 min a 15 °C, se incubaron a 37 °C por diferentes períodos de tiempo y finalmente se fijaron o previamente a la fijación se trataron 5 min con ácido. En la **Figura 2.3** se muestra un experimento representativo para células expresando el IR-B-GFP. El tratamiento ácido despegga totalmente la marcación en el momento inicial dado que aún no comenzó la internalización y la interacción ligando-receptor que se encuentra únicamente en la superficie celular es susceptible a la disociación a pH bajo (**Figura 2.3.B**). A medida que la internalización avanza se observa que aumenta la señal de QD655 en el interior celular y que ésta es resistente al tratamiento con ácido por encontrarse dentro de la célula (comparar las **Figuras 2.3.B** y **2.3.D**). El tratamiento breve con ácido demostró que los complejos insulina-QD655 se localizan

al principio exclusivamente en la membrana plasmática y que sólo se internalizan al incubar las células a 37 °C. Estos resultados confirmaron que la endocitosis ocurre efectivamente.

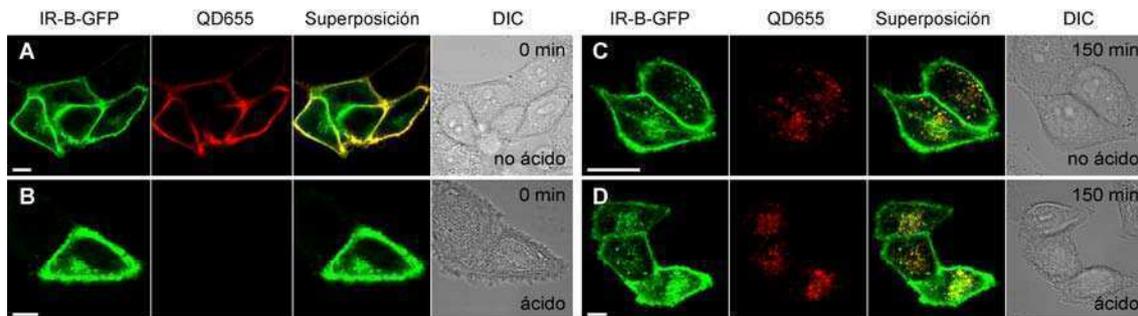


Figura 2.3. Confirmación de la endocitosis por microscopía confocal y tratamiento ácido. Células HeLa expresando el IR-B-GFP se marcaron vivas con 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655 a 15 °C y fueron directamente fijadas en 3.7 % PFA (A) o bien previamente a la fijación se las trató durante 5 min con una solución 0.1 M Na-glicina pH 3, 0.5 M NaCl (B). C-D. Los paneles de la derecha muestran el mismo tipo de experimentos pero luego de la marcación las células fueron incubadas a 37 °C durante 150 min. La visualización se realizó en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación GFP, 488 nm; excitación QD655, 488 nm y 458 nm; emisión GFP, BP: 500/20 nm; emisión QD655, LP: 650 nm). Barras de escala: 10 μ m.

Finalmente, fue posible seguir el proceso de internalización por citometría de flujo, técnica que permite evaluar un número más grande de eventos y al mismo tiempo analizar cada evento (célula) en particular. En este caso, células expresando el IR-A-SYFP marcadas con BAC-Ins y QD655 e incubadas a 37 °C fueron colectadas con EDTA en PBS y su fluorescencia analizada por citometría de flujo. La medición se realizó sobre las células vivas y las marcaciones se realizaron por duplicado. Se utilizó una muestra tal cual y la otra tratada brevemente con una solución ácida durante 2 min con el objeto de despegar los complejos BAC-Ins-QD655 localizados en la superficie celular pudiendo así medir únicamente los internalizados. Se analizó primero dónde se localiza la media geométrica en los histogramas que muestran el número de eventos en función de la señal de QD655. Para esto se seleccionaron solamente los eventos con SYFP comparando los gráficos de células transfectadas y los de las que no habían sido transfectadas. Una vez seleccionada la región que presentaba eventos con SYFP se realizaron los histogramas para la señal de QD655 para cada uno de los tiempos de incubación a 37 °C. Cuando se superpusieron estos histogramas resultó claro que en el caso de las muestras tratadas con ácido la media se corre a valores mayores a medida que se incrementa el tiempo de incubación a 37 °C. Esto no sucede con las muestras no tratadas con ácido (Figura 2.4.A-B). Se calculó la media geométrica para cada caso y se la normalizó a la de tiempo 0 min en 5 experimentos independientes. Este análisis se muestra en la Figura 2.4.C y en la Tabla 2.1 tanto para muestras tratadas con ácido como para aquellas no tratadas.

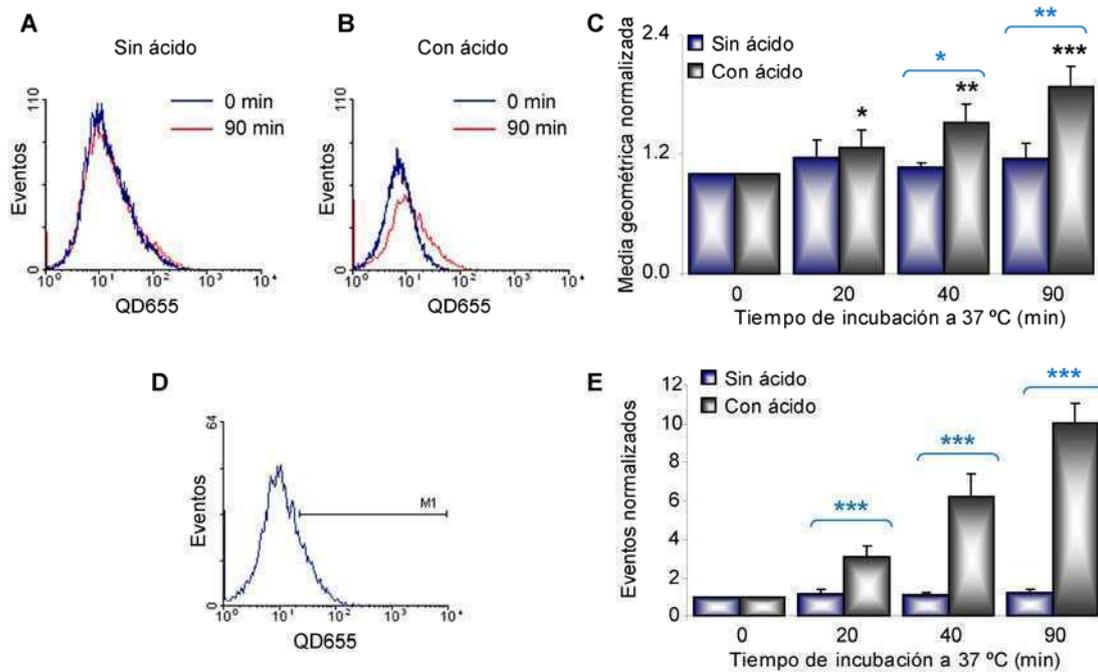


Figura 2.4. Análisis de la internalización en células vivas por citometría de flujo. Células HeLa expresando el IR-SYFP marcadas con 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655 a TA fueron incubadas durante diferentes tiempos a 37 °C, se trataron o no con una solución ácida (0.1 M Na-glicina, pH 3, 0.5 M NaCl) durante 2 min, se colectaron con 0.5 mM EDTA y se pasaron vivas por el citómetro de flujo detectándose la señal de SYFP y de QD655. Se realizaron los histogramas para la señal de QD655 de los eventos que eran positivos para SYFP (células transfectadas) superponiéndose los de las muestras provenientes de células incubadas a 37 °C durante 90 min y aquellas no incubadas (A y B). C. Análisis de la media geométrica de los histogramas normalizada a la media geométrica a tiempo 0 min de cada experimento. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 5 experimentos independientes. D-E. En cada histograma de QD655 se determinó un marcador (M1) que incluyera aproximadamente el 4 % de los eventos a tiempo 0 min (D). Para cada tiempo de internalización se midió el porcentaje de eventos dentro de esa región y este análisis de 5 experimentos independientes se muestra en el panel E. La normalización se realizó a la situación a tiempo 0 min. Los asteriscos negros muestran diferencias significativas con la situación a tiempo 0 min) y los asteriscos celestes indican diferencias entre las muestras tratadas o no con ácido (*: $p = 0.03$; **: $p = 0.003$; ***: $p \leq 0.0008$).

Tiempo de incubación a 37 °C	Media geométrica normalizada	
	Sin ácido	Con ácido
0 min	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
20 min	1.2 \pm 0.2	3.1 \pm 0.5
40 min	1.1 \pm 0.1	6.2 \pm 1.2
150 min	1.2 \pm 0.2	10.0 \pm 1.0

Tabla 2.1. Endocitosis por citometría de flujo. Análisis del efecto de la incubación a 37 °C en el corrimiento de la media geométrica para la señal de QD655. Células expresando el IR-SYFP marcadas con 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655 incubadas a 37 °C durante 20, 40 ó 150 min se trataron o no durante 2 min a TA con 0.1 M Na-glicina, pH 3, 0.5 M NaCl, se lavaron y se colectaron con 0.5 mM EDTA. Se pasaron vivas por el citómetro de flujo. Luego de seleccionar los eventos con señal de SYFP (células transfectadas) se realizaron los histogramas para la señal de QD655 y se calculó la media geométrica de cada uno. Se normalizó en cada experimento esta medición a la media geométrica obtenida para el tiempo 0 min. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM de 5 experimentos independientes.

En las muestras no tratadas con ácido (barras azules) no se evidencian diferencias a medida que avanza la endocitosis (dado que se miden los QD655 unidos

totales). Por otro lado, la media geométrica se va corriendo a valores mayores a medida que aumenta el tiempo de internalización en las que sí fueron tratadas con ácido antes de ser analizadas por citometría (barras grises, donde se miden solamente los QD655 internalizados). Este corrimiento es un indicador de que el promedio de la señal de QD655 en las células se incrementa. Los asteriscos negros muestran diferencias significativas con el tiempo 0 min y los asteriscos azules diferencias entre la muestra tratada o no con ácido.

Posteriormente se determinó un marcador que incluyera a tiempo 0 min aproximadamente el 4 % de los eventos en cada histograma (**Figura 2.4.D**). De este modo se midió el porcentaje de eventos dentro de esta región a medida que aumentaba el tiempo de internalización. Mediante este análisis se concluyó que la endocitosis procede ya que en células tratadas con ácido este porcentaje aumenta con el tiempo y no sucede lo mismo con las muestras no tratadas con ácido (**Figura 2.4.E**, comparar barras azules y grises).

Estos experimentos corroboran la endocitosis observada por microscopía, evaluando un número grande de eventos. Se analizaron aproximadamente 30000-50000 eventos por muestra de los cuáles entre el 25 % y el 45 % eran positivos para SYFP.

2.3.2. La presencia de QD y VFP no interfiere en la endocitosis

Una vez confirmada la internalización se analizó si la misma se debía a endocitosis. Se evaluaron entonces las diversas etapas de la endocitosis combinando los ligandos biotinilados y los QD conjugados con SA (para seguir el tráfico del ligando) con una inmunofluorescencia convencional con anticuerpos que permitieran visualizar la localización subcelular de los complejos ligando-receptor durante el tráfico vesicular. Se evaluaron dominios ricos en caveolina (con un marcador de caveolina), endosomas tempranos (con EEA1) y lisosomas (con anti-CD63, contra la proteína 63 asociada a membrana de lisosomas, LAMP3). Estos experimentos fueron realizados en células expresando el IR-A, marcadas vivas con BAC-Ins y QD655 incubadas a 37 °C durante diferentes tiempos y luego fijadas en 3.7 % PFA.

Antes de la incubación a 37 °C (tiempo 0 min) los complejos BAC-Ins-QD655 presentes exclusivamente en la membrana colocalizan con los dominios ricos en caveolina (**Figura 2.5.A**). A tiempos relativamente breves (20 min) de internalización se detectan mayores niveles de colocalización entre la señal roja (QD655) y la verde correspondiente a endosomas tempranos (comparar la **Figura 2.5.D** con **2.5.E**). En la

Figura 2.5.F se muestra una ampliación de la región recuadrada en el panel **E** junto con un gráfico PDM en el que se ve la colocación de los QD655 con los endosomas tempranos en el interior celular. A tiempos prolongados de internalización (60 min) fue posible detectar la señal correspondiente a los QD655 en vesículas lisosomales presentes en regiones perinucleares (**Figura 2.5.C**).

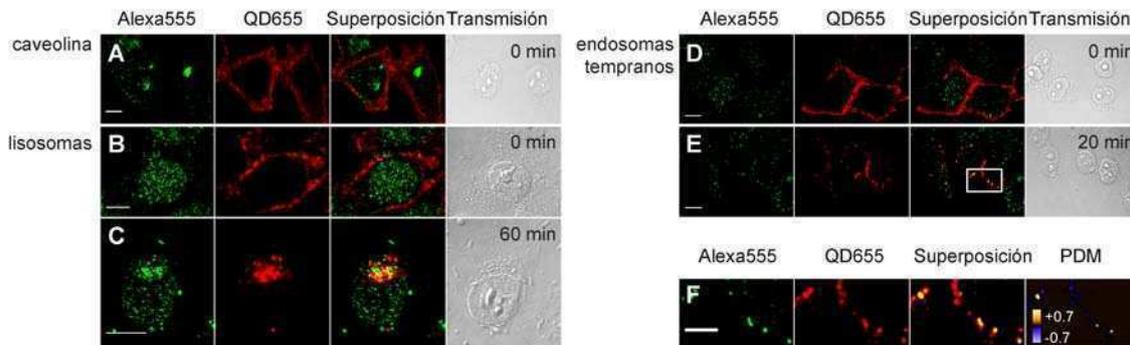


Figura 2.5. Tráfico vesicular del complejo BAC-Ins-QD655. Células HeLa expresando el IR-A se marcaron vivas con 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655, se incubaron a 37 °C los tiempos indicados y luego fueron fijadas en 3.7 % PFA. Posteriormente se realizaron las correspondientes inmunofluorescencias: **A.** Caveolina (0 min). **B y C.** Lisosomas (0 y 40 min) con anti-CD63. **D y E.** Endosomas tempranos (0 y 20 min), utilizando en todos los casos anticuerpos secundarios conjugados a Alexa flúor 555. **F.** Ampliación de la región recuadrada en **E**. El panel de la derecha muestra un gráfico PDM evaluando la colocación entre la señal de QD655 y la de los endosomas tempranos en la zona ampliada. La visualización se realizó por microscopía confocal (Olympus Fluoview FV 1000, excitación Alexa flúor 555, 543 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión Alexa flúor 555, BP: 560-620 nm; emisión QD655, BP: 585-685 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 μ m.

Teniendo en cuenta los experimentos con y sin ácido por citometría y microscopía y los resultados obtenidos con los marcadores de tráfico vesicular podemos concluir que la endocitosis del complejo BAC-Ins-QD655-IR ocurre.

A continuación se analizó si la presencia de las VFP interfería en el proceso de endocitosis. Para esto se realizó la cuantificación del grado de internalización como se describió para células expresando el IR-B, ahora en células expresando el IR-B-GFP: 20 min, 44 % \pm 14 %, $n = 21$; 40 min, 67 % \pm 13 %, $n = 22$; 150 min, 87 % \pm 8 %, $n = 9$. Estos resultados, que se presentan en la **Figura 2.6**, no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de internalización en ambos tipos de células, concluyéndose entonces que la fusión con proteínas fluorescentes no interfiere en el proceso de endocitosis.

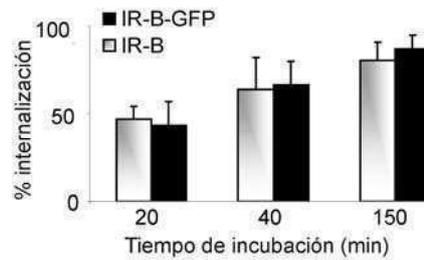


Figura 2.6. Análisis del efecto de la fusión con VFP en el proceso de endocitosis del complejo insulina-IR. Cuantificación de la internalización en células expresando el IR-B (barras grises) o el IR-B-GFP (barras negras) marcadas con 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655 incubadas a 37 °C. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p \leq 0.001$; $n = 9-39$ células).

De la misma manera, los QD, cuyo tamaño aproximado es de 20 nm, podía afectar la internalización del complejo ligando-receptor. Para analizar si este efecto existía se realizaron experimentos similares pero con insulina unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC-Ins). Primeramente, se comprobó que este ligando es capaz de unirse al IR en células por microscopía confocal (**Figura 2.7.C**), procediendo luego a la evaluación de su capacidad de inducir la autofosforilación del receptor. Para esto se estimularon células expresando el IR-B con 50 nM FITC-Ins durante 10 min y se analizó la activación del receptor por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (PY99) y uno secundario conjugado a Cy3. Estos experimentos mostraron señal positiva en la membrana plasmática en células estimuladas con FITC-Ins de modo similar a cuando la estimulación fue realizada con rhIns o BAC-Ins confirmando la actividad del ligando fluorescente (**Figura 2.7.A-B**). Si bien el anticuerpo utilizado es un anticuerpo genérico contra fosfotirosina pudo verse que no todas las células ubicadas en el mismo campo de observación mostraban señal positiva. En el panel correspondiente a la estimulación con BAC-Ins se seleccionó un ejemplo de esta observación: mientras la célula inferior es positiva a la inmunofluorescencia, no lo es la que se encuentra en la esquina superior derecha del mismo campo. Dado que las transfecciones son transientes este es el control más adecuado tanto de que no hay pegado inespecífico del anticuerpo secundario como del hecho que el anticuerpo primario está revelando fosforilación en tirosina debido a la activación del IR exógeno. Las células transfectadas solo muestran la señal positiva en membrana cuando son estimuladas con insulina o sus análogos, células no transfectadas en el mismo campo de observación son negativas al ensayo.

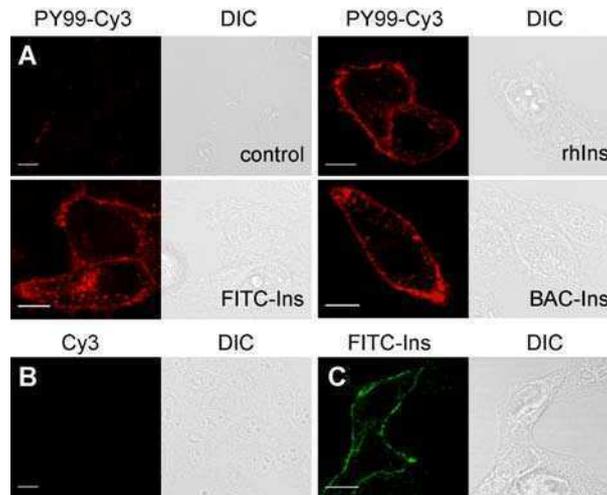


Figura 2.7. Análisis de la funcionalidad de la FITC-Ins. **A.** Células HeLa expresando transientemente el IR-B fueron hambreadas durante 18 h y luego estimuladas con 50 nM FITC-Ins durante 10 min. Posteriormente a la fijación en metanol a -20 °C se realizó un experimento de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (PY99) y un anticuerpo secundario conjugado a Cy3. **B.** Control sin anticuerpo primario. **C.** Células HeLa expresando el IR-B, hambreadas durante toda la noche se marcaron a TA con 50 nM FITC-Ins durante 15 min y se fijaron en metanol. La visualización fue realizada en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación FITC, 488 nm; emisión FITC, 510-563 nm.; excitación Cy3, 532 nm; emisión Cy3, 563-606 nm; modo meta). Barras de escala: 10 μ m.

Al marcar células expresando el IR-B con FITC-Ins en una sola etapa los resultados de internalización fueron los siguientes: 20 min, 46 % \pm 5 % ($n = 12$); 40 min, 60 % \pm 14 % ($n = 12$); 150 min: 75 % \pm 12 % ($n = 15$). Estos datos no mostraron diferencias significativas con los obtenidos con BAC-Ins y QD655 (**Figura 2.8**). Por lo tanto, se concluye que los QD no interfieren en el proceso de endocitosis brindando una herramienta mucho más ventajosa que la FITC-Ins dado su brillo más intenso, su fluorescencia más estable y la posibilidad de combinarlos con diferentes VFP.

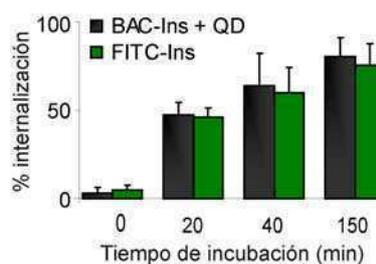


Figura 2.8. Análisis del efecto de los QD655 unidos a la BAC-Ins en el proceso de endocitosis del complejo insulina-IR. Cuantificación de la internalización en células expresando el IR-B marcadas con 50 nM FITC-Ins (barras verdes) ó 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655 (barras grises) incubadas a 37 °C.

Estos resultados en conjunto permiten concluir que es posible visualizar la endocitosis del complejo insulina-IR en células vivas ocurriendo este proceso de manera normal. Además, es posible realizar un análisis cuantitativo en células individuales.

2.3.3. La colocalización del IR-GFP e Ins-QD disminuye durante el tráfico intracelular

Con el objeto de evaluar el complejo ligando-receptor durante el tráfico vesicular y su desensamblado posteriormente a la endocitosis, se analizó el grado de colocalización entre los QD655 (unidos a BAC-Ins) y la señal correspondiente a IR-GFP a distintos tiempos de incubación a 37 °C (**Figura 2.9**).

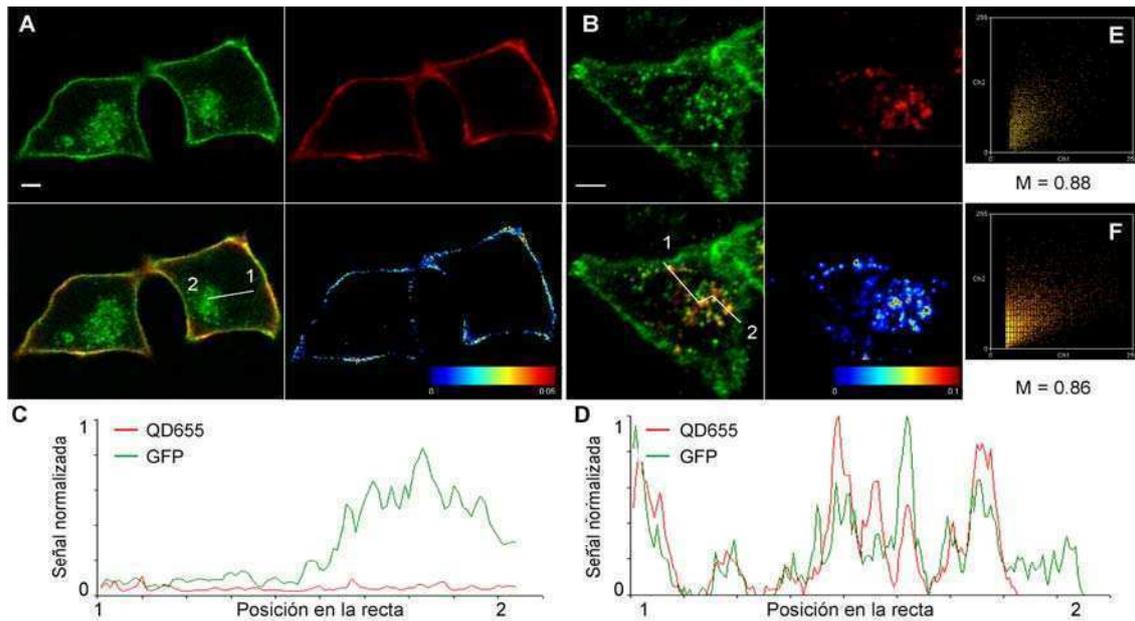


Figura 2.9. Análisis de colocalización del ligando y el receptor. Células expresando el IR-B-GFP fueron marcadas con 50 nM BAC-Ins y 1nM QD655, incubadas (**B**) o no (**A**) a 37 °C durante 1 h, fijadas en 3.7 % PFA y visualizadas por microscopía confocal (Zeiss LSM 510 Meta; excitación GFP, 488 nm; excitación QD655, 488 nm y 458 nm; emisión GFP, BP: 500/20 nm; emisión QD655, LP: 650 nm). Barras de escala: 10 μ m. **C-D.** Se trazaron trayectorias lineales atravesando la célula y se analizó la señal de los dos canales sobre cada píxel de dicha trayectoria (se normalizó al máximo de cada canal). **E-F.** Gráficos de dispersión de frecuencias realizados con el plugin de análisis de correlación de intensidad del programa Image J (canal 1: QD655; canal 2: GFP). Se presenta además el valor del coeficiente de Manders calculado para cada célula mostrada (M).

Al principio la señal de BAC-Ins-QD655 se localiza en la superficie celular (**Figura 2.9.A**) colocalizando con la señal de GFP. De este modo, las mayores contribuciones al coeficiente de Manders se encuentran en la membrana, como se evidencia en el mapa de Manders (cuarto panel). En cambio, luego de 150 min de incubación a 37 °C los QD655 se detectan en regiones perinucleares (**Figura 2.9.B**), sin haber prácticamente señal roja en la superficie celular. Las mayores contribuciones al coeficiente de Manders calculado se encuentran en las regiones cercanas al núcleo (mapa de Manders en el cuarto panel). El primer análisis se realizó cuantificando la señal de fluorescencia de cada canal en cada píxel ubicado sobre una línea trazada en la célula. Esto permitió visualizar de un modo semicuantitativo lo que se observaba cualitativamente: mientras que al principio las dos señales no muestran máximos

conjuntos en el interior de la célula, luego de que la internalización comienza se detectan máximos de ambas señales conjuntamente en posiciones dentro de la célula (**Figura 2.9.C-D**).

A continuación, se cuantificó por medio de los coeficientes de Manders la colocalización del ligando y el receptor con el objeto de detectar su tráfico conjunto y su disociación. Las imágenes adquiridas por microscopía confocal permitieron una clasificación de las células en cuatro grupos teniendo en cuenta el grado de endocitosis que mostraban (**Figura 2.10.A**): S0 (la internalización no se inició, es decir la señal de QD655 se encuentra exclusivamente en la membrana plasmática); S1 (la señal de QD655 es detectada muy cerca de la membrana probablemente en endosomas tempranos); S2 (la señal roja es más interna pero aún no se encuentra en la región perinuclear); y S3 (la señal de QD655 se encuentra predominantemente en las regiones perinucleares de la célula).

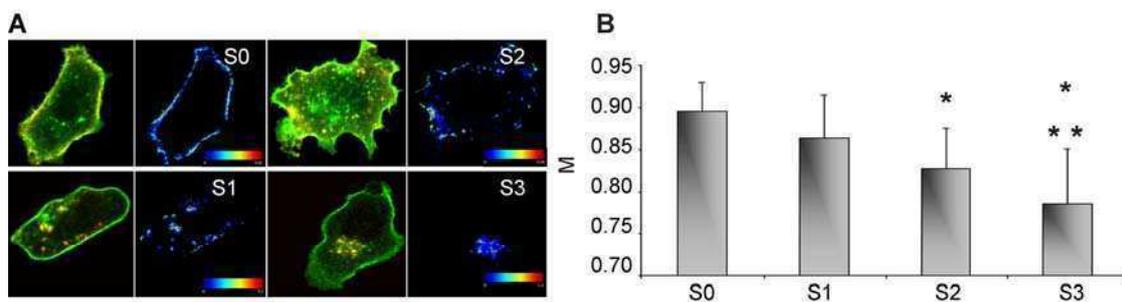


Figura 2.10. Análisis de la colocalización del IR-GFP e Ins-QD655 durante el tráfico intracelular. Se analizó cuantitativamente la evolución de la colocalización entre el ligando y el receptor en células expresando el IR-B-GFP marcadas con BAC-Ins y QD655 e incubadas a 37 °C durante diferentes periodos de tiempo. **A.** Clasificación de las células según el grado de endocitosis mostrado. Se muestran las imágenes de superposición de la señal de GFP y la de los QD655 y los mapas de Manders realizados generando una rutina en el Matlab. La visualización se realizó por microscopía confocal (Zeiss LSM 510 Meta; excitación GFP, 488 nm; excitación QD655, 488 nm y 458 nm; emisión GFP, BP: 500/20 nm; emisión QD655, LP: 650 nm). **B.** Coeficientes de Manders calculados para cada grupo de células introduciendo una máscara (luego de restar el background) definida como el conjunto de los píxeles en los cuales la señal de QD655 fuera mayor al doble de la media en toda la célula. Sólo se consideraron en el análisis estadístico las células cuya media en la señal de GFP estuviera entre 500 y 5500 cts. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo S0 ($p < 0.001$). Los dobles asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con el grupo S1 ($p < 0.05$). Todas las imágenes fueron tomadas con los mismos parámetros de adquisición (potencia de láseres de excitación, ganancia de los fotomultiplicadores, factor de ampliación, tamaño del pinhole).

Los mapas de Manders muestran que, mientras al comienzo (S0) las mayores contribuciones al coeficiente M están dadas por los píxeles de la membrana, este aporte desaparece en las células del grupo S3 donde las mayores contribuciones son debidas a los píxeles de regiones perinucleares. En los estados intermedios la colocalización persiste en la membrana pero se ven otros sitios de asociación probablemente en endosomas tempranos. El análisis estadístico de los valores de M calculados para cada célula ($n = 12-25$ células) mostró que existen diferencias

significativas ($p < 0.001$) entre S0 (0.90 ± 0.03) y tanto el grupo S2 (0.83 ± 0.05) como el grupo S3 (0.79 ± 0.07). Las diferencias también resultan significativas entre las etapas S1 (0.86 ± 0.05) y S3 ($p < 0.05$), mientras que no lo son entre las etapas S0 y S1 y entre S1 y S2. Estos experimentos conjuntamente con los descritos en el apartado anterior permiten afirmar que la insulina se internaliza con el IR ya que es posible detectar el complejo con altos niveles de colocación (insulina-QD655-IR-GFP) en la membrana y en endosomas tempranos pero hacia el final del tráfico vesicular ocurre la disociación del ligando del receptor probablemente en compartimentos lisosomales.

2.3.4. El grado de internalización depende del nivel de expresión del IR

Por observación se detectó que las células que expresan niveles más altos de IR-GFP muestran menor tasa de internalización de insulina-QD-IR-GFP que aquellas con menores niveles de expresión (**Figura 2.11.A**). Del mismo modo, células expresando el IR-B con altos niveles de QD totales unidos (que permiten inferir altos niveles de expresión) presentan menor proporción de los mismos en el interior. Con el objeto de clarificar estas observaciones, las células se clasificaron en dos grupos de acuerdo a los niveles de expresión del IR-GFP (ver **Materiales y métodos**): *alta expresión* cuando el cociente GFP/tamaño celular resultó mayor de 25 cts/píxel; o *baja expresión* cuando dicho cociente resultó menor de 20 cts/píxel. Para medir cuantitativamente el efecto del nivel de expresión del IR en la endocitosis inducida por insulina se calculó célula a célula el porcentaje de internalización luego de diferentes tiempos de incubación a 37 °C como se describió (**Tabla 2.2**).

Tiempo de incubación a 37 °C	% internalización		n	
	Alta expresión	Baja expresión	Alta expresión	Baja expresión
20 min	35 ± 7 *	60 ± 13 *	19	13
40 min	62 ± 13	71 ± 13	8	18
150 min	90 ± 6	92 ± 4	14	8

Tabla 2.2. Efecto del nivel de expresión del IR-GFP en el proceso de endocitosis. Células expresando el IR-GFP marcadas con BAC-Ins y QD65 incubadas a 37 °C durante 20, 40 ó 150 min se clasificaron según el nivel de expresión del receptor en “alta expresión” y “baja expresión” y se cuantificó en cada una de ellas el porcentaje de internalización como $100 \times QD_i/QD_e$. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM. El asterisco significa $p < 0.001$. n indica el número de células analizadas.

El análisis demostró que las diferencias entre ambos grupos (*alta* y *baja expresión*) eran estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en las primeras etapas del proceso de endocitosis (20 min). Este efecto del nivel de expresión del receptor

disminuye con el tiempo de incubación dando una diferencia marcadamente menor entre ambos grupos luego de 40 min ó 150 min de incubación a 37 °C. Estos resultados se muestran gráficamente en la **Figura 2.11.B**.

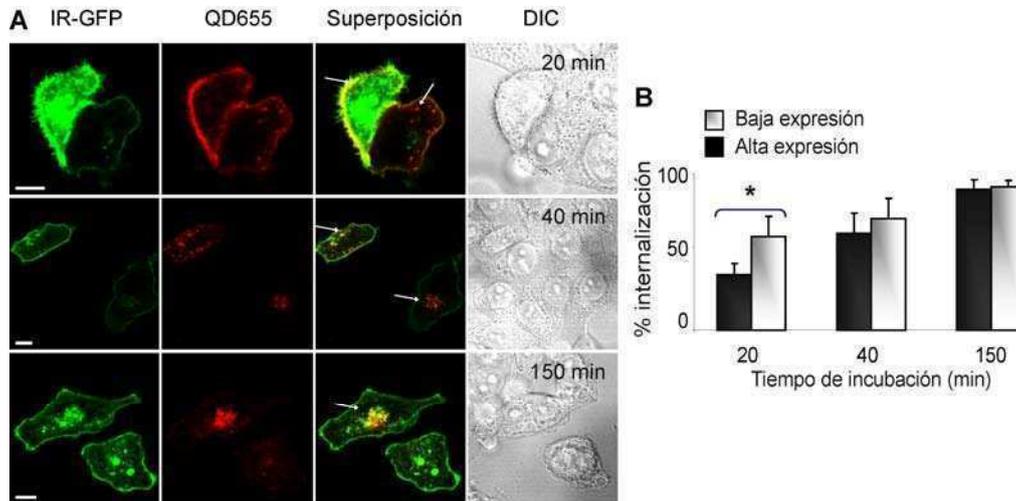


Figura 2.11. Efecto de los niveles de expresión del IR en el proceso de internalización. Células expresando el IR-B-GFP se marcaron con 50 nM BAC-Ins y 1nM QD655, se incubaron a 37 °C durante 20 (A), 40 (B) ó 150 min (C), fueron fijadas en 3.7 % PFA y visualizadas por microscopía confocal (Zeiss LSM 510 Meta; excitación GFP, 488 nm; excitación QD655, 488 nm y 458 nm; emisión GFP, BP: 500/20 nm; emisión QD655, LP: 650 nm). Barras de escala: 10 μ m. D. Cuantificación del grado de internalización en células con altos (GFP/tamaño celular > 25 cts/píxel) y bajos (GFP/tamaño celular < 20 cts/píxel) niveles de expresión del IR-B-GFP. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0.001$; $n = 8-19$ células).

2.3.5. La isoforma A del IR se internaliza antes que la isoforma B

Con el objeto de comparar la endocitosis de ambas isoformas del IR se realizaron los experimentos con células transfectadas con el pcDNA3-IR-A-GFP o el pcDNA3-IR-B-GFP. La fusión con GFP permitió entonces analizar solo células con niveles similares de expresión ya que en la sección anterior se mostró que los niveles de expresión afectan la tasa de internalización. A tiempos tempranos de incubación (20 min) el análisis mostró mayores niveles de endocitosis para la isoforma A (65 % \pm 11 %, $n = 10$) que para la isoforma B (47 % \pm 13 %, $n = 16$, **Figura 2.12**), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.001$). Sin embargo, a tiempos mayores de incubación las diferencias dejan de ser significativas: 40 min (IR-A-GFP: 77 % \pm 16 %, $n = 3$; IR-B-GFP: 70 % \pm 12 %, $n = 17$) y 150 min (IR-A-GFP: 92 % \pm 3 %, $n = 5$; IR-B-GFP: 87 % \pm 10 %, $n = 6$), si bien muestran una mayor internalización para la isoforma A.

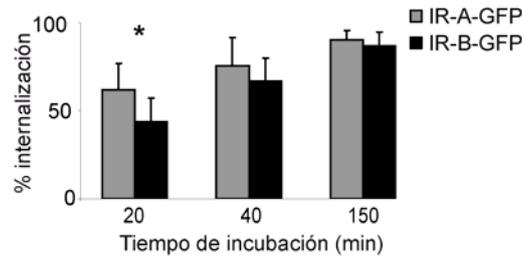


Figura 2.12. Cuantificación de la internalización de la isoforma A y B del IR. Se cuantificó la internalización en células expresando el IR-A-GFP (barras grises) o el IR-B-GFP (barras negras) incubadas con 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655 y luego a 37 ° C durante 20, 40 ó 150 min. Para el análisis estadístico sólo se consideraron células con similares niveles de expresión (GFP/tamaño celular < 30 cts/píxel). Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p \leq 0.001$; $n = 4-17$ células).

2.3.6. La insulina activa diferencialmente a las isoformas del IR

Las diferencias detectadas en la internalización de las dos variantes de *splicing* del IR condujeron a la pregunta de si estas diferencias se traducen en etapas posteriores de la señalización de cada una de ellas.

El primer parámetro analizado fue el nivel de autofosforilación de cada isoforma del IR inducido por insulina. Para esto se realizaron experimentos de Western blot en células expresando el IR-A, el IR-B o ambas isoformas conjuntamente (cantidades iguales de ADN total se usaron en las transfecciones) estimuladas con 50 nM rhIns durante 2, 5 ó 15 min (**Figura 2.13.A**).

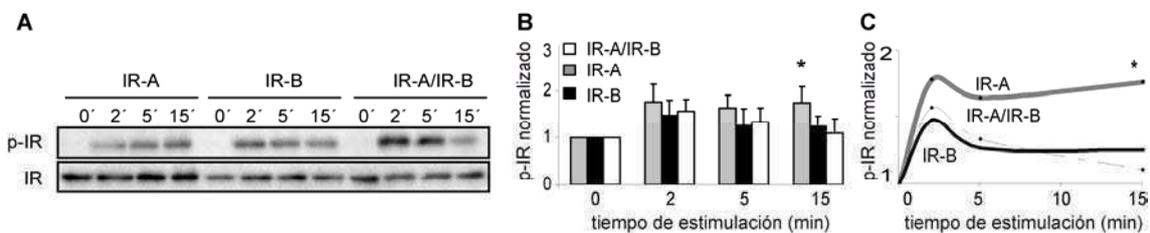


Figura 2.13. Activación diferencial de las distintas isoformas del IR por insulina. Perfiles de activación del IR en células expresando el IR-A, el IR-B o ambas isoformas conjuntamente que fueron hambreadas durante toda la noche en DMEM suplementado con 0.1 % BSA y estimuladas con 50 nM rhIns durante diferentes períodos de tiempo (2, 5 y 15 min). **A.** Los lisados fueron analizados por Western blot con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (PY20) y contra la subunidad β del IR. Las bandas reveladas con ambos anticuerpos se ubicaban en la misma posición. **B-C.** Cuantificación de los resultados obtenidos en **A**. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas del IR-A versus el IR-B y el IR-A/IR-B ($p < 0.05$).

La isoforma A mostró una mayor y más sostenida activación que las células expresando el IR-B o ambas isoformas conjuntamente. La activación del IR-A inducida por la estimulación con insulina durante 15 min fue estadísticamente diferente de la del IR-B y de la coexpresión de IR-A/IR-B (**Figura 2.13.B-C, Tabla 2.3**).

Tiempo de estimulación con 50 nM rhIns	p-IR (veces respecto del basal)		
	IR-A	IR-B	IR-A/IR-B
2 min	1.8 ± 0.4	1.5 ± 0.3	1.6 ± 0.3
5 min	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.3
15 min	1.8 ± 0.4 *	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.3

Tabla 2.3. Activación diferencial del IR inducida por insulina. Cuantificación de los niveles de fosforilación del IR medidos por Western blot, normalizados a los niveles basales (es decir, células sin estimular). Los resultados se expresan como el promedio ± SEM de 4 experimentos independientes. El asterisco indica diferencias significativas del IR-A versus el IR-B y el IR-A/IR-B ($p < 0.05$).

2.3.7. El IR-A activa ERK 1/2 de forma más rápida y sostenida que el IR-B

Ante estos resultados se analizó si la mayor internalización del IR-A y la mayor y más sostenida autofosforilación se refleja en cambios en las vías de señalización activadas por insulina río abajo del receptor. Para esto se evaluó primero un evento de la cascada mitogénica: la fosforilación de ERK 1/2 (Thr202 y Tyr204 de ERK 1 y Thr185 y Tyr187 de ERK 2) por Western blot (**Figura 2.14.A**).

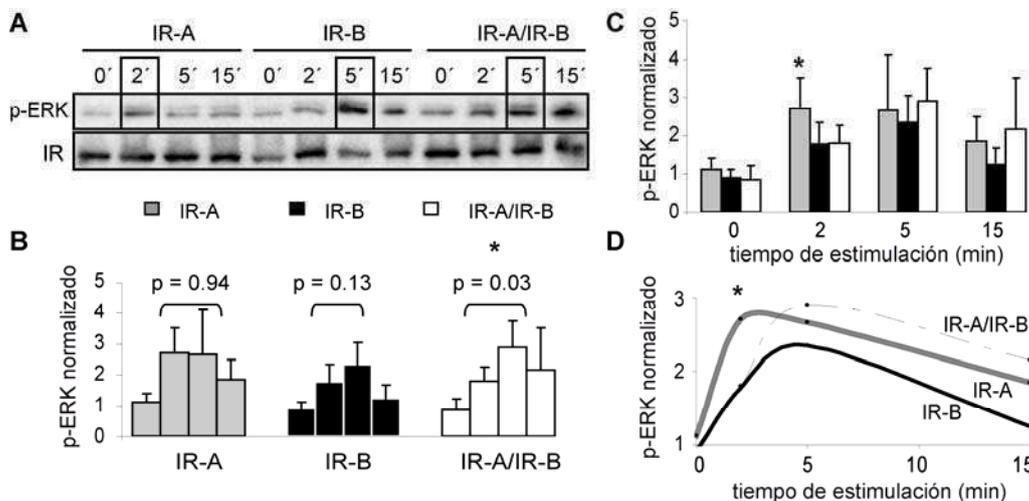


Figura 2.14. Activación diferencial de ERK 1/2 a través del IR-A y del IR-B en respuesta a insulina. Perfiles de activación de ERK 1/2 obtenidos de modo similar que para el IR utilizando anticuerpos contra ERK 1/2 fosforilado y contra ERK 1/2. **B-D.** En la cuantificación de estos resultados se normalizaron los valores de p-ERK al promedio de los controles no estimulados en cada experimento. Los resultados se muestran como el promedio ± SEM de 6 experimentos independientes. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Células expresando el IR-B muestran un pico máximo para la activación de ERK 1/2 a los 5 min de estimulación con rhIns mientras que células expresando el IR-A presentan un máximo más temprano entre los 2 min y los 5 min (**Figura 2.14.C-D**). Cuando ambos receptores se expresan conjuntamente, los perfiles de estimulación resultan más parecidos a los de células expresando el IR-B, pero con mayores niveles

de activación que las isoformas por separado. En resumen, la activación de ERK 1/2 luego de 2 min de estimulación con rhIns es mayor para el IR-A que para el IR-B o ambas isoformas juntas siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En conclusión, se puede afirmar que la isoforma A se internaliza de forma más rápida y sus niveles de fosforilación son mayores, gatillando la fosforilación de ERK 1/2 antes que la isoforma B.

Tiempo de estimulación con 50 nM rhIns	p-ERK 1/2 (veces respecto del basal)		
	IR-A	IR-B	IR-A/IR-B
2 min	2.7 ± 0.8 *	1.8 ± 0.6	1.8 ± 0.5
5 min	2.7 ± 1.5	2.4 ± 0.7	2.9 ± 0.9
15 min	1.8 ± 0.6	1.3 ± 0.4	2.2 ± 1.3

Tabla 2.4. Fosforilación diferencial de ERK 1/2 inducida por insulina. Cuantificación de los niveles de fosforilación de ERK 1/2 (p-ERK) medidos por Western blot, normalizados a los niveles basales (células sin estimular). Los resultados se expresan como el promedio ± SEM de 6 experimentos independientes. El asterisco indica diferencias significativas del IR-A versus el IR-B y el IR-A/IR-B ($p < 0.05$).

2.3.8. El IR-A estimula más la transcripción génica mediada por AP-1 que el IR-B

La activación de la vía de las MAPK resulta crítica en la expresión génica dependiente del factor de transcripción AP-1 (Pastore *et al.*, 2005). Con el objeto de evaluar la relevancia de las diferencias observadas entre las isoformas del IR río abajo en la cascada de señalización, se estudió la transcripción génica estimulada por cada una por medio de experimentos con un gen reportero. Para ello se utilizó el plásmido reportero pAP1-Luc que contiene siete copias en *tándem* del sitio de unión para el factor de transcripción AP-1 regulando la transcripción de la secuencia codificante para luciferasa. Se transfectaron células HeLa con este plásmido reportero en combinación con el pcDNA3-IR-A o el pcDNA3-IR-B o el pcDNA3 vacío (EV). Se midió la actividad de luciferasa respecto de células sin estimular luego de 24 h de expresión, 24 h de hambreado y 16 h de estimulación con 100 nM rhIns. Estos resultados se muestran en la **Figura 2.15**. La estimulación de la transcripción génica a través de la vía de AP-1 resultó mayor para el IR-A (inducción respecto al basal: 7.2 ± 0.4) que para el IR-B (inducción respecto al basal: 6.2 ± 0.6) y estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p = 0.004$, $n = 6$ experimentos independientes).

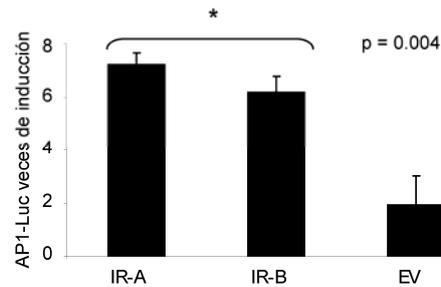


Figura 2.15. Activación de la transcripción génica mediada por AP-1. Células HeLa cotransfectadas con el pAP1-Luc y el pcDNA3-IR-A, el pcDNA3-IR-B o el EV luego de 24 h de expresión y 24 h de hambreado en DMEM fueron estimuladas con 100 nM rhIns durante 16 h. Luego de la lisis se midió la actividad de luciferasa y se calculó el nivel de inducción como el cociente entre la actividad de luciferasa medida en células estimuladas y no estimuladas. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 6 experimentos independientes. El asterisco muestra diferencias significativas ($p = 0.004$).

2.3.9. El IR-B activa la vía de Akt en mayor medida que el IR-A

Se evaluó la activación de la vía metabólica que conduce a la regulación del metabolismo de la glucosa en respuesta a insulina. Se estudió primero la fosforilación de Akt cualitativamente por microscopía de epifluorescencia utilizando un anticuerpo contra Akt fosforilado en la serina 473 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa flúor 555 en células coexpresando el IR-A o el IR-B junto con Akt fusionado al tag HA (Akt-HA), estimuladas o no con 100 nM rhIns durante 5 min (**Figura 2.16.A**).

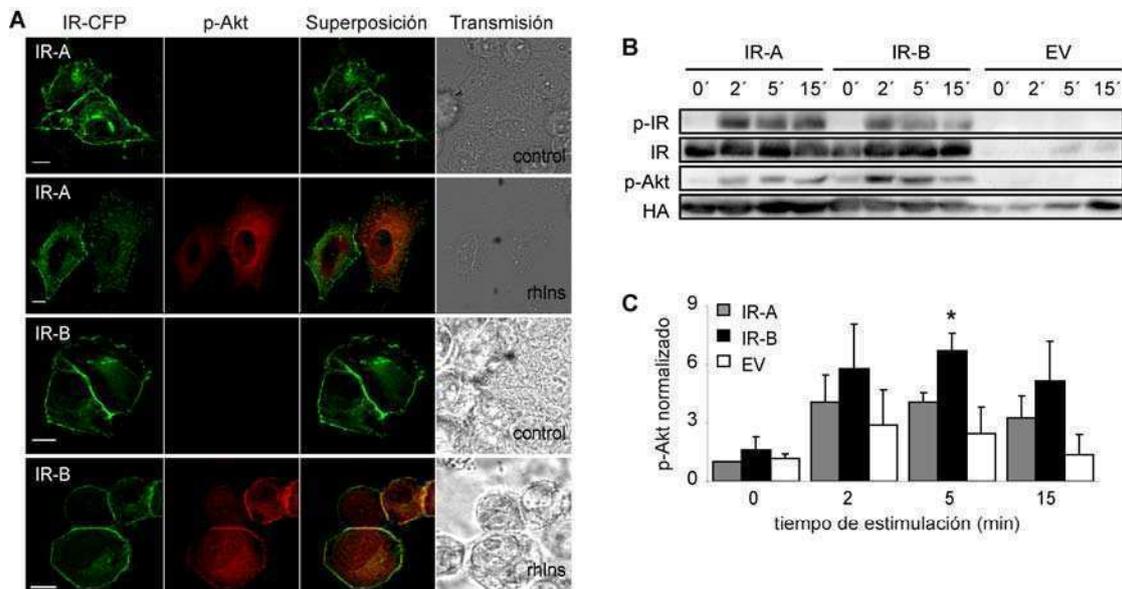


Figura 2.16. Activación de la vía de Akt a través del IR-A y del IR-B. **A.** Células coexpresando el IR-A o el IR-B y Akt-HA se hambreado toda la noche en DMEM, se estimularon con 100 nM rhIns durante 5 min a 37 °C y se fijaron en metanol. Las inmunofluorescencias se realizaron con un anticuerpo contra Akt fosforilado en serina 473 (Cell Signaling) y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa flúor 555. Las imágenes mostradas provienen de escaneados en z de 80 planos con un intervalo entre secciones de 0.2 μ m deconvolucionados con el programa Scientific Volume Imaging Huygens Professional Versión 3.6, aplicándose el algoritmo QMLE. La visualización se realizó en un microscopio Olympus IX71. Barras de escala: 10 μ m. **B.** Experimento de Western blot estudiando la fosforilación de Akt en la serina 473 en células coexpresando Akt-HA y alguna de las isoformas del IR (IR-A o IR-B) o el EV, hambreadas durante 16 h y estimuladas con 100 nM rhIns durante diferentes 2, 5 ó 15 min. **C.** La cuantificación se hizo de modo similar a la realizada para la fosforilación de ERK 1/2. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 5 experimentos independientes.

Para cuantificar la fosforilación de Akt inducida por cada una de las isoformas del IR se realizaron experimentos de Western blot en lisados provenientes de células coexpresando Akt-HA y el IR-A o el IR-B o el EV, hambreadas durante 16 h y estimuladas con 100 nM rhIns durante 2, 5 y 15 min (**Figuras 2.16.B**).

Estos ensayos revelaron que, a diferencia de lo que ocurre en la vía mitogénica, en este caso el IR-B provoca una mayor estimulación de la fosforilación de Akt que el IR-A, siendo estas diferencias estadísticamente significativas a los 5 min (**Figura 2.16.C y Tabla 2.5**).

Tiempo de estimulación con 100 nM rhIns	p-Akt (Ser473) (veces respecto del basal)		
	IR-A	IR-B	EV
2 min	4.1 ± 1.4	5.8 ± 2.3	2.9 ± 1.8
5 min	4.1 ± 0.5	6.8 ± 0.9 *	2.4 ± 1.4
15 min	3.3 ± 1.1	5.1 ± 2.1	1.4 ± 1.0

Tabla 2.5. Fosforilación diferencial de Akt-HA (Ser473) inducida por insulina. Cuantificación de los niveles de fosforilación de Akt (p-Akt) medidos por Western blot, normalizados a los niveles basales (células sin estimular). Los resultados se expresan como el promedio ± SEM de 5 experimentos independientes. El asterisco muestra diferencias estadísticamente significativas del IR-A versus el IR-B y el IR-A/IR-B ($p < 0.001$).

2.3. DISCUSIÓN

Las herramientas generadas y descritas en el capítulo anterior permitieron el análisis cuantitativo del proceso de endocitosis en células individuales. El complejo insulina-IR se visualizó en diferentes etapas del proceso de tráfico vesicular luego de la endocitosis: primero en la membrana y filopodias, luego en endosomas tempranos y finalmente la señal de QD655 se concentra fundamentalmente en la zona perinuclear posiblemente en lisosomas. Los análisis de colocalización mostraron que a medida que el proceso de endocitosis avanza se pierde o disminuye el grado de colocalización entre la señal de QD655 y la señal correspondiente al receptor. Esto permite concluir que mientras la asociación de la insulina con su receptor en la membrana plasmática y en endosomas tempranos es alta, las etapas posteriores muestran un menor grado de colocalización reflejando probablemente la disociación del ligando del receptor en endosomas más ácidos y en lisosomas.

En los años siguientes al descubrimiento del *splicing* alternativo del IR (Ebina *et al.*, 1985; Ullrich *et al.*, 1985; Seino y Bell, 1989) numerosos estudios fueron publicados describiendo las diferencias y/o similitudes entre las dos isoformas en lo

que respecta a su afinidad por ligandos, la actividad de la quinasa citoplasmática, la internalización del receptor inducida por insulina, el proceso de reciclado así como la señalización de cada una y su distribución diferencial en diversos tejidos (Mosthaf *et al.*, 1990; McClain, 1991; Vogt *et al.*, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1991, 1993; Kellerer *et al.*, 1992; Frasca *et al.*, 1999; Leibiger *et al.*, 2001; Pandini *et al.*, 2002; Denley *et al.*, 2004; Benyoucef *et al.*, 2007). Los estudios previos que abordaron la endocitosis del IR se realizaron a través de ensayos bioquímicos con ligandos marcados radiactivamente (Vogt *et al.*, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1991; Pandini *et al.*, 2002; Denley *et al.*, 2004; Benyoucef *et al.*, 2007). Por lo tanto, las conclusiones obtenidas en los mismos resultan del promedio del comportamiento de una población celular.

En este capítulo se describió el estudio cualitativo y cuantitativo de la endocitosis en células individuales. Fue posible detectar que células con altos niveles de expresión del IR muestran tasas de internalización menores probablemente por saturación de la maquinaria celular de endocitosis. Por lo tanto, esta aproximación permitió estudiar las diferencias en la internalización del IR-A y del IR-B teniendo en cuenta células con niveles de expresión del IR aproximadamente uniformes. De esta manera, se concluyó que el IR-A se internaliza a tiempos cortos en mayor medida que el IR-B en concordancia con otros reportes basados en muy diferentes aproximaciones experimentales (Vogt *et al.*, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1991). Es posible que estas diferencias en la endocitosis de las dos isoformas del IR varíen de modo tejido-específico y estén relacionadas con la regulación fisiológica del reciclado y el apagado de la señalización. Este resultado condujo entonces a explorar la influencia de estas diferencias en la dinámica de endocitosis sobre la cascada de señalización de cada IR.

Reportes previos mostraron que análogos de insulina que presentan una disociación lenta del IR inducen una activación más sostenida del receptor, provocando una fosforilación más persistente de la proteína adaptadora Shc (Hansen *et al.*, 1996). Esto, a su vez, correlaciona con un incremento de la actividad mitogénica indicando que un aumento de la duración de la señal a nivel del receptor conduce a una respuesta más mitogénica de la insulina (Hansen *et al.*, 1996; Ish-Shalom *et al.*, 1997; De Meyts y Shymko, 2000; Kurtzhals *et al.*, 2000), sugiriendo que la señalización mitogénica puede estar mediada por una activación sostenida del IR. En la literatura está aceptado que el IR-A es más “mitogénico” y el IR-B más “metabólico”; sin embargo los mecanismos moleculares de esto no están claros en absoluto.

Los resultados obtenidos sugieren que la regulación de la internalización podría ser un evento clave en la señalización diferencial desencadenada por la activación de

cada isoforma. Dadas las diferencias en la endocitosis y que la isoforma A es reportada en la literatura como más mitogénica que la B, se evaluaron tres puntos de esta vía: i) el principio (autofosforilación del IR), ii) una etapa intermedia (la activación de ERK 1/2) y iii) un efecto mitogénico (la transcripción génica regulada por el factor de transcripción AP-1). Se demostró que la isoforma que se internaliza en mayor proporción (IR-A) muestra una mayor y más persistente activación inducida por insulina que la isoforma B, mientras que células coexpresando ambas isoformas presentan una activación elevada intermedia entre el IR-A y el IR-B por separado pero menos persistente en el tiempo. Con respecto a la activación de ERK 1/2 se detectaron diferencias significativas consistentes con la endocitosis diferencial. La isoforma A, que se internaliza antes, presenta el pico de activación de ERK 1/2 entre los 2 y los 5 min, mientras que la isoforma B lo hace más tarde (5 min). En los endosomas el IR unido a ligando puede permanecer activado y continuar fosforilando moléculas efectoras río debajo en la cascada de señalización (Sorkin *et al.*, 1993; Di Guglielmo *et al.*, 1994; Bergeron *et al.*, 1995; Grimes *et al.*, 1996; Pol *et al.*, 1998; Rizzo *et al.*, 2000; Sorkin *et al.*, 2000). Se sabe que al bloquear la internalización del IR se inhibe tanto la fosforilación de Shc como la activación de ERK 1/2, mientras que no se detectan efectos en la fosforilación del IR, de IRS1 o de Akt (Biener *et al.*, 1996; Ceresa *et al.*, 1998; Hamer *et al.*, 2002), sugiriendo que estos efectos, predominantemente metabólicos, son activados por el IR completamente desde la superficie de la célula.

Esto permite plantear un modelo de activación diferencial donde la isoforma A se activa más y de forma más sostenida (medida como autofosforilación del receptor) y se internaliza más rápido, activando de esta manera la vía mitogénica e induciendo la cascada de señalización de ERK 1/2 que lleva a la activación de los factores de transcripción de la familia AP-1. Estas evidencias sugieren la hipótesis de que los efectos mitogénicos de la insulina pueden resultar de la señalización del IR desde endosomas. Por otro lado, la isoforma B se internaliza de forma más lenta, permitiendo mayor señalización desde la membrana, gatillando la fosforilación de Akt. Akt activa regula enzimas metabólicas como la quinasa 3 de la glucógeno sintetasa y la 6-fosfofructo-2-quinasa así como el metabolismo de la glucosa ya que induce la translocación a la membrana plasmática del GLUT4 (Taguchi y White, 2008). Otra cascada regulada por la activación de la vía PI3K/Akt es la asociada con mTOR el cual regula el crecimiento y el metabolismo celular (Taniguchi *et al.*, 2006). El modelo planteado en este capítulo se seguirá discutiendo a lo largo de la tesis.

CAPÍTULO 3

Marcación del dominio extracelular del IR en células vivas

3. Marcación del dominio extracelular del IREn células vivas

3.1. INTRODUCCIÓN

La fusión con VFP ha permitido estudiar la dinámica de proteínas en células vivas en una enorme cantidad de sistemas biológicos. Sin embargo, para ciertas aplicaciones estas proteínas resultan demasiado grandes pudiendo interferir con la localización, la estructura o la actividad de las proteínas a las que se las fusiona.

Una alternativa interesante es la fusión de la proteína en estudio con una secuencia que codifica para un péptido (*tag*) reconocido específicamente por una enzima capaz de unirlo covalentemente con una sonda o una nanopartícula como los QD. De este modo, se logra alta especificidad en la marcación (dada por la especificidad de la enzima) con sondas adecuadas para los estudios a realizar. Actualmente existen sondas pequeñas, con alta fotoestabilidad, con intenso brillo e intensidad de fluorescencia y también moléculas que poseen sensibilidad por el medio que pueden ser utilizadas para marcar la proteína de interés y estudiar su dinámica.

Uno de estos *tags* es un péptido de 77 aminoácidos basado en la secuencia de la proteína transportadora de acilo (*Acyl carrier protein, ACP*) de *E. coli*, reconocida por una fosfopanteteinil transferasa (ACPwt-S), que transfiere el grupo fosfopanteteinilo de la CoA a una serina conservada dentro de la secuencia ACP (George *et al.*, 2004). Utilizando derivados biotinilados o fluorescentes de la CoA se puede entonces modificar covalente y específicamente la proteína de interés expresada en la superficie celular permitiendo asimismo diferenciarla de la que aún está siendo procesada en el RE y el sistema de Golgi dado que tanto la enzima como los derivados de la CoA no son permeables a la membrana celular.

La **Figura 3.1** muestra esquemáticamente esta estrategia de marcación aplicada al caso particular del IR como se describirá a lo largo de este capítulo.

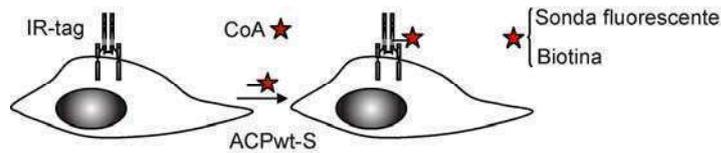


Figura 3.1. Modificación covalente de proteínas de membrana (en este caso el IR) en células vivas. Las células expresando la proteína de membrana de interés fusionada a un tag pueden ser marcadas utilizando el sistema de modificación covalente de proteínas de superficie ACP a través de la enzima ACPwt-S que transfiere un grupo fosfopanteteínico de la CoA a una serina conservada en la secuencia de dicho tag. Cuando la CoA a su vez está modificada a través de su grupo sulfhidrilo con sondas fluorescentes o bien con biotina estos grupos quedan unidos covalentemente en la modificación enzimática.

A partir de los primeros trabajos presentando esta poderosa herramienta varios grupos reportaron secuencias sensiblemente más cortas, de entre 11 y 15 aminoácidos que son reconocidas específicamente por enzimas tanto de *E. coli* como de *Bacillus subtilis* (Yin *et al.*, 2005 a; Jacquier *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2006 a y b; Zhou *et al.*, 2007).

Este método ha sido utilizado para marcar proteínas de la superficie celular con el fin de estudiar *in vivo* la dinámica de receptores de membrana así como interacciones con sus ligandos o su localización en microdominios en la membrana plasmática: el receptor de neurokinina 1 (George *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006 b), el receptor olfatorio asociado a proteína G (Jacquier *et al.*, 2006), el receptor de transferrina (Yin *et al.*, 2005 b).

Más recientemente, se ha utilizado esta herramienta para estudiar la movilidad en la superficie celular de dos subunidades del receptor de tipo AMPA-glutamato en neuronas del hipocampo vivas marcando cada subunidad con un fluoróforo diferente (Kropf *et al.*, 2009). Para esto cada subunidad fue fusionada a un tag distinto (ACP y ACP9) y se realizó una marcación de tipo ortogonal con las dos enzimas, ACPwt-S de *E. coli* y Sfp de *B. subtilis*. El tag ACP es reconocido por ambas enzimas y es el que se marca primero con ACPwt-S. El segundo tag es el denominado ACP9 y es reconocido sólo por la Sfp, por lo tanto se modifica en un segundo paso ya que todos los sitios ACP ya fueron saturados con la ACPwt-S.

En este capítulo se propone marcar extracelularmente el IR permitiendo distinguir el receptor ya localizado en la membrana del que aún no terminó de procesarse y localizarse. Resulta de interés además desarrollar esta herramienta para seguir el IR internalizado sin confundirlo con el que aún no fue localizado en

membrana. Asimismo, esta aproximación permitirá en una segunda etapa marcar ortogonalmente las dos isoformas del IR fusionando cada una a un *tag* diferente. Hasta el momento esto no es posible hacerlo ya que no existen anticuerpos que distingan a cada isoforma. De este modo, sería posible estudiar la dinámica de cada IR en células vivas luego de su unión a ligando y sus mecanismos de endocitosis, reciclado y degradación. El poder contar con cada monómero del dímero que forma el IR en la membrana marcados con dos fluoróforos permitiría además estudiar la dinámica de los cambios conformacionales que sufre el receptor al unirse el ligado, al activarse e internalizarse por técnicas de transferencia de energía.

Objetivos

1. Marcar el dominio extracelular del IR mediante su fusión a *tags* pequeños
2. Evaluar 3 *tags* diferentes: ACP, YbbR13 y A1 clonándolos en dos posiciones de ambas isoformas del IR
3. Analizar para cada proteína su expresión, localización, marcación y funcionalidad biológica

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Generación de IR recombinantes fusionados a diversos *tags*

Se obtuvieron los vectores de expresión del IR fusionado a diversos *tags* derivados de la proteína transportadora de acilos: ACP (George *et al.*, 2004), YbbR13 (Yin *et al.*, 2005) y A1 (Zhou *et al.*, 2007). Dichas secuencias se insertaron o bien dentro del primer dominio rico en leucina (posición 34 de la secuencia de aminoácidos) o en el primer dominio de tipo fibronectina III (posición 626 de la secuencia de aminoácidos) con el objetivo de marcar la porción extracelular del receptor.

Las construcciones generadas fueron las siguientes: pcDNA3-IR-ACP (A y B), pcDNA3-IR-B-ACP-GFP, pcDNA3-IR-A1EcoRV-GFP (A y B), pcDNA3-IR-YbbR13-GFP (A y B), pcDNA3-IR-A-A1-GFP, pcDNA3-IR-B-A1x3 y pcDNA3-IR-B-A1x3-GFP.

La **Tabla 3.1** presenta los plásmidos generados detallando el *tag* utilizado, su posición dentro de la secuencia aminoacídica del IR, así como el dominio donde se encuentra y la enzima que es capaz de modificarlo covalentemente.

Plásmido	Tag	Tamaño tag (aminoácidos)	Posición de inserción del tag (en la secuencia de aminoácidos)	Dominio donde se encuentra el tag	Enzima que reconoce el tag
pcDNA3-IR-ACP (A y B)	ACP	77	34	L1	ACPwt-S
pcDNA3-IR-B-ACP-GFP	ACP	77	34	L1	ACPwt-S
pcDNA3-IR-YbbR13 (A y B)	YbbR13	11	34	L1	Sfp
pcDNA3-IR-YbbR13-GFP (A y B)	YbbR13	11	34	L1	Sfp
pcDNA3-IR-A1EcoRV-GFP (A y B)	A1	12	34	L1	ACPwt-S
pcDNA3-IR-A-A1-GFP	A1	12	626	FnIII-1	ACPwt-S
pcDNA3-IR-B-A1x3	A1x3	36	626	FnIII-1	ACPwt-S
pcDNA3-IR-B-A1x3-GFP	A1x3	36	626	FnIII-1	ACPwt-S

Tabla 3.1. Plásmidos de expresión del IR fusionado a diversos tags derivados de la proteína transportadora de acilos. Se muestra el nombre del plásmido generado, el tag insertado, su posición y tamaño y la enzima capaz de modificarlo covalentemente.

Algunos de los plásmidos generados se muestran de modo esquemático en la **Figura 3.2.**

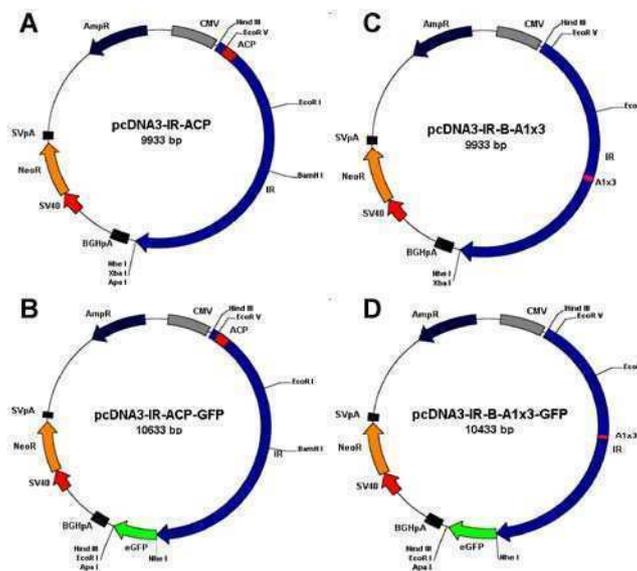


Figura 3.2. Esquema de algunos de los plásmidos generados. **A.** pcDNA3-IR-ACP (A y B). **B.** pcDNA3-IR-ACP-GFP (A y B). **C.** pcDNA3-IR-B-A1x3. **D.** pcDNA3-IR-B-A1x3-GFP.

3.2.2. Marcación del IR con el ACP

La puesta en funcionamiento del sistema de marcación de interés implicó por un lado optimizar la expresión y purificación de la enzima ACPwt-S. Para ello primero se evaluó el crecimiento de las bacterias *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pBAD-ACPwt-S. La curva de crecimiento permitió determinar la DO hasta la cual se crecería el cultivo bacteriano luego de la inducción para estar dentro de la fase de crecimiento exponencial. Como se ve en la **Figura 3.3**, cuando la DO = 0.8 u.a el cultivo bacteriano se encuentra aún en su fase de crecimiento exponencial. Por este motivo se decidió que ésta sería la DO a la cuál se cosecharían las bacterias para aislar la proteína y purificarla.

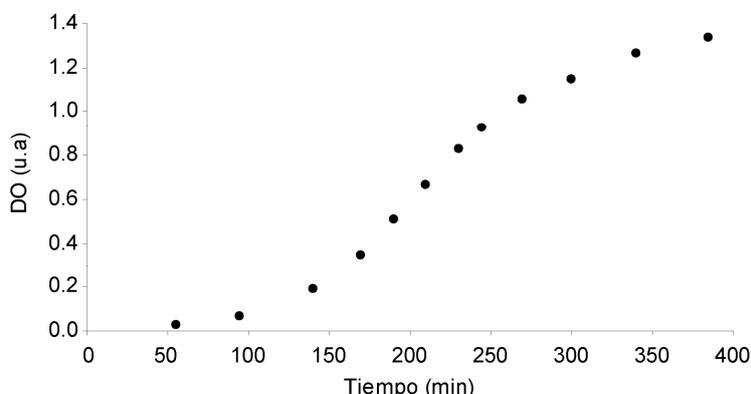


Figura 3.3. Curva de crecimiento de bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido pBAD-ACPwt-S. Se transformaron por electroporación células *E. coli* TOP10 (*araBADC-* y *araEFGH+*) electrocompetentes con el plásmido pBAD-ACPwt-S. Se midió la DO de un cultivo de estas bacterias crecidas en medio 2xYT a diversos tiempos. De este modo se determinó que la DO a la cual inducir la expresión de ACPwt-S sería 0.8 u.a.

Posteriormente se evaluaron diversas concentraciones de L-(+)-arabinosa (0.2 %, 0.1 % y 0.05 % p/v) para inducir la expresión de la proteína. Se determinó que la concentración de trabajo sería 0.1 % L-(+)-arabinosa dado que a esta concentración se alcanza el máximo de inducción.

A continuación se evaluaron dos soluciones de lisis y de lavado I y II, con mayor (1) o menor (2) concentración de imidazol (80 y 10 mM respectivamente) para la purificación por cromatografía de afinidad con una resina Ni-NTA. En el primer caso se esperaba mayor pureza pero probablemente menor rendimiento y en el segundo mayor cantidad de proteína aunque podría estar menos pura.

En la **Figura 3.4.A** se muestran dos geles 10 % poliacrilamida en los cuales se analizó la purificación en las dos condiciones ensayadas. Se analizaron la fracción posterior al pegado a la resina (P), las fracciones posteriores a los lavados I (LI) y II

(LII) y las primeras cinco fracciones eluidas (E1 a E5). Se observó que soluciones más concentradas en imidazol producían mayor pérdida de la enzima de interés luego del pegado a la resina y de los sucesivos lavados. Con las soluciones menos concentradas esta pérdida resultó marcadamente menor, mientras que la cantidad de proteína en los primeros eluatos fue mayor y el grado de pureza obtenido no resultó ser mayormente diferente en las dos condiciones. En la **Figura 3.4.B** se muestran cuantitativamente estos resultados obtenidos a partir de la electroforesis con patrones de BSA de concentración conocida y en la **Figura 3.4.C** se presenta la cuantificación de la concentración de proteína de los primeros eluatos por espectrofotometría midiendo A_{280} .

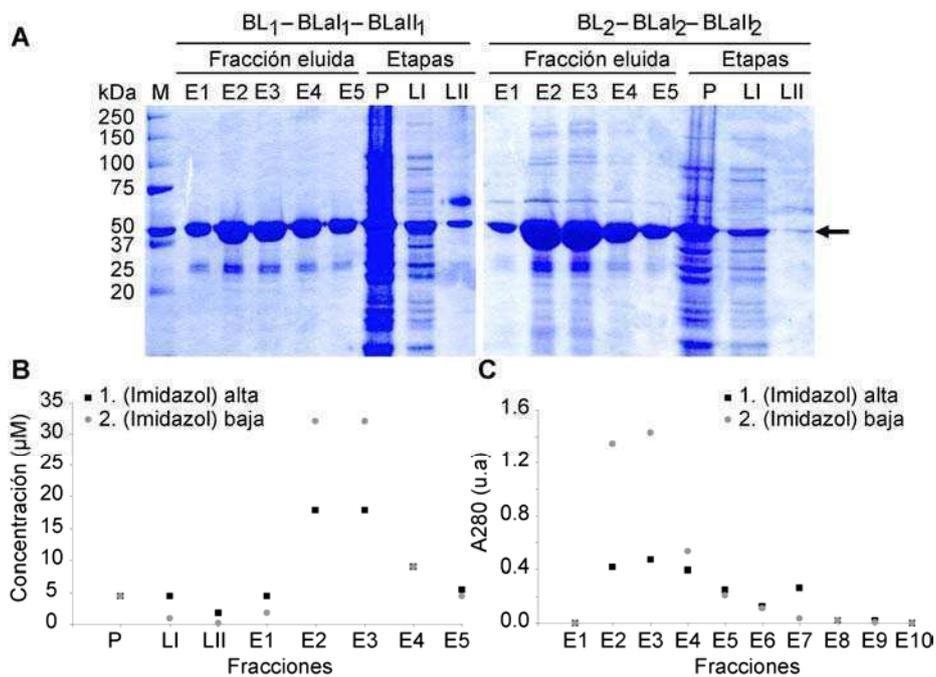


Figura 3.4. Evaluación de condiciones de purificación de ACPwt-S por cromatografía de afinidad. **A.** Se evaluaron por SDS-PAGE 10 % las fracciones eluidas (E1 a E5) y aquellas correspondientes a los pasos intermedios de purificación (posterior al pegado, P, posterior al primer lavado, LI, posterior al segundo lavado, LII) de la enzima ACPwt-S con dos concentraciones diferentes de imidazol en las soluciones de lisis (BL1 y BL2) y de lavado (BLal1, BLall1 y BLal2, BLall2). M: marcador de peso molecular. La flecha indica la banda de aproximadamente 56 kDa correspondiente al peso molecular de la ACPwt-S. **B.** Cuantificación de la concentración de enzima determinada a partir de los geles con patrones de BSA de concentración conocida. **C.** Determinación del contenido de proteína de los eluatos por espectrofotometría.

Posteriormente se analizó la actividad de la enzima purificada como se detallará más adelante. Habiendo determinado que efectivamente la enzima obtenida en las condiciones (2) era activa, se decidió realizar la purificación en mayor escala con las soluciones menos concentradas en imidazol, es decir, con las soluciones BL₂ (lisis), BLal₂ (lavado I) y BLall₂ (lavado II).

Por último, la síntesis de los derivados de la CoA biotinilados y fluorescentes permitieron tener completo el sistema de marcación ACP con el objeto de marcar el lado extracelular del IR. La CoA- Peo₂-biotina fue sintetizada de dos modos teniendo en cuenta y modificando levemente lo reportado en la literatura (George *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2005 a). En la **Figura 3.5** se muestra el perfil de elución obtenido por FPLC para el producto obtenido en uno de los casos (George *et al.*, 2004). En el panel **A** se presenta la A₂₆₀ en función del volumen eluido y en el **B** la A₂₁₅ en función del volumen eluido.

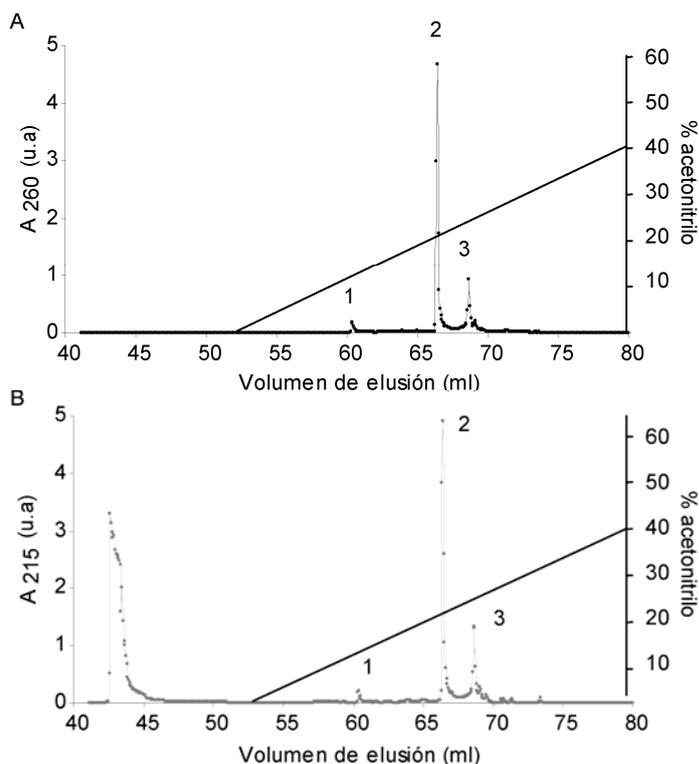


Figura 3.5. FPLC del producto de reacción entre la CoA y la Biotina-Peo₂-maleimido. Se modificaron levemente las condiciones informadas en bibliografía (George *et al.*, 2004) y la purificación se realizó por FPLC con una columna C18 eluyendo con un gradiente acetronitrilo: agua / 0.1 % TFA desde 0:100 a 60:40 en 45 min. Se detectó A₂₁₅ y A₂₆₀ durante la cromatografía. En **A** se muestra para cada fracción eluida la A₂₆₀ y en **B** la A₂₁₅. Estas longitudes de onda corresponden a los máximos de absorción de la CoA pura.

Las dos condiciones de reacción ensayadas permitieron obtener el producto deseado en el pico mayoritario. Dado que la purificación en el primer caso produjo menor cantidad de picos y los rendimientos fueron similares y cercanos al 27 % (siendo el reportado de 33 %, George *et al.*, 2004) se decidió continuar con estas condiciones y fueron las utilizadas para obtener CoA-biotina en mayor escala.

La espectrometría de masa permitió confirmar que el producto mayoritario era el buscado. La **Figura 3.6** muestra los resultados del MALDI-TOF para el primer pico del FPLC (muy pequeño, pico 1) que presenta señal de absorbancia a las dos

longitudes de onda monitoreadas, correspondiente a un volumen de elución de 61 ml (panel **A**), para el pico 2, el mayoritario (panel **B**), y para el pico 3 (panel **C**).

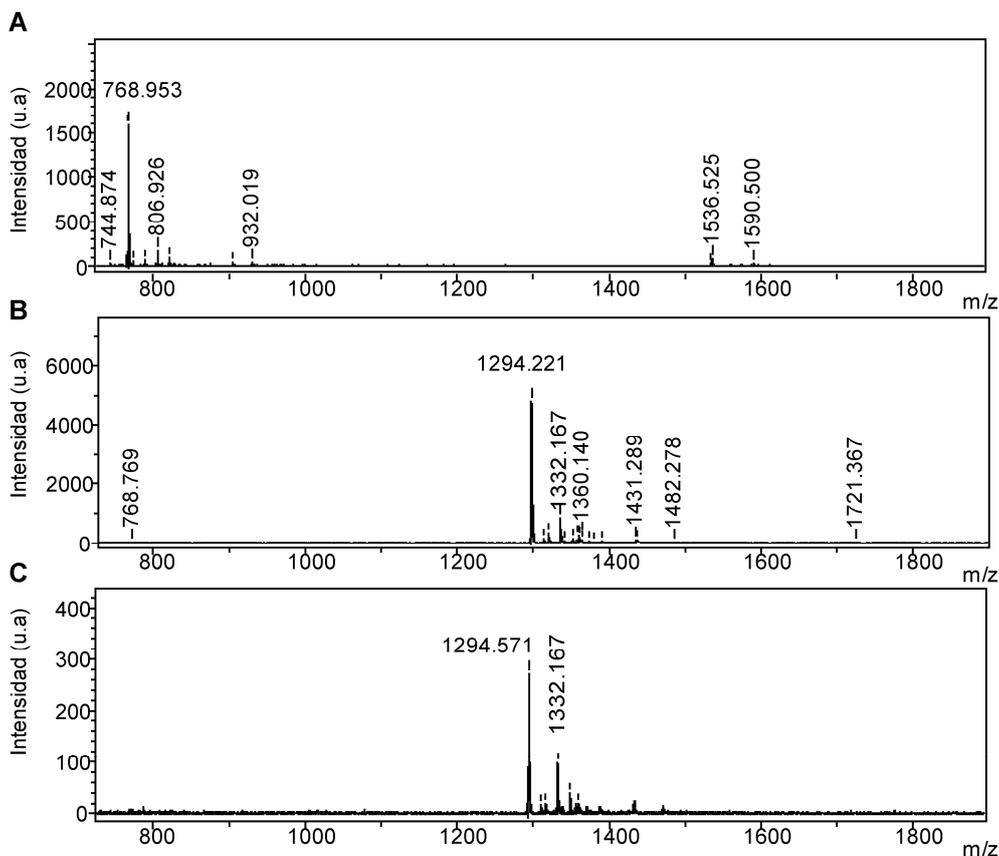


Figura 3.6. Caracterización de los productos de purificación por MALDI-TOF. Resultados por MALDI-TOF de los tres picos (1, 2 y 3, **Figura 3.5**) obtenidos en la purificación del producto de reacción entre la CoA y la Biotina-Pe_o₂-maleimido por FPLC. **A.** MALDI del pico 1. **B.** MALDI del pico 2. **C.** MALDI del pico 3. La matriz utilizada fue HPA en una concentración 15.3 mg/ml en agua.

La asignación de los picos (**Tabla 3.2**) permitió concluir que el primero estaba constituido mayoritariamente por CoA sin reaccionar y el segundo y el tercero por CoA-Pe_o₂-biotina.

Pico FPLC	Pico experimental (Da)	Pico teórico (Da)	Asignación
1	768.953	769.389	CoA
2	1294.221	1293.619	CoA-Pe _o ₂ -biotina
3	1294.571	1293.619	CoA-Pe _o ₂ -biotina

Tabla 3.2. Picos más importantes del análisis por espectrometría de masa MALDI-TOF de los productos aislados luego de la purificación por FPLC.

Finalmente, se utilizó el producto obtenido para marcar células HEK 293 vivas transientemente expresando el IR-B-A1x3-GFP. Se incubaron las células con 2 μ M ACPwt-S funcional y 1 μ M CoA-Pe_o₂-biotina como sustrato. Luego se agregó 1 nM

SA-atto550 y pudo observarse la marcación en la membrana de las células transfectadas (evidenciadas por la presencia de GFP) (**Figura 3.7.A**)

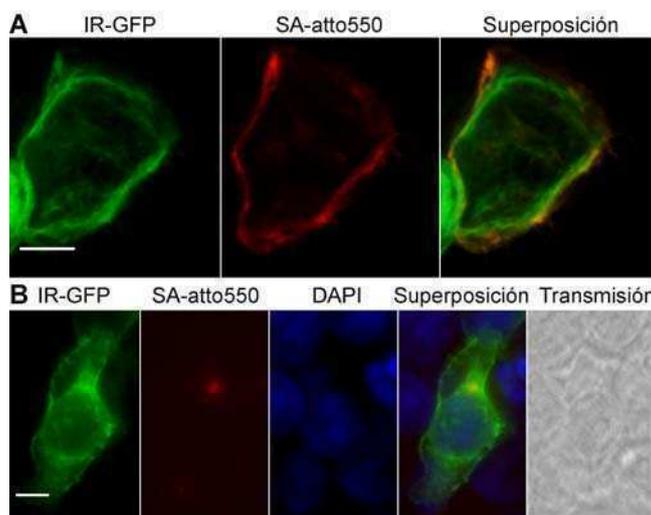


Figura 3.7. Marcación de células HEK 293 vivas con CoA-biotina y SA-atto550. Células HEK 293 expresando el IR-B-A1x3-GFP se incubaron vivas con 1 μM CoA-PeO₂-biotina con (**A**) y sin (**B**) 2 μM ACPwt-S durante 30 min a TA y marcadas luego con 1 nM SA-atto550 por 10 min. Las células luego fueron fijadas en metanol, montadas en Mowiol y visualizadas por microscopía de campo amplio (Zeiss Axiovert S100). Barras de escala: 5 μm .

Por otro lado, se derivatizó la CoA con una sonda fluorescente pequeña a través de su grupo sulfhidrilo utilizando un maleimido del atto488 como reactivo, purificando el producto de interés por HPLC. Las fracciones eluidas de la cromatografía se caracterizaron primero por espectrofotometría. Se midió A_{260} y A_{501} de cada uno de los picos (fracciones 26, 28-30, 36-37 y 41-42) y se calculó el cociente entre ambas medidas.

Se calculó con los datos bibliográficos el cociente teórico A_{501}/A_{260} para la CoA, atto488 y CoA-atto488 (**Tabla 3.3**).

Teórico	ϵ_{260} ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	ϵ_{501} ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	A_{501}/A_{260}
CoA	15300	-	0.00
atto488	18900	90000	4.76
CoA-atto488	34200	90000	2.63

Tabla 3.3. Cocientes teóricos A_{501}/A_{260} para la CoA, atto488 y CoA-atto488 calculados a partir de los coeficientes de absorptividad molar (ϵ) a las diversas longitudes de onda.

De este modo se asignó la posible identidad de los compuestos presentes en cada fracción (**Tabla 3.4**) pudiendo concluir que la fracción 28-30 contenía CoA-atto488, el producto deseado. El rendimiento obtenido fue de aproximadamente 77 %.

Fracción	A_{501}/A_{260}	Asignación
26	0.05	CoA
28-30	2.58	CoA-atto488
36-37	4.43	atto488
41-42	4.48	atto488

Tabla 3.4. Cocientes experimentales A_{501}/A_{260} para los picos obtenidos en la purificación por HPLC.

Para confirmar que se trataba del compuesto deseado se marcaron células vivas A431 expresando establemente el EGFR fusionado al tag ACP con esta fracción proveniente de la cromatografía y una enzima ACPwt-S (cuya actividad estaba confirmada). En la **Figura 3.8** el panel **A** muestra la marcación del EGFR en la membrana de células A431 con la sonda obtenida en la fracción 28-30. El panel **B** presenta el control positivo utilizando CoA-atto488 comercializado por Covalys.

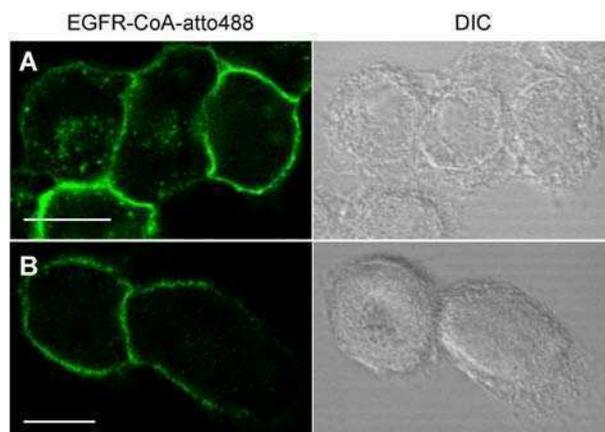


Figura 3.8. Marcación de células A431 con CoA-atto488. Células A431 estables para el EGFR fusionado al tag ACP, marcadas vivas con 0.2 μ M ACPwt-S y 1 μ M CoA-atto488 a TA durante 30 min y posteriormente fijadas en metanol. **A.** CoA-atto488, fracción 28-30. **B.** CoA-atto488 comercial. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación, 488 nm; emisión, LP: 505 nm). Barras de escala: 10 μ m.

Las otras fracciones (26, 36-37 y 41-42) no mostraron marcación así como tampoco el control negativo en el que las células se incubaron con CoA-atto488 comercial sin enzima. Esto permitió concluir entonces que el producto obtenido era CoA-atto488 y que la marcación obtenida era específica.

3.2.3. Marcación de la porción N-terminal del IR

El marcar el IR del lado extracelular permitiría diferenciar el IR ya localizado en la membrana del que está siendo aún procesado en el RE y el sistema de Golgi y eventualmente el receptor que ya fue internalizado del que aún no se localizó en la

membrana celular. Para lograr esto se procedió a ensayar diversos *tags* insertados en dos posiciones diferentes dentro del IR.

El *tag* más largo (ACP, 77 aminoácidos) insertado en la región cercana al extremo N-terminal (residuo 34 de la secuencia de aminoácidos) del receptor fue eficazmente reconocido por la enzima ACPwt-S y modificado covalentemente tanto en el caso de células expresando el IR-A-ACP como el IR-B-ACP.

De este modo fue posible marcar diferencialmente cada una de las isoformas del IR en células vivas coexpresando ambas variantes de *splicing*: una isoforma se visualizó a través de la convencional fusión con GFP al extremo C-terminal y la otra uniéndose covalentemente una sonda pequeña en su porción N-terminal extracelular a través del *tag* ACP (**Figura 3.9**).

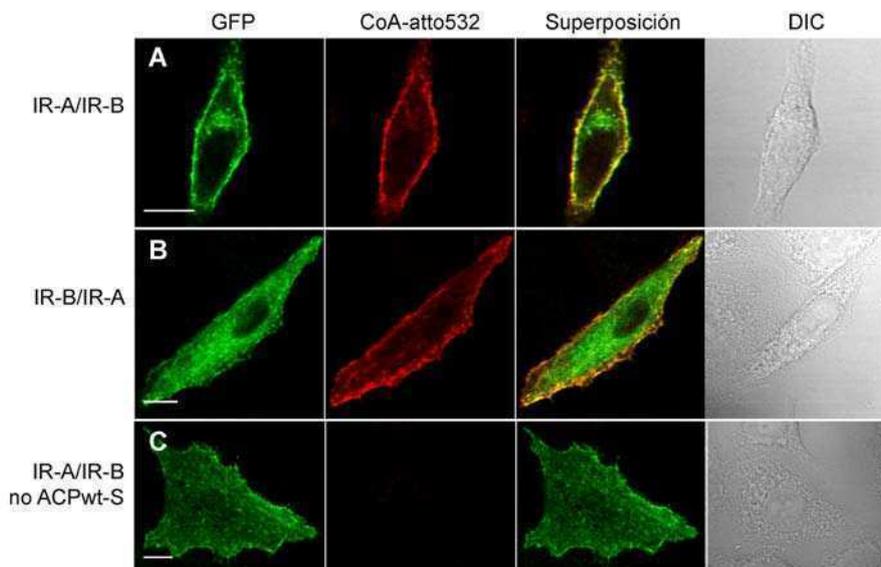


Figura 3.9. Visualización de las dos variantes de *splicing* del IR. Células HeLa coexpresando transientemente el IR-A-GFP y el IR-B-ACP (**A**), el IR-B-GFP y el IR-A-ACP (**B**) marcadas vivas con 0.2 μM ACPwt-S y 1 μM CoA-atto532 durante 30 min a TA fueron fijadas en metanol. **C.** Control: células HeLa coexpresando el IR-A-GFP y el IR-B-ACP incubadas con 1 μM CoA-atto532 sin enzima. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación GFP, 488 nm; excitación atto532, 532 nm; emisión GFP, BP: 500/20 nm; emisión atto532, LP: 560 nm). Barras de escala: 10 μm .

La **Figura 3.9** muestra células HeLa coexpresando transientemente el IR-A-GFP y el IR-B-ACP (panel **A**) o bien el IR-A-ACP y el IR-B-GFP (panel **B**) marcadas vivas con CoA-atto532 y ACPwt-S. La señal roja correspondiente a CoA-atto532 se localiza en la membrana celular, en cambio la señal verde de aquella isoforma fusionada a GFP se detecta tanto en la membrana como en el interior celular. Asimismo, la marcación resultó altamente específica ya que no se observó fluorescencia en el canal correspondiente a CoA-atto532 cuando el experimento fue realizado en ausencia de enzima (panel **C**).

Se analizó a continuación la colocalización de ambas señales calculando los coeficientes de Pearson y de Manders con el objeto de cuantificar lo que la imagen de superposición muestra cualitativamente. Estos coeficientes mostraron valores cercanos a uno, indicando un alto grado de colocalización. Una vez calculados los coeficientes fue posible construir los mapas de Pearson y Manders en los cuales se muestra el aporte de cada píxel a cada uno de los coeficientes. Estos mapas confirmaron que las mayores contribuciones están dadas por los píxeles correspondientes a la membrana celular siendo esto lo esperado ya que una de las isoformas se marcó extracelularmente, detectándose entonces solo su presencia en la membrana. En la **Figura 3.10** se muestra un ejemplo de este análisis correspondiente al experimento mostrado en la figura anterior. En el panel **B** se presenta el mapa de Manders y en el panel **C** el mapa de Pearson. En ambos paneles los mayores aportes a cada uno de los coeficientes se presentan en rojo y los aportes más bajos en azul.

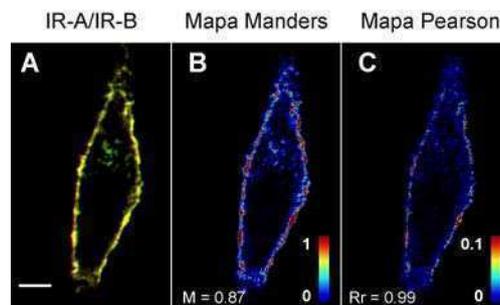


Figura 3.10. Colocalización del IR-A y el IR-B. Análisis de colocalización correspondiente al experimento de la **Figura 3.9.A**. **A.** Superposición de la señal correspondiente al IR-A-GFP (verde) y al IR-B-ACP-CoA-atto532 (rojo). **B.** Mapa de Manders (Matlab). **C.** Mapa de Pearson (Matlab). Se indican los coeficientes de colocalización calculados utilizando el Matlab (M y R_r). Barra de escala: $5 \mu\text{m}$.

Se confirmó que la proteína expresada era el IR por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico contra los aminoácidos 128-205 del receptor (anti-IR subunidad α , H78). Estos experimentos permitieron observar que el IR-ACP se expresa correctamente y puede ser marcado extracelularmente pero que una proporción importante del mismo se acumula en el interior celular. La **Figura 3.11** muestra un experimento de microscopía de epifluorescencia en la cual el primer panel es la imagen detectada en el canal correspondiente al anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa flúor 488 revelando el IR. El segundo panel corresponde al canal rojo, evidenciando la marcación extracelular con CoA-atto547 y ACPwt-S. La microscopía de campo amplio permitió detectar tanto el IR intracelular (en verde, revelado por el anticuerpo) como el IR ya localizado en la membrana (en rojo, dado que la CoA-atto547 no es permeable a la membrana celular, pudiendo solo marcar el IR en la superficie). Esto resultó concordante con lo observado en experimentos con células expresando el IR-ACP-GFP (A o B) en los cuales la señal verde

correspondiente a la proteína fluorescente se acumula en el interior celular y la marcación en membrana con ACPwt-S y CoA fluorescente resulta ser baja revelando fallas en la localización.

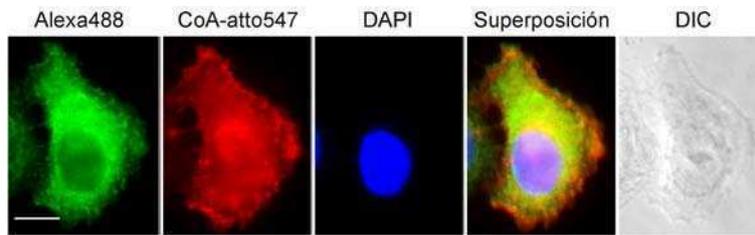


Figura 3.11. Inmunofluorescencia del IR-ACP. Células HeLa expresando el IR-B-ACP marcadas vivas con $1 \mu\text{M}$ CoA-atto547 y $0.2 \mu\text{M}$ ACPwt-S fueron fijadas en metanol e inmunomarcadas con un anticuerpo específicamente dirigido contra los aminoácidos 128-205 de la subunidad α del IR (H78) y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa flúor 488. Las muestras se visualizaron por microscopía de epifluorescencia (Zeiss Axiovert S100). Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

Lo expuesto condujo a rediseñar la estrategia probando dos tags más pequeños sospechando que el tamaño del mismo podía ser la causa de lo observado. Se eligieron dos péptidos: YbbR13 (11 aminoácidos) y A1 (12 aminoácidos). En el primer caso, no pudo verse marcación y nuevamente se detectó la proteína acumulada en el RE y el Golgi.

El tag A1, en cambio, permitió marcar la porción extracelular del IR al principio del dominio rico en leucina (L1) cuando fue insertado en el sitio de corte para la enzima de restricción *EcoR* V. La **Figura 3.12** muestra imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia de células expresando cada una de las isoformas del IR fusionadas a GFP en el extremo C-terminal y al tag A1 insertado en la posición 34 de la secuencia aminoacídica. Las células fueron marcadas con ACPwt-S y CoA-atto547.

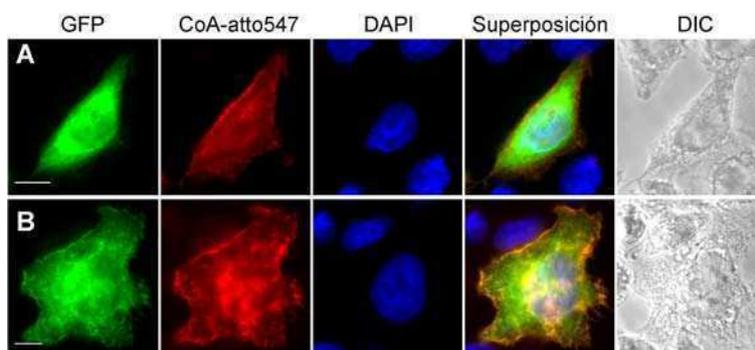


Figura 3.12. Marcación del extremo N-terminal del IR con el tag A1 (12 aminoácidos). Células HeLa expresando el IR-A-A1-EcoRV-GFP o el IR-B-A1-EcoRV-GFP fueron marcadas vivas con $0.2 \mu\text{M}$ ACPwt-S y $1 \mu\text{M}$ CoA-atto547 y fijadas en metanol. Las muestras se visualizaron por microscopía de epifluorescencia (Zeiss Axiovert S100). Barras de escala: $10 \mu\text{m}$.

Los experimentos realizados y evaluados hasta esta parte mostraron la marcación específica y la posibilidad de marcar diferencialmente ambas variantes de

splicing del IR. Sin embargo, las imágenes de microscopía muestran que al fusionar un *tag* (más largo, de 77 aminoácidos, o aún más corto, de 12 aminoácidos) a la porción cercana al extremo N-terminal del receptor éste se acumula en una proporción importante en el citoplasma, probablemente el RE y el sistema de Golgi. Asimismo, cuando se evaluó si es capaz de unir insulina utilizando la aproximación descrita en el **Capítulo 1** con BAC-Ins, no pudo verse señal de QD con estas construcciones. Esto, conjuntamente con experimentos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específicamente dirigido contra la subunidad β del IR fosforilado en la tirosina 1361, condujo a la conclusión de que si bien estas mutantes del IR-A y del IR-B se expresan correctamente y se localizaban en cierta proporción en la membrana celular, parecen no ser totalmente funcionales.

En el caso de los IR-ACP se evaluó la autofosforilación del receptor observando activación independiente de insulina aunque estos niveles fueron menores que los presentados por los IR-GFP o los IR salvajes cuando son estimulados. En la **Figura 3.13** se muestran células expresando el IR-ACP (A o B) que sin ser estimuladas presentan señal en la membrana. Esto no sucede con aquellas quimeras que expresan el IR-GFP (ver **Capítulo 1**). En cambio, al ser estimuladas, los niveles de activación resultan sensiblemente menores que para las proteínas fusionadas a GFP. Es relevante aclarar que el análisis de células individuales permitió ver que el comportamiento no es homogéneo siendo lo expuesto lo observado en mayor medida.

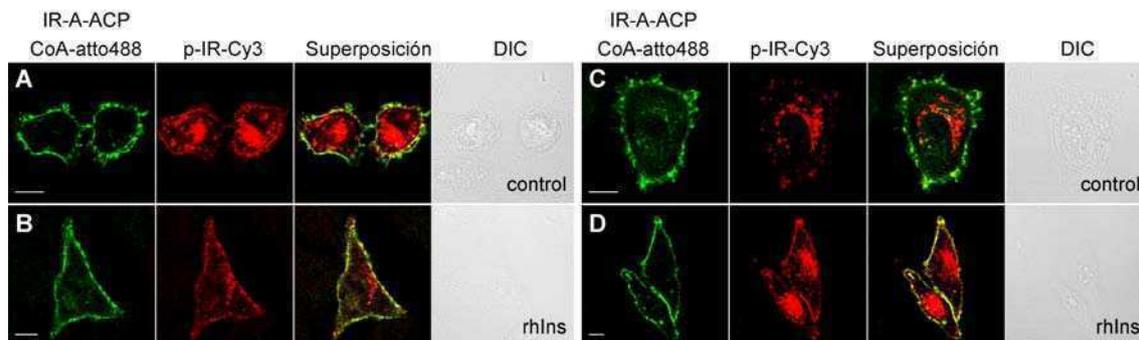


Figura 3.13. Evaluación de la activación del IR-ACP. Células HeLa expresando el IR-A-ACP (A-B) o el IR-B-ACP (C-D) marcadas con 0.2 μM ACPwt-S y 1 μM CoA-atto488, estimuladas (rhIns) o no (control) con 100 nM rhIns durante 10 min. Luego de fijar las células en metanol se realizaron las inmunofluorescencias con un anticuerpo contra la subunidad β del IR fosforilada en la tirosina 1361 y un anticuerpo secundario conjugado a Cy3. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación atto488, 488 nm; excitación Cy3, 532 nm; emisión atto488, 500-520 nm; emisión Cy3, 563-606 nm; modo meta). Barras de escala: 10 μm .

3.2.4. Marcación extracelular del IR introduciendo un pequeño tag en el dominio FnIII-1

Estos resultados condujeron a seguir adelante con el tag A1 ya que el YbbR13 no mostró marcación, siendo además más pequeño que el ACP, pudiendo ser eficazmente reconocido por la enzima. Por otro lado, se modificó la posición donde insertarlo dentro del IR dado que la interrupción de la secuencia en el extremo N-terminal estaría alterando probablemente el adecuado procesamiento y localización del receptor. Se eligió entonces la posición 626 de la secuencia aminoacídica (1878 pb río abajo del ATG inicial en la secuencia del gen) coincidente con un sitio de reconocimiento para la enzima *BamH* I favoreciendo la estrategia de clonado. Esta posición se encuentra dentro del dominio FnIII-1 del IR sin encontrarse en ella ningún aminoácido involucrado en mutaciones patológicas del gen del IR, residuos glicosilables, ni residuos cisteínas, que resultan importantes para el procesamiento post-traducciona

La generación de los vectores de expresión pcDNA3-IR-A-A1-GFP, pcDNA3-IR-B-A1x3 y pcDNA3-IR-B-A1x3-GFP permitieron nuevamente marcar la porción extracelular del receptor de insulina en células vivas (HEK 293, **Figura 3.7**, y HeLa).

En el caso de estas construcciones se observó una mejor localización del IR en membrana así como mayores niveles de transfección y/o expresión de la proteína respecto a lo detectado con los IR en los que se introdujeron tags en el extremo N-terminal, lo cual se reflejó en niveles más elevados de marcación. La **Figura 3.14** muestra experimentos representativos para las tres construcciones en células HeLa marcadas vivas. En el panel **A** células expresando el IR-B-A1x3-GFP se marcaron vivas con CoA-atto532 y ACPwt-S detectándose ambas señales en la membrana celular así como en filopodias (panel **B**). Lo que se observa cualitativamente en la imagen de superposición (**Figura 3.14.A**, tercer panel) se cuantificó en un mapa de Manders que mostró que los mayores aportes a M están dados por los píxeles correspondientes a la membrana celular (**Figura 3.14.C**).

El IR fusionado al tag A1 pero sin GFP en el extremo C-terminal también permitió detectar marcación en membrana como se ve en la **Figura 3.14.D** la cual presenta una imagen de microscopía de epifluorescencia donde la señal roja corresponde a CoA-atto532. Resultados similares se obtuvieron al expresar el IR-A-A1-GFP (**Figura 3.14.E**).

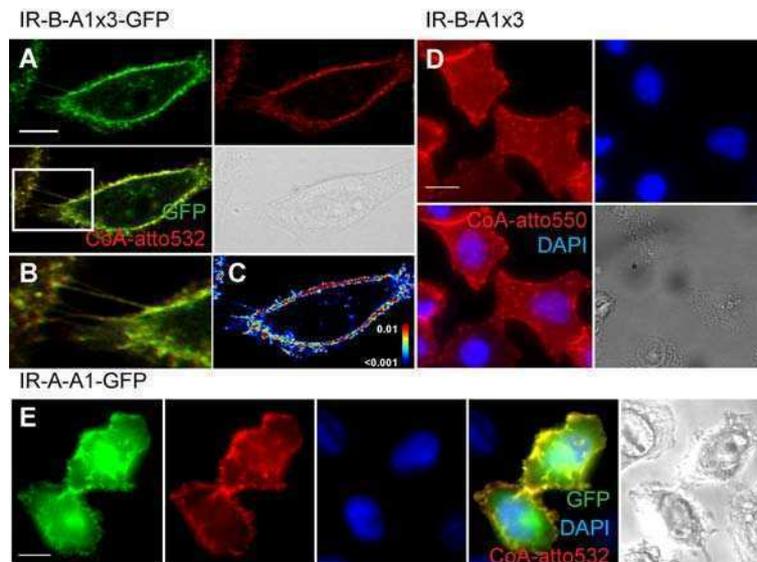


Figura 3.14. Marcación del dominio FnIII-1 del IR (A y B). Células HeLa expresando el IR-B-A1x3-GFP (A-C) o el IR-B-A1x3 (D) o el IR-A-A1-GFP (E) fueron marcadas con 0.2 μ M ACPwt-S y 1 μ M CoA-atto532 o CoA-atto550. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación atto488, 488 nm; excitación atto532, 532 nm; emisión atto488, 500-520 nm; emisión atto532, 563-606 nm; modo meta) en el caso del IR-B-A1x3-GFP (A-B) o por microscopía de epifluorescencia (Zeiss Axiovert S100) en los otros casos (D-E). Barras de escala: 10 μ m. **B.** Ampliación de la región dentro del recuadro en **A**. **C.** Mapa de Manders correspondiente al experimento del panel **A**.

Asimismo, estas construcciones mostraron unir insulina antes y después de ser marcadas. Los experimentos se hicieron de modo similar a lo detallado en los capítulos precedentes como se esquematiza en la **Figura 3.15**.

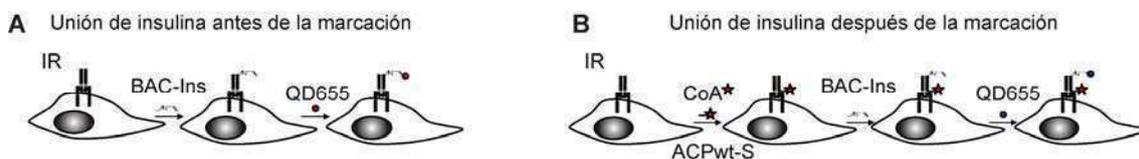


Figura 3.15. Unión de insulina. Esquemas de cómo se evaluó la unión de insulina antes (A) y después (B) de la marcación del dominio extracelular del IR con ACPwt-S y CoA fluorescentes.

En la **Figura 3.16.A** se muestran células expresando el IR-B-A1x3-GFP incubadas con 50 nM BAC-Ins a 15 $^{\circ}$ C y posteriormente con 1 nM QD655. Se detectó la unión del ligando a través de la señal de los QD655 en la membrana celular, siendo esta específica ya que células no transfectadas no mostraron señal en el canal rojo (ver células en la esquina inferior derecha de la **Figura 3.16.A**).

A continuación, se analizó si se mantenía esta funcionalidad luego de marcar extracelularmente el receptor. Para esto las células se marcaron con CoA-atto532 y ACPwt-S, luego se incubaron con BAC-Ins y posteriormente con QD655. En la **Figura 3.16.B** se presenta un experimento representativo de esta evaluación: en verde se muestra la señal correspondiente a GFP, en rojo la de CoA-atto532 y en azul la correspondiente a los QD655. Nuevamente, se observa que mientras GFP se

encuentra tanto en la membrana como en el interior, las señales correspondientes al ligando unido a los QD655 y a la marcación del dominio extracelular se evidencian solamente en la membrana plasmática.

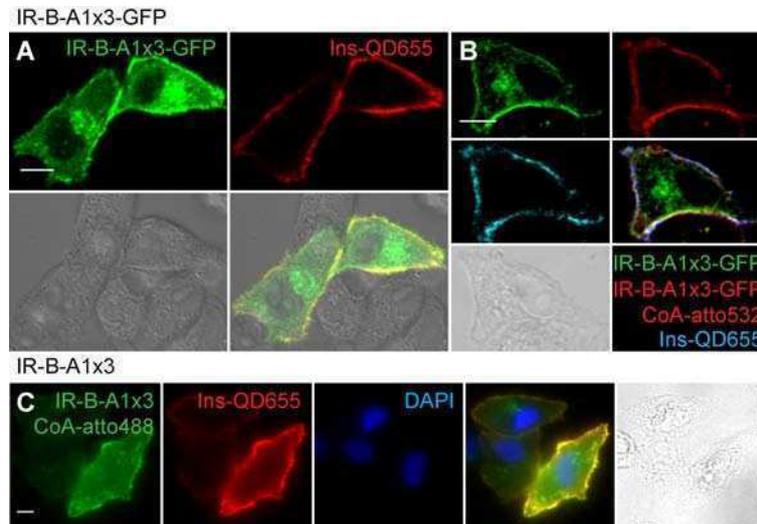


Figura 3.16. Unión de insulina antes y después de la marcación. **A.** Células HeLa expresando el IR-B-A1x3-GFP incubadas vivas con 50 nM BAC-Ins y posteriormente con 1 nM QD655, fijadas en 3.7 % PFA. **B-C.** Las células expresando IR-B-A1x3-GFP (**B**) o IR-B-A1x3 (**C**) se marcaron primero con 1 μ M CoA-atto532 y 0.2 μ M ACPwt-S y luego con 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655 (se muestra GFP en verde, CoA-atto532 en rojo y QD655 en azul). Las imágenes del panel **B** se adquirieron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación GFP, 488 nm; excitación atto532, 532 nm; excitación QD655, 488 nm; emisión GFP, BP: 500/20 nm; emisión atto532, BP: 565-615 nm; emisión QD655, LP: 650 nm; modo meta). Barras de escala 10 μ m. Las imágenes del panel **C** fueron adquiridas por microscopía de epifluorescencia (Olympus IX71). Barra de escala: 5 μ m.

Resultados similares se observaron en células expresando transientemente el IR-B-A1x3 (**Figura 3.16.C**) marcadas primero con CoA-atto488 y ACPwt-S y luego incubadas con BAC-Ins seguidamente de QD655.

Sin embargo, al estudiar la internalización del IR-B-A1x3 y del IR-B-A1x3-GFP luego de la unión de insulina no se detectó en niveles comparables a lo que sucedía con los IR salvajes o fusionados a GFP en el extremo C-terminal (**Figura 3.17**). Además, fue posible observar que a tiempos largos de incubación a 37 °C (150 min) el IR-B-A1x3-GFP se agrupa en la membrana formando estructuras similares a *clusters* con el ligando unido (panel correspondiente a 150 min).

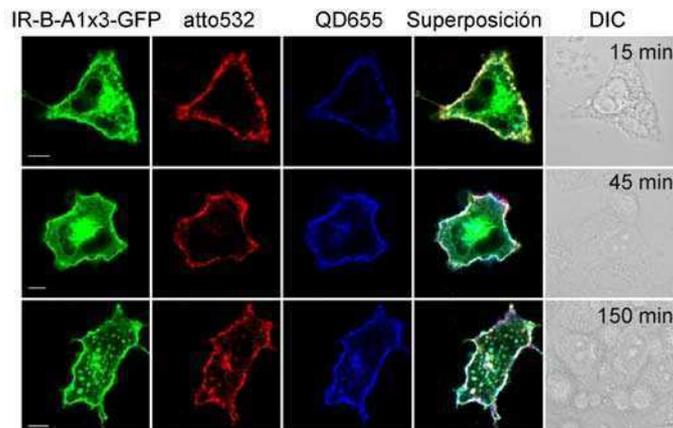


Figura 3.17. Análisis de la internalización del IR-B-A1x3-GFP luego de unir insulina. Células HeLa expresando el IR-B-A1x3-GFP se marcaron con 1 μ M CoA-atto532 y 0.2 μ M ACPwt-S, fueron incubadas vivas con 50 nM BAC-Ins y posteriormente con 1 nM QD655 y luego a 37 °C durante 15, 45 ó 150 min. A continuación fueron fijadas en 3.7 % PFA y visualizadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (excitación GFP, 488 nm; excitación atto532, 532 nm; excitación QD655, 488 nm; emisión GFP, BP: 500/20 nm; emisión atto532, BP: 565-615 nm; emisión QD655, LP: 650 nm; modo meta). Barras de escala: 10 μ m.

3.3. DISCUSIÓN

En este capítulo se mostró el desarrollo de quimeras de ambas isoformas del IR fusionadas a diversos *tags* que permitieron su marcación extracelular con sondas pequeñas en células vivas. El trabajo realizado se orientó a conseguir mutantes del IR que puedan ser marcadas extracelularmente a fin de poder diferenciar el receptor ya localizado en membrana del que está siendo procesado previamente a su localización. De este modo, sería posible, en primer lugar, contar con una herramienta para estudiar los receptores localizados en la membrana exclusivamente sin tener interferencia de los que aún están siendo procesados en el RE y el aparato de Golgi. En segundo lugar, esta estrategia permitiría seguir el tráfico del IR y del ligando por separado una vez que ha ocurrido la internalización. Para esto resulta fundamental que la marcación pueda ser exclusivamente extracelular.

Se puso a punto el sistema de marcación expresando y purificando la enzima ACPwt-S y sintetizando tanto CoA fluorescentes como CoA-PeO₂-biotina. Se generaron diversas quimeras del IR uniendo *tags* más largos (ACP de 77 aminoácidos) o más cortos (A1 de 12 aminoácidos) que pudieron ser marcados extracelularmente. Se estudió cada una de las construcciones generadas en lo que respecta a su expresión, localización, activación, su capacidad de unir insulina y de internalizarse en respuesta a ella.

Si bien las quimeras con el *tag* más largo (ACP) en el extremo N-terminal no resultaron funcionales, permitieron validar la marcación diferencial de las dos

isoformas del IR. Estas quimeras pudieron ser marcadas luego de su expresión y localización en membrana. Estas construcciones no permitieron detectar unión del ligando; sin embargo, mostraron estar activas (fosforiladas en su dominio quinasa) tanto en ausencia como en presencia de insulina resultando esto interesante para experimentos futuros. Estas formas constitutivamente activas permitirían estudiar los eventos de la vía independientemente del ligando. Se sabe que este receptor se agrega (forma *clusters*) previamente a ser internalizado, siendo entonces relevante contar con quimeras que no unen insulina para estudiar este tipo de fenómenos.

La unión de insulina al IR ocurre preferentemente en microvellosidades de la superficie celular. El complejo insulina-IR se redistribuye entonces acumulándose en zonas sin microvellosidades desde donde se internaliza (Carpentier *et al.*, 1981; 1985; Fan *et al.*, 1982). Los mecanismos que dan la especificidad de los efectos de la insulina en diversos tejidos no se conocen mayormente. Un modo de lograr esta especificidad en la señalización por insulina es la regulación de la dinámica espacial y temporal (Foti *et al.*, 2007). Los IR están compartimentalizados en dominios específicos en la membrana plasmática (Carpentier, 1993) y luego de la estimulación con insulina migran a dominios diferentes en la superficie celular y luego dentro de la célula. Dentro de este trayecto, la activación de distintas vías intracelulares han sido reportadas, lo cual apoya la hipótesis que postula que existe un control tanto espacial como temporal de la señalización del IR (Foti *et al.*, 2004). Entender los procesos biológicos que controlan la localización del IR y el tráfico resulta fundamental para dilucidar los factores que determinan la especificidad de las cascadas de señalización de la insulina.

Por otra parte, el IR con el *tag* A1 ubicado en el dominio FnIII-1 del IR mostró una localización coincidente con el IR salvaje, pudiendo además unir insulina tanto antes como después de la marcación. Este receptor se localiza y expresa correctamente, une insulina pero no se activa por autofosforilación ni se internaliza. Este comportamiento condujo a estudiar esta mutante como un posible dominante negativo del IR que es posible de detectar, marcar y modificar covalentemente en la membrana celular. Esto se presenta en el siguiente capítulo.

Asimismo los resultados de este capítulo abren la posibilidad de utilizar este *tag* A1 en otra posición más interior del IR con el objeto de lograr quimeras totalmente funcionales que puedan ser marcadas extracelularmente. Probablemente la región interdominio del IR sea una buena posibilidad así como el dominio FnIII-3. Si es posible conseguir una quimera funcional con este *tag* el paso siguiente resulta

entonces insertar en esa misma posición otro *tag* que sea marcado solamente por la enzima Sfp de *B. subtilis* de modo de lograr un sistema ortogonal (Sielaff *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Kropf *et al.*, 2009) que permitirá marcar diferencial y extracelularmente las dos isoformas del IR. Esto resulta relevante ya que no existen anticuerpos específicos que distingan cada una de las isoformas (es decir, dirigidos a la secuencia aminoacídica codificada por el exón 11). Además, la generación de estas herramientas hará posible seguir el tráfico intracelular del IR con sondas pequeñas o bien con QD unidos al IR a través de la CoA biotinilada, utilizando nanopartículas sensibles al pH se podría monitorear el ambiente intracelular que el IR atraviesa una vez que se ha producido la endocitosis.

CAPÍTULO 4

Estudio de los heterodímeros IR A/ IR B en la membrana plasmática

4. Estudio de los heterodímeros IR-A/ IR-B en la membrana plasmática

4.1. INTRODUCCIÓN

La adquisición del exón 11 del gen *Ir* en mamíferos y la capacidad de ser procesado de manera alternativa incluyéndolo o no de manera tejido específica originó una nueva variante del IR. Esta novedad evolutiva dio lugar a la especialización de la señalización de cada isoforma. La abundancia relativa del IR-A y del IR-B varía en los diversos tejidos y además se modifica de acuerdo a la etapa del desarrollo. La isoforma B es la que se expresa predominantemente en tejidos sensibles a insulina como lo son el hígado, el músculo o los adipocitos (Moller *et al.*, 1989; Mosthaf *et al.*, 1990). Mientras tanto, tejidos embrionarios expresan mayoritariamente el IR-A donde su principal función es regular la proliferación y diferenciación celular (Frasca *et al.*, 1999).

En tejidos de pacientes diabéticos se han detectado cambios en la relación de ARNm del IR-A y del IR-B (Mosthaf *et al.*, 1991; Sesti *et al.*, 1991; Kellerer *et al.*, 1993; Haring *et al.*, 1994) y en numerosos tumores se observa la sobreexpresión del IR-A (Pandini *et al.*, 1999; Sciacca *et al.*, 1999; Vella *et al.*, 2002).

La formación de receptores híbridos IRA/IRB ha sido postulada en varios trabajos pero comprobar su existencia ha sido dificultado por la carencia de las herramientas necesarias. Hasta el momento no se cuenta con anticuerpos específicamente dirigidos contra cada una de las isoformas. Una evidencia de la existencia de los híbridos son las afinidades diferentes por diversos ligandos del IR-A, el IR-B y los híbridos IR-A/IR-B en células transfectadas con cada uno de los receptores o ambos conjuntamente.

Para poner a prueba la hipótesis de la existencia de los híbridos se han realizado medidas BRET en receptores purificados de células expresando una isoforma fusionada a YFP y la otra a la luciferasa (Boute *et al.*, 2001) o bien realizando las mediciones en toda la célula. En estas mediciones se incluyen tanto los receptores

en la membrana como aquellos que aún están siendo procesados en el RE y en el aparato de Golgi (Blanquart *et al.*, 2008).

Por otra parte, utilizando células HEK 293 (endógenamente expresan el IR-A) transfectadas con el IR-B fusionado a una proteína fluorescente permitieron detectar por inmunoprecipitación las bandas correspondientes a ambas isoformas por Western blot: IR-A e IR-B-YFP (Blanquart *et al.*, 2008).

Sin embargo, en estos estudios se detectan los receptores presentes en toda la célula. La combinación de las construcciones presentadas en el capítulo anterior (IR-B-A1x3 e IR-A1x3-GFP) con las isoformas salvajes o fusionadas a SCFP permitirá estudiar la presencia de híbridos en la membrana, que, en definitiva, son los responsables de la respuesta celular a insulina y a IGF (I y II)

Objetivos

1. Caracterizar funcionalmente al IR-B-A1x3 y al IR-B-A1x3-GFP
2. Estudiar la existencia de heterodímeros IR-A/IR-B en la membrana plasmática
3. Estudiar el efecto de la internalización en la señalización por insulina de ambas isoformas del IR

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Caracterización funcional del IR-B-A1x3 y del IR-B-A1x3-GFP

En el capítulo anterior se mostró que los IR fusionados al *tag* A1 dentro del dominio FnIII-1 unen insulina. Sin embargo, no se detectó internalización del receptor en respuesta a insulina en niveles comparables a los IR salvajes o los IR-VFP. Estas dos características sugerían que se trataba de un posible dominante negativo del IR que además podía ser marcado extracelularmente, lo cual lo hacía doblemente interesante.

Para evaluar si la unión de insulina al IR-B-A1x3 se traduce en la activación de la cascada de señalización del IR, se analizó si el IR-B-A1x3 y el IR-B-A1x3-GFP se autofosforilan en respuesta a insulina. Para esto se realizaron inmunofluorescencias con un anticuerpo específico contra la subunidad β del IR fosforilada en la tirosina 1361. La **Figura 4.1** muestra que mientras el IR-B-SCFP y el IR-B presentan señal de

activación en la membrana en respuesta a insulina (paneles B y E), esto no ocurre al insertar el tag A1 en el dominio FnIII-1 (paneles D y H).

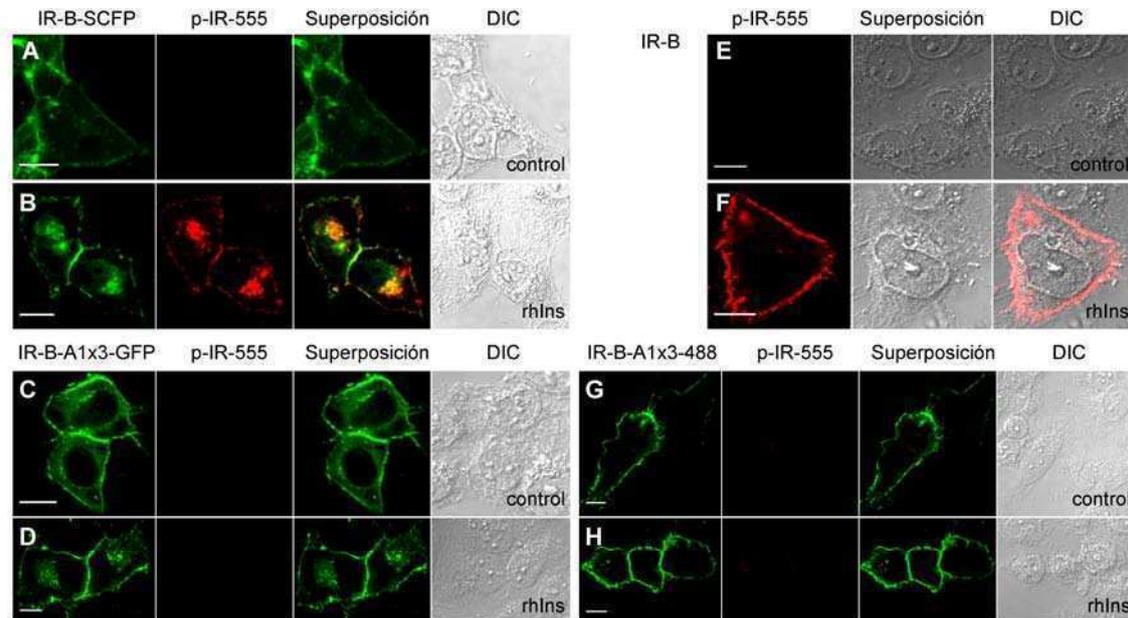


Figura 4.1. Evaluación de la autofosforilación del IR-B-A1x3 y del IR-B-A1x3-GFP por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Células HeLa expresando el IR-B-SCFP (A y B), IR-B-A1x3-GFP (C y D), IR-B (E y F), o IR-B-A1x3 (G y H) estimuladas o no (control) con 100 nM rhIns durante 10 min fueron fijadas en metanol. Las inmunofluorescencias fueron realizadas con un anticuerpo específico contra la subunidad β del IR fosforilada (Tyr1361) y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa flúor 555. En C-D las células se marcaron con 2 μ M ACPwt-S y 1 μ M CoA-atto488 durante 30 min a TA y luego fueron o no estimuladas con rhIns. La visualización se realizó en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación SCFP, 405 nm; excitación Alexa flúor 555, 543 nm; emisión SCFP, BP: 480-495 nm; emisión Alexa flúor 555, BP: 560-620 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 μ m.

Este resultado muestra que estas construcciones son capaces de expresarse, unir insulina, marcarse extracelularmente pero no de activarse en su dominio quinasa en respuesta al ligando. Esto las convierte en potenciales dominantes negativos del IR. Los resultados obtenidos por microscopía fueron confirmados por experimentos de Western blot. En primer lugar, pudo observarse que el IR-B-A1x3 presenta el tamaño correcto coincidente con el peso molecular del IR (95 kDa). Sin embargo, coincidentemente con la microscopía no pudo detectarse señal de fosforilación utilizando en este caso un anticuerpo dirigido contra tirosinas fosforiladas (PY20) (Figura 4.2).

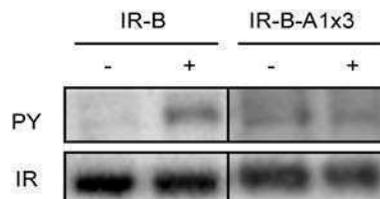


Figura 4.2. Evaluación de la autofosforilación del IR-B-A1x3 por Western blot. Células HeLa expresando el IR-B o el IR-B-A1x3 hambreadas durante toda la noche fueron estimuladas (+) o no (-) con 100 nM rhIns durante 5 min y los lisados se analizaron por Western blot con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (PY20) y luego con un anticuerpo contra la subunidad β del IR.

4.2.2. El IR-B-A1x3 es un dominante negativo del IR

Continuando con la caracterización del IR-B-A1x3, se evaluó un evento río abajo en la cascada de señalización del IR: la transcripción génica mediada por el factor de transcripción AP-1. Se analizó el efecto sobre la inducción de la transcripción vía AP-1 cuando se coexpresa el IR-B-A1x3 con cada una de las isoformas del IR-SCFP.

El objetivo de esta parte fue analizar si el IR-B-A1x3 es capaz de apagar la señalización mitogénica desencadenada por cada IR funcional (el IR-A-SCFP y el IR-B-SCFP). Cuando se normalizaron estos datos a la inducción generada por las células expresando sólo el IR-SCFP correspondiente se obtuvieron los resultados mostrados en la **Figura 4.3**. Las barras azules muestran que el IR-B-A1x3 disminuye el efecto sobre la transcripción génica inducida tanto por el IR-A-SCFP como por el IR-B-SCFP. Por el contrario, introducir el IR-B (sin tag, salvaje) aumenta la actividad de luciferasa, lo cual resulta lógico ya que se está transfectando mayor masa de ADN total del IR funcional (IR + IR-SCFP). Cuando se introdujo el IR-A al IR-A-SCFP la transcripción se incrementa aún más. Esto resulta consistente con lo expuesto en el **Capítulo 2** donde se demostró que el IR-A desencadena una mayor estimulación de la transcripción génica inducida por AP-1 que el IR-B.

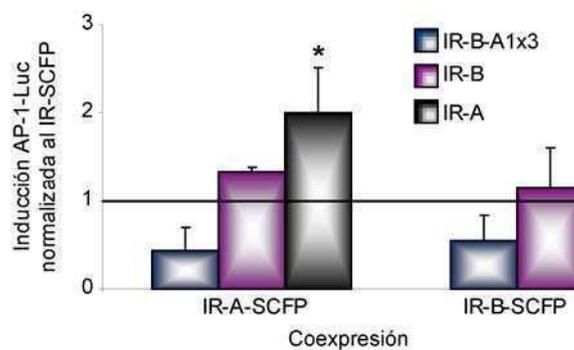


Figura 4.3. Efecto del IR-B-A1x3 sobre la transcripción génica inducida por ambas isoformas del IR-SCFP. Células HeLa coexpresando el reportero AP-1-Luc y: i) el IR-B-A1x3 con el IR-A-SCFP o el IR-B-SCFP (barras azules), ii) el IR-B con el IR-A-SCFP o el IR-B-SCFP (barras violetas), iii) el IR-A con el IR-A-SCFP o el IR-B-SCFP (barra gris). Las células fueron hambreadas durante 24 h, luego se estimularon o no con 100 nM rhIns durante 16 h y se midió la actividad de luciferasa presente en los lisados. Se cuantificó la inducción calculando el cociente entre las muestras estimuladas y las no estimuladas. Los niveles de inducción se normalizaron a células que habían sido transfectadas solamente con el pcDNA3-IR-SCFP correspondiente (igual masa de ADN de ese plásmido que el usado en las cotransfecciones).

A continuación se analizó el efecto de la dominancia negativa a concentraciones crecientes del IR-B-A1x3. Para esto se ensayaron transfecciones con diferentes relaciones de masa de ADN del pcDNA3-IR-B-A1x3 y el pcDNA3-IR (0:1, 1:4 y 1:2). Se midió la activación del factor de transcripción AP-1 en respuesta a

insulina. Ambas isoformas del IR mostraron que al ser coexpresados con el IR-B-A1x3 se produce una disminución dependiente de los niveles de expresión de esta mutante en la actividad de luciferasa con respecto a lo observado en las muestras en las que no se transfectó el pcDNA3-IR-B-A1x3 (Tabla 4.1 y Figura 4.4).

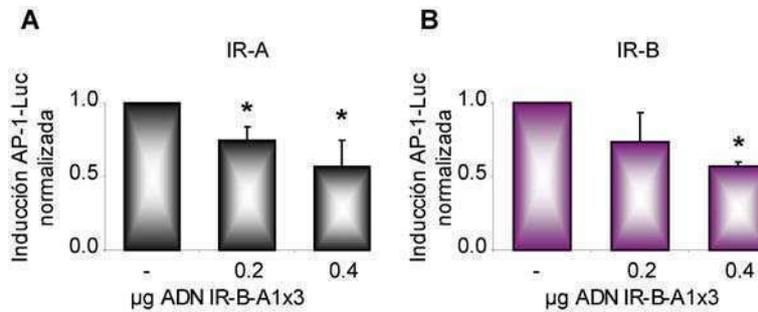


Figura 4.4. Dominancia negativa del IR-B-A1x3 sobre ambas isoformas del IR. Células HeLa cotransfectadas con el plásmido reportero pAP1-Luc y el pcDNA3-IR-A (A) o el pcDNA3-IR-B (B) y diferentes cantidades de ADN del pcDNA3-IR-B-A1x3 luego de 24 h de expresión fueron deprivadas de SFB durante 24 h. Posteriormente se estimularon o no con 100 nM rhIns durante 16 h y se midió la actividad de luciferasa. Se cuantificó la inducción de luciferasa calculando el cociente entre las muestras estimuladas y las no estimuladas. Los niveles de inducción se normalizaron al grado de inducción que mostraron células que habían sido transfectadas sin el pcDNA3-IR-B-A1x3. Los asteriscos muestran diferencias significativas con la inducción causada solo por el IR salvaje ($p \leq 0.03$; $n = 4$ experimentos independientes).

ADN pcDNA3-IR (µg)	ADN pcDNA3-IR-B-A1x3 (µg)	Inducción AP-1-Luc (veces)	
		IR-A	IR-B
0.8	0.0	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
0.8	0.2	0.74 ± 0.09	0.73 ± 0.20
0.8	0.4	0.56 ± 0.18	0.57 ± 0.03

Tabla 4.1. Inducción de la transcripción mediada por AP-1 al coexpresar el IR-A o el IR-B con el IR-B-A1x3 y estimular con insulina ($n = 4$ experimentos independientes). Se ensayaron diferentes relaciones de masas de ADN de los plásmidos correspondientes.

Estos resultados muestran que el IR-B-A1x3 apaga la transcripción génica inducida por ambas isoformas del IR de manera dependiente de la cantidad de ADN transfectado. Esto permite concluir que se comporta como un dominante negativo tanto de la isoforma A como de la B del IR en la vía mitogénica.

4.2.3. El IR-B-A1x3 es un dominante negativo del IR endógeno en células HEK 293

Los resultados hasta aquí descriptos condujeron a analizar el comportamiento del IR-B-A1x3 frente al IR que endógenamente expresan las células HEK 293 (la isoforma A) estudiando si era posible apagar o disminuir su respuesta a insulina. Se diseñaron experimentos que evaluaran la transcripción génica a través de la vía de

AP-1. Para esto las células se transfectaron con diversas cantidades del pcDNA3-IR-B-A1x3 junto con el reportero pAP1-Luc y luego de 24 h de expresión, 24 h de hambreado y 16 h de estimulación con 100 nM rhIns se midió la actividad de luciferasa en los lisados. La **Figura 4.5** muestra que el efecto de la insulina (2.5 ± 0.3 veces de inducción) disminuye al aumentar la cantidad de IR-B-A1x3 en la célula (1.4 ± 0.4 veces de inducción para 0.1 μ g ADN y 0.6 ± 0.2 veces de inducción para 0.2 μ g ADN) siendo 0.2 μ g de ADN suficiente para apagarlo totalmente.

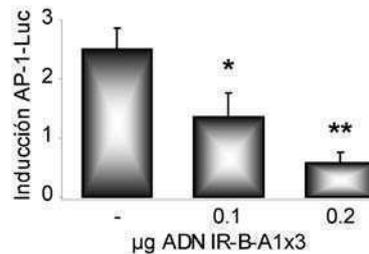


Figura 4.5. Análisis de la dominancia negativa del IR-B-A1x3 sobre el IR endógeno de células HEK 293. Células HEK 293 cotransfectadas con el plásmido reportero pAP1-Luc y diferentes cantidades de ADN del pcDNA3-IR-B-A1x3 (0, 0.1 y 0.2 μ g) fueron deprivadas de SFB durante 24 h. Posteriormente se estimularon o no con 100 nM rhIns durante 16 h y se midió la actividad de luciferasa presente en las muestras. Se cuantificó la inducción de luciferasa calculando el cociente entre las muestras estimuladas y las no estimuladas. Los asteriscos muestran diferencias significativas con la inducción causada solo por el IR endógeno (*: $p = 0.02$; **: $p = 0.003$; $n = 3$ experimentos independientes).

Este resultado confirmó la dominancia negativa de esta construcción sobre el IR endógeno.

4.2.4. El IR-B-A1x3 afecta diferencialmente la activación del IR-A y del IR-B y sus cascadas río abajo

Hasta ahora la caracterización funcional de esta construcción se centró en el efecto sobre la activación mitogénica río abajo del IR. El paso siguiente fue medir el efecto de esta quimera sobre tres eventos de activación de las cascadas de señales: la autofosforilación del IR (primer paso de la vía luego de la unión del ligando), la activación de Akt y la de ERK 1/2.

Se diseñaron entonces experimentos de Western blot que permitieran estudiar lo que sucede río abajo del IR cuando se cotransfectan células con el pcDNA3-IR-B-A1x3 y cada una de las isoformas del IR totalmente funcionales. Se observó que en células expresando el IR-A y el IR-B-A1x3 la fosforilación del IR disminuye al incrementar la cantidad relativa de ADN del pcDNA3-IR-B-A1x3 transfectado. Por otro lado, sobreexpresándolo junto con el IR-B salvaje se observó que la fosforilación del IR es mayor que en el caso de células sólo expresando el IR, independientemente de la cantidad de IR-B-A1x3 coexpresado (**Figura 4.6**).

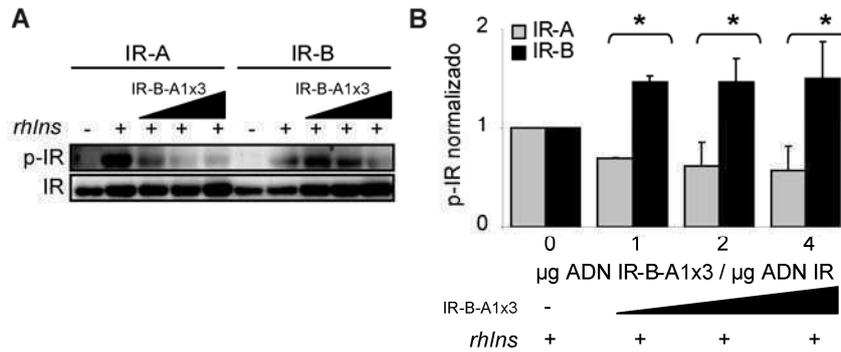


Figura 4.6. Efecto de la expresión del IR-B-A1x3 sobre la fosforilación del IR. **A.** Células HeLa coexpresando el IR-B-A1x3 con el IR-A o el IR-B (las relaciones en masa de ADN entre el IR-B-A1x3 y el IR utilizadas se variaron entre 0:1 y 4:1) fueron estimuladas durante 5 min con 100 nM rhins y los lisados se analizaron por Western blot con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (PY20) y luego un anticuerpo contra la subunidad β del IR. **B.** Cuantificación de los experimentos de Western blot: la normalización se realizó respecto a la fosforilación del IR salvaje sin IR-B-A1x3 (barra 0). Los asteriscos indican diferencias significativas entre isoformas del IR ($p \leq 0.03$, $n = 3$ experimentos independientes).

Al medir la activación de Akt mediante la detección de su forma fosforilada en la serina 473, se observó que coexpresando el IR-B-A1x3 con el IR-A disminuyen los niveles de activación de manera dependiente de la concentración de ADN del pcDNA3-IR-B-A1x3 utilizada en la transfección. En cambio, cuando el IR salvaje utilizado es el IR-B esta tendencia se invierte (**Figura 4.7**).

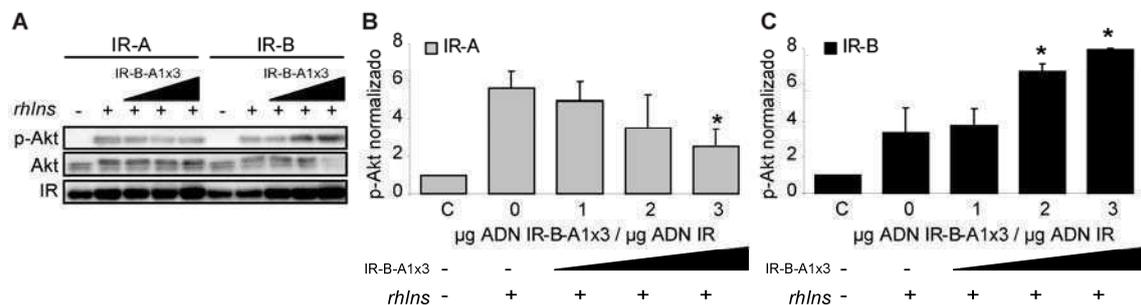


Figura 4.7. Efecto de la expresión del IR-B-A1x3 sobre la fosforilación de Akt. **A.** Células HeLa coexpresando el IR-B-A1x3 con el IR-A o el IR-B (las relaciones en masa de ADN entre el IR-B-A1x3 y el IR utilizadas se variaron entre 0:1 y 4:1) fueron estimuladas durante 5 min con 100 nM rhins y los lisados se analizaron por Western blot con un anticuerpo contra Akt fosforilado (Ser473; Cell Signaling) y luego contra Akt. **B-C.** Cuantificación de los experimentos de Western blot: la normalización se realizó respecto al basal (barra C). Los asteriscos indican diferencias significativas entre isoformas del IR ($p < 0.03$, $n = 3$ experimentos independientes).

Finalmente, al medir los niveles de fosforilación de ERK 1/2 en respuesta a insulina no se observaron diferencias en la activación desencadenada por el IR-A y el IR-B coexpresados con cantidades crecientes del IR-B-A1x3 (**Figura 4.8**).

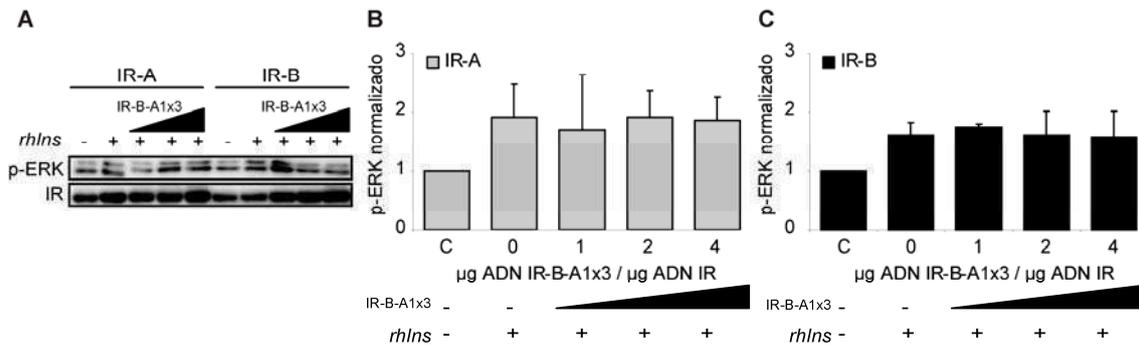


Figura 4.8. Efecto de la expresión del IR-B-A1x3 sobre la fosforilación de ERK 1/2. A. Células HeLa coexpresando el IR-B-A1x3 con el IR-A o el IR-B (las relaciones en masa de ADN entre el IR-B-A1x3 y el IR utilizadas se variaron entre 0:1 y 4:1) fueron estimuladas durante 5 min con 100 nM rhIns y los lisados se analizaron por Western blot con un contra ERK 1/2 fosforilado (Thr202 / Tyr204) y luego un anticuerpo contra ERK 1/2. **B-C.** Cuantificación de los experimentos de Western blot: la normalización se realizó respecto al basal (barra C) ($n = 3$ experimentos independientes).

Los resultados mostrados hasta el momento indican que el receptor recombinante IR-B-A1x3 produce el apagado de la señalización mitogénica tanto a través del IR-A como a través del IR-B como se espera de un dominante negativo. Sin embargo, la señalización en etapas tempranas de la cascada se modifica de manera distinta para cada isoforma del IR. Mientras la autofosforilación del IR-A y la sucesiva activación de Akt disminuyen en presencia del IR-B-A1x3, la fosforilación del IR-B no varía y la activación de Akt inducida por esta isoforma se incrementa cuando se coexpresa con el IR-B-A1x3. Estos resultados sugieren un efecto diferente según se lo exprese con cada isoforma: el IR-B-A1x3 disminuye la señalización metabólica y mitogénica del IR-A, mientras que el IR-B-A1x3 disminuye la señalización mitogénica del IR-B pero aumenta la metabólica.

Esto condujo a proponer dos hipótesis: i) por un lado, la internalización diferencial de cada isoforma podría estar involucrada en estas diferencias ya que el IR-B-A1x3 (al igual que el IR-B-A1x3-GFP) une insulina pero no se internaliza como se mostró en el capítulo anterior; ii) por el otro, la formación de receptores híbridos entre el IR-B-A1x3 y cada una de las isoformas del IR no ocurriría de forma aleatoria explicando las diferencias observadas. En ambas direcciones se diseñaron experimentos y son los que se presentan a continuación.

4.2.5. El IR-B-A1x3 retiene a ambas isoformas del IR en membrana

En el **Capítulo 2** se vio que la internalización juega un papel importante en la señalización diferencial del IR-A y del IR-B. Para probar si el IR-B-A1x3 afecta la endocitosis de las isoformas A y B del IR afectando de esta manera las cascadas de señalización río abajo, se diseñaron experimentos de internalización de modo similar a los realizados en el **Capítulo 2**. Primeramente se confirmó la no internalización del IR-

B-A1x3 tratando brevemente las muestras con una solución ácida 0.1 M Na-glicina pH 3, 0.5 M NaCl (**Figura 4.9**).

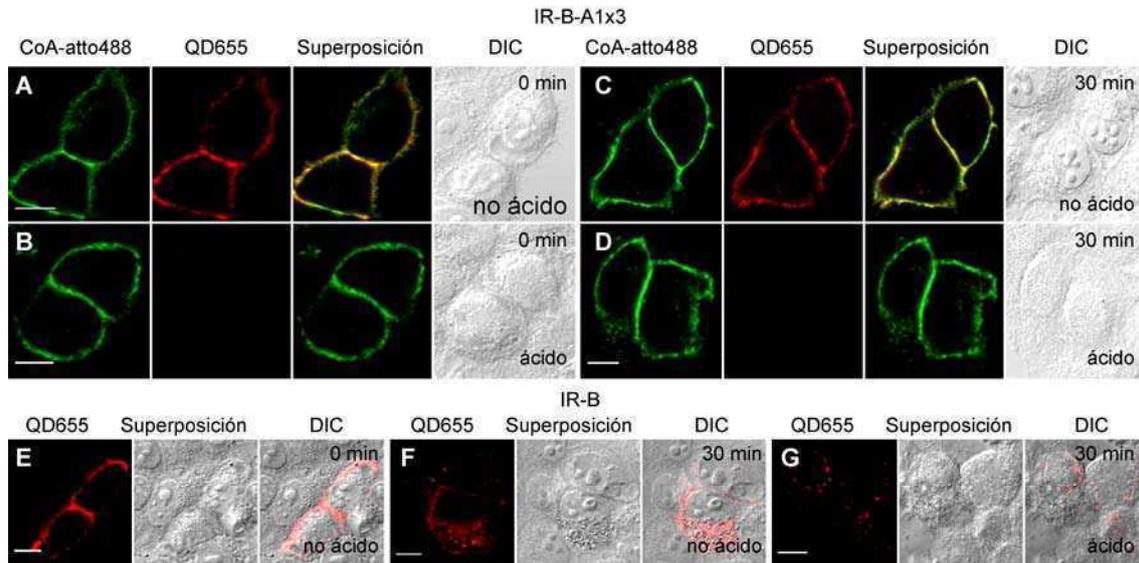


Figura 4.9. Estudios de internalización del IR-B-A1x3. A-D. Células HeLa expresando el IR-B-A1x3 fueron marcadas con 2 μ M ACPwt-S y 2 μ M CoA-atto488 a TA durante 30 min, luego se incubaron con 50 nM BAC-Ins por 15 min y posteriormente con 1 nM QD655 durante 10 min a TA. A. Las células se fijaron directamente en 3.7 % PFA. B. Las células se incubaron durante 5 min con una solución ácida 0.1 M Na-glicina pH 3, 0.5 M NaCl y luego fueron fijadas. C-D. Las células se incubaron 30 min a 37 °C y luego fueron fijadas tratándolas (D) o no (C) previamente con ácido. E-G. Células HeLa expresando el IR-B se marcaron con 50 nM BAC-Ins y 1 nM QD655 (E), se incubaron a 37 °C durante 30 min (F-G), y se fijaron en 3.7 % PFA directamente (E-F) o luego de tratarlas previamente con ácido durante 5 min (G). Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación atto488, 488 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión atto488, BP: 505-525 nm; emisión QD655, BP: 640-670 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 μ m.

Como control positivo se utilizaron células expresando el IR salvaje. Mientras que para el IR-B-A1x3 no pudo detectarse la presencia de QD655 dentro de las células luego de 30 min de incubación a 37 °C y el tratamiento con ácido (**Figura 4.9.D**), sí fue posible observar señal de QD655 en el interior celular en el caso del IR-B (**Figura 4.9.G**).

A continuación, se hicieron experimentos similares pero en células expresando el IR-B-A1x3 junto con el IR-A o el IR-B. En ambos casos la presencia del IR-B-A1x3 produce una disminución en el grado de internalización. La **Figura 4.10** muestra estos resultados para la isoforma A del IR. Sin embargo, también fue posible observar que existían diferentes comportamientos entre las células. En general, células con altos niveles de expresión del IR-B-A1x3 (situación puesta en evidencia por la marcación con CoA-atto488) muestran baja proporción de internalización. En cambio, aquellas células con niveles de expresión del IR-B-A1x3 menores (es decir, la marca de CoA-atto488 es baja) presentan mayor grado de endocitosis (comparar paneles **B** y **C** de la **Figura 4.10** y dentro del panel **B** comparar las distintas células).

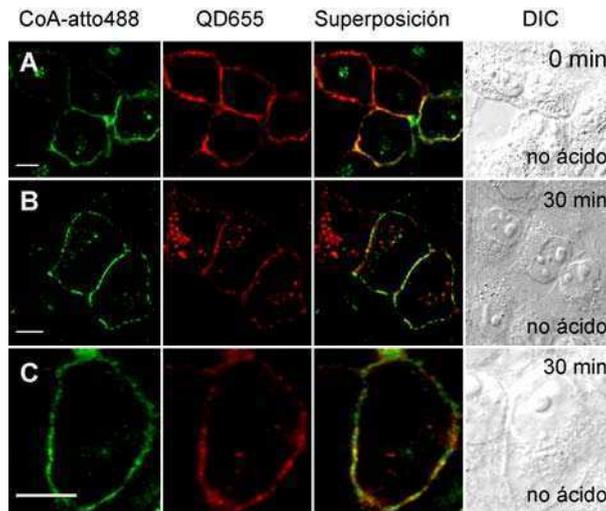


Figura 4.10. Efecto del IR-B-A1x3 en la internalización del IR-A. Células HeLa coexpresando el IR-B-A1x3 y el IR-A fueron marcadas con 2 μ M ACPwt-S y 2 μ M CoA-atto488 a TA durante 30 min, luego se incubaron con 50 nM BAC-Ins y posteriormente con 1 nM QD655. **A.** Las células se fijaron directamente en 3.7 % PFA. **B-C.** Las células se incubaron durante 30 min a 37 °C y luego se fijaron en 3.7 % PFA. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación atto488, 488 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión atto488, BP: 505-525 nm; emisión QD655, BP: 640-670 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 μ m.

Las imágenes para células coexpresando el IR-B-A1x3 y el IR-B se presentan en la **Figura 4.11** mostrando que también se produce la retención del IR-B en la membrana plasmática. La señal de QD655 luego de 30 min a 37 °C se mantiene mayormente en la membrana (panel **B**) y al tratar con ácido es baja (panel **C**)

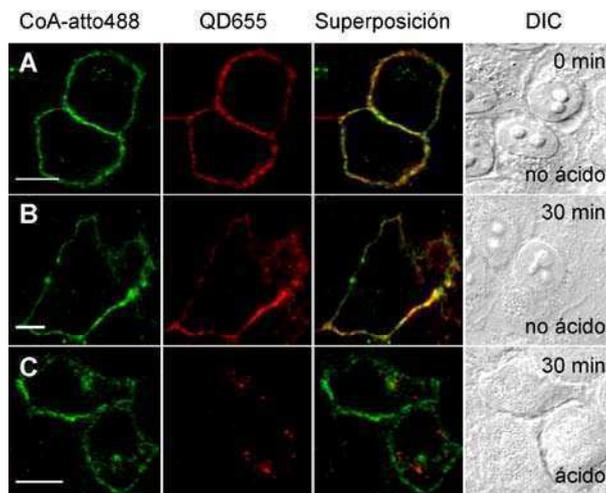


Figura 4.11. Efecto del IR-B-A1x3 en la internalización del IR-B. Células HeLa coexpresando el IR-B-A1x3 y el IR-B fueron marcadas con 2 μ M ACPwt-S y 2 μ M CoA-atto488 a TA durante 30 min, luego se incubaron con 50 nM BAC-Ins y posteriormente con 1 nM QD655. **A.** Las células se fijaron directamente en 3.7 % PFA. **B-C.** Las células se incubaron durante 30 min a 37 °C y luego se fijaron en 3.7 % PFA directamente (**B**) o bien primero se trataron con ácido durante 5 min (**C**). Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación atto488, 488 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión atto488, BP: 505-525 nm; emisión QD655, BP: 640-670 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 μ m.

La observación de que el grado de internalización disminuye en función de la señal de CoA-atto488 en la membrana (es decir, del nivel de expresión del IR-B-A1x3)

motivó realizar una cuantificación de estas observaciones. Se procedió de manera equivalente a lo descrito en el **Capítulo 2**: se midió la señal de atto488 y esto permitió dividir a las células analizadas en dos grupos, *alto* (atto488 > 1600 cts) y *bajo* (atto488 < 900 cts). Se cuantificó el grado de internalización para cada célula como QD_i/QD_t y estos resultados se presentan en la **Figura 4.12**.

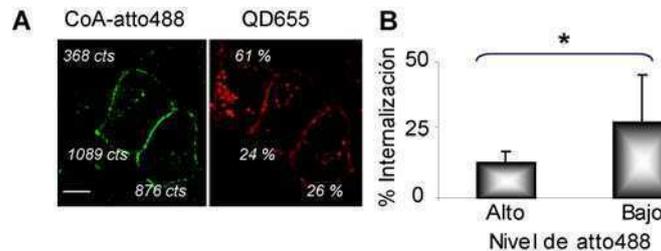


Figura 4.12. Efecto del nivel de expresión del IR-B-A1x3 en la internalización del IR salvaje.
A. Ejemplo de la cuantificación de los niveles de marcación con CoA-atto488 (en cts en el canal verde) y el porcentaje de internalización en el canal rojo para tres células. **B.** Cuantificación de los niveles de internalización en células coexpresando el IR-B-A1x3 y el IR-A luego de 30 min de incubación a 37 °C según los niveles medidos de fluorescencia en el canal verde correspondiente a CoA-atto488. Se clasificaron las células en alta marcación (atto488 > 1600 cts) y baja marcación (atto488 < 900 cts) y se cuantificó el grado de internalización creando una rutina en el Matlab. La misma permitió medir la señal de QD_i y los QD_m y calcular la relación entre QD_i y los QD_t como se explicó en **Materiales y métodos** y en el **Capítulo 2**. El asterisco muestra diferencias significativas ($p = 0.01$; $n = 8$ células de cada tipo).

Lo que se observó cualitativamente pudo confirmarse estadísticamente. En la **Figura 4.12.A** se muestran tres células coexpresando el IR-B-A1x3 y el IR-A con diferentes intensidades de señal de CoA-atto488 indicadas en el canal verde (panel izquierdo). En el panel derecho se indica el porcentaje de internalización calculado para cada una de ellas. Cuanto mayor es la expresión del IR-B-A1x3, menor es la internalización que tiene lugar. El análisis de 8 células de cada tipo se presenta en el gráfico de barras de la **Figura 4.12.B** mostrando que células con alta expresión del IR-B-A1x3 (grupo denominado *alto*) internalizan significativamente menor proporción de BAC-Ins-QD655 que células con bajos niveles de expresión del IR-B-A1x3 (grupo denominado *bajo*).

Finalmente, entonces, se tomaron células con similares niveles de expresión del IR-B-A1x3 (atto488 > 1600 cts) y se analizó el grado de internalización luego de 30 min a 37 °C cuando se expresa solamente el IR-B-A1x3, solamente el IR-B, el IR-B-A1x3 + IR-A y el IR-B-A1x3 + IR-B (barras grises, **Figura 4.13**). Las barras blancas muestran el porcentaje de internalización al inicio, es decir, sin haber incubado las células a 37 °C.

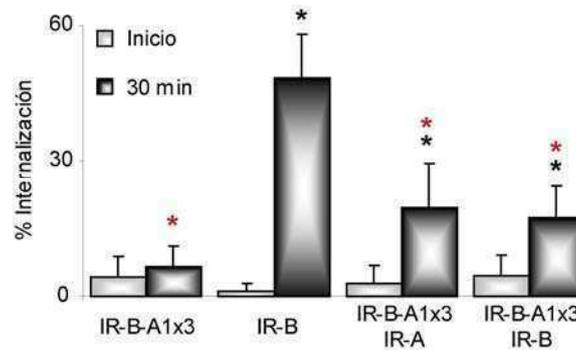


Figura 4.13. Cuantificación del efecto del IR-B-A1x3 sobre la internalización del IR-A y del IR-B. Cuantificación de los niveles de internalización presentado por células expresando el IR-B-A1x3 o el IR-B o bien coexpresando el IR-B-A1x3 con el IR-A o con el IR-B. Se cuantificaron las imágenes obtenidas por microscopía confocal creando una rutina en el Matlab como se describió en **Materiales y métodos** y en el **Capítulo 2**. Se midió así la señal de QD en el interior celular y en la membrana y se calculó así la relación QD_i/QD_e definiendo entonces el porcentaje de internalización en cada tipo de células tanto en el inicio como luego de 30 min de incubación a 37 °C. Los asteriscos negros muestran diferencias significativas ($p < 1.10^{-6}$) entre la internalización de las células cotransfectadas con el IR-B-A1x3 y cada isoforma del IR y las células expresando solamente el IR-B. Los asteriscos rojos muestran diferencias significativas ($p \leq 0.002$) entre las células cotransfectadas y las que solamente expresan el IR-B-A1x3. Se midieron entre 6 y 17 células para cada caso.

De esta forma se confirmó de modo cuantitativo lo observado cualitativamente: el IR-B-A1x3 no se internaliza ($7 \% \pm 6 \%$; $n = 6$), el IR-B se internaliza ($48 \% \pm 9 \%$; $n = 10$), y el IR-B-A1x3 retiene en membrana tanto al IR-A ($20 \% \pm 10 \%$; $n = 17$) como al IR-B ($17 \% \pm 7 \%$; $n = 10$).

4.2.6. La localización de Akt en membrana en respuesta a insulina es mayor para el IR-B

Con los resultados que se presentaron hasta aquí se puede concluir que: i) hay diferencias entre el IR-A y el IR-B en la activación de Akt en presencia del IR-B-A1x3; ii) la internalización diferencial es un evento importante en la señalización diferencial de las isoformas del IR (**Capítulo 2**); iii) el IR-B induce desde la membrana la cascada metabólica (por la vía de Akt) en mayor medida que el IR-A (**Capítulo 2**); iv) el IR-B-A1x3 retiene en la membrana tanto al IR-A como al IR-B.

Esto plantea la siguiente pregunta: ¿puede el IR-B reclutar a la membrana la maquinaria responsable de la señalización metabólica más que el IR-A? De este modo, el IR-B-A1x3 al retener al IR-B en la superficie celular permitiría el reclutamiento más persistente por parte del IR-B de las moléculas involucradas en esta vía. Por lo tanto, la cascada de Akt se vería mayormente activada, detectándose un aumento en la señal de fosforilación de Akt (**Figura 4.7.C**). En cambio, en el caso de la isoforma A el IR-B-A1x3 actuaría como un clásico dominante negativo disminuyendo gradualmente la señal al incrementar sus niveles de expresión (**Figura 4.7.B**). Esto sería así ya que esta isoforma tendría menor capacidad de reclutar estas moléculas a

la membrana. De hecho, se trata de la isoforma que gatilla más la vía mitogénica desde endosomas (**Capítulo 2**).

Se decidió entonces evaluar qué sucede con la localización de Akt en respuesta a insulina. Para esto se realizaron experimentos de inmunofluorescencia tanto con un anticuerpo contra Akt total como con uno contra Akt fosforilado en la serina 473 en células coexpresando Akt-HA y el IR-A o Akt-HA y el IR-B estimuladas o no con 100 nM rhIns durante 5 min. Las imágenes adquiridas por microscopía confocal permitieron cuantificar, creando una rutina en el Matlab, la señal de Akt presente en membrana (Akt_m) y en el interior celular (Akt_i) luego de segmentar cada célula en una región denominada *membrana* y otra denominada *interior* teniendo en cuenta para esto la señal de SCFP (ver **Materiales y métodos**). Cuando los experimentos se hicieron con el anticuerpo contra Akt fosforilado la relación p-Akt_m/p-Akt_i resultó significativamente mayor para las células expresando el IR-B-SCFP (0.19 ± 0.05 ; $n = 16$ células) que para células expresando el IR-A-SCFP (0.12 ± 0.05 ; $n = 21$ células; $p = 0.0002$) (**Figura 4.14**). Esto confirmó la hipótesis de que el IR-B genera que Akt fosforilado se localice más en la membrana plasmática que lo que sucede al sobreexpresar el IR-A.

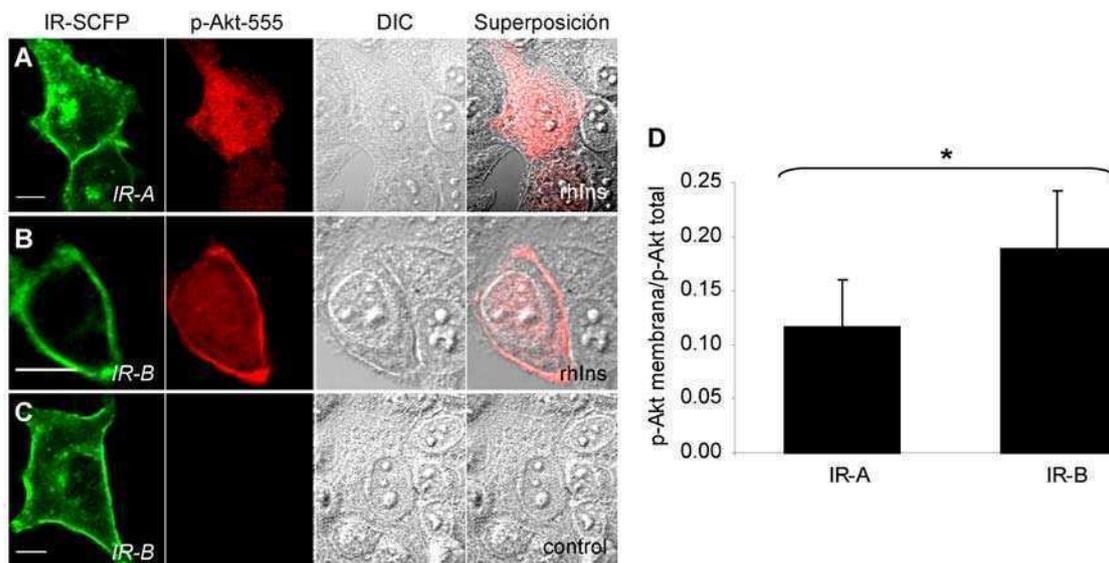


Figura 4.14. Cuantificación de la proporción de Akt fosforilado en la membrana plasmática en respuesta insulina para el IR-A y el IR-B. A-B. Células HeLa expresando el IR-A-SCFP o el IR-B-SCFP en conjunto con Akt-HA fueron deprivadas de SFB durante 16 h y luego estimuladas con 100 nM rhIns durante 5 min, se fijaron en metanol y se ensayaron por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra Akt fosforilado en serina 473 (Cell Signaling) y luego con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa flúor 555. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación SCFP, 405 nm; excitación Alexa flúor 555, 543 nm; emisión SCFP, BP: 480-495 nm; emisión Alexa flúor 555, BP: 560-620 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 μ m. C. Control de células no estimuladas ensayadas de igual forma que en A-B. D. Se cuantificó la señal roja en la membrana y en el total de la célula generando una rutina en el Matlab y se calculó el cociente entre ambas señales. El asterisco muestra diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.0002$; $n = 21$ células para la isoforma A y $n = 16$ células para la B).

Para confirmar que lo observado no era un artefacto el anticuerpo utilizado se realizaron experimentos similares pero utilizando un anticuerpo contra Akt total cuantificándose de igual modo la relación ahora Akt_m/Akt_t tanto en las células estimuladas con rhIns como en las células control sin estimular. Estos resultados presentados en la **Figura 4.15** mostraron que en las células no estimuladas no existen diferencias significativas entre las isoformas del IR (IR-A-SCFP: 0.09 ± 0.03; n = 17 células; IR-B-SCFP: 0.09 ± 0.02; n = 17 células). En las células estimuladas, en cambio, se observaron diferencias de modo coincidente con lo medido para p-Akt. Células expresando la isoforma B del IR muestran que en respuesta a insulina mayor proporción de Akt (0.18 ± 0.05; n = 28 células) se localiza en membrana que células expresando el IR-A (0.13 ± 0.05; n = 12 células; p = 0.02). Asimismo cada isoforma presenta diferencias significativas en Akt_m/Akt_t entre las células estimuladas y las no estimuladas (p = 0.02 para el IR-A-SCFP; p < 0.00001 para el IR-B-SCFP).

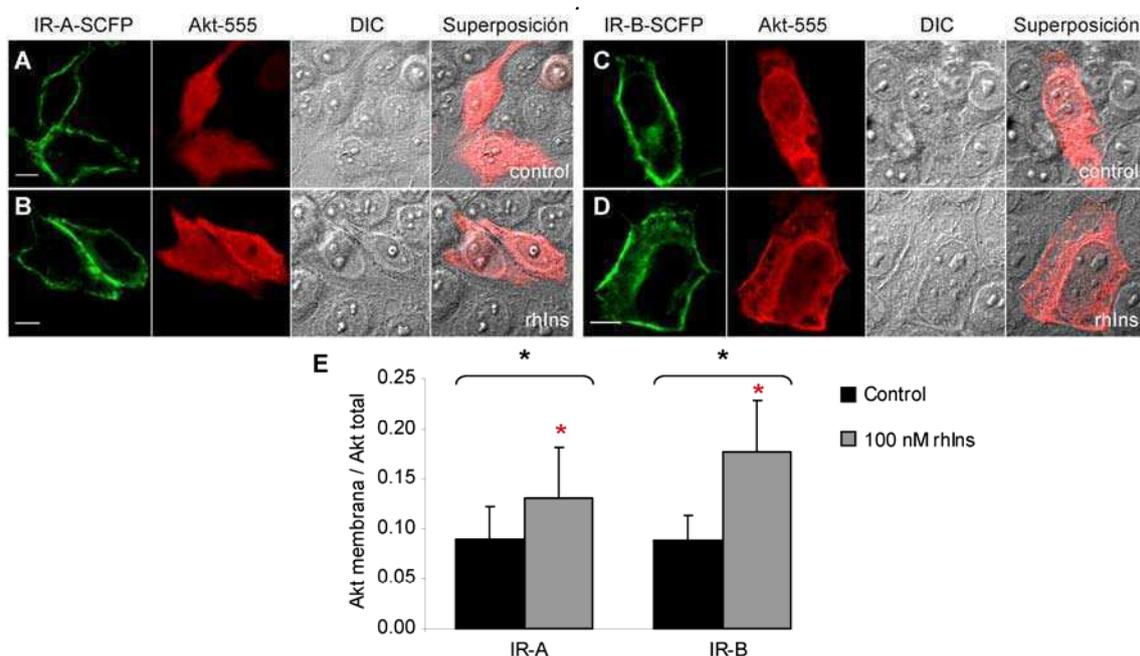


Figura 4.15. Cuantificación de la proporción de Akt en la membrana plasmática en respuesta insulina para el IR-A y el IR-B. A-D. Células HeLa expresando el IR-A-SCFP (A y B) o el IR-B-SCFP (C y D) en conjunto con Akt-HA fueron privadas de SFB durante 16 h y luego estimuladas (B y D) o no (A y C) con 100 nM rhIns durante 5 min, se fijaron en metanol y se ensayaron por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra Akt y luego con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa flúor 555. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación SCFP, 405 nm; excitación Alexa flúor 555, 543 nm; emisión SCFP, BP: 480-495 nm; emisión Alexa flúor 555, BP: 560-620 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 µm. E. Se cuantificó la señal roja en la membrana y en el total de la célula generando una rutina en el Matlab y se calculó el cociente entre ambas señales. Los asteriscos negros muestran diferencias estadísticamente significativas entre células estimuladas y células no estimuladas con rhIns (p = 0.02 para el IR-A; p < 0.00001 para el IR-B; n = 12-28 células). Los asteriscos rojos indican diferencias entre las dos isoformas del IR en la proporción de Akt en membrana luego de ser estimuladas con rhIns (p = 0.02).

Estos resultados permitieron confirmar que el IR-B recluta más a Akt a la membrana plasmática pudiendo entonces ser fosforilado. En primer lugar, esta

evidencia sugiere que la mayor activación de Akt inducida por insulina a través del IR-B (**Capítulo 2**) puede deberse en parte a una diferencia en su localización celular. En segundo lugar, dado que el IR-B es retenido en la membrana por el IR-B-A1x3, entonces podría ejercer este efecto de reclutamiento de modo más persistente y esto se traduce en una mayor activación de Akt al aumentar la expresión de esta mutante junto con el IR-B (**Figura 4.7.C**). Con la isoforma A del IR salvaje esto no sucede ya que este receptor posee menor capacidad de reclutar a la membrana moléculas de esta vía (en particular, Akt que es lo que se midió en este trabajo). Por lo tanto, para el IR-A el aumento de la expresión del IR-B-A1x3 se traduce en una disminución de la fosforilación de Akt (**Figura 4.7.B**).

4.2.7. Los receptores híbridos IR-A/IR-B en la membrana plasmática se forman pero no de manera aleatoria

Dado que las mutantes IR-B-A1x3 y IR-B-A1x3-GFP pueden ser modificadas extracelularmente de manera covalente, es posible marcar selectivamente sólo aquellos receptores presentes en la membrana. Esta herramienta permitió diseñar experimentos para estudiar los heterodímeros IR-A/IR-B en la membrana plasmática.

La segunda hipótesis planteada anteriormente proponía la formación diferencial de los heterodímeros IR-A/IR-B en la membrana y que estos señalicen diferente. Las posibilidades eran tres: i) los híbridos se forman estequiométrica y aleatoriamente como se asume mayoritariamente en la literatura (Kasuga et al., 1983; Olson *et al.*, 1988; Benyoucef *et al.*, 2007; Blanquart *et al.*, 2008); ii) que los híbridos no se forman y que las dos isoformas del IR se localizan en microdominios diferentes de la membrana plasmática pudiendo esto explicar la señalización distinta del IR-A y del IR-B (Leibiger *et al.*, 2001; Uhles *et al.*, 2003) o bien iii) que los híbridos se forman pero no de manera aleatoria.

Se llevaron adelante, entonces, experimentos en células transfectadas con el pcDNA3-IR-B-A1x3 o bien cotransfectadas con esta construcción y cada isoforma funcional fusionada a SCFP. La modificación covalente en la serina conservada del tag A1 con ACPwt-S y CoA-biotina permitió una posterior purificación de los receptores solamente presentes en la membrana (porque son los que podían ser modificados) con esferas de agarosa unidas a SA. Cuando se analizó el producto de la precipitación por Western blot se detectaron las bandas del IR-B-A1x3 (de aproximadamente 97 kDa) y del IR-SCFP correspondiente 25 kDa más pesada por la presencia de SCFP

(Figura 4.16.A). Este resultado permite concluir que los híbridos IR-A/IR-B-A1x3 e IR-B/IR-B-A1x3 se forman efectivamente en la membrana plasmática.

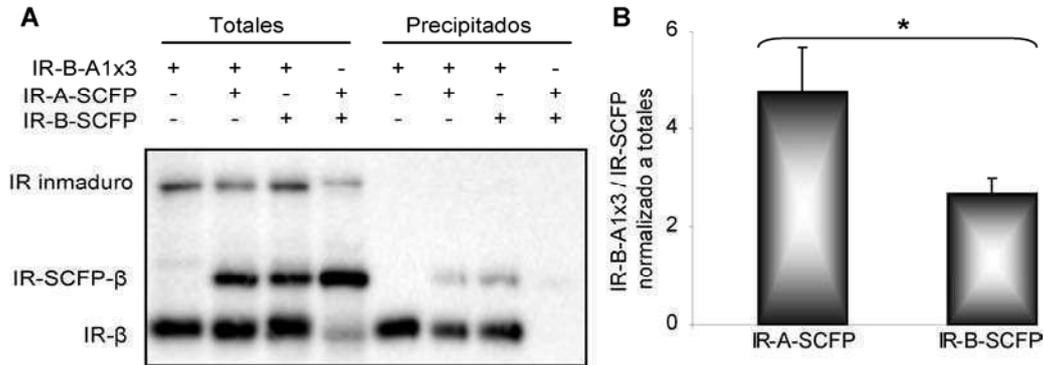


Figura 4.16. Receptores híbridos IR-A/IR-B en la membrana plasmática. A. Células HeLa expresando el IR-B-A1x3 solamente o coexpresando el IR-B-A1x3 y el IR-SCFP (A o B) o bien ambas isoformas del IR fusionadas a SCFP fueron tratadas con 2 μ M ACPwt-S y 5 μ M CoA-biotina durante 30 min a TA para modificar covalentemente la serina del tag A1 del IR-B-A1x3 localizado en la membrana. Los lisados fueron incubados con esferas de agarosa unidas a estreptavidina durante 1 h a 4 °C, los precipitados se lavaron y se analizaron por Western blot con un anticuerpo contra la subunidad β del IR junto con las alícuotas tomadas antes de precipitación (totales). B. Se cuantificó la relación de bandas correspondientes al IR-A1x3/IR-SCFP en los precipitados y esta relación se relativizó a la presente en los totales. El asterisco muestra diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.03$; $n = 3$ experimentos independientes).

El paso siguiente fue analizar si la dimerización del IR-B-A1x3 con el IR-A y con el IR-B es aleatoria y, por lo tanto, igualmente probable que la homodimerización. Para encarar esta pregunta se cuantificó por densitometría la relación entre las bandas del IR-B-A1x3 y del IR-SCFP (A o B) para las fracciones correspondientes a los precipitados y se la normalizó a aquella calculada para las fracciones totales. Los datos se muestran en la **Figura 4.16.B** y permiten ver que la misma es significativamente mayor para la isoforma A que para la B ($p = 0.03$). Este resultado estaría indicando que la formación de los híbridos IR-B/IR-B-A1x3 estaría más favorecida que la de los IR-A/IR-B-A1x3.

Si la formación de los dímeros fuera azarosa, por lo tanto estequiométrica, y fuera equivalente la cantidad de moléculas de un IR-SCFP y del IR-B-A1x3 esta relación debería ser cercana a 2 dado que se pueden formar: IR-SCFP/IR-B-A1x3 (con el doble de probabilidad); IR-SCFP/IR-SCFP o bien IR-B-A1x3/IR-B-A1x3. Por lo tanto, la cantidad de IR-B-A1x3 presente en el precipitado debería ser el doble de la del IR-SCFP. Dado que nunca se logran los mismo niveles de expresión aunque se transfecte con cantidades equivalentes de ADN, se normalizó a la relación de bandas calculada en la fracción total que, en definitiva, es indicativa de las cantidades relativas de cada IR.

Para analizar los resultados con conceptos de probabilidad y estadística, se calculó cómo debería ser la relación de bandas en los precipitados (denotada a partir de ahora como $r_{\text{teórico}}$) en función de la relación de bandas en las fracciones totales (R) si se supone que la formación de dímeros ocurre de manera aleatoria. Finalmente, se calculó el cociente entre la relación esperada ($r_{\text{teórico}}$) y la relación experimental ($r_{\text{experimental}}$).

La relación R dada por la abundancia relativa del IR-B-A1x3 (a) y del IR-SCFP en estudio (b) estará dada por la **ecuación 4.1**.

$$R = \frac{a}{b} \quad \text{[ec. 4.1]}$$

Una probabilidad (P) se escribe como el cociente entre los eventos considerados positivos y los eventos totales de la muestra (en este caso, a + b). Cuando se trata de dos eventos independientes la probabilidad de que ocurran es el producto de la probabilidad de que ocurra cada uno.

Esto permite escribir en función de R la probabilidad de que se forme un heterodímero IR-SCFP/IR-B-A1x3 (P_1) o un homodímero IR-B-A1x3/IR-B-A1x3 (P_2) a través de las **ecuaciones 4.2 y 4.3**.

$$P_1 = 2 \cdot P(\text{IR-SCFP}) \cdot P(\text{IR-B-A1x3}) = \frac{2 \cdot R}{(1+R)^2} \quad \text{[ec. 4.2]}$$

$$P_2 = (P(\text{IR-B-A1x3}))^2 = \frac{R^2}{(1+R)^2} \quad \text{[ec. 4.3]}$$

Por cada molécula de heterodímero IR-SCFP/IR-B-A1x3 se obtendrían, al romper los puentes disulfuro, una molécula de IR-SCFP y una molécula de IR-B-A1x3. En cambio, por cada molécula de homodímero IR-B-A1x3/IR-B-A1x3 se obtendrían dos moléculas de IR-B-A1x3 y ninguna de IR-SCFP. Por lo tanto, puede escribirse la abundancia de cada tipo de banda en función de R en el precipitado según las **ecuaciones 4.4 y 4.5**.

$$\text{IR-B-A1x3} = 1 \cdot P_1 + 2 \cdot P_2 = 1 \cdot \frac{2 \cdot R}{(1+R)^2} + 2 \cdot \frac{R^2}{(1+R)^2} \quad \text{[ec. 4.4]}$$

$$\text{IR-SCFP} = 1 \cdot P_1 = \frac{2 \cdot R}{(1+R)^2} \quad \text{[ec. 4.5]}$$

De este modo, si la formación de dímeros fuera aleatoria, la relación de bandas esperadas, $r_{teórico}$, sería la dada por la **ecuación 4.6**, es decir sencillamente $R+1$.

$$r_{teórico} = \frac{IR-B-A1x3}{IR-SCFP} = R+1 \quad [\text{ec. 4.6}]$$

Se analizó esta relación para 4 experimentos de *pull down* independientes. La **Tabla 4.2** presenta para cada uno y para cada IR-SCFP el valor de R calculado densitométricamente de las fracciones totales de los Western blots, la P_1 y la P_2 calculadas en base a las **ecuaciones 4.2 y 4.3**, las abundancias esperadas en el *pull down* de cada banda (del IR-B-A1x3 según la **ecuación 4.4** y del IR-SCFP según la **ecuación 4.5**) y el cociente entre ellas, $r_{teórico}$. Además se muestra la relación experimental de bandas en el precipitado ($r_{experimental}$) y finalmente el cociente entre el $r_{teórico}$ y el $r_{experimental}$.

Experimento	1		2		3		4	
	A	B	A	B	A	B	A	B
R (totales)	1.30	1.39	0.60	0.90	0.96	0.95	1.02	1.01
P_1	0.49	0.49	0.47	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
P_2	0.32	0.34	0.14	0.22	0.24	0.24	0.25	0.25
IR-B-A1x3 (banda)	1.13	1.16	0.75	0.95	0.98	0.97	1.01	1.01
IR-SCFP (banda)	0.49	0.49	0.47	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
$r_{teórico}$	2.30	2.39	1.60	1.90	1.96	1.95	2.02	2.01
$r_{experimental}$	5.5	3.9	2.6	2.3	5.6	2.0	4.8	2.4
$r_{experimental}/r_{teórico}$	2.4	1.6	1.6	1.2	2.8	1.0	2.4	1.2

Tabla 4.2. Análisis probabilístico de las bandas esperadas en los experimentos de *pull down*. Se consideraron 4 experimentos independientes de *pull down* en los que se cuantificó la relación entre las bandas correspondientes al IR-B-A1x3 y al IR-SCFP en las fracciones totales por densitometría de los Western blots (R). Suponiendo que la formación de dímeros es aleatoria con estos valores se calcularon P_1 , P_2 , la abundancia relativa del IR-B-A1x3 y del IR-SCFP esperada en un precipitado y el $r_{teórico}$ según las **ecuaciones 4.2 a 4.6**. Finalmente, con el dato del $r_{experimental}$ obtenido por densitometría de las fracciones correspondientes a los precipitados se calculó el cociente entre el $r_{experimental}$ y el $r_{teórico}$.

Resultó evidente que, mientras para el IR-B-SCFP el cociente entre el $r_{experimental}$ y el $r_{teórico}$ resultó cercano a 1 (1.3 ± 0.2), para la isoforma A se obtenían valores superiores (2.3 ± 0.5) (**Figura 4.17**) y estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p = 0.02$). De esta manera es posible concluir que, mientras los dímeros IR-B-SCFP/IR-B-A1x3 se formarían aleatoriamente (lo cual es lógico ya que se trata

de la misma isoforma), los heterodímeros IR-A-SCFP/IR-B-A1x3 se formarían con menor probabilidad.

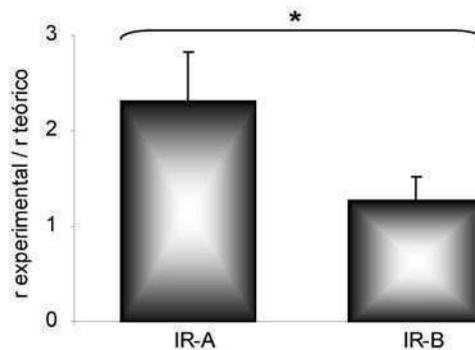


Figura 4.17. Análisis probabilístico de la formación de los híbridos en la membrana plasmática. Se cuantificó la relación entre las bandas correspondientes al IR-B-A1x3 y al IR-SCFP en las fracciones totales por densitometría de los Western blots provenientes de los experimentos de pull down (R). Suponiendo que la formación de dímeros es aleatoria con estos valores se calculó el $r_{teórico}$ según la **ecuación 4.6** y con el dato del $r_{experimental}$ obtenido por densitometría de las fracciones correspondientes a los precipitados se calculó el cociente entre el $r_{experimental}$ y el $r_{teórico}$ para cada una de las isoformas del IR-SCFP sobreexpresado en el experimento (A o B). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.02$; $n = 4$ experimentos independientes).

Cuando los experimentos de pull down se realizaron estimulando o no con 100 nM rhIns durante 5 min no fue posible detectar fosforilación del IR en los precipitados, mientras sí se evidenció en las fracciones totales (**Figura 4.18**). Esto conduce a la conclusión de que la presencia del IR-B-A1x3 generaría que los híbridos formados (en la membrana que son los detectados en los precipitados) no se fosforilen.

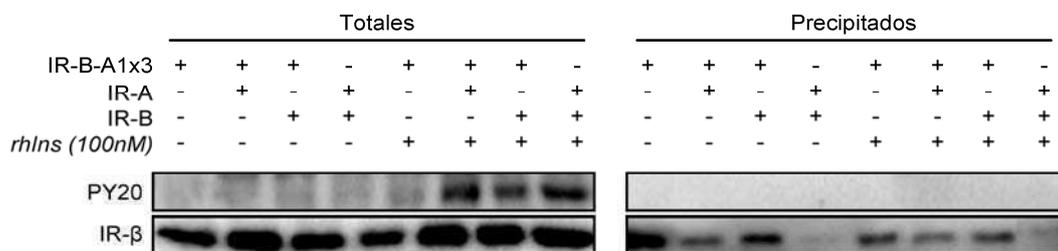


Figura 4.18. Análisis de la fosforilación de los híbridos con el IR-B-A1x3. Experimento similar al mostrado en la **Figura 4.16** pero las células se transfectaron con los pcDNA3-IR (A y B) salvajes en lugar de con los que tienen el IR-SCFP. Luego de la modificación con CoA-biotina y ACPwt-S las células se estimularon (+) o no (-) con 100 nM rhIns durante 5 min a 37 °C en DMEM. Posteriormente se continuó el experimento de la misma manera que lo descrito en la **Figura 4.16** y el Western blot se reveló con un anticuerpo contra tirosinas fosforiladas (PY20) y luego con uno contra la subunidad β del IR.

4.3. DISCUSIÓN

En esta parte de la tesis se caracterizó funcionalmente la mutante IR-B-A1x3. Se trata de una quimera del IR-B que es capaz de localizarse en la membrana plasmática y unir insulina. Dado que se insertó el tag A1 dentro del dominio FnIII-1 extracelular fue posible modificarlo covalentemente tanto con fluoróforos pequeños (mucho más pequeños que una VFP) o bien con biotina. Hasta el momento no existen

anticuerpos que puedan distinguir una isoforma del IR de la otra. Numerosos trabajos utilizan quimeras del IR fusionadas a diferentes VFP en sus extremos C-terminales citoplasmáticos (Leibiger *et al.*, 2001; Uhles *et al.*, 2003; Benyoucef *et al.*, 2007; Blanquart *et al.*, 2008, entre otros). Esta estrategia es sumamente útil pero no permite distinguir, en ensayos sobre lisados celulares, el receptor presente en membrana del que está siendo procesado. Asimismo, cuando se trata de experimentos de microscopía, no es posible diferenciar el receptor que ya fue internalizado del que está siendo procesado. El IR-B-A1x3 y el IR-B-A1x3-GFP permiten obtener el receptor marcado desde el lado extracelular o bien modificado con biotina para poder purificar exclusivamente la proteína presente en membrana.

A continuación se demostró que tanto el IR-B-A1x3 como el IR-B-A1x3-GFP unen insulina, no se autofosforilan ni se internalizan. Este resultado condujo a la hipótesis de que se trataba de dominantes negativos para el IR. Por lo tanto, la caracterización continuó mostrando la dominancia negativa en un evento río abajo de la cascada de señalización del IR. El factor de transcripción AP-1, como se describió anteriormente, responde rápida y transientemente a una gran variedad de estímulos externos (Angel y Karin, 1991; Karin *et al.*, 1997), entre ellos los factores de crecimiento y la insulina. Una gran variedad de genes poseen sitios de unión para esta proteína en sus regiones promotoras y el control temporal de la activación de AP-1 regula procesos celulares como el crecimiento y la proliferación (Shaulian y Karin, 2001 y 2002). Por este motivo se evaluó la inducción de AP-1 por insulina cuando el IR-B-A1x3 se encuentra presente. Si el mismo es un dominante negativo del IR en la vía mitogénica debería disminuir esta respuesta. Efectivamente, se demostró que el IR-B-A1x3 disminuye la inducción de AP-1 tanto a través del IR-A como del IR-B en células HeLa sobreexpresando cada isoforma. Asimismo, es capaz de apagar esta respuesta inducida por el IR que las células HEK 293 expresan endógenamente. Estas características permitieron utilizarlo para estudiar el comportamiento de cada isoforma del IR coexpresada con esta mutante en diversas etapas de la cascada de señalización evaluando similitudes y diferencias.

Cuando se coexpresa esta quimera junto con receptores totalmente funcionales se afecta de manera diferente la actividad río abajo del IR-A y del IR-B. En primer lugar, la autofosforilación del IR disminuye al incrementar la cantidad de IR-B-A1x3 expresada en el caso de la isoforma A del IR pero no se ve afectada para el IR-B. Esto motivó analizar un evento río abajo en la cascada metabólica, la fosforilación de Akt. La activación de Akt disminuye también para el IR-A al aumentar la cantidad de IR-B-

A1x3. En cambio, en células sobreexpresando el IR-B la fosforilación de Akt aumenta al incrementarse la cantidad de dominante negativo coexpresado. Por lo tanto, el IR-B-A1x3 actúa como dominante negativo de la señalización mitogénica de ambos receptores (experimentos de inducción de AP-1). Sin embargo, en la primera etapa de la cascada (autofosforilación del receptor) y en la señalización metabólica (Akt) la situación es diferente.

Esto estaría reflejando algún efecto del IR-B-A1x3 sobre la localización de los IR fosforilados. Se sabe que la localización subcelular de los receptores modula su señalización en el caso del IR (Sorkin *et al.*, 1993; Bergeron *et al.*, 1995; Grimes *et al.*, 1996; Di Guglielmo *et al.*, 1994; Pol *et al.*, 1998; Rizzo *et al.*, 2000; Sorkin *et al.*, 2000), del EGFR (Di Guglielmo *et al.*, 1994; Vieira *et al.*, 1996), y del receptor del factor α de necrosis tumoral (Wiegmann *et al.*, 1994). Desde los endosomas los receptores activos son capaces de señalar vías distintas que las que activan desde la membrana dado que pueden interactuar con moléculas efectoras diferentes. Los resultados presentados en el **Capítulo 2** apoyan este modelo y los obtenidos en esta parte de la tesis los confirman.

Los experimentos de internalización mostraron que esta quimera bloquea la endocitosis de ambas isoformas del IR, reteniéndolas en la membrana plasmática. La retención en la membrana por parte del dominante negativo sería responsable entonces de que el IR-B permanezca más tiempo en la membrana señalizando hacia la vía de Akt. Esto confirmaría que la señalización a través de Akt requiere la permanencia del receptor en la membrana, una de las hipótesis propuestas en el **Capítulo 2**. Esta hipótesis es consistente con trabajos que muestran que los dominios ricos en caveolina en la membrana plasmática son importantes para la señalización de la vía de Akt pero no tienen efecto sobre la vía de ERK 1/2 (Parpal *et al.*, 2001). Esto además apoya el modelo que sostiene que la vía metabólica es señalizada desde la membrana predominantemente, mientras que la mitogénica es gatillada desde endosomas donde el IR puede permanecer activo y unido a insulina.

Por otro lado, el patrón de fosforilación de estos receptores regula la internalización del receptor y la divergencia en la señalización de la vía metabólica y la mitogénica. Al menos siete residuos de tirosina han sido descritos como fosforilables en respuesta a insulina (Youngren, 2007). Dos de estas tirosinas (Tyr965 y Tyr972; la numeración corresponde a la secuencia aminoacídica del IR-B) se encuentran en la porción yuxtamembrana y están involucradas en la selección de los sustratos. Estas

tirosinas se sabe son fosforiladas en *cis*, es decir, por la actividad de fosfotransferasa de la misma subunidad β del IR (Cann y Kohanski, 1997).

Otras dos tirosinas (Tyr1328 y Tyr1334) que están ubicadas cerca del extremo C-terminal no poseen un papel de importancia en la activación del dominio TK ni en la internalización. Sin embargo, se ha demostrado que tanto cuando se delecionan los 43 aminoácidos terminales del dominio CT como cuando son mutadas estas tirosinas a fenilalanina o arginina la señalización metabólica del IR no se ve afectada pero la mitogénica es incrementada. Se hipotetiza entonces, que el CT tendría un papel inhibitorio de la vía mitogénica por impedimento estérico. Cuando no se encuentra fosforilada esta región impediría el acceso de moléculas que son sustratos de la cascada mitogénica a la región catalítica. En cambio, al fosforilarse este impedimento desaparecería desencadenando la señalización (Takata *et al.*, 1991, Ando *et al.*, 1992). Esta hipótesis se apoya además en el hecho de que en la secuencia del IGF-IR la Tyr1328 se encuentra conservada, sin embargo, la posición equivalente a la Tyr1334 se encuentra ocupada por una fenilalanina. Esto sugiere que esta región en el IGF-IR deja libre el acceso a las moléculas efectoras de la vía mitogénica.

Finalmente, los tres residuos de tirosinas fosforilables restantes (Tyr1158, Tyr1162 y Tyr1163) se localizan en la región de activación y regulación del dominio quinasa. Estos residuos son fosforilados en *trans* (Frattali y Pessin, 1993; Cann y Kohanski, 1997) y son los primeros en fosforilarse luego de la unión de la insulina (White *et al.*, 1988 b). La fosforilación de estas tirosinas activa la fosfotransferasa de la subunidad β que cataliza la fosforilación de los otros residuos tirosina (White *et al.*, 1988 b). Cuando se bloquea la fosforilación de estos residuos, no se fosforila el resto y se pierde la actividad quinasa. Asimismo, estos residuos se encuentran involucrados en la internalización del receptor. La mutación de cada uno por separado produce un descenso considerable de la internalización, si bien estas mutantes son capaces de señalizar. Varios trabajos muestran que la tri-fosforilación es esencial para la completa activación de la quinasa y la internalización del receptor pero no para la señalización metabólica y mitogénica. No es absolutamente claro el papel de cada uno de los residuos individualmente en las vías de señalización divergentes, sin embargo, las mayores diferencias se han observado al mutar la Tyr1158 (Wilden *et al.*, 1990). Se postula que las diferencias entre las respuestas mitogénica y metabólicas serían dependientes del grado de activación de la quinasa (Wilden *et al.*, 1992).

Otra aproximación experimental en este punto es la evaluación de la respuesta celular inducida por péptidos análogos a la insulina. Concordante con los datos

provenientes de los estudios con mutantes del IR ha sido la respuesta de un péptido denominado S597 (Jensen *et al.*, 2007). Este análogo se disocia del IR más lentamente que la insulina y permanece más tiempo en la membrana. En general, los trabajos han demostrado que ligandos que se disocian más lentamente producen un aumento de la señalización mitogénica con respecto a la metabólica y a la inversa (Hansen *et al.*, 1996). El péptido S597, en cambio, mostró menor capacidad de fosforilar al IR en general y en particular en la Tyr1158. Cuando el IR se activa, fosforila a diversos sustratos intracelulares, entre ellos IRS-1, IRS-2 y Shc, desencadenando las dos cascadas de señalización principales: la vía de las MAPK conduciendo a la transcripción génica, la síntesis de proteínas y el crecimiento celular; y la vía de PI3K que incluye la activación de Akt, la síntesis de glucógeno y otras enzimas necesarias para los efectos metabólicos de la insulina (White, 1997). El péptido S597 es capaz de inducir la fosforilación del 41-59 % del IRS1 y del IRS2 en comparación con la insulina y activar completamente a Akt. Sin embargo, la activación de Shc y ERK 1/2 es considerablemente menor que la desencadenada por la insulina. Nuevamente, esto muestra que a través de un mismo receptor dos ligandos están desencadenando respuestas diferentes sugiriendo que su activación e internalización son eventos claves en la divergencia de las vías de señalización. Diversos trabajos han mostrado efectos en la vía mitogénica al inhibir la internalización del IR por reducción de la temperatura (Biener *et al.*, 1996), por mutación del receptor (Hammer *et al.*, 2002) o por expresión de una dominante de la dinamina que interfiere en la endocitosis (Ceresa *et al.*, 1998). Asimismo, la inhibición de la internalización del IGF-IR también mostró inhibición de la fosforilación de Shc (Chow *et al.*, 1998). Todos estos estudios en conjunto apoyan el concepto de que la internalización del IR (y del IGF-IR) es requisito para la fosforilación y activación de la vía de Shc/MAPK pero no para la fosforilación del IRS-1 y de Akt, sugiriendo que estas moléculas pueden ser activadas completamente por el IR desde la membrana.

Toda esta evidencia afirma el modelo de la dominancia negativa de la mutante IR-B-A1x3. Esta mutante no muestra capacidad de fosforilarse en respuesta a insulina y esto se traduce entonces en que no se internaliza. Cuando se coexpresa con los receptores funcionales se observa que su presencia los retiene en la membrana. Esto sugiere que la autofosforilación en *trans* no se produce y que por lo tanto los dímeros formados entre los IR funcionales y el IR-B-A1x3 permanecen más tiempo en membrana. Sin embargo, la activación de la vía metabólica no requiere la activación completa de la quinasa del IR. Esto explica que cuando se coexpresa el IR-B con el IR-B-A1x3 la activación de Akt se incrementa ya que esta mutante, por un lado, retiene

al IR en la membrana permitiéndole una mayor señalización y, por el otro, evita la activación completa de la quinasa. Para el IR-A el efecto es distinto ya que como se mostró en el **Capítulo 2** esta isoforma presenta menor capacidad de activar a Akt posiblemente porque posee menor capacidad de reclutarla a la membrana como se mostró en este capítulo. Por otro lado, la formación de híbridos IR-A/IR-B no está favorecida como se vio con los ensayos de *pull down*. Esto supone que en esta situación, los receptores funcionales IR-A/IR-A serían minoritarios y los mayoritarios serían los mutantes IR-B-A1x3/IR-B-A1x3. En cambio, cuando el receptor funcional es el IR-B, los dímeros IR-B/IR-B-A1x3 se formarían de manera aleatoria, podrían ser fosforilados en *trans* y desde la membrana señalarían junto con los IR-B/IR-B.

Al inhibirse la internalización lo que estaría diferenciando la señalización de los IR es la capacidad de reclutar moléculas efectoras de la vía metabólica a la membrana. La activación de Akt se inicia con su translocación a membrana (Vivanco y Sawyers, 2002). Una vez que esto sucede Akt puede ser fosforilada en su treonina 308 por PDK o en la serina 473 por mTORC2. Los estudios de la localización subcelular de Akt y p-Akt en respuesta a insulina presentados en este capítulo demostraron que en células sobreexpresando el IR-B al ser estimuladas con insulina Akt (Akt total o Akt fosforilado) se localiza en la membrana plasmática en mayor proporción que cuando se trata de células expresando el IR-A. Esto permite sostener que el IR-B recluta en mayor grado moléculas de esta vía a la membrana y cuando su permanencia en la superficie celular se prolonga, la señalización de Akt se incrementa.

A diferencia de la señalización metabólica, la vía mitogénica requiere una activación de la quinasa más completa y la internalización del receptor. El IR-B-A1x3 actúa como un dominante negativo de ambas isoformas del IR ya que, por un lado, genera que la autofosforilación en *trans* de los dímeros formados no se produzca. Como se describió, la literatura muestra que la fosforilación de estos residuos desencadena la fosforilación de los restantes y conduce así a la activación de la quinasa. A diferencia de las respuestas metabólicas a través de la vía PI3K/Akt que pueden gatillarse con una activación parcial de la quinasa, la vía mitogénica Shc/MAPK necesita una activación de la quinasa más completa. Por lo tanto, la presencia del IR-B-A1x3 muestra un efecto considerable en esta vía al coexpresarse tanto con el IR-A como con el IR-B. Asimismo, al interferir en la internalización también esto disminuye la inducción de esta vía de señalización. Estos dos aspectos se encuentran relacionados ya que la fosforilación de la región regulatoria en *trans* (que es la primera en ocurrir) es necesaria para la internalización. Por lo tanto, no es

posible concluir con los datos expuestos cuál de los dos fenómenos es responsable del apagado de la señal mitogénica.

La segunda hipótesis que se formuló a partir de los resultados obtenidos al coexpresa los IR salvajes con el IR-B-A1x3 es que los dímeros IR-A/IR-B-A1x3 (isoformas diferentes) e IR-B/IR-B-A1x3 (iguales isoformas) no se forman de la misma manera o no poseen propiedades similares. La formación de dímeros como ya se presentó es controversial en la literatura. El grupo de Leibiger sostiene que las isoformas del IR se localizarían en microdominios diferentes de la membrana plasmática (Leibiger *et al.*, 2001; Uhles *et al.*, 2003). Esto sería responsable de su señalización diferencial ya que al estar localizados en microdominios distintos tendrían acceso a moléculas efectoras diferentes. Sin embargo, toda la literatura desde el descubrimiento de las dos isoformas en 1985 (Ebina *et al.*, 1985; Ullrich *et al.*, 1985) asume que los dímeros existen sosteniendo que la dimerización de pro-receptores y la formación de puentes disulfuro son eventos inmediatamente post-traduccionales en el RE (Olson *et al.*, 1988). Por lo tanto, si una segregación de isoformas existe para prevenir la heterodimerización debe ocurrir en este compartimento. Varios autores (Benyoucef *et al.*, 2007) afirman que actualmente no existen pruebas de que esto ocurra ni hay evidencias de intercambio de puentes disulfuro en etapas posteriores a la maduración y al tráfico del receptor. Por lo tanto, concluyen que si los mecanismos que previenen la heterodimerización de las isoformas del IR y que las localizan en regiones diferentes de la membrana plasmática existen estos deben ser específicos de ciertos tipos celulares como las células β (Leibiger *et al.*, 2001; Uhles *et al.*, 2003).

Para abordar esta cuestión y evaluar la hipótesis formulada, se estudió la existencia en la membrana de los dímeros IR-A/IR-B-A1x3 (isoformas diferentes) e IR-B/IR-B-A1x3 (iguales isoformas). Se pudo demostrar que se forman tanto con el IR-A como con el IR-B por experimentos de *pull down* que permitieron monitorear solamente la proteína presente en la superficie celular. Luego se estudió con esta aproximación el tema controversial acerca de si la formación es aleatoria o no. Este análisis muestra que, mientras para el IR-B la dimerización con el IR-B-A1x3 sería una formación azarosa (lo cual era esperable ya que se trata de dímeros de la misma isoforma), no lo sería para el IR-A. Algo estaría segregando de manera diferencial a las moléculas de IR, y probablemente el segmento de 12 aminoácidos codificado por el exón 11 podría estar involucrado dado que es la única diferencia entre las isoformas.

CAPÍTULO 5

Endocitosis y señalización diferencial del IGF-II a través del IR

5. Endocitosis y señalización diferencial del IGF-II a través del IR

5.1. INTRODUCCIÓN

El IGF-I y el IGF-II se secretan como propéptidos adquiriendo su forma madura luego de un clivaje proteolítico. Si bien sus funciones biológicas son similares, el IGF-I se expresa durante el crecimiento y se sintetiza en el hígado, mientras que el IGF-II se expresa predominantemente en las etapas fetales en mamíferos. El IGF-I se une a su receptor (presente en la mayoría de las células) y estimula el crecimiento y la proliferación celular, siendo además un inhibidor de la apoptosis. También regula el desarrollo y diferenciación de distintos tipos celulares (particularmente las neuronas) y estimula la síntesis de ADN. Mientras el IGF-II es responsable del crecimiento en las primeras etapas del desarrollo embrionario, el IGF-I juega un papel clave en la regulación del crecimiento máximo alcanzado. Evidencia de esto es el hallazgo relativamente reciente de que la gran variabilidad de tamaños en perros (la mayor en vertebrados terrestres) se debe a polimorfismos en este único gen (Sutter *et al.*, 2007).

El IGF-IR comparte más de 50 % de identidad de secuencia de aminoácidos totales y un 60-85 % en el dominio quinasa con el IR así como una estrecha relación de estructura (Whittaker *et al.*, 2001; Ullrich *et al.*, 1986). El IR y el IGF-IR presentan una estructura proteica modular conservada (Ullrich *et al.*, 1986; De Meyts, 2004). Ambos receptores unen insulina e IGF pero el IGF-IR tiene mayor afinidad por el IGF-I y el IR tiene mayor afinidad por la insulina. Por esto la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina están mediados por el IR y los estimuladores de crecimiento por el IGF-IR (Chan y Steiner, 2000).

La mayoría de las células de mamíferos expresan tanto el IR como el IGF-IR pero en diferentes niveles (Papa *et al.*, 1993; Pandini *et al.*, 1999; Vella *et al.*, 2001). Cuando ambos receptores se expresan, los pro-receptores pueden heterodimerizar en el Golgi dando origen a receptores híbridos IR/IGF-IR (Kasuga *et al.*, 1983; Soos *et al.*, 1989, 1990 y 1993; Yamaguchi *et al.*, 1993) que serían responsables de la respuesta celular a IGF-I, IGF-II e insulina. Se sugiere que estos receptores híbridos participan de la resistencia a la insulina en la DMT2 disminuyendo el número de sitios de unión a

esta hormona. A su vez, una alta fracción de receptores híbridos aumentaría los sitios de unión a IGF-I e IGF-II participando en la señalización de estos factores de crecimiento en procesos tumorales de tipo proliferativos (Pandini *et al.*, 1999; Benyoucef *et al.*, 2007).

Dado que altos niveles de expresión de estos híbridos están asociados a diversos tipos de cáncer, resulta de interés determinar diferencias entre las distintas isoformas del IR respecto a la unión de diversos ligandos y su señalización. Varios estudios han determinado que en tejidos embrionarios el IR-A promueve el crecimiento celular debido a su afinidad por insulina y por IGF-II. En cambio, en tejidos adultos, el IR-B es el que se expresa de modo predominante presentando baja afinidad por el IGF-II (Pandini *et al.*, 1999; 2002; Benyoucef *et al.*, 2007). La inclusión del exón 11 del IR está regulada hormonalmente y durante el desarrollo, encontrándose alterada en gran variedad de enfermedades (DMT2, distrofia miotónica, envejecimiento y cáncer). Por lo tanto, la desregulación del *splicing* alternativo del IR tiene importantes consecuencias en la sensibilidad y respuesta celular a insulina y a IGF-II (Mosthaf *et al.*, 1991 y 1998; Kellerer *et al.*, 1993; Savkur *et al.*, 2001).

La afinidad del IR-A y del IR-B por diversos ligandos ha sido estudiada por distintos grupos, en algunos casos con resultados opuestos. La **Tabla 5.1** presenta solamente algunos datos publicados mostrando las diferencias en la afinidad de los receptores por diversos ligandos, la aproximación experimental utilizada para su estudio, el tipo celular analizado y la diversidad de resultados obtenidos.

Actualmente existe consenso entre algunos grupos de investigación que afirman en que el IR-A une insulina con mayor afinidad que el IR-B (Mosthaf *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1991, 1993; Pandini *et al.*, 2002; Benyoucef *et al.*, 2007). Sin embargo, la relevancia fisiológica de esta diferencia no es clara, especulándose que la predominancia de una isoforma de menor afinidad (IR-B) en el hígado debería compensar la relativamente alta concentración portal de insulina a la cual el órgano está expuesto (Mosthaf *et al.*, 1990). Asimismo, se demostró que el IGF-II se une al IR-A con una afinidad similar a la insulina pero esto no sucede con el IR-B, mientras que la afinidad del IGF-I es similar para ambas isoformas (Mosthaf *et al.*, 1991; Frasca *et al.*, 1999; Pandini *et al.*, 2002; Benyoucef *et al.*, 2007). Si bien esta es la hipótesis más aceptada, resultados opuestos fueron reportados en células 3T3 de ratón utilizando una ablación del gen *Igf1r* (Denley *et al.*, 2004).

Receptor	IC ₅₀ (nM)			Aproximación experimental	Referencia
	Ins	IGF-I	IGF-II		
IR-A/IR-A	0.9	41	ND	Células CHO intactas o receptores purificados. Ensayos de unión con insulina radiactiva (¹²⁵ I-insulina)	Yamaguchi et al., 1993
	0.9	> 30	2.5	Células NIH-3T3 y CHO transfectadas. Ensayos de unión con insulina marcada.	Frasca et al., 1999
	0.2	> 30	0.9	Fibroblastos murinos (que no expresan el IGF-IR endógeno) transfectadas con el IR. Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 2 h. TA.	Pandini et al., 2002
	2.8	120	18	Células 3T3 de ratón en las que se anuló el gen Igf1r. Ensayos de unión con insulina marcada (Eu-Insulina), inmunocaptura. 2 días. 4 °C.	Denley et a., 2004
	0.3	9	2.2	Células CHO sobreexpresando el IR. Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 16 h. 4 °C	Benyoucef et al., 2007
IR-B/IR-B	1.6	390	ND	Células CHO intactas o receptores purificados. Ensayos de unión con insulina radiactiva (¹²⁵ I-insulina)	Yamaguchi et al., 1993
	1.0	> 30	> 20	Células NIH-3T3 y CHO transfectadas. Ensayos de unión con insulina marcada.	Frasca et al., 1999
	0.3	> 30	11	Fibroblastos murinos (que no expresan el IGF-IR endógeno) transfectadas con el IR. Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 2 h. TA.	Pandini et al., 2002
	1.4	366	68	Células tipo 3T3 de ratón en las que se anuló el gen Igf1r. Ensayos de unión con insulina marcada (Eu-Insulina), inmunocaptura. 2 días. 4 °C.	Denley et a., 2004
	0.5	90	10	Células CHO sobreexpresando el IR. Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 16 h. 4 °C	Benyoucef et al., 2007
IR-A/IGF-IR	3.7	0.3	0.6	Fibroblastos murinos (que no expresan el IGF-IR endógeno) transfectadas con el IR. Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 2 h. TA.	Pandini et al., 2002
	70	0.5	0.7	Células CHO sobreexpresando el IR. Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 16 h. 4 °C	Benyoucef et al., 2007
IR-B/IGF-IR	>100	2.5	15	Fibroblastos murinos (que no expresan el IGF-IR endógeno) transfectadas con el IR. Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 2 h. TA.	Pandini et al., 2002
	76	0.3	0.3	Células CHO sobreexpresando el IR. Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 16 h. 4 °C	Benyoucef et al., 2007
IGF-IR	>30	0.2	0.6	Fibroblastos murinos (que no expresan el IGF-IR endógeno) transfectadas con el IR. Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 2 h. TA.	Pandini et al., 2002
	>100	0.5	ND	Células CHO sobreexpresando el IR. Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 16 h. 4 °C	Benyoucef et al., 2007
HepG2 no diferenciadas	4.5	0.4	0.6	Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 2 h. TA. Condiciones de cultivo: medio esencial mínimo suplementado con 10 % SFB.	Pandini et al., 2002
HepG2 diferenciadas	20	1.8	4	Ensayos de unión con ligandos radiactivos (¹²⁵ I-IGF-I y ¹²⁵ I-insulina). 2 h. TA. Condiciones de cultivo: medio esencial mínimo suplementado con 10 % SFB y dexametasona.	Pandini et al., 2002

Tabla 5.1. Valores de IC₅₀ (nM) para la unión de distintos ligandos a ambas isoformas del IR, al IGF-IR y a los híbridos IR/IGF-IR.

El hecho de que los estudios se hayan llevado a cabo en diversas líneas celulares, en diferentes condiciones y utilizando distintas aproximaciones experimentales bioquímicas puede en parte contribuir a la variedad de resultados que en algunos casos resultan contradictorios.

En los capítulos anteriores el trabajo se centró en el estudio del comportamiento de dos receptores (IR-A e IR-B) en respuesta a un mismo ligando. Se concluyó que la activación diferencial de las vías mitogénica y metabólica depende de la permanencia en la membrana y de la internalización del complejo ligando-receptor. En este capítulo se propone estudiar la activación de estos dos receptores frente a un nuevo ligando, el IGF-II, que induce respuestas predominantemente proliferativas. Se probará además qué sucede cuando un mismo receptor (el IR-A o el IR-B) es estimulado con dos ligandos diferentes, IGF-II e insulina.

Objetivos

1. Estudiar la señalización del IR-A y del IR-B inducida por el IGF-II
2. Visualizar la internalización del IGF-II a través del IR-A y del IR-B
3. Estudiar la dinámica de endocitosis del IGF-II en células individuales

5.2. RESULTADOS

5.2.1. El IR responde a IGF-II

En la primera etapa de este capítulo se evaluó el efecto del IGF-II sobre la activación de las distintas isoformas del IR y el efecto en las cascadas de señalización río abajo. Para esto se realizaron experimentos de Western blot en células sobreexpresando cada una de las isoformas del IR. Luego de un período de 16 h de hambreado las células fueron estimuladas durante 5 min con 100 nM IGF-II humano y los lisados se ensayaron por Western blot. Estos experimentos mostraron que el IR se activa en respuesta a IGF-II aunque en menor grado que con rhIns (**Figura 5.1**). Se analizó también qué ocurre río abajo del IR midiendo la fosforilación de ERK 1/2 confirmando que el IGF-II induce la activación de la vía de las MAPK.

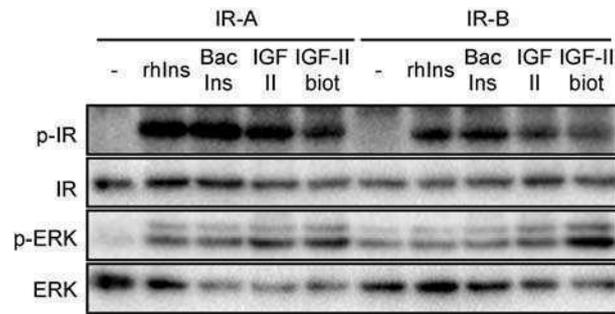


Figura 5.1. Efecto del IGF-II-biotina y del IGF-II sobre la vía del IR. Células HeLa expresando el IR-A o el IR-B fueron hambreadas durante 16 h y estimuladas con 100 nM rhIns, BAC-Ins, IGF-II o bien IGF-II-biotina durante 5 min a 37 °C. Los lisados celulares se analizaron por Western blot con anticuerpos contra tirosinas fosforiladas (PY20) y luego la membrana se ensayó contra la subunidad β del IR. Las dos últimas filas muestran el ensayo con anticuerpos contra ERK 1/2 fosforilado y luego contra ERK 1/2.

Se estudió si el IGF-II-biotina es capaz de activar al IR ya que la autofosforilación del receptor es esencial para la internalización del complejo ligando-receptor. Se detectó autofosforilación de ambas isoformas del IR y la activación de ERK 1/2 en respuesta a IGF-II-biotina. Esto condujo a la conclusión de que el IGF-II-biotina se comporta de modo similar al IGF-II desencadenando ambos la señalización a través del IR-A y del IR-B.

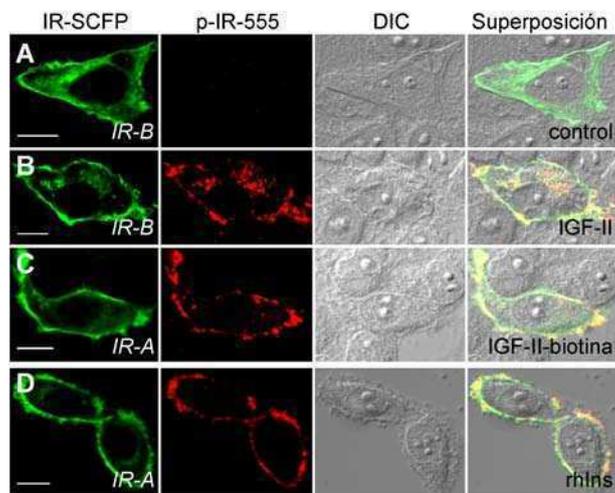


Figura 5.2. Confirmación de la activación del IR inducida por el IGF-II por microscopía confocal. Células HeLa expresando el IR-B-SCFP (A y B) o el IR-A-SCFP (C y D) fueron hambreadas durante 16 h y estimuladas con 100 nM IGF-II (B), IGF-II-biotina (C) o rhIns (D) durante 5 min a 37 °C. Las células se fijaron en metanol y se analizaron por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra la subunidad β del IR fosforilado (Tyr1361) y posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa flúor 555. La visualización se realizó en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación SCFP, 405 nm; excitación Alexa flúor 555, 543 nm; emisión SCFP, 430-470 nm; emisión Alexa flúor 555, BP: 560-620 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 μm.

Estos experimentos fueron confirmados por inmunofluorescencia y microscopía confocal utilizando un anticuerpo específico contra la subunidad β del IR fosforilada en la Tyr1361 en células HeLa transfectadas con el pcDNA3-IR-SCFP y estimuladas con 100 nM IGF-II o IGF-II-biotina. Fue posible detectar señal de activación del IR (dada por el anticuerpo secundario conjugado a Alexa flúor 555) en respuesta a IGF-II

(Figura 5.2.B) y a IGF-II-biotina (Figura 5.2.C) en la membrana celular colocalizando con la señal de SYFP (revelando el IR). Las células no transfectadas no mostraron señal de activación (ver otras células dentro del mismo campo analizado que no presentan señal de SCFP), concluyendo entonces que el IGF-II y el IGF-II-biotina inducen la autofosforilación de ambas isoformas del IR.

5.2.2. El IGF-II activa al IR-A más que del IR-B

Se sabe que la afinidad del IR-B por el IGF-II es menor que la del IR-A (Denley *et al.*, 2002; Pandini *et al.*, 2002; Benyoucef *et al.*, 2007). Por esta razón se estudió la señalización río abajo del IR en respuesta a IGF-II. Para comenzar se decidió analizar la fosforilación de Akt (Ser473) y la de ERK 1/2 (Thr202 / Tyr204) por experimentos de Western blot. La Figura 5.3 presenta estos resultados en células expresando el IR-A o el IR-B estimuladas durante 2, 5 ó 15 min con 10 nM IGF-II ensayadas contra ERK 1/2. Los niveles de activación de ERK 1/2 resultaron mayores para el IR-A (inducción: 1.9 ± 0.4 (2 min), 2.4 ± 0.3 (5 min), 1.6 ± 0.5 (15 min)) que para el IR-B (inducción: 1.4 ± 0.5 (2 min), 1.4 ± 0.3 (5 min), 1.3 ± 0.3 (15 min)), siendo esta diferencia significativa a los 5 min de estimulación.

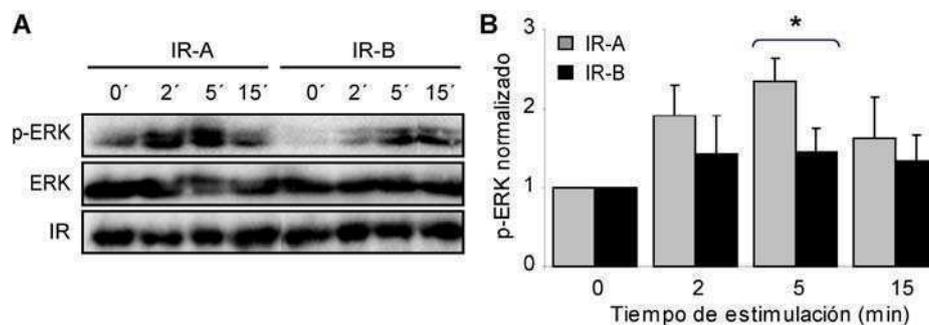


Figura 5.3. Activación de ERK 1/2 inducida por el IGF-II a través del IR-A y del IR-B. **A.** Células HeLa expresando el IR-A o el IR-B hambreadas durante 16 h en DMEM fueron estimuladas con 10 nM IGF-II durante 2, 5 ó 15 min a 37 °C. Los lisados se analizaron por Western blot con anticuerpos contra ERK 1/2 fosforilado, contra ERK 1/2 y contra la subunidad β del IR. **B.** Cuantificación de los resultados obtenidos en **A.** Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. El asterisco muestra diferencias estadísticamente significativas entre isoformas ($p = 0.005$).

Cuando se estudió la fosforilación de Akt (Ser473) se obtuvo una tendencia similar mostrando que el IR-A induce más la activación de Akt en respuesta a IGF-II luego de 5 min de estimulación que el IR-B. Los resultados de 4 experimentos de Western blot independientes se presentan analizados estadísticamente en la Figura 5.4 (inducción: IR-A, 6.8 ± 0.5 (2 min), 6.6 ± 0.5 (5 min), 6.0 ± 1.2 (15 min); IR-B, 5.2 ± 1.3 (2 min), 4.8 ± 1.0 (5 min), 4.1 ± 1.2 (15 min)).

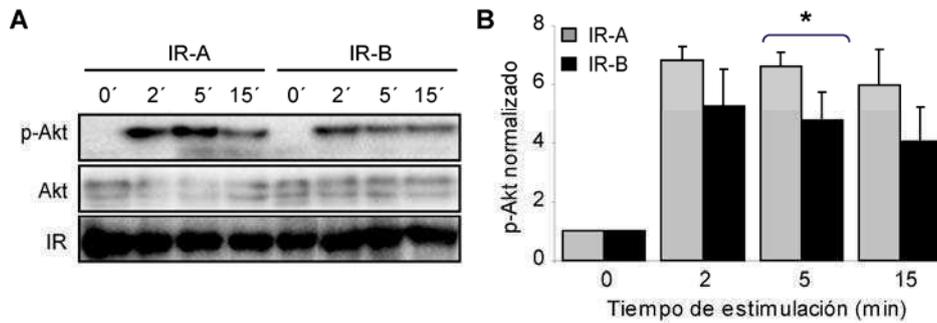


Figura 5.4. Activación de Akt inducida por el IGF-II a través del IR-A y del IR-B. **A.** Células HeLa expresando el IR-A o el IR-B hambreadas durante 16 h en DMEM fueron estimuladas con 10 nM IGF-II durante 2, 5 ó 15 min a 37 °C. Los lisados se analizaron por Western blot con anticuerpos contra Akt fosforilado en la Ser473 (Cell Signaling), contra Akt y contra la subunidad β del IR. **B.** Cuantificación de los resultados obtenidos en **A.** Los resultados se muestran como el promedio ± SEM de 4 experimentos independientes. El asterisco muestra diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.02$).

5.2.3. Visualización del IGF-II unido al IR y su endocitosis

La confirmación de que el IGF-II y el IGF-II-biotina inducen la activación del IR condujo al diseño de experimentos de microscopía para estudiar la endocitosis del IR unido al IGF-II en células individuales como se describió anteriormente para la insulina (**Capítulos 1 y 2**). Cuando células HeLa sobreexpresando el IR-A-SYFP se incubaron con IGF-II-biotina y luego con QD655 pudo detectarse claramente la señal de ambos fluoróforos en la membrana evidenciando la unión de este ligando al IR (**Figura 5.5.A**). Nuevamente, esta señal es específica ya que células no transfectadas en el mismo campo de observación no muestran señal de QD655. Cuando luego de la marcación las células se incubaron a 37 °C durante 1 h y se trataron brevemente con una solución ácida 0.1 M Na-glicina pH 3, 0.5 M NaCl se detectó la presencia de QD655 en el interior celular confirmando así que la endocitosis tiene lugar. Esto se observó solamente en las células transfectadas (**Figura 5.5.B**).

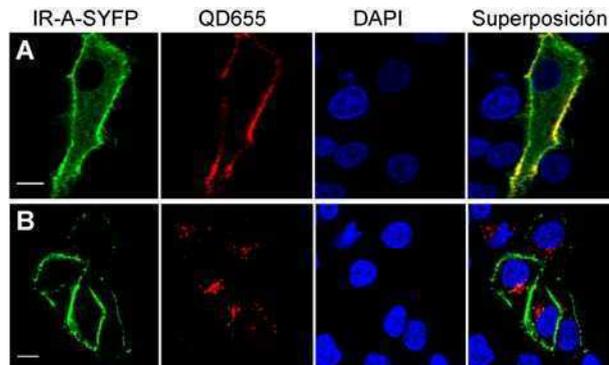


Figura 5.5. Unión de IGF-II al IR-A-SYFP e internalización. **A.** Células HeLa expresando el IR-A-SYFP se marcaron vivas con 50 nM IGF-II-biotina y 2 nM QD655 a TA, fueron fijadas en 3.7 % PFA y teñidas con 1 μM DAPI. **B.** Luego de la marcación las células se incubaron 1 h a 37 °C, posteriormente se trataron con una solución ácida (0.1 M Na-glicina pH 3, 0.5 M NaCl) durante 5 min, se lavaron y se fijaron. La visualización se realizó en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación DAPI, 405 nm; excitación SYFP, 488 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión DAPI, BP: 430-470 nm; emisión SYFP, BP: 505-605 nm; emisión QD655, BP: 655-755 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 μm.

Como otro modo de evidenciar la presencia de los QD655 dentro de las células luego de ser incubadas a 37 °C y tratadas con ácido se realizó un análisis por deconvolución de las imágenes provenientes de 64 planos tomados en z (con una separación entre ellos de 0.16 μm) por microscopía confocal. La deconvolución es una operación matemática que se usa para restaurar señales, es decir, para recuperar datos que han sido degradados por algún proceso físico que pueda describirse matemáticamente mediante la operación inversa, una convolución. En microscopía, la convolución modeliza matemáticamente el proceso de formación de una imagen degradada a causa del desenfoque y el ruido. El desenfoque, aun en las mejores condiciones, aparece inevitablemente en el límite de resolución del dispositivo, debido al fenómeno de difracción en las lentes. Por otra parte, las variaciones de flujo inherentes a las propiedades estadísticas de los fotones producen imágenes ruidosas, sobre todo en los límites de baja intensidad. La restauración mediante una deconvolución aplica el proceso matemático inverso a la imagen degradada, para obtener una mejor representación del objeto original. La deconvolución de imágenes de microscopía permite así sacar la luz fuera de foco proveniente de otros planos focales.

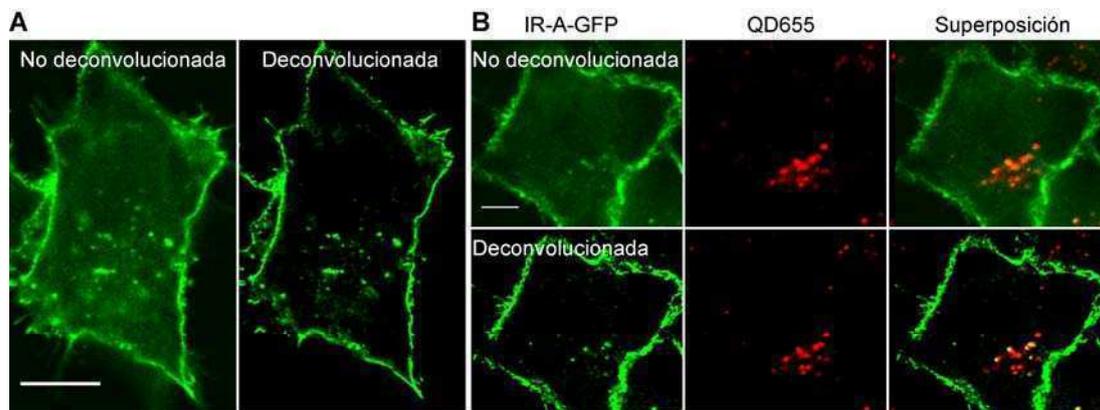


Figura 5.6. Deconvoluciones. **A.** Célula HeLa expresando el IR-A-GFP antes y después de la deconvolución de las imágenes. **B.** Células HeLa expresando el IR-A-GFP marcadas con 50 nM IGF-II-biotina y 2 nM QD655, se incubaron a 37 °C durante 1 h, se trataron brevemente (5 min) con 0.1 mM Na-glicina pH 3, NaCl 0.5 M y se fijaron en 3.7 % PFA. Se tomaron 64 planos en z con una separación entre ellos de 0.16 μm en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación GFP, 488 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión GFP, BP: 505-605 nm; emisión QD655, BP: 655-755 nm; modo secuencial) y luego se deconvolucionaron (ver **Materiales y métodos**). Barras de escala: 10 μm .

La **Figura 5.6.A** muestra la imagen antes y después de ser deconvolucionada de una célula expresando el IR-A-GFP. El proceso de deconvolución permitió obtener imágenes de mayor calidad y con considerable menor ruido ya que se elimina la luz fuera de foco en cada plano. En la **Figura 5.6.B** se presenta una célula expresando el IR-A-GFP marcada con IGF-II-biotina y QD655 luego de 1 h a 37 °C antes y después

del proceso de deconvolución. Al deconvolucionar es posible observar con más detalle la presencia de los QD655 colocalizando con la señal verde en la región perinuclear.

El proceso de deconvolución permitió, en primer lugar, obtener la imagen de cada plano solamente con la señal proveniente del mismo aumentado como se dijo su calidad y claridad. En segundo lugar, permitió realizar reconstrucciones tridimensionales de las células que evidenciaron la presencia de los QD655 en el interior celular colocalizando parcialmente con el IR-GFP en regiones perinucleares (Figura 5.7 y Película Suplementaria 5.1).

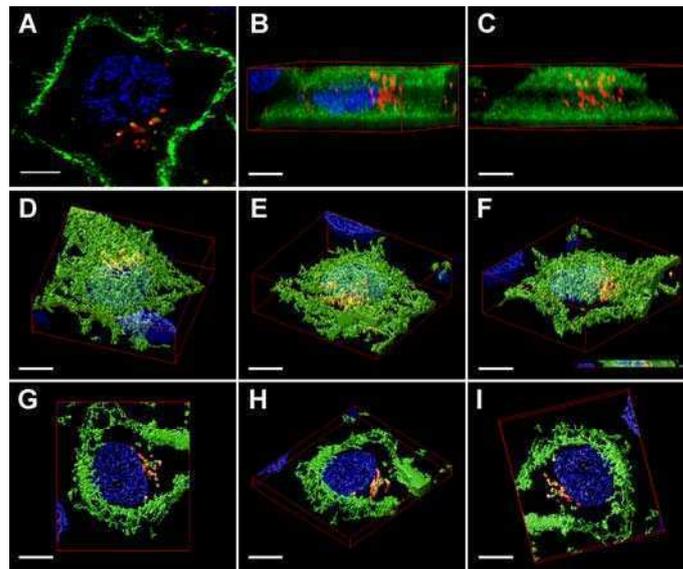


Figura 5.7. Visualización del IGF-II internalizado vía el IR. Células HeLa expresando el IR-A-GFP fueron marcadas con 50 nM IGF-II-biotina y 2 nM QD655, incubadas 1 h a 37 °C, luego 5 min con 0.1 mM Na-glicina pH 3, NaCl 0.5 M y se fijaron en 3.7 % PFA. Se tomaron 64 planos en z con una separación entre ellos de 0.16 μm en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación DAPI, 405 nm; excitación GFP, 488 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión DAPI, BP: 430-470 nm; emisión GFP, BP: 505-605 nm; emisión QD655, BP: 655-755 nm) y luego se deconvolucionaron (ver **Materiales y métodos**). **A.** Superposición de los tres canales posteriormente a la deconvolución: DAPI en azul, IR-A-GFP en verde y QD655 en rojo. **B-F.** Vistas de una reconstrucción tridimensional de la célula. En **B** y **C** se muestra las proyecciones de máxima intensidad, en **D-F** se utilizó el procesador de superficie (surface renderer) del programa Huygens. **G-I.** Vistas del corte de 2.24 μm (14 planos) de espesor que se muestra en el extremo inferior derecho del panel **F**. Barras de escala: 5 μm .

De igual manera que para la isoforma A del IR, se realizaron experimentos de unión y de internalización en células expresando el IR-B-SYFP. En este caso también se observó que el IGF-II se une al IR-B-SYFP en la membrana celular (Figura 5.8.A). Cuando se incubaron las células a 37 °C se detectó la presencia del IGF-II-QD655 dentro de las células (Figura 5.8.B) confirmando, así, la endocitosis del IGF-II a través del IR-B.

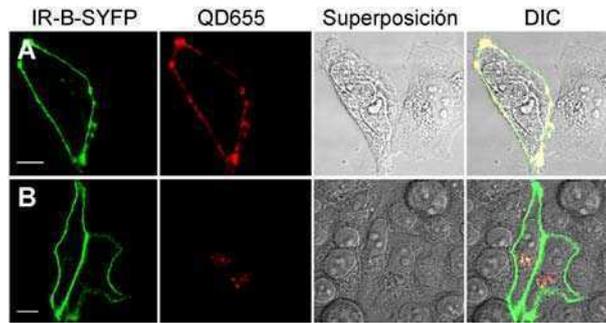


Figura 5.8. Unión de IGF-II al IR-B-SYFP e internalización. Células HeLa expresando el IR-B-SYFP se marcaron vivas con 50 nM IGF-II-biotina y 2 nM QD655 a TA. **A.** Luego de la marcación las células fueron fijadas en 3.7 % PFA. **B.** Antes de la fijación las células se incubaron 150 min a 37 °C y se trataron brevemente con ácido. La visualización se realizó en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación SYFP, 488 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión SYFP, BP: 500-535 nm; emisión QD655, BP: 655-755 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 μ m.

5.2.4. Análisis cuantitativo de la internalización del IGF-II vía el IR-A y el IR-B

Se realizaron experimentos de internalización como los descritos en el **Capítulo 2** a diferentes tiempos: 10, 20 ó 150 min. Como se muestra en la **Figura 5.9** la endocitosis de este ligando ocurre efectivamente en las células que sobreexpresan el IR ya que la señal de QD655 dentro de las células se incrementa a lo largo del tiempo disminuyendo asimismo la señal en la membrana.

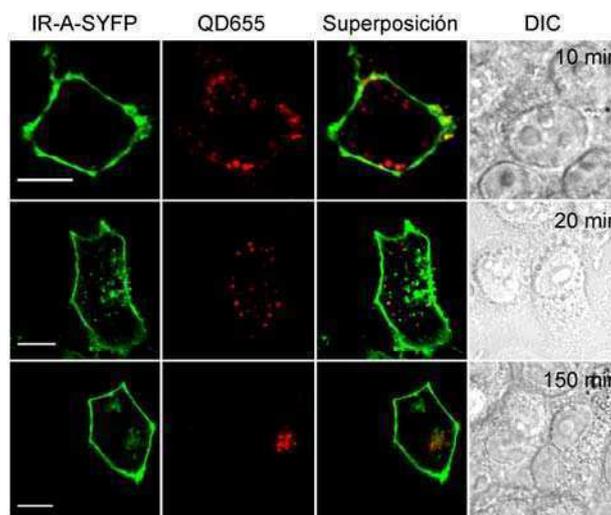


Figura 5.9. Internalización del IGF-II en células expresando el IR. Células HeLa expresando el IR-A-SYFP se marcaron vivas con 50 nM IGF-II-biotina y 2nM QD655 a TA, se incubaron a 37 °C durante 10, 20 ó 150 min y luego de ser fijadas se visualizaron por microscopía confocal (Olympus Fluoview FV 1000; excitación SYFP, 488 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión SYFP, BP: 500-535 nm; emisión QD655, BP: 655-755 nm; modo secuencial). Barras de escala: 10 μ m.

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal luego de incubar las células marcadas con IGF-II-biotina y QD655 a 37 °C por diferentes tiempos fueron analizadas cuantitativamente generando una rutina en el Matlab de modo similar a lo expuesto en **Capítulo 2**. Se tuvo como objetivo estudiar si existían diferencias en las tasas de internalización de ambas isoformas del IR luego de la unión del IGF-II.

En primer lugar, se observó que la proporción de QD655 presente en el interior celular aumenta al incrementar el tiempo de incubación a 37 °C (**Tabla 5.2** y **Figura 5.10**).

Tiempo de incubación a 37 °C	% internalización IGF-II		n	
	IR-A-SYFP	IR-B-SYFP	IR-A-SYFP	IR-B-SYFP
Inicio	31 ± 10	18 ± 13	15	17
10 min	68 ± 10	56 ± 11	8	9
20 min	79 ± 8	67 ± 14	10	8
150 min	96 ± 4	95 ± 4	8	11

Tabla 5.2. Internalización del IGF-II a través del IR-A-SYFP y del IR-B-SYFP. Cuantificación del porcentaje de internalización a partir de las imágenes de microscopía confocal obtenidas de experimentos con células HeLa expresando el IR-A-SYFP o el IR-B-SYFP marcadas con IGF-II-biotina y QD655 a TA e incubadas a 37 °C durante 10, 20 ó 150 min. Se cuantificó en cada una de ellas el porcentaje de internalización como $100 \times QD_i/QD_t$. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM; n indica el número de células analizadas.

La **Figura 5.10** muestra que la endocitosis del IGF-II a través del IR-A-SYFP (barras oscuras) ocurre más rápidamente que a través del IR-B-SYFP (barras claras). A tiempos breves de incubación a 37 °C (10 y 20 min) el porcentaje de QD655 internalizados fue significativamente mayor en células expresando la isoforma A del IR que cuando se sobreexpresó el IR-B.

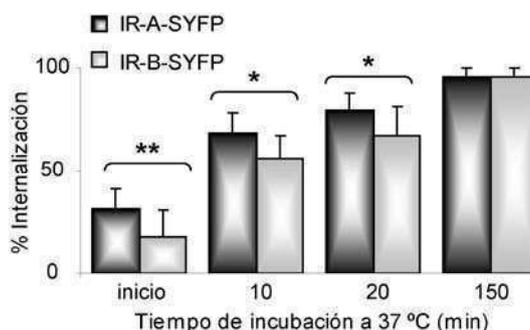


Figura 5.10. Análisis cuantitativo de la internalización del IGF-II en células individuales expresando el IR (A o B). Cuantificación de la internalización en células expresando el IR-A-SYFP o el IR-B-SYFP incubadas con 50 nM IGF-II-biotina y 2 nM QD655 y luego a 37 °C durante 10, 20 ó 150 min. Para el análisis estadístico sólo se consideraron células con similares niveles de expresión del IR-SYFP. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre isoformas del IR-SYFP (*: $p \leq 0.05$; **: $p < 0.001$; n = 8-17 células).

Luego de estudiar comparativamente la internalización del IGF-II a través de ambas isoformas del IR se comparó para cada una de ellas la endocitosis de ambos ligandos: insulina e IGF-II. Estos resultados indican que el IGF-II es internalizado más rápidamente que la insulina por ambas isoformas del IR siendo estas diferencias significativas a tiempos cortos (inicio y 20 min) (**Figura 5.11**).

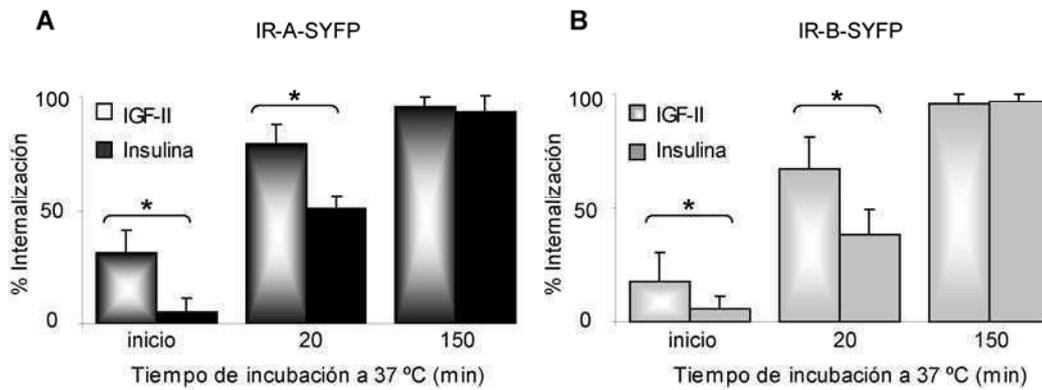


Figura 5.11. Internalización de la insulina y el IGF-II por el IR-A y el IR-B. Cuantificación de la internalización en células expresando el IR-A-SYFP (A) o el IR-B-SYFP (B) incubadas con 50 nM IGF-II-biotina o BAC-Ins y 2 nM QD655 y luego a 37 °C durante 20 ó 150 min. Para el análisis estadístico sólo se consideraron células con similares niveles de expresión del IR-SYFP. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre ligandos ($p < 0.001$; $n = 7-19$ células).

En estos experimentos la marcación fue realizada a TA explicando esto que antes de incubar las células a 37 °C (momento del experimento que se denomina *inicio*) se detecte internalización de IGF-II. En el caso de insulina se evidenció una menor internalización antes de incubar las células a 37 °C de forma similar a lo observado cuando los experimentos se hicieron a 15 °C (ver **Capítulo 2**). La **Tabla 5.3** muestra el grado de internalización para la insulina en los experimentos realizados paralelamente a los del IGF-II en los cuáles la marcación fue realizada a TA y luego se incubaron las células a 37 °C durante diferentes tiempos.

Tiempo de incubación a 37 °C	% internalización insulina		<i>n</i>	
	IR-A-SYFP	IR-B-SYFP	IR-A-SYFP	IR-B-SYFP
<i>Inicio</i>	5 ± 6	6 ± 5	9	19
20 min	51 ± 6	39 ± 11	7	10
150 min	93 ± 7	96 ± 3	13	11

Tabla 5.3. Internalización de la insulina a través del IR-A-SYFP y del IR-B-SYFP. Cuantificación del porcentaje de internalización realizada a partir de las imágenes de microscopía confocal obtenidas de experimentos con células HeLa expresando el IR-A-SYFP o el IR-B-SYFP marcadas con BAC-Ins y QD655 a TA e incubadas a 37 °C durante 20 ó 150 min. Se cuantificó en cada una de ellas el porcentaje de internalización como $100 \times QD_i/QD_t$. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM; *n* indica el número de células analizadas.

5.2.5. Diferencias en la endocitosis del IR-A y del IR-B con diversos ligandos reveladas por citometría de flujo

Los resultados obtenidos por microscopía confocal y su cuantificación permitieron demostrar que, como ocurría con la insulina, el IR-A presenta una mayor tasa de internalización a tiempos cortos en respuesta al IGF-II. Como alternativa a la microscopía se diseñaron experimentos en los cuales se midió la internalización por

citometría de flujo con el objeto de estudiar la endocitosis del IGF-II y de la insulina a través del IR-A y del IR-B. Se marcaron las células expresando el IR-A-SYFP o el IR-B-SYFP de manera similar a lo ya descrito, se incubaron durante diferentes tiempos a 37 °C y se trataron o no con una solución ácida durante 2 min. Luego de esto se analizaron vivas por citometría detectando la señal de SYFP y la de QD655.

Primero, se confirmó que el tratamiento con ácido remueve el IGF-II-biotina-QD655 unido a la membrana como ya se probó para la insulina en los **Capítulos 1 y 2**. Se cuantificó el porcentaje de eventos en cada cuadrante (I a IV, ver **Figura 5.12.A**) de los gráficos que muestran la señal de QD655 en función de la señal de SYFP (**Figura 5.12.A-D**). Luego se calculó el cociente (Q) entre el porcentaje de eventos en el cuadrante II y la suma de los del II y el IV (**ecuación 5.1**) para cada una de las isoformas del IR-SYFP antes o después del tratamiento con ácido (**Figura 5.12.E**).

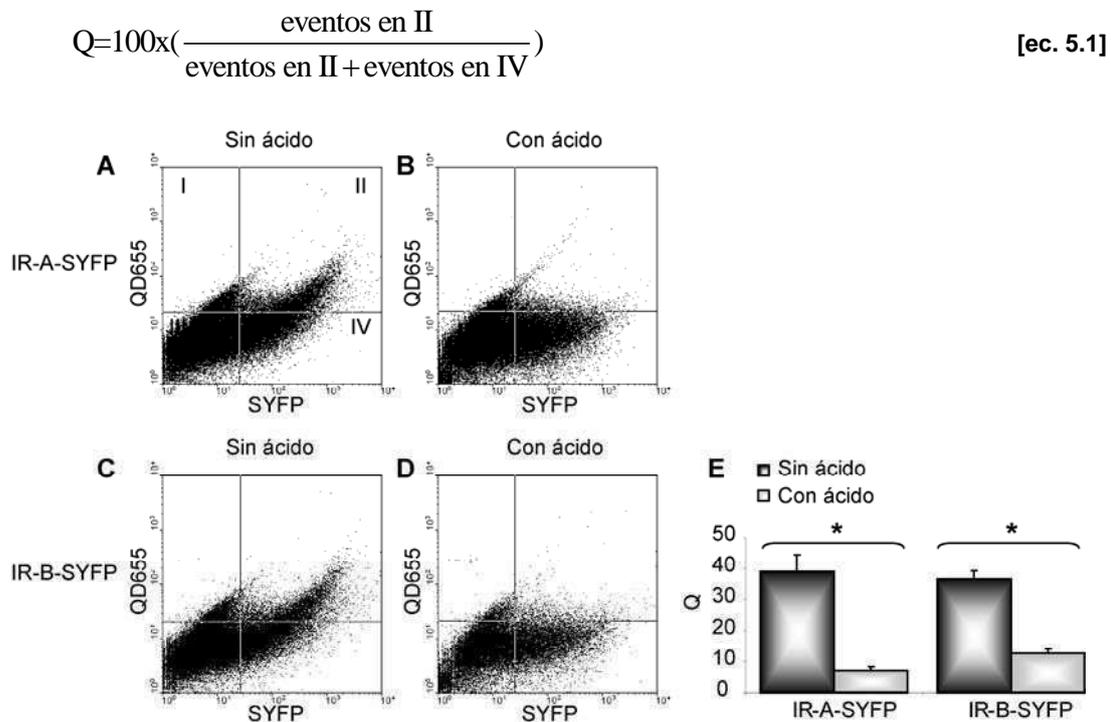


Figura 5.12. Efecto del tratamiento ácido sobre el IGF-II unido al IR en la superficie celular. Células HeLa expresando cada una de las isoformas del IR-SYFP marcadas con 50 nM IGF-II-biotina y 1 nM QD655 a TA se trataron (**A** y **C**) o no (**B** y **D**) con una solución ácida (0.1 M Na-glicina, pH 3, 0.5 M NaCl) durante 2 min, se lavaron y se colectaron con 0.5 mM EDTA en PBS y se analizaron vivas por citometría de flujo detectando la señal de SYFP y de QD655 (SYFP: excitación, 488 nm; espejo dicróico, LP: 502 nm; emisión, BP: 530/30 nm. QD655: excitación, 488 nm; espejo dicróico, LP: 655 nm; emisión, BP: 660/20 nm). **E**. Se cuantificó para cada isoformas antes y después del tratamiento con ácido el porcentaje de eventos en los cuadrantes I a IV indicados en el panel A. Se calculó luego el cociente Q entre el porcentaje de eventos en el cuadrante II y la suma de los de los cuadrantes II + IV (**ecuación 5.1**). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre las muestras tratadas con ácido y las no tratadas ($p \leq 0.01$; $n = 3$ experimentos independientes).

Este análisis permitió detectar que el ácido remueve significativamente el IGF-II-biotina-QD655 presente en la superficie celular ya que el porcentaje de células

transfectadas (cuadrantes II + IV) con alta señal de QD655 (cuadrante II) es significativamente menor que cuando no se tratan las células con ácido. Esto ocurre tanto para el IR-A-SYFP como para el IR-B-SYFP.

Una vez confirmado que el tratamiento con ácido remueve el ligando unido a la superficie celular, se llevaron adelante los experimentos de internalización para comparar la endocitosis del IGF-II en células expresando el IR-A o el IR-B. Para esto se marcaron las células con IGF-II-biotina y QD655, se las incubó a 37 °C durante 20, 40 ó 90 min tratándolas a continuación con ácido y se estudió la endocitosis por citometría de flujo. Los datos se analizaron de dos modos. Se seleccionaron los eventos con alta señal de SYFP (es decir células transfectadas) y se realizaron los histogramas para la señal de QD655. Se calculó la media geométrica pudiendo observar que la misma se corre a valores mayores al aumentar el tiempo de incubación a 37 °C, revelando de esta manera que en promedio las células presentan mayor señal de QD655 dentro (**Figura 5.13.A-D**). Se pudo observar que, si bien este corrimiento se detecta para ambas isoformas, resulta mayor para la isoforma A del IR.

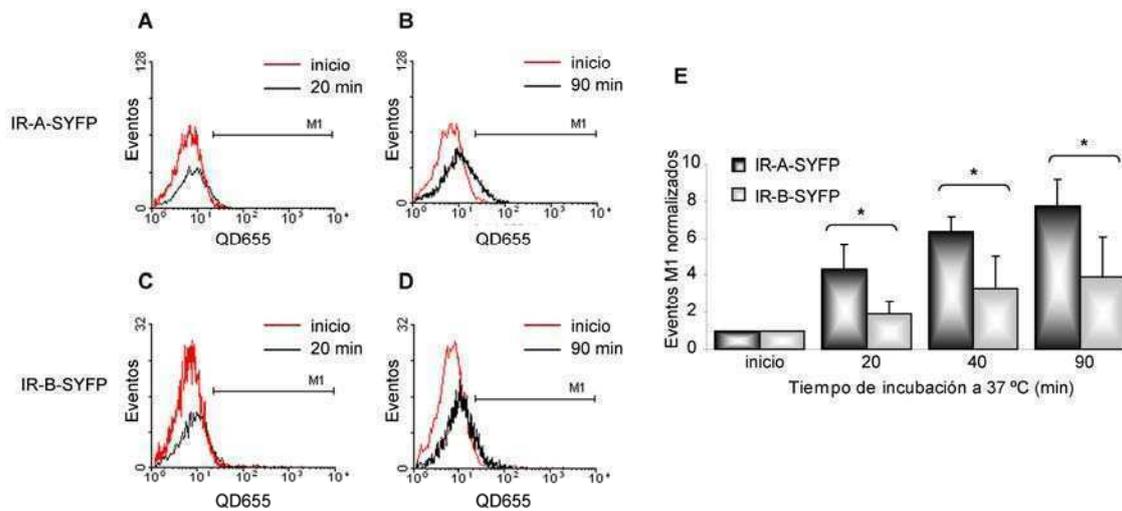


Figura 5.13. Análisis de la internalización del IGF-II a través del IR-A y del IR-B en células vivas por citometría de flujo. Células HeLa expresando el IR-SYFP marcadas con 50 nM IGF-II-biotina y 1 nM QD655 a TA fueron incubadas durante diferentes tiempos a 37 °C, se trataron con una solución ácida (0.1 M Na-glicina pH 3, 0.5 M NaCl) durante 2 min, se colectaron con 0.5 mM EDTA y se pasaron vivas por el citómetro de flujo detectándose la señal de SYFP y de QD655 (SYFP: excitación, 488 nm; espejo dicróico, LP: 502 nm; emisión, BP: 530/30 nm. QD655: excitación, 488 nm; espejo dicróico, LP: 655 nm; emisión, BP: 660/20 nm). Se realizaron los histogramas para la señal de QD655 de la población de eventos que eran positivos para SYFP (células transfectadas) superponiéndose los de las muestras provenientes de células incubadas a 37 °C durante 20 min y aquellas no incubadas para el IR-A-SYFP y para el IR-B-SYFP (**A** y **C** respectivamente). Similar superposición se realizó con los histogramas correspondientes al inicio de la incubación a 37 °C y a los 90 min (**B** y **D**). **E**. En cada histograma se determinó un marcador (M1) que incluyera aproximadamente el 4 % de los eventos al momento inicial. Para cada tiempo de internalización se midió el porcentaje de eventos dentro de esa región M1. La normalización se realizó a la situación inicial. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre ambas isoformas del IR-SYFP ($p < 0.05$; $n = 4$ experimentos independientes).

El segundo tipo de análisis consistió en seleccionar un marcador (M1) en cada histograma que incluyera aproximadamente el 4 % de los eventos al momento inicial. Para cada tiempo de incubación a 37 °C se determinó el porcentaje de eventos dentro de esa región M1. Esto se realizó para las células sobreexpresando el IR-A-SYFP y para aquellas que expresan el IR-B-SYFP. Los resultados (**Figura 5.13.E**) muestran que para la isoforma A la proporción de eventos (células) con alta señal de QD655 (determinada por el marcador M1) se incrementa a medida que aumenta el tiempo de incubación a 37 °C en mayor medida que para la isoforma B.

Para estudiar de modo comparativo la internalización de la insulina y del IGF-II por las isoformas del IR se llevaron adelante nuevos experimentos de citometría de flujo. Para ambos ligandos se observó un corrimiento de la media geométrica en los histogramas de QD655 para las dos isoformas del IR; sin embargo el IR-A muestra un mayor corrimiento que el IR-B tanto para el IGF-II como para la insulina (**Figura 5.14.A-D**).

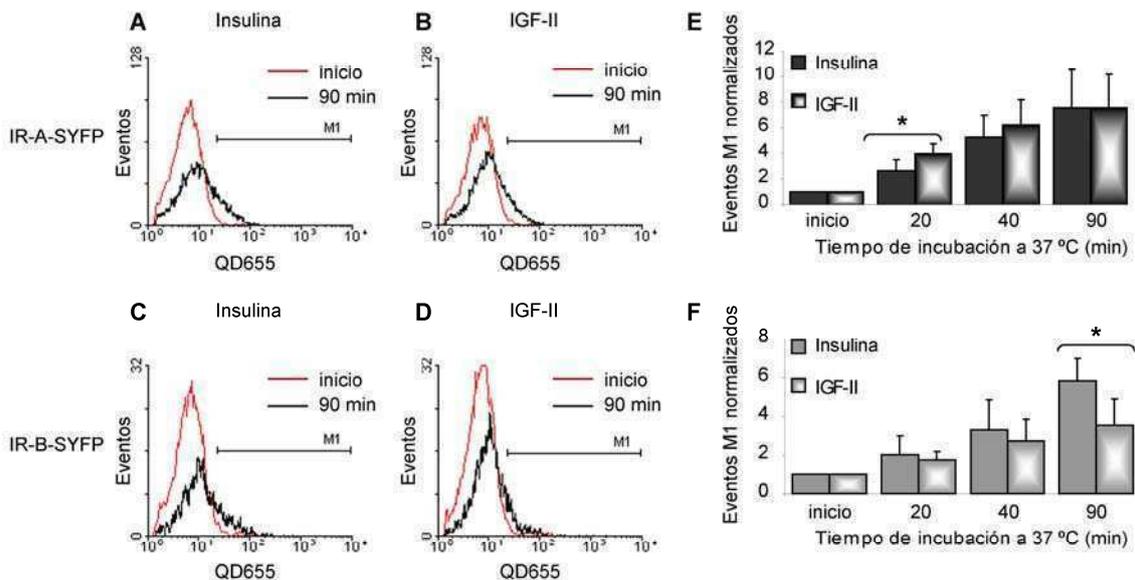


Figura 5.14. Comparación de la internalización de insulina y de IGF-II a través del IR-A y del IR-B por citometría de flujo. A-D. Células HeLa expresando el IR-SYFP marcadas con 50 nM IGF-II-biotina o BAC-Ins y 1 nM QD655 a TA fueron incubadas durante diferentes tiempos a 37 °C, se trataron con ácido durante 2 min, se colectaron con 0.5 mM EDTA en PBS y se pasaron vivas por el citómetro de flujo detectándose la señal de SYFP y de QD655. Se realizaron los histogramas para la señal de QD655 de los eventos que eran positivos para SYFP (células transfectadas) superponiéndose los de las muestras a no incubadas a 37 °C (inicio) y aquellas incubadas durante 90 min para el IR-A-SYFP y para el IR-B-SYFP para cada uno de los ligandos. **E-F.** En cada histograma se determinó un marcador M1 que incluyera aproximadamente el 4 % de los eventos al momento inicial. Para cada tiempo de internalización se midió el porcentaje de eventos dentro de esa región M1 y se normalizó a la situación inicial. Esto se hizo para el IR-A-SYFP (**E**) y para el IR-B-SYFP (**F**). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre ambos ligandos ($p < 0.05$; $n = 5$ experimentos independientes).

Analizando los datos de manera similar a lo presentado anteriormente, se observa que para la isoforma A el IGF-II muestra una mayor proporción de células con

QD655 que la insulina (**Figura 5.14.E**). La isoforma B, en cambio, presenta la tendencia opuesta (**Figura 5.14.F**). Esto resulta consistente con el hecho de que el IR-B es el receptor que presenta menor afinidad por el IGF-II. A su vez el IR-A (isoforma más mitogénica) se internaliza más en respuesta a un ligando más mitogénico como el IGF-II que en respuesta a uno más metabólico (la insulina).

5.2.6. El IGF-II induce más la actividad del factor de transcripción AP-1 a través del IR-A que a través del IR-B.

Las diferencias observadas en la internalización del IR-A y del IR-B en respuesta a IGF-II condujeron a estudiar si esto se refleja río abajo en la señalización del IR como sucede con la insulina. Para esto, se caracterizó en primer lugar la línea celular utilizada. Células HeLa transfectadas con el reportero pAP1-Luc se hambreadaron durante 24 h y luego se estimularon con diversos factores de crecimiento (EGF, IGF-II) o bien con rhIns (**Figura 5.15**).

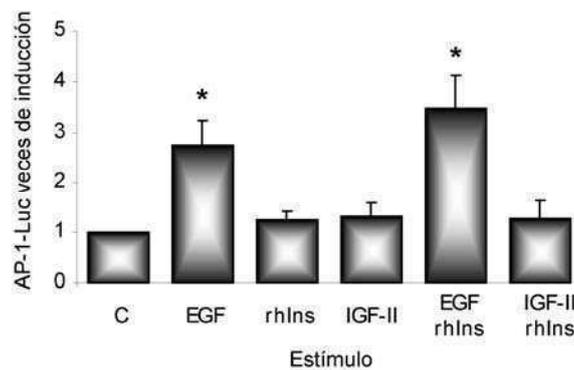


Figura 5.15. Transcripción génica mediada por AP-1 inducida por diversos ligandos en células HeLa. Células HeLa fueron transfectadas con el plásmido reportero pAP1-Luc y el pcDNA3. Luego de 24 h de expresión fueron deprivadas de SFB por otras 24 h y se estimularon con durante 16 h con alguno de los siguientes tratamientos: 1.6 nM EGF, 100 nM rhIns, 100 nM IGF-II, 1.6 nM EGF + 100nM rhIns ó 100 nM IGF-II + 100 nM rhIns. Luego de la lisis se midió la actividad de luciferasa calculándose las veces de inducción como el cociente entre la actividad de luciferasa medida en células estimuladas y la medida en células no estimuladas. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes para el caso de EGF, rhIns y de EGF + rhIns ó 3 experimentos para IGF-II e IGF-II + rhIns. El asterisco muestra diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.005$) con respecto al control sin estimular (C).

Estas células, derivadas de un tumor epitelial, responder sólo al EGF, no mostrando efectos significativos ante el tratamiento con insulina o IGF-II. Esto se explica por la baja expresión de receptores endógenos que poseen las células HeLa.

A continuación se evaluó el efecto de sobreexpresar cada isoforma del IR sobre la inducción de AP-1 inducida por EGF, IGF-II, rhIns o bien EGF + rhIns, o IGF-II + rhIns. La **Figura 5.16** muestra que mientras la sobreexpresión del ambos IR incrementa la respuesta de las células HeLa a la rhIns y al IGF-II, la misma no tiene efecto sobre la inducción de la transcripción génica promovida por el EGF. La

coestimulación con EGF y rhIns mostró para ambos IR la suma de sus efectos, sugiriendo que ambos ligandos activan por vías diferentes la señalización de AP-1. En cambio, al tratar las células con IGF-II y rhIns simultáneamente no se observó que los efectos se sumaran. Esto permite concluir que ambos ligandos estarían induciendo la transcripción génica mediada por AP-1 a través de la misma vía (el IR).

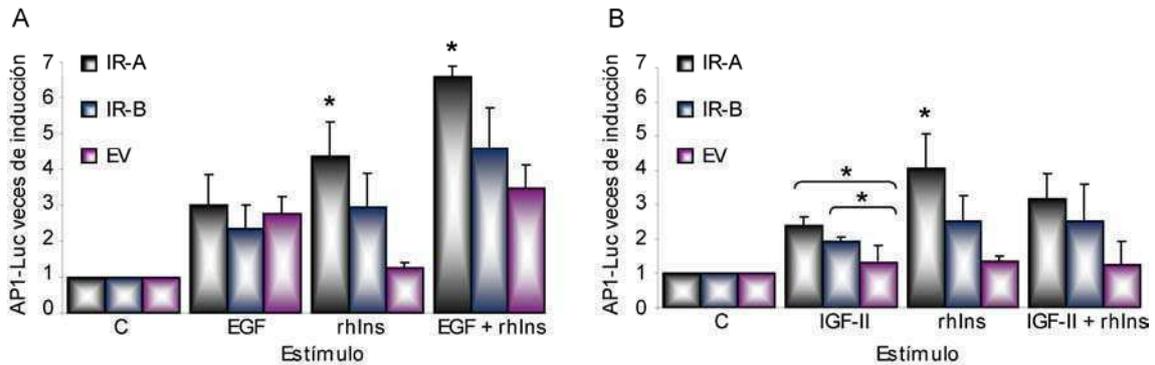


Figura 5.16. Efecto de la sobreexpresión del IR en la transcripción génica mediada por AP-1 inducida por diversos ligandos en células HeLa. Células HeLa cotransfectadas con el reportero pAP1-Luc y con el pcDNA3-IR-A, el pcDNA3-IR-B o el EV luego de 24 h de expresión fueron privadas de SFB por 24 h y finalmente se estimularon con: 1.6 nM EGF, 100 nM rhIns, 100 nM IGF-II, 1.6 nM EGF + 100nM rhIns ó 100 nM IGF-II + 100 nM rhIns durante 16 h. Posteriormente a la lisis se midió la actividad de luciferasa calculándose las veces de inducción como el cociente entre la actividad de luciferasa medida en células estimuladas y la medida en células no estimuladas. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes para el caso de EGF, rhIns y de EGF + rhIns ó 3 experimentos para IGF-II e IGF-II + rhIns. El asterisco muestra diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Al sobreexpresar el IR-A se observa una inducción mayor de la transcripción génica por el IGF-II de modo similar a lo que sucede con la insulina. Se ensayaron entonces diferentes concentraciones de IGF-II (1, 10 y 100 nM) y se midió la inducción de la actividad de luciferasa con respecto a los niveles basales (**Figura 5.17**).

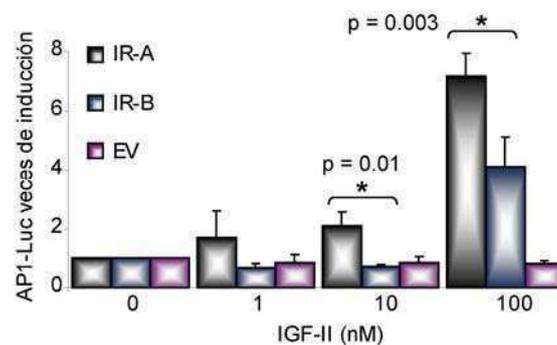


Figura 5.17. Transcripción génica inducida por IGF-II a través del IR-A y del IR-B. Células HeLa coexpresando el reportero AP1-Luc con el IR-A, el IR-B o solamente el reportero luego de 24 h de expresión fueron privadas de SFB por 24 h y finalmente se estimularon durante 16 h con: 1, 10 ó 100 nM IGF-II. Posteriormente a la lisis se midió la actividad de luciferasa calculándose las veces de inducción como el cociente entre la actividad de luciferasa en células estimuladas y no estimuladas. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambas isoformas del IR.

Estos experimentos permitieron detectar que con 100 nM IGF-II el IR-A induce más la transcripción génica vía AP-1 (7.2 ± 0.8 veces de inducción respecto del basal) que el IR-B (4.1 ± 1.0 veces de inducción respecto del basal). Al estimular con 10 nM IGF-II la isoforma A es capaz de inducir la transcripción génica (2.1 ± 0.5 veces de inducción respecto del basal), mientras que la isoforma B no presenta diferencias con los niveles basales.

Estos resultados en su conjunto conducen a la conclusión que el IGF-II activa mayormente al IR-A, la isoforma más mitogénica y que presenta mayor afinidad por este ligando.

5.3. DISCUSIÓN

En este capítulo de la tesis se ampliaron las estrategias desarrolladas en los capítulos previos para estudiar otro ligando capaz de señalizar a través del IR. En primera instancia se evaluaron las herramientas de modo similar a lo realizado para la insulina. Se pudo confirmar que el IGF-II humano así como el IGF-II-biotina (también recombinante humano) se unen al IR, lo activan e inducen la señalización río abajo del receptor.

Como se esperaba, dada las diferencias en las propiedades de unión y afinidad reportadas (Yamaguchi *et al.*, 1993; Morrione *et al.*, 1997; Frasca *et al.*, 1999; Sciacca *et al.*, 2002; Pandini *et al.*, 2003; Benyoucef *et al.*, 2007), se determinó que el IGF-II conduce a una mayor activación de la señalización por la vía de ERK 1/2 y por la vía de Akt cuando se une al IR-A que cuando se une al IR-B.

La combinación de las VFP fusionadas a las dos isoformas del IR y los QD unidos a dos ligandos naturales del receptor de insulina permitió en esta parte de la tesis el estudio comparativo de isoformas y ligandos a nivel de células individuales. En este caso se utilizó la microscopía confocal y además la citometría de flujo para seguir y cuantificar la internalización de los complejos ligando-IR con una estrategia que fue aplicada en otros receptores de tipo tirosina quinasa como el del EGFR y el NGFR (Lidke *et al.*, 2004, 2005 y 2007; Echarte *et al.*, 2007; Kantelhardt *et al.*, 2010).

Las herramientas generadas brindaron la posibilidad de estudiar la internalización de este ligando unido a cada una de las isoformas del IR en células vivas e individuales. Fue posible primero visualizar la unión del IGF-II tanto al IR-A como al IR-B y su internalización. Por microscopía y por citometría de flujo se

determinó que la isoforma A del IR muestra una cinética de internalización más rápida para el IGF-II que para el IR-B siendo esto coincidente con lo demostrado para la insulina (**Capítulo 2**).

El IGF-II desencadena respuestas proliferativas y de crecimiento estando involucrado en el desarrollo embrionario y en la proliferación tumoral (Louvi *et al.*, 1997; Sciacca *et al.*, 1999; Kalli *et al.*, 2002; Vella *et al.*, 2002). Los resultados de la endocitosis del IGF-II unido al IR-A o al IR-B son coherentes con este comportamiento si consideramos el modelo presentado en el **Capítulo 2** y **4**. Desde la membrana celular el IR gatilla respuestas metabólicas y al ser endocitado su señalización por la vía de las MAPK es más proliferativa y mitogénica. Las diferencias detectadas en la endocitosis del IGF-II a través del IR-A y del IR-B permiten confirmar que la señalización mitogénica es gatillada principalmente desde los endosomas. Por lo tanto, una cinética de internalización más rápida se traduce en una mayor activación de esta vía.

Asimismo, al comparar la endocitosis del IR-A en respuesta a los dos ligandos en estudio también fue posible observar diferencias: el IGF-II, ligando proliferativo, es internalizado más rápidamente que la insulina, ligando metabólico, a través de esta isoforma. Nuevamente, esto es consistente con el modelo propuesto acerca de la divergencia en las cascadas de transducción de señales y la importancia de la localización celular en la modulación de la señalización del IR (Sorkin *et al.*, 1993; Bergeron *et al.*, 1995; Biener *et al.*, 1996; Grimes *et al.*, 1996; Ceresa *et al.*, 1998; Parpal *et al.*, 2001; Hamer *et al.*, 2002; Uhles *et al.* 2007)

Los resultados acerca de la internalización diferencial de ligandos e isoformas del IR condujeron a estudiar los efectos del IGF-II sobre la transcripción génica en células sobreexpresando cada variante de *splicing* del IR. Los promotores de diversos genes poseen sitios de unión para AP-1 y la regulación de la activación de esta familia de factores de transcripción está involucrada en el crecimiento y la proliferación celular (Shaulian y Karin, 2001 y 2002). Dado que AP-1 responde a insulina y a diversos factores de crecimiento (Angel y Karin, 1991; Karin *et al.*, 1997) se analizó la inducción de su actividad en respuesta a IGF-II a través de las dos isoformas del IR. La hipótesis planteada propone que la endocitosis del IGF-II a través del IR-A ocurre más rápidamente que a través del IR-B reflejándose en una mayor activación de las vías mitogénicas desde los endosomas. Los resultados obtenidos mostraron que, efectivamente, el IR-A en respuesta a IGF-II induce la transcripción de genes a través de la vía de AP-1 con mayor potencia que el IR-B.

Ambos receptores mostraron internalizar al IGF-II con una cinética más rápida que a la insulina (el grado de internalización medido por microscopía resultó mayor para el IGF-II a tiempo cortos). Esto es consistente con el modelo que asume que un ligando que es internalizado más rápidamente desencadena una respuesta predominantemente mitogénica señalizando desde los endosomas. En cambio, los ligandos que permanecen más tiempo en la membrana gatillan respuestas fundamentalmente metabólicas. En este capítulo pudo demostrarse que esto es así tanto en células expresando el IR-A como el IR-B. Cuando se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células que muestran internalización se vio que al expresar el IR-A este porcentaje resulta mayor para el IGF-II que para la insulina. Sin embargo, al expresar el IR-B es al revés, lo cual es consistente con la menor afinidad que presenta esta isoforma por el IGF-II en comparación con la insulina.

Varios trabajos han abordado esta temática pero de un modo diferente. Se han utilizado, por un lado, ligandos análogos a insulina que se disocian más rápida o más lentamente del receptor y se analizaron sus repuestas celulares (Hansen *et al.*, 1996; Jensen *et al.*, 2007). Así también, se han ensayado mutantes del IR que no se internalizan para ver el efecto en la señalización receptor (Hammer *et al.*, 2002). Finalmente, otras aproximaciones han consistido en inhibir la endocitosis y estudiar la cascada metabólica y mitogénica del IR en respuesta a insulina (Biener *et al.*, 1996; Ceresa *et al.*, 1998). En el caso del trabajo que se presentó en este capítulo el diseño experimental aprovechó la dualidad del modelo en estudio: dos receptores, uno más mitogénico (IR-A) y uno más metabólico (IR-B), y dos ligandos, uno más mitogénico (el IGF-II) y el otro más metabólico (la insulina). Las diversas combinaciones y comparaciones permitieron confirmar el modelo que venía proponiéndose desde el **Capítulo 2** teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo y la extensa evidencia publicada por diversos grupos.

Estos resultados en conjunto con los expuestos anteriormente para la insulina permiten afirmar que un mismo ligando induce una respuesta mitogénica o metabólica según a qué IR se una. A su vez esto es controlado por la localización celular de los receptores. El IR-A es internalizado más rápidamente en respuesta a ambos ligandos que el IR-B. Asimismo, si ahora se comparan ligandos unidos a un mismo receptor, sucede que ligandos más mitogénicos se internalizan con cinéticas más rápidas que ligandos más metabólicos.

Estos resultados confirman el modelo de activación diferencial regulada por la localización del receptor luego de su fosforilación. La localización en la membrana

favorece la señalización metabólica mientras que la internalización del complejo ligando-IR favorece la mitogénica. Las isoformas del IR responden al IGF-II internalizándose más rápidamente promoviendo una respuesta mitogénica más robusta comparada con la estimulación con insulina. A su vez, si se compara el comportamiento en respuesta a IGF-II de las dos isoformas del IR se observó que, al igual que en la respuesta a insulina, el IR-A se internaliza más rápido y activa de forma más sostenida la respuesta mitogénica.

Película Suplementaria 5.1. Visualización QD655-Ins unidos al IR-A-GFP y endocitados.
Células HeLa expresando el IR-A-GFP marcadas con 50 nM IGF-II-biotina y 2 nM QD655, se incubaron a 37 °C durante 1 h, se trataron brevemente (5 min) con 0.1 mM Na-glicina pH 3, NaCl 0.5 M y se fijaron en 3.7 % PFA. Se tomaron 64 planos en z con una separación entre ellos de 0.16 µm en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 (excitación GFP, 488 nm; excitación QD655, 405 nm; emisión GFP, BP: 505-605 nm; emisión QD655, BP: 655-755 nm) y luego se deconvolucionaron. Finalmente se realizó una película mostrando los QD655 dentro de la célula vista desde diferentes ángulos. Se utilizó el procesador de superficie (surface renderer) del programa Huygens para generar las vistas desde los diferentes ángulos.

CAPÍTULO 6

Interacción ligando-receptor por microscopía de fuerza atómica

6. Interacción ligando-receptor por microscopía de fuerza atómica

6.1. INTRODUCCIÓN

La microscopía de fuerza atómica

Debido a su alta sensibilidad en la medición de fuerzas (del orden de los piconewton, pN) y en el posicionamiento (del orden de los nm) el microscopio de fuerza atómica ha demostrado ser una herramienta muy poderosa para el estudio de dinámicas y fuerzas de interacción ligando-receptor tanto en moléculas individuales como en superficies celulares. La **Figura 6.1** muestra las partes principales de un AFM: el sensor de fuerza compuesto por el fleje (del inglés, *cantilever*) y la punta propiamente dicha (del inglés, *tip*); la platina donde se coloca la muestra; el sistema óptico de detección de las deflexiones compuesto por un láser de diodo y un fotodiodo; el barredor piezoeléctrico (del inglés, *scanner*).

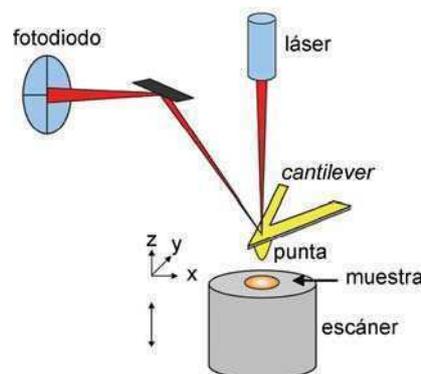


Figura 6.1. Principios generales de la microscopía de fuerza atómica. La visualización por AFM se logra por el barrido que realiza la punta del sensor de fuerza a lo largo de la superficie de la muestra mientras que la fuerza de interacción entre la punta y la muestra es monitoreada con una sensibilidad del orden de los pN. Tomado de Hinterdorfer y Dufrêne, 2006.

El AFM puede usarse tanto para obtener imágenes topográficas como en el modo de espectroscopía de fuerzas. En el primer caso, las imágenes son creadas por el escaneo de la superficie de la muestra en las direcciones x e y por parte de la punta del sensor de fuerza, a lo que se suma la información de la fuerza de interacción entre la punta y la muestra para obtener información acerca de la topografía de la superficie. Por su parte, la espectroscopía de fuerza se basa en la medición de esta fuerza con

una sensibilidad del orden de los pN cuando la punta se apoya sobre la muestra y luego se lo separa en la dirección z (retracción). La muestra se monta sobre un escáner piezoeléctrico el cual asegura el posicionamiento tridimensional con una resolución del orden de los nm. La fuerza es monitoreada midiendo la deflexión (vertical) que sufre el *cantilever* mediante un láser enfocado en el extremo libre del *cantilever* y reflejado en un fotodiodo: esta deflexión es directamente proporcional a la fuerza. A su vez, en la denominada espectroscopía de fuerza dinámica se varía la tasa de incremento de la fuerza (fuerza de carga o tasa de carga; *loading rate* en inglés) durante el experimento obteniendo de este modo información sobre la dinámica molecular de los procesos de reconocimiento (Hinterdorfer y Dufrêne, 2006).

Microscopía de fuerza atómica de superficies celulares

Las células interactúan con el medio que las rodea a través de las superficies, las cuales juegan además un papel clave en diversos procesos celulares como la señalización, la comunicación célula-célula, la adhesión, el transporte, la generación de energía, la diferenciación celular, la metástasis tumoral y las infecciones virales y bacterianas (Sheetz, 2001; Discher *et al.*, 2005; Gumbiner, 2005; Vogel y Sheetz, 2006; Lecuit y Lenne, 2007). Todos los procesos en las superficies celulares implican fuerzas moleculares que son el resultado de una compleja interconexión de interacciones químicas, físicas y biológicas (Bustamante *et al.*, 2004; Vogel y Sheetz, 2006).

Diversas espectroscopías de fuerza permiten medir interacciones inter e intra-moleculares en las superficies celulares a escala molecular (Chen *et al.*, 2008; Moffitt *et al.*, 2008; Neuman y Nagy, 2008). Sin embargo, dado su sensor nanoscópico de fuerza (~2-50 nm), la microscopía de fuerza atómica es la única que permite medir y localizar interacciones específicas en las superficies celulares con alta resolución, del orden de los 10 nm (Bining *et al.*, 1986; Gerber y Lang, 2006). Además, la sensibilidad de los ensayos basados en AFM permite detectar un amplio rango de fuerzas entre los 5 pN y los 100 nN (Helenius *et al.*, 2008; Müller y Dufrêne, 2008; Puchner *et al.*, 2008; del Río *et al.*, 2009). Esto hace a la microscopía de fuerza atómica una herramienta adecuada e ideal para detectar desde fuerzas de unión receptor-ligando individual (~60-80 pN) hasta fuerzas de adhesión entre células (>> 1nN). En la **Tabla 6.1** se presentan algunos ejemplos de fuerzas características de ciertos procesos que van desde niveles celulares hasta niveles moleculares.

Proceso	Fuerza requerida/generada	Referencia bibliográfica
Contracción celular	~2 μ N	Fay, 1977.
Ruptura de enlace covalente	~4 nN	Grandbois <i>et al.</i> , 1999.
Despliegue de proteínas solubles en agua	~100-200 pN	Rief <i>et al.</i> , 1997.
Despliegue y separación de proteínas de membrana desde la bicapa lipídica	~100-150 pN	Oesterhelt <i>et al.</i> , 2000; Ganchev <i>et al.</i> , 2004.
Ruptura de interacciones ligando-receptor	~20-200 pN	Hinterdorfer y Dufrene, 2006; Evans y Calderwood, 2007.
Activación enzimática	~10-50 pN	Puchner <i>et al.</i> , 2008; del Río <i>et al.</i> , 2009.
Proteínas motoras del citoesqueleto	~2-10 pN	Piazzesi <i>et al.</i> , 2007.

Tabla 6.1. Fuerzas características de procesos celulares. Adaptado de Müller *et al.*, 2009.

Las aplicaciones de la microscopía de fuerza atómica se extendieron desde su uso para visualización de alta resolución (**Figura 6.2**) hasta su implementación en investigaciones nanotecnológicas que apuntan a medir fuerzas de interacciones biológicas, químicas y físicas con resolución molecular.

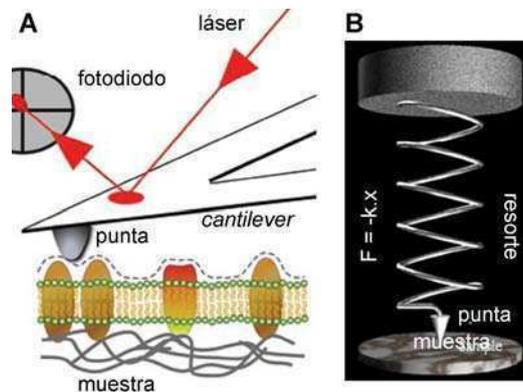


Figura 6.2. Esquema del modo de visualización del AFM. **A.** La punta del AFM contornea la topografía de la superficie celular (líneas punteadas) (tomado de Müller *et al.*, 2009). **B.** Al acercar el cantilever a la superficie de la muestra, las fuerzas entre la punta y la muestra deflexionan el cantilever según la ley de Hooke. Estas fuerzas pueden ser mecánicas de contacto, de tipo Van der Waals, electrostáticas, magnéticas y/o de enlace químico.

En el modo de visualización de alta resolución la punta del AFM interactúa con la muestra generando topografías de la superficie. Esto es posible debido a que la punta se encuentra unida al *cantilever* produciendo su deflexión cuando existe interacción con la muestra. Las fuerzas entre la punta y la muestra deflexionan el cantilever según la ley de Hooke: $F = k \cdot x$, donde k es la constante elástica del

cantilever. Un escáner piezoeléctrico permite la alta resolución en el posicionamiento tridimensional de la punta (~ 0.1 nm) (**Figura 6.2**).

El AFM se utiliza además en la modalidad de diversas espectroscopías de fuerza (**Figura 6.3**): espectroscopía de fuerza de moléculas individuales (SMFS, por sus siglas en inglés, *Single molecule force spectroscopy*), microscopía de fuerzas químicas (CFM, por sus siglas en inglés, *Chemical force microscopy*), mapeo de reconocimiento molecular (MRM, por sus siglas en inglés, *Molecular recognition mapping*) y espectroscopía de fuerza de células individuales (SCFS, por sus siglas en inglés, *Single cell force spectroscopy*).

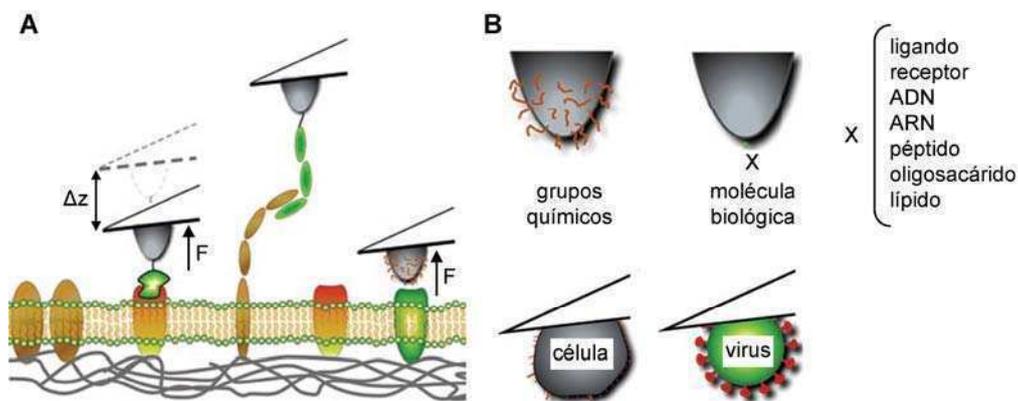


Figura 6.3. Esquema del AFM utilizado en la modalidad de espectroscopía de fuerza. A. La punta del sensor de fuerza detecta interacciones en la superficie celular con resolución de moléculas individuales. Ejemplos que muestran: la punta funcionalizada con un ligando para detectar la interacción con su receptor (izquierda), una punta con una proteína de adhesión celular para medir interacciones con otras moléculas de adhesión (centro), y una punta recubierta con grupos químicos para detectar las interacciones de interés (derecha). **B.** Funcionalización de las puntas del AFM o del cantilever para detectar interacciones biológicas, celulares, virales o químicas específicas. Tomado de Müller et al., 2009.

En la modalidad de espectroscopía de fuerza se registra la deflexión del *cantilever* mientras la punta y la muestra se aproximan y luego se separan (**Figura 6.3.A**). Esta información permite obtener curvas de deflexión versus desplazamiento que pueden ser transformadas en curvas de fuerzas versus distancias, siendo la fuerza igual al valor de la deflexión multiplicado por la constante elástica del *cantilever*. La fuerza de adhesión o despegado característica observada durante el despegado de la punta del AFM es el parámetro clave que brinda información sobre la interacción ligando-receptor (en SMFS), sobre la distribución espacial de la interacción química (en CFM), sobre la distribución espacial de receptores individuales (MRM) y sobre las fuerzas que gobiernan las interacciones célula-célula y célula-sustrato (en SCFS).

La mayoría de los experimentos de espectroscopía de fuerza con células vivas requieren la funcionalización química o biológica de la punta del AFM (**Figura 6.3.B**). Para SMFS y MRM se unen a la punta ligandos, péptidos o proteínas que interactúan

específicamente con receptores de la superficie celular. Para ensayos de CFM la punta es modificada con diversos grupos químicos, mientras que para SCFS se unen al *cantilever* células o virus.

Las curvas de fuerza

Las curvas de fuerza muestran la fuerza de interacción en función de la distancia de separación entre la punta y la muestra para un ciclo en el que la punta se acerca a la muestra (punto A de la **Figura 6.4**), toma contacto (punto **B**), ejerce presión sobre la misma (punto **C**) y finalmente se aleja (puntos **D-E**). Se mide la adhesión entre la punta y la muestra como la diferencia entre el valor de fuerza antes de tocar la muestra y el valor en el que se desprende la punta de la muestra en el ciclo de retracción (punto **F**).

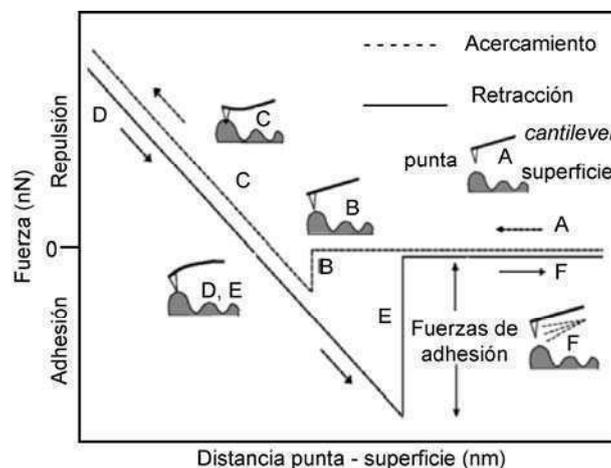


Figura 6.4. Curva esquemática de fuerza versus distancia. Curva fuerza-distancia que describe un ciclo de aproximación-retracción de la punta del AFM a la muestra. Este ciclo se repite durante el escaneo de la superficie. La punta se aproxima a la superficie (A), esta atracción inicial entre la punta y la superficie está dada por fuerzas de tipo Van der Waals que conducen al contacto (B). La punta ejerce presión sobre la superficie y esto conduce a la indentación de la muestra y a la deflexión del cantilever (C). Posteriormente, la punta se aleja de la superficie (D-E). Se mide la adhesión entre la punta y la muestra como la diferencia entre el valor de fuerza antes de tocar la muestra y el valor en el que se desprende la punta de la muestra (F) en el ciclo de retracción. Adaptado de Shahin et al., 2005.

Si la punta está modificada químicamente, por ejemplo con un ligando, y la superficie presenta un receptor para ese ligando entonces esa fuerza de adhesión corresponderá a la fuerza de interacción específica ligando-receptor. La caracterización de fuerzas de interacción específicas a nivel funcional y molecular consiste en tomar una gran cantidad de curvas de fuerza y analizarlas estadísticamente para obtener el valor de la fuerza de interacción característica del sistema de interés. El AFM permite además combinar las curvas de fuerza y la resolución espacial en un mapa de fuerzas para medir y localizar las interacciones específicas sobre la célula.

La técnica de SMFS ha sido ampliamente utilizada para i) caracterizar la interacción de moléculas de adhesión celular (Fritz *et al.*, 1998; 2000; Shi *et al.*, 2008); ii) localizar la unión de ligandos e inhibidores a proteínas de membrana (Kedrov *et al.*, 2008) y proteínas solubles en agua (Junker *et al.*, 2009); iii) caracterizar las fuerzas de anclaje de ciertos péptidos a la membrana plasmática (Ganchev *et al.*, 2004).

Para aplicar la SMSF para detectar interacciones específicas de moléculas individuales en la superficie de células vivas es necesario que los grupos que se utilicen para funcionalizar las puntas de los sensores estén más fuertemente unidos al mismo que la interacción que se desea medir. Por otro lado, la molécula a detectar debe estar en su estado nativo y debe ser posible discriminar las interacciones inespecíficas de aquellas que son específicas. Finalmente, las interacciones detectadas deben representar aquellas de las moléculas individuales.

Fuerzas de interacción ligando-receptor al nivel de moléculas individuales

Tanto la localización de los receptores como la cinética de unión del ligando resultan aspectos fundamentales para entender las funciones celulares desencadenadas por los receptores. Sin embargo, muy pocas aproximaciones experimentales permiten brindar simultáneamente una visión de la dinámica espacial y temporal y de las fuerzas intermoleculares en células individuales (Lauffenburger y Linderman, 1993). Este tipo de estudios cuantitativos es esencial para comprender cómo las células responden diferencialmente a un mismo ligando. Esto resulta útil para estudiar la respuesta a drogas, (Rotsch y Radmacher, 2000), diferenciación (Kamba *et al.*, 2006) o bien cómo la unión del ligando puede depender del agregado (del inglés, *clustering*) de diversas moléculas en la sinápsis (Vyas *et al.*, 2004) o la asociaciones en el citoesqueleto en la formación de adhesiones focales (Avalos *et al.*, 2004).

La mayoría de las mediciones de fuerzas de interacción antígeno-anticuerpo y ligando-receptor así como el estudio de sus dinámicas de unión fue realizada por AFM hasta el momento con proteínas purificadas adheridas a superficies rígidas (Browning-Kelley *et al.*, 1997; Yip *et al.*, 1998; Merkel *et al.*, 1999; Schwesinger *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Slade *et al.*, 2002, Stroh *et al.*, 2004). Utilizar esta medición de fuerzas de interacción molecular en la escala de los pN para visualizar receptores individuales e inferir cinéticas de interacción ligando-receptor en células intactas y vivas sigue siendo un gran desafío.

Las diferencias detectadas en la señalización de ambas isoforma del IR motivaron el diseño de experimentos que permitieran medir la fuerza de interacción

entre el ligando y el receptor al nivel de moléculas individuales. Las herramientas generadas, evaluadas y detalladas en el comienzo de este trabajo de tesis resultaban ideales para estudiar interacciones ligando-receptor de insulina por AFM.

La hipótesis que surgió de los resultados presentados en los capítulos previos supone que diferencias en las fuerzas de interacción entre cada isoforma del IR y la insulina podían explicar en cierto grado las diferentes cinéticas de internalización y señalización observadas. Esto es consistente con los datos de la literatura acerca de las diferencias en la afinidad de ambas isoformas por diversos ligandos. Para esto, en colaboración con la Dra. Lía Pietrasanta y la Lic. Catalina von Bilderling (Centro de Microscopías Avanzadas, CMA) se diseñaron y se llevaron adelante experimentos tendientes a abordar los objetivos que se detallan a continuación.

Objetivos

1. Visualizar células HeLa por AFM
2. Funcionalizar la punta del AFM con insulina biológicamente activa
3. Medir fuerzas de interacción entre la insulina y cada una de las isoformas del IR en células vivas
4. Estudiar la dinámica de la espectroscopía de fuerza

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Visualización de células HeLa por AFM

Para adquirir familiaridad con la técnica, en primer lugar se visualizaron células HeLa fijadas en 3.7 % PFA crecidas en cubreobjetos sobre fibronectina para asegurar que no se despeguen durante la visualización. Las muestras se visualizaron en medio líquido y fue posible obtener imágenes de las mismas con alta resolución como se muestra en la **Figura 6.5**.

Las imágenes fueron adquiridas en modo de contacto intermitente (*tapping mode*). Durante el barrido, el sensor oscila verticalmente y la punta toma contacto con la superficie o lo pierde alternativamente. Mientras el sensor de fuerza interactúa intermitentemente con la superficie su oscilación necesariamente se reduce debido a pérdidas de energía producidas en el contacto de la punta con la muestra. Esta reducción en la amplitud de la oscilación es lo que permite obtener información de la

superficie. Sin embargo, durante el barrido en modo de contacto intermitente existe una retroalimentación que produce que la amplitud se mantenga constante. La amplitud de la oscilación es medida por un detector del controlador electrónico. La retroalimentación de tipo digital ajusta luego la separación entre la muestra y la punta del AFM de modo tal de mantener constante la amplitud y la fuerza en la muestra.

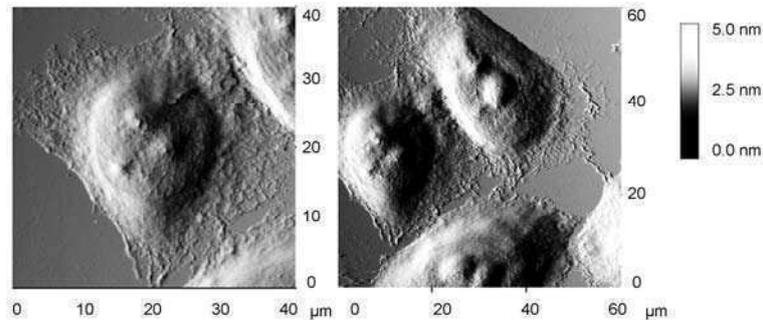


Figura 6.5. Visualización de células HeLa por AFM. Células HeLa fijadas en 3.7 % PFA visualizada por AFM en PBS en modo de contacto intermitente. Se utilizó un sensor de fuerza NP (Veeco) de nitruro de silicio cuya constante elástica fue $k = 0.58 \text{ N/m}$ y el radio nominal de la punta fue 20 nm. La barra ubicada a la derecha indica la escala de profundidad o altura (eje z).

La microscopía de fuerza atómica permitió obtener imágenes que muestran detalles topográficos de las células que por microscopía óptica no es posible observar. Mientras que la resolución en las direcciones x-y es $<25 \text{ nm}$ para AFM, la misma es de 300 nm en la microscopía confocal de barrido con láser. En el eje z las diferencias son aún más importantes: mientras que en AFM esta resolución es de 0.1 nm, la microscopía confocal sólo permite resolver 800 nm.

6.2.2. Funcionalización de los sensores de fuerza del AFM con insulina

La microscopía de fuerza atómica basada en el reconocimiento molecular (MR-AFM, por sus siglas en inglés, *Molecular recognition atomic force microscopy*) permite la detección y localización de eventos singulares basados en el reconocimiento entre pares ligando-receptor.

Para esto, en primer lugar, fue necesario modificar el sensor de fuerza del AFM de modo de tener al ligando unido al mismo. Esto permitió reconocer a los receptores localizados en la membrana plasmática de las células vivas midiendo la fuerza de interacción ligando-receptor. Se utilizó un sensor de fuerza con una punta modificada con una cadena de polietilenglicol como espaciador flexible con una biotina en el extremo. Para funcionalizarlo se lo incubó durante 1-2 h a TA con 1 μM SA en PBS. Luego de sucesivos lavados se incubó la punta así modificada con 2 μM BAC-Ins durante 1 h a TA en la solución Rab. Esta estrategia permitió obtener el ligando en la

punta del sensor del AFM y el receptor expresándose en la membrana plasmática de las células vivas (**Figura 6.6**).

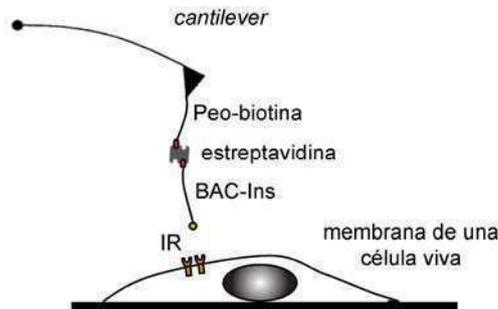


Figura 6.6. Funcionalización de la punta del AFM con insulina biológicamente activa. La punta del sensor de fuerza del AFM modificada con una cadena de Peo y una biotina en el extremo (Novoscan) fue incubada con $1 \mu\text{M}$ SA en PBS durante 1-2 h a TA, luego de varios lavados se modificó con $2 \mu\text{M}$ BAC-Ins en solución Rab durante 1 h a TA. Las células expresando el IR se crecieron sobre cubreobjetos previamente tratados con $5 \mu\text{g/ml}$ fibronectina / PBS.

La unión biotina-SA es una de las interacciones no covalentes más fuertes que existen en la naturaleza. Es también un sistema modelo para estudiar interacciones ligando-receptor. Experimentalmente, fue posible demostrar la capacidad del AFM de medir fuerzas discretas de ruptura al nivel de moléculas individuales (Lee *et al.* 1994). La medición directa de la ruptura de uniones individuales avidina-biotina (160 pN) y biotina-SA (257 pN) es posible con esta técnica (Florin *et al.*, 1994; Moy *et al.*, 1994).

Resultados previos de Catalina von Bilderling mostraron que la fuerza de interacción biotina-SA medida en el microscopio del CMA es de (172 ± 79) pN, siendo consistente con lo reportado por diversos grupos para esta fuerza de unión. Es importante contar con este dato dado que en este trabajo la punta fue modificada con SA y BAC-Ins, por lo tanto era imprescindible estar seguros de que la interacción insulina-IR medida fuera menor a la fuerza de unión biotina-SA. En caso contrario lo medido sería la ruptura de la unión no covalente entre la biotina y la SA de la punta modificada y no la que existe entre la insulina y el IR.

6.2.3. Medición de la interacción insulina-IR

La estrategia diseñada y llevada adelante hasta aquí permitió medir mapas de fuerza en células HeLa vivas sobreexpresando el IR-A o el IR-B o bien en células que no hubieran sido transfectadas, las cuales actuaron como uno de los controles dado que las células HeLa expresan endógenamente menos de 5000 IR/célula (McKeon *et al.*, 1990).

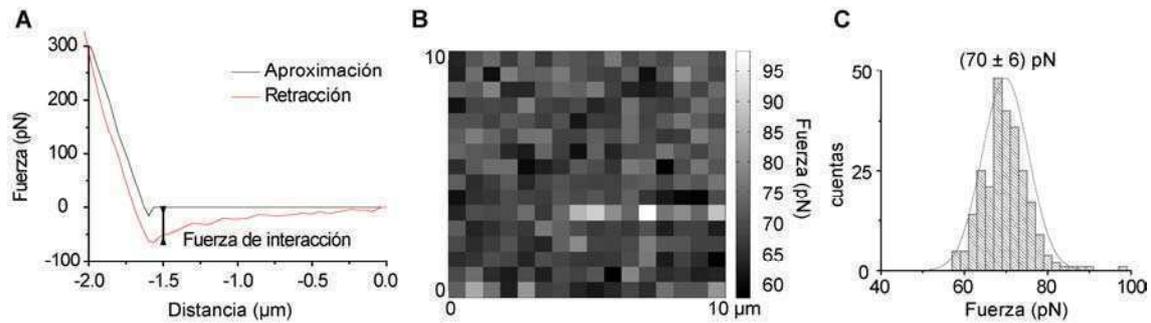


Figura 6.7. Interacción ligando-receptor por espectroscopía de fuerza atómica. **A.** Curva fuerza-distancia esquemática que muestra en negro las fuerzas medidas durante la aproximación de la punta a la muestra y en rojo las medidas durante la retracción. **B.** Mapa de fuerzas de adhesión obtenido de una muestra de células HeLa expresando el IR-A (hambreadas durante toda la noche) interactuando con una punta modificada con BAC-Ins. **C.** Histograma de la distribución de las fuerzas de interacción medidas en **B** provenientes de 256 curvas.

Se midió la fuerza de interacción en regiones de 10 μm x 10 μm realizando curvas de fuerza de 16 píxeles x 16 píxeles (es decir, 256 curvas por región). Los valores de la fuerza de adhesión se estimaron en cada píxel como la diferencia entre el mínimo de cada curva y el valor en el que se desprende la punta del AFM de la muestra en el ciclo de retracción (**Figura 6.7.A**) utilizando una rutina escrita en el Matlab. Estos datos para cada píxel se representaron en un mapa de fuerzas de adhesión (**Figura 6.7.B**) en el cuál una escala de grises muestra la magnitud de cada evento de adhesión (blanco: alta adhesión; negro: baja adhesión).

Finalmente, los datos de los mapas de fuerza se graficaron en histogramas mostrando así la distribución de las fuerzas de adhesión medidas en cada región analizada. En la **Figura 6.7.C** se muestra uno de estos histogramas obtenidos a partir de un mapa de fuerza en una región de 10 μm x 10 μm (256 curvas de fuerza) de una muestra de células HeLa transfectadas con el pcDNA3-IR-A utilizando una punta modificada con BAC-Ins. Se puede observar en este experimento que el pico de la distribución de Gauss se encuentra en (70 ± 6) pN. Este valor se encuentra en el orden de las interacciones ligando-receptor reportadas en otros sistemas biológicos (Hinterdorfer y Dufrêne, 2006; Evans y Calderwood, 2007; Lee *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008), siendo además menor que la unión biotina-SA.

6.2.4. El IR-A interactúa más fuertemente con la insulina que el IR-B

Los resultados presentados a lo largo de la tesis muestran las diferencias en la señalización e internalización de ambas isoformas del IR. La funcionalidad de las herramientas generadas motivó diseñar experimentos de espectroscopía de fuerza con células expresando el IR-A o el IR-B de modo de evaluar si la interacción física de cada isoforma con la insulina es diferente. Se procedió de manera similar a lo que se

describió anteriormente y se evaluaron 6 células expresando el IR-A, 6 células expresando el IR-B y 6 no transfectadas midiendo en cada una de ellas 256 curvas de fuerza. Los datos provenientes de todas las curvas de fuerza medida para cada grupo de células se incluyeron en los histogramas que se muestran en la **Figura 6.8**.

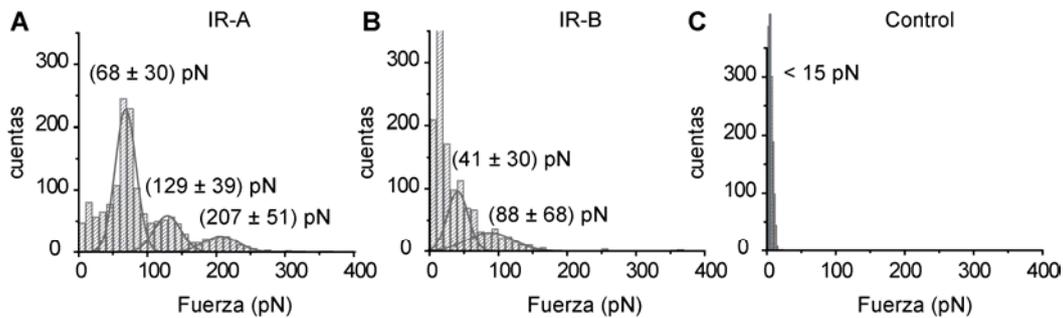


Figura 6.8. Interacción del IR con insulina. Células HeLa sobreexpresando el IR-A (A) o el IR-B (B) o bien células no transfectadas (C, control) fueron hambreadas durante la noche anterior a la medición de los mapas de fuerza. Los histogramas incluyen los datos de las curvas de fuerza de 6 células de cada tipo. Para cada célula se tomó una región de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ y se midieron 256 curvas de fuerzas en cada una. Se realizaron los ajustes a distribuciones de Gauss y se muestran los máximos de las mismas. Para la espectroscopía de fuerza se utilizaron sensores de fuerza con puntas modificadas con una cadena de Peo y una biotina en el extremo que se incubaron con $1 \mu\text{M}$ SA durante 1-2 h y luego con $2 \mu\text{M}$ BAC-Ins. Las mediciones se realizaron con las células vivas crecidas sobre fibronectina en medio de cultivo DMEM sin aditivos.

La fuerza de adhesión medida en células transfectadas resultó diferente de la adhesión medida en células control. Mientras en el caso de células HeLa sin transfectar todas las interacciones detectadas resultaron menores de 15 pN (**Figura 6.8.C**), cuando las células habían sido transfectadas con alguno de los pcDNA3-IR (A o B) se detectaron interacciones de significativa mayor magnitud. Los histogramas permiten observar la distribución de las fuerzas de adhesión para cada una de las isoformas del IR.

Por otro lado, las dos isoformas del IR presentan los máximos de sus distribuciones de fuerza en magnitudes distintas. Estos máximos constituyen lo que se conoce como fuerzas características de interacción ligando-receptor. Para el IR-A esta interacción característica medida es de (68 ± 30) pN (**Figura 6.8.A**), mientras que para el IR-B es de (41 ± 30) pN (**Figura 6.8.B**).

El tercer aspecto relevante fue que para ambas isoformas se encontraron máximos de menor frecuencia cuya fuerza de interacción resultó ser aproximadamente un múltiplo de la fuerza característica: para el IR-A estos picos fueron de (129 ± 39) pN y (207 ± 51) pN; y para el IR-B de (88 ± 68) pN. Esto podría indicar que una molécula de ligando (de la punta del AFM) se une a dos receptores vecinos, pero esto resulta poco probable ya que el bolsillo dentro del cual se une el ligando en la estructura del IR no permitiría que una misma molécula de insulina esté accesible a dos sitios de

unión de dos receptores. La otra opción es que dos moléculas de insulina unidas a la punta del AFM estén interaccionando con dos receptores cercanos y que por lo tanto la fuerza medida sea del doble, del triple o del cuádruple, corroborando además así que las interacciones características de cada receptor son diferentes entre sí.

6.2.5. La interacción ligando-receptor disminuye en presencia de rhIns libre

Un aspecto clave en los experimentos de reconocimiento molecular es demostrar la especificidad de la interacción medida. Uno de estos controles fue medir la interacción en células no transfectadas en las que pudo verse que las interacciones no superaban los 15 pN (**Figura 6.8.C**).

Asimismo, se midió la fuerza de interacción en células sobreexpresando el IR antes y después del agregado de rhIns libre a la muestra en estudio (**Figura 6.9**).

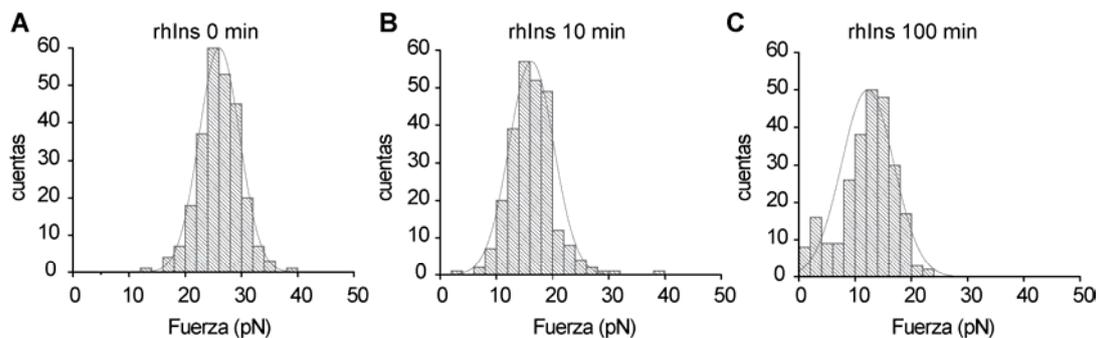


Figura 6.9. La interacción insulina-IR en presencia de rhIns libre. Se midió la interacción en células HeLa sobreexpresando el IR-A que fueron hambreadas durante toda la noche. Los histogramas incluyen los datos de 256 curvas de fuerza tomadas en la misma región antes de agregar rhIns libre (**A**) o bien 10 min más tarde del agregado de 8 μ M rhIns (**B**) o luego de 100 min (**C**).

Si la interacción es específica debe desaparecer o disminuir en presencia de ligando libre. Este experimento permitió ver que la interacción medida luego de agregar 8 μ M rhIns disminuyó significativamente confirmando la especificidad de las interacciones ligando-receptor determinadas.

6.2.6. La interacción ligando-receptor medida depende de la tasa de carga

Las fuerzas de interacción entre ligandos y receptores medidas a una velocidad constante de retracción representan solamente un punto de un espectro continuo de fuerzas de interacción ya que tanto la predicción teórica (Evans y Ritchie, 1997) como los experimentos (Fitz *et al.*, 1998; Merkel *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004) muestran que esto depende del tiempo en el que se produce el acercamiento y la interacción antes de la retracción (tasa de carga). La tasa de carga puede

aproximarse al producto entre la constante elástica del *cantilever* (k) y la velocidad de retracción, $v_{\text{retracción}}$, (**ecuación 6.1**):

$$r = k \cdot v_{\text{retracción}} \quad \text{[ec. 6.1]}$$

Por lo tanto la tasa de carga puede variarse modificando la velocidad de retracción o bien la constante elástica del *cantilever*. Se espera que dentro de ciertos límites se establezca una relación lineal entre el logaritmo de la tasa de carga y la fuerza de interacción medida.

Para entender la dependencia entre la tasa de carga y la fuerza de interacción es necesario tener en cuenta que las uniones entre ligandos y receptores poseen un tiempo de vida media que se acorta en presencia de una fuerza aplicada sobre esta unión debido a la activación térmica. De hecho, la energía térmica del medio que circunda al enlace puede provocar que se rompa la unión ligando-receptor incluso sin la presencia de una fuerza externa. Existe un tiempo de vida media, $\zeta(0)$, que es el necesario para que se produzca la pérdida de interacción de modo espontáneo y está dado por la inversa de la constante cinética (k_{off}) en solución (**ecuación 6.2**).

$$\zeta(0) = \frac{1}{k_{\text{off}}} \quad \text{[ec. 6.2]}$$

Cuando la retracción se produce más rápidamente que este tiempo es posible, entonces, medir una fuerza de interacción. La escala de tiempos del AFM (desde los milisegundos a los segundos) se encuentra dentro de los tiempos de activación térmica. Es posible describir matemáticamente cómo una fuerza (F) actúa sobre un complejo ligando-receptor disminuyendo la barrera de disociación y acortando el tiempo de vida media de la unión, $\zeta(F)$, a través de la **ecuación 6.3** (Bell, 1978; Evans y Ritchie, 1997):

$$\zeta(F) = \zeta(0) \exp\left(-\frac{x_{\beta} F}{k_B T}\right) \quad \text{[ec. 6.3]}$$

donde x_{β} es la proyección térmica promedio de la barrera de energía en la dirección de la fuerza, $\zeta(F)$ es el tiempo de vida media de la interacción en presencia de la fuerza F , k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta.

La fuerza de interacción ligando-receptor puede medirse en función de la tasa de carga ya que $r = dF / dt$. Esta aproximación es muy útil dado que permite obtener parámetros cinéticos del proceso de interacción. La ruptura de un enlace es un

proceso estocástico y la probabilidad de que un enlace sobreviva se puede expresar como una probabilidad en función del tiempo, $N(t)$, de estar en el estado de unión bajo una fuerza que se incrementa linealmente según la **ecuación 6.4** (Strunz *et al.*, 2000):

$$dN(t)/dt = -k_{\text{off}}(r)N(t) \quad [\text{ec. 6.4}]$$

Por lo tanto, suponiendo que una única barrera de energía gobierna el proceso de disociación, el máximo de las distribuciones de fuerza a diferentes tasa de cargas (F^*) depende de manera logarítmica de la tasa de carga de acuerdo a la **ecuación 6.5**:

$$F^* = F_{\beta} \ln(r k_{\text{off}}^{-1} / F_{\beta}) \quad [\text{ec. 6.5}]$$

donde F_{β} es la escala de fuerza dada por la relación entre la energía térmica ($k_B T$) y x_{β} (Evans y Ritchie, 1997; Strunz *et al.*, 2000). Por lo tanto al graficar F^* en función del log (r) se obtiene una línea recta. Hay en la literatura varios ejemplos de este tipo de comportamiento en la interacción entre ligandos y receptores (Fritz *et al.*, 1998; Ros *et al.*, 1998; Kienberger *et al.*, 2000).

Para poner a prueba esto, se midió la fuerza de interacción insulina-IR variando la velocidad de retracción en un rango entre 0.32 $\mu\text{m/s}$ y 2.4 $\mu\text{m/s}$. Luego de calcular la tasa de carga según la **ecuación 6.1** se realizaron los gráficos de r (en escala logarítmica) en función de la fuerza de adhesión medida.

En la **Figura 6.10** se presenta el espectro dinámico de fuerza para una célula sobreexpresando el IR-A mostrando que existe una relación lineal entre el logaritmo de la tasa de carga y la fuerza de interacción. Esto está de acuerdo con la **ecuación 6.5** (Evans y Ritchie, 1997; Strunz *et al.*, 2000), permitiendo confirmar la mediciones realizadas.

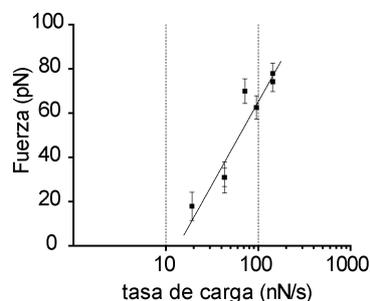


Figura 6.10. Espectro dinámico de la fuerza de interacción insulina-IR. Se midió la fuerza de interacción variando la velocidad de retracción entre 0.32 $\mu\text{m/s}$ y 2.4 $\mu\text{m/s}$. Cada punto representa el pico de una distribución de Gauss de 256 curvas de fuerza. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dichas distribuciones. Los datos experimentales de fuerzas de interacción muestran una dependencia lineal con el logaritmo de la tasa de carga.

6.3. DISCUSIÓN

Los procesos de interacción ligando-receptor han sido ampliamente estudiados utilizando técnicas bioquímicas. Actualmente, es posible abordar este tipo de estudios al nivel de moléculas individuales y en células vivas con alta resolución. La espectroscopía de fuerza y la microscopía de fuerza atómica hacen posible, por un lado, visualizar topografías con una resolución tridimensional de aproximadamente 0.1 nm y, a su vez, medir fuerzas de interacción entre receptores localizados en la superficie celular y sus ligandos. Recientemente este tipo de estudios han sido utilizados con algunos receptores de membrana. Esta aproximación permite el análisis de los procesos de unión de ligandos a sus receptores de un modo que complementa la visión bioquímica con los fundamentos físicos y de interacción de moléculas individuales.

Se han publicado pocos trabajos de AFM que involucran a la insulina o al IGF-II y sus receptores, pero ninguno aún *in vivo*. En uno de ellos se miden fuerzas de interacción entre monómeros de insulina modificando la punta del sensor de fuerza con insulina y haciéndolo interactuar con insulina depositada sobre mica (Yip *et al.*, 1998). Otro trabajo muestra la visualización de receptores de insulina reconstituidos sobre una bicapa lipídica (Slade *et al.*, 2002). Más recientemente fue posible detectar el IGF-II unido a receptores en células vivas pero modificando el sensor con un anticuerpo capaz de reconocer al IGF-II unido al receptor (Han *et al.*, 2008).

En esta parte de la tesis fue posible funcionalizar la punta del AFM con insulina biotinilada activa biológicamente a través de la unión biotina-SA. Se utilizó una punta modificada con un grupo Peo como espaciador para tener un sistema de medición flexible. Esto es importante dado que el sitio de unión de insulina dentro del IR no se encuentra expuesto según la conformación propuesta en el modelo de la “V invertida” (Ward *et al.*, 2006). En el trabajo presentado en este capítulo se midió la interacción directa entre la insulina y el IR en células vivas. Esto permitió, por primera vez, estudiar esta interacción ligando-receptor con una técnica de muy alta resolución y al nivel de moléculas individuales.

Como ya se ha detallado a lo largo de esta tesis, numerosos trabajos han estudiado las propiedades de unión de la insulina a cada una de las isoformas del IR con aproximaciones fundamentalmente bioquímicas. La mayor parte de ellos concluyen que el IR-A posee una afinidad mayor por insulina que el IR-B (Mosthaf *et al.* 1990; Yamaguchi *et al.* 1991; Benyoucef *et al.* 2007; Blanquart *et al.* 2008). Pero

estas diferencias son mucho mayores cuando se trata del IGF-II ya que el IR-A presenta un afinidad aproximadamente 10 veces mayor que el IR-B por este ligando (Yamaguchi *et al.*, 1993).

Esta evidencia, en conjunto con los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, motivó el estudio de la interacción ligando-receptor entre la insulina y las isoformas del IR. Para ello se utilizaron las herramientas presentadas anteriormente y una técnica de alta resolución como es la espectroscopía de fuerza atómica. Los resultados muestran que la interacción con insulina es diferente para cada isoforma del IR. Esto es interesante dado que la única diferencia entre ellas es la presencia o ausencia de solo unos pocos aminoácidos en la región inmediatamente río abajo del péptido C-terminal esencial para la unión de ligando (Kristensen *et al.*, 1999; Surinya *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2007).

La fuerza de interacción medida entre la insulina y el IR-A resultó mayor que para el IR-B. Estas diferencias son consistentes con el conjunto de resultados presentados en la tesis y los datos de literatura existentes.

Cuatro aproximaciones experimentales permiten afirmar que la interacción medida es específica. Por un lado, las células no transfectadas mostraron una fuerza de interacción significativamente menor que las transfectadas. Las células HeLa expresan niveles bajos de expresión del IR endógeno, por lo tanto los histogramas obtenidos de células no transfectadas se encuentran centrados en valores bajos de fuerza. Por otro lado, los múltiples máximos de los histogramas de las células transfectadas resultan ser múltiplos unos de otros (**Figura 6.8**). Esto confirma, por un lado, que las interacciones medidas son reales y, por otro, que las diferencias entre las isoformas también lo son. En tercer lugar, el máximo de las distribuciones de fuerza a diferentes tasas de cargas (*loading rate*) se comprobó que depende de manera logarítmica de la tasa de carga (**Figura 6.10; ecuación 6.5**). Finalmente, en presencia de insulina libre la fuerza de interacción disminuye y no se observa la multiplicidad en los máximos (**Figura 6.9**). Si bien la interacción no desaparece, esta disminuye a valores que son similares a los obtenidos en células no transfectadas. En el caso del receptor del factor de crecimiento vascular (VGFR), también se han detectado este tipo de interacciones en presencia de un anticuerpo libre bloqueante. Los autores detectan interacciones ligando (anticuerpo)-receptor de 33 pN y 64 pN y en presencia del anticuerpo bloqueante la interacción medida disminuye a 13 pN (Lee *et al.*, 2007).

Este tipo de mediciones de unión de ligandos a sus receptores sobre superficies de células individuales permite realizar predicciones acerca de la dinámica de la interacción, de la cinética de disociación y de efectos de agregación de receptores inducidos por la unión del ligando (Lee *et al.*, 2007). Con este objetivo se analizarán los datos obtenidos en las mediciones realizadas en este trabajo de modo de obtener información acerca del equilibrio de disociación ligando-receptor. Se calcularán las constantes k_{off} como se describió anteriormente y k_{on} a partir de los ensayos de competencia con el ligando libre. Con estos datos será posible estimar la constante de equilibrio del proceso de disociación ligando-receptor para cada isoforma del IR.

El IR es un receptor dimérico que presenta esta estructura de “V invertida” descrita en la **Introducción** y que, como dímero, presenta dos sitios de unión a ligando (sitio 1 y 2' de un lado de la “V invertida” y 1' y 2 del otro lado). Resulta, por lo tanto de interés, estudiar los fenómenos de unión a cada sitio y la afinidad mayor y menor de cada uno con esta técnica. Los datos medidos permitirán realizar estimaciones de los procesos de equilibrio que se establecen y será necesario analizarlos en el marco de este modelo.

IV. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

IV. Consideraciones finales y perspectivas

En esta tesis se estudió la dinámica espacial y temporal de las dos variantes de *splicing* del IR en respuesta a dos de sus ligandos, insulina e IGF-II. Se caracterizaron las fuerzas de unión entre ligando y receptor y el comportamiento de ambas isoformas de manera dinámica. Se correlacionó la localización celular y la velocidad de internalización de los complejos ligando-receptor con la señalización mitogénica y metabólica río abajo de los receptores.

Fue posible generar un conjunto de herramientas que permitieron visualizar procesos celulares *in vivo* por microscopía de epifluorescencia y confocal. Estas herramientas fueron además aplicadas al estudio cuantitativo de la endocitosis de cada isoforma del IR en respuesta a insulina y a IGF-II en células individuales tanto por microscopía confocal como por citometría de flujo. Las herramientas generadas y evaluadas se presentaron además como adecuadas para estudiar fenómenos de interacción ligando-receptor entre la insulina y el IR-A y el IR-B por técnicas de alta resolución. En este trabajo se utilizó la microscopía de fuerza atómica para entender si la interacción molecular entre la insulina y cada IR podía ser uno de los mecanismos o razones de las diferencias detectadas en su comportamiento biológico. Los resultados de la espectroscopía de fuerza atómica descriptos demuestran que la interacción entre la insulina y el IR-A es mayor que para el IR-B. Estas diferencias detectadas son consistentes con el cuerpo de resultados presentados a lo largo de la tesis y también con la gran variedad de datos bioquímicos existentes en la literatura.

El complejo ligando-IR fue visualizado en diferentes etapas del tráfico vesicular luego de la endocitosis. La microscopía confocal permitió realizar estudios de colocalización entre el ligando, el receptor y diversos compartimentos de la vía endocítica. Estos demostraron que, mientras la asociación de la insulina con su receptor en la membrana plasmática y en endosomas tempranos es alta, las etapas posteriores muestran que el grado de colocalización es menor reflejando posiblemente la disociación del ligando del receptor en endosomas tardíos y en lisosomas dado el pH ácido de estos compartimentos.

IV. Consideraciones finales y perspectivas

El análisis cuantitativo de la endocitosis en células individuales demostró que el IR-A se internaliza a tiempos cortos a mayor velocidad que la isoforma B tanto en respuesta a insulina como a IGF-II. Es posible que las diferencias en las propiedades de endocitosis de las dos variantes de *splicing* del IR sean tejido específicas y potencialmente importantes en la regulación del reciclado y traducción del IR *in vivo*.

Las diferencias evidenciadas en la endocitosis condujeron a explorar la influencia de este fenómeno río abajo del receptor. Teniendo en cuenta que el IR-A es propuesto como la isoforma más mitogénica y el IR-B como la más metabólica, el estudio continuó analizando cuatro eventos de la señalización: la activación por autofosforilación del receptor (evento inicial), la fosforilación de Akt y la activación de ERK 1/2 (eventos inmediatos) y un efecto mitogénico tardío como es la inducción de la transcripción génica. En esta parte fue posible demostrar que un mismo ligando (la insulina) activa en mayor medida la cascada mitogénica a través del IR-A que a través el IR-B presentando una activación más temprana de ERK 1/2 y estimulando en mayor grado la transcripción génica mediada por el factor AP-1. El IR internalizado unido a ligando puede continuar fosforilando moléculas efectoras apoyando, así, la hipótesis de que los efectos mitogénicos del IR son señalizados desde los endosomas. En cambio, el IR-B al internalizarse de manera más lenta señala mayormente desde la membrana hacia la vía de Akt regulando el metabolismo de la glucosa.

Por lo tanto, se propuso a la dinámica de internalización como el posible mecanismo responsable de la señalización diferencial de las dos isoformas del IR en respuesta a un mismo ligando (**Figura IV.1**). Se planteó un modelo de activación diferencial donde el IR-A se activa más y de forma más sostenida internalizándose más rápido, activando así la vía mitogénica desde los endosomas. Por otro lado, la isoforma B se internaliza de forma más lenta, permitiendo mayor señalización desde la membrana, gatillando la fosforilación de Akt, regulando por esta vía la actividad de enzimas metabólicas y la translocación a la membrana plasmática del GLUT4.

Además de la localización celular (membrana versus endosomas), un factor capaz de modular la respuesta desencadenada por el IR es el patrón de fosforilación de su dominio intracelular. Esto regula la internalización del receptor y también la divergencia en la señalización de la vía metabólica y la mitogénica. Los resultados obtenidos de los experimentos de internalización mostraron que el IR-A se internaliza más que el IR-B y además esta isoforma es la que presenta niveles de autofosforilación más elevados y sostenidos. Patrones de fosforilación diferenciales

IV. Consideraciones finales y perspectivas

podrían explicar en parte la señalización del IR-A hacia la vía mitogénica y del IR-B hacia la metabólica y las diferencias en su dinámica de endocitosis.

De esta forma, el modelo propuesto muestra dos aspectos responsables de la modulación de la señalización diferencial de las isoformas del IR en respuesta a ligando. Uno de estos es la localización de los receptores en la membrana o en endosomas y el otro los patrones de fosforilación (**Figura IV.1**).

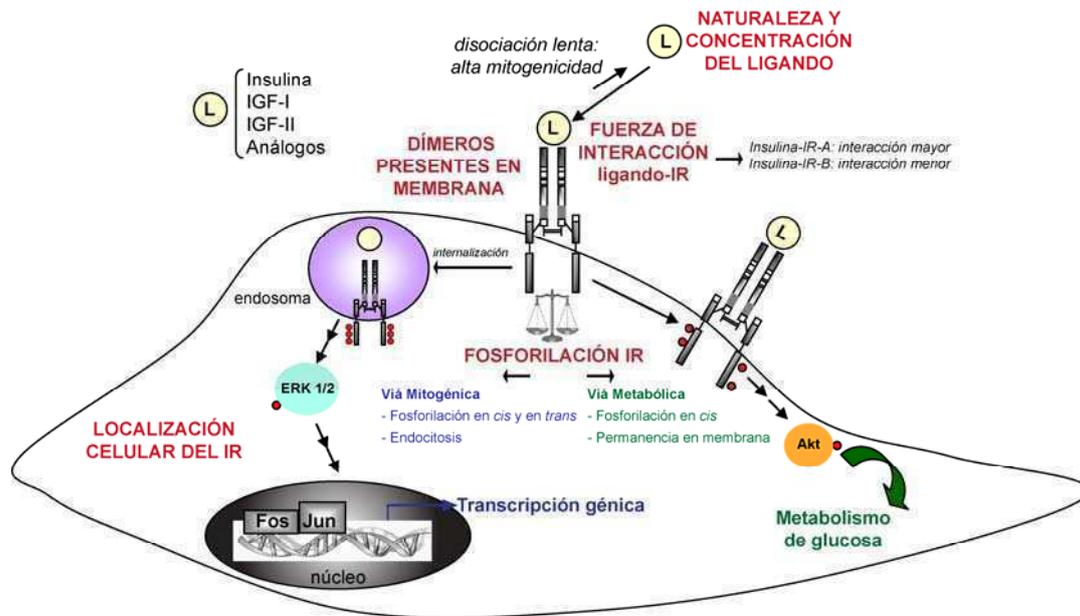


Figura IV.1. Esquema final. Señalización diferencial de las dos variantes del IR en respuesta a diversos ligandos. Los círculos rojos indican grupos fosfato.

La extensión del análisis a otro ligando, el IGF-II, permitió estudiar la divergencia de las cascadas de señalización desde otra perspectiva: ¿qué sucede con un mismo receptor cuando uno es un ligando mitogénico como es el IGF-II o uno metabólico como la insulina? Ambos receptores mostraron internalizar al IGF-II con una cinética más rápida que a la insulina. Esto es consistente con el modelo propuesto ya que un ligando predominantemente proliferativo será internalizado más rápidamente para poder señalizar desde los endosomas la cascada mitogénica. A su vez, el IGF-II mostró inducir la endocitosis del IR-A más rápidamente que la del IR-B. Por lo tanto, desde la membrana plasmática el IR gatilla respuestas metabólicas y dentro de los endosomas su señalización por la vía de las MAPK es más proliferativa y mitogénica. Por otro lado, la insulina mostró una respuesta más coincidente con la vía metabólica que el IGF-II a través del mismo receptor IR-A. Los resultados del trabajo con los dos ligandos y los dos receptores permitió confirmar doblemente el modelo propuesto por el lado de los receptores con diferencias en su señalización metabólica

IV. Consideraciones finales y perspectivas

y mitogénica y porque existen dos ligandos capaces de unirse y de activarlos diferencialmente.

La divergencia en la señalización de dos receptores que difieren tan solo en 12 aminoácidos en su porción extracelular y son idénticos en su dominio intracelular y catalítico fue explorada de un modo complementario. Se generó un dominante negativo del IR (IR-B-A1x3) capaz de unir insulina pero no de internalizarse. La dominancia negativa fue demostrada sobre el IR-A tanto en la vía mitogénica como en la metabólica. En cambio, para la isoforma B esta dominancia negativa se manifestó solamente sobre la cascada mitogénica. Por lo tanto, se trataría de un dominante negativo selectivo de la vía mitogénica. Esta mutante retiene a los receptores funcionales en la membrana plasmática, siendo entonces consistente con que sea un dominante negativo selectivo de la vía mitogénica. Cuando es el IR-B el receptor retenido en la superficie celular, la activación de Akt y su reclutamiento a la membrana en respuesta a insulina es mayor que en células expresando el IR-A. Esto confirmaría la hipótesis de que la señalización a través de Akt requiere la permanencia del receptor en la membrana. La no internalización de los receptores funcionales al coexpresarse con el dominante negativo sugiere que la fosforilación en *trans* no se produce y que por lo tanto los dímeros formados entre los IR funcionales y el IR-B-A1x3 permanecen más tiempo en membrana. Dado que la activación de la vía metabólica no requiere la activación completa de la quinasa del IR, la activación de Akt se incrementa cuando el IR-B es retenido por el dominante negativo. En cambio, para el IR-A el efecto es distinto pues esta isoforma presenta menor capacidad de activar a Akt porque es menos capaz de reclutarla a la membrana lo cual también fue probado en este trabajo.

Otro aspecto que puede modular la señalización es la identidad de los homodímeros o heterodímeros presentes en la membrana. Se estudió, por lo tanto, la existencia de los híbridos IR-A/IR-B en la membrana plasmática utilizando una quimera del IR (IR-B-A1x3) capaz de ser modificada extracelularmente. Esta estrategia permitió purificar y analizar los receptores presentes en la superficie celular exclusivamente. La hipótesis a partir de los resultados obtenidos al coexpresar los IR funcionales con el IR-B-A1x3 fue que los dímeros IR-A/IR-B-A1x3 (isoformas diferentes) e IR-B/IR-B-A1x3 (iguales isoformas) no se formarían de la misma manera. Pudo demostrarse que se forman dímeros entre el IR-B-A1x3 y el IR-A y entre el IR-B-A1x3 y el IR-B por experimentos de *pull down* detectando solamente la proteína presente en la superficie celular. Al estudiar con esta aproximación si la formación de

IV. Consideraciones finales y perspectivas

estos dímeros es aleatoria o no pudo observarse que para el IR-B ocurre de manera estocástica. En cambio, se observó que la formación de dímeros IR-A/IR-B-A1x3 se encuentra desfavorecida. Si bien esto demuestra la existencia de receptores híbridos, confirma la existencia de un mecanismo de segregación en el RE y el Golgi que distingue a las isoformas del IR durante el procesamiento.

La **Figura IV.1** resume en un esquema el modelo propuesto durante la tesis a partir de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta los datos existentes en la literatura. Se muestra la señalización diferencial de las dos isoformas del IR en respuesta a diversos ligandos. La divergencia en las vías mitogénica y metabólica estaría modulada por diversos factores: i) por un lado, la naturaleza del ligando al nivel de la interacción del mismo con el receptor; ii) por otro, la localización del receptor ya sea en la membrana plasmática o bien en endosomas donde es capaz de continuar señalizando iii) los patrones y el grado de fosforilación; iv) la presencia de receptores híbridos en membrana.

Si bien, el IR y el IGF-IR y asimismo el IR-A y el IR-B, poseen funciones superpuestas, otras son específicas de cada uno. Esto sugiere un grado de especialización adquirido a lo largo de la evolución. Sin embargo, los mecanismos moleculares y evolutivos a través de los cuales se seleccionó la especialización de cada receptor continúan siendo una pregunta abierta. La isoforma A del IR se encuentra presente tanto en invertebrados como en vertebrados. La aparición de la nueva variante del *splicing* alternativo del mensajero del IR permitió separar las funciones metabólicas de las mitogénicas. Esto es coincidente con la aparición de la viviparidad y la necesidad de separar la regulación metabólica de la madre del crecimiento del embrión. Cada una de estas vías de señalización ha sido ampliamente estudiada desde el descubrimiento de la existencia de las dos isoformas del IR en 1985. En numerosas oportunidades los resultados y conclusiones de aproximaciones bioquímicas han sido controversiales. Esto se ha discutido en la literatura y en este trabajo y probablemente sea debido a la complejidad del modelo en estudio. La insulina, los factores de crecimiento y el IR se expresan en todos los tejidos estando involucrados en procesos esenciales del crecimiento y el metabolismo celular. En este sentido, es posible afirmar que su funcionamiento y mecanismos de acción son generales. Pero, al mismo tiempo, su regulación es lo suficientemente específica de cada tipo celular, como para mostrar particularidades al ser estudiada. Es por este motivo, que la combinación de técnicas bioquímicas y aquellas que permiten el análisis de moléculas y células individuales así como la interdisciplinariedad en el abordaje de

IV. Consideraciones finales y perspectivas

las hipótesis presentadas a lo largo de esta tesis representan un avance importante en los estudios de la señalización a través del IR. Además se proponen como estrategia para profundizar en el entendimiento molecular de la divergencia de la transducción de señales y de los mecanismos a través de los cuales se adquirió la especialización de receptores y ligandos.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, T.E., Epa, V.C., Garrett, T.P. y Ward, C.W. 2000. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol. Life Sci.* **57**: 1050-1093.
- Ahn, J., Donner, D.B. y Rosen, O.M. 1993. Interaction of the human insulin receptor tyrosine kinase from the baculovirus expression system with protein kinase C in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **268**: 7571-7576.
- Al-Hasani, H., Eisermann, B., Tennagels, N., Magg, C., Passlack, W., Koenen, M., Müller-Wieland, D., Meyer, H.E. y Klein, H.W. 1997. Identification of Ser1275 and Ser1309 as autophosphorylation sites of the insulin receptor. *FEBS Lett.* **400**: 65-70.
- Anderson, C.M., Henry, R.R., Knudson, P.E., Olefsky, J.M. y Webster, N.J. 1993. Relative expression of insulin receptor isoforms does not differ in lean, obese, and noninsulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**: 1380-1382.
- Ando, A., Momomura, K., Tobe, K., Yamamoto-Honda, R., Sakura, H., Tamori, Y., Kaburagi, Y., Koshio, O., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Kasuga, M. y Kadowaki, T. 1992. Enhanced insulin-induced mitogenesis and mitogen-activated protein kinase activities in mutant insulin receptors with substitution of two COOH-terminal tyrosine autophosphorylation sites by phenylalanine. *J. Biol. Chem.* **267**: 12788-12796.
- Andrews, N.L., Pfeiffer, J.R., Martinez, A.M., Haaland, D.M., Davis, R.W., Kawakami, T., Oliver, J.M., Wilson, B.S. y Lidke, D.S. 2009. Small, mobile Fc epsilon RI receptor aggregates are signaling competent. *Immunity* **31**: 469-479.
- Angel, P. y Karin, M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**: 129-157.
- Avalos, A.M., Arthur, W.T., Schneider, P., Quest, A.F.G., Burridge, K. y Leyton, L. 2004. Aggregation of integrins and RhoA activation are required for Thy-1-induced morphological changes in astrocytes. *J. Biol. Chem.* **279**: 39139-39145.
- Backer, J.M., Kahn, C.R., Cahill, D.A., Ullrich, A. y White, M.F. 1990. Receptor mediated internalization of insulin requires a 12-amino acid sequence in the juxtamembrane region of the insulin receptor beta-subunit. *J. Biol. Chem.* **265**: 16450-16454.
- Backer, J.M., Schroeder, G.G., Kahn, C.R., Myers, M.G., Wilden, P.A., Cahill, D.A., y White, M.F. 1992. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity maps to insulin receptor regions required for endogenous substrate phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **267**: 1367-1374.
- Bandyopadhyay, D., Kusari, A., Kenner, K.A., Liu, F., Chernoff, J., Gustafson, T.A. y Kusari, J. 1997. Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin. *J. Biol. Chem.* **272**: 1639-1645.
- Bartke, A., Chandrashekar, V., Dominici, F., Turyn, D., Kinney, B., Steger, R. y Kopchick, J.J. 2003. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and aging: controversies and new insights. *Biogerontology* **4**: 1-8.

V. Referencias bibliográficas

- Baserga, R., Peruzzi, F. y Reiss, K. 2003. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int. J. Cancer* **107**: 873-877.
- Bass, J., Chiu, G., Argon, Y. y Steiner, D.F. 1998. Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization. *J. Cell Biol.* **141**: 637-646.
- Belfiore, A. 2007. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr. Pharm. Des.* **13**: 671-686.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L. y Vigneri, R. 2009. Insulin receptor isoforms and Insulin receptor / Insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews* **30**:1-38.
- Bell, G.I. 1978. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* **200**: 618-627.
- Benecke, H., Flier, J.S. y Moller, D.E. 1992. Alternatively spliced variants of the insulin receptor protein. Expression in normal and diabetic human tissues. *J. Clin. Invest.* **89**: 2066-2070.
- Benyoucef, S., Surinya, K.H., Hadaschik, D. y Siddle, K. 2007. Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. *Biochem. J.* **403**: 603-613.
- Bergeron, J.J., Di Guglielmo, G.M., Baass, P.C., Authier, F. y Posner, B.I. 1995. Endosomes, receptor tyrosine kinase internalization and signal transduction. *Biosci. Rep.* **15**: 411-418.
- Biener, Y., Feinstein, R., Mayak, M., Kaburagi, Y., Kadowaki, T. y Zick, Y. 1996. Annexin II is a novel player in insulin signal transduction. Possible association between annexin II phosphorylation and insulin receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **271**: 29489-29496.
- Binnig, G., Quate, C.F. y Gerber, C. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**: 930-933.
- Blanquart, C., Achi, J. e Issad, T. 2008. Characterization of IRA/IRB hybrid insulin receptors using bioluminescence resonance energy transfer. *Biochem. Pharm.* **76**: 873-883.
- Borisov, N., Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., Legewie, S., Berkhout, J., Maiwald, T., Kaimachnikov, N.P., Timmer, J., Hoek, J.B. y Kholodenko, B.N. 2009. Systems-level interactions between insulin-EGF networks amplify mitogenic signaling. *Molecular Systems Biology* **5**: 256. doi:10.1038/msb.2009.19.
- Bossenmaier, B., Mosthaf, L., Mischak, H., Ullrich, A. y Häring, H.U. 1997. Protein kinase C isoforms beta 1 and beta 2 inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. *Diabetologia* **40**: 863-866.
- Boute, N., Pernet, K. e Issad, T. 2001. Monitoring the activation state of the insulin receptor using bioluminescence resonance energy transfer. *Mol. Pharmacol.* **60**: 640-645.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

V. Referencias bibliográficas

- Brandt, J., Andersen, A.S. y Kristensen, C. 2001. Dimeric fragment of the insulin receptor α -subunit binds insulin with full holoreceptor affinity. *J. Biol. Chem.* **276**: 12378-12384.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R. y Hafen, E. 2001. An evolutionarily conserved function of the Drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* **11**: 213-221.
- Browning-Kelley, M.E., Wadu-Mesthrige, K., Hari, V. y Liu, G.Y. 1997. Atomic force microscopic study of specific antigen/antibody binding. *Langmuir* **13**: 343-350.
- Bustamante, C., Chemla, Y.R., Forde, N.R. e Izhaky, D. 2004. Mechanical processes in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 705-748.
- Cambi, A., Lidke, D.S., Arndt-Jovin, D.J., Figdor, C.G. y Jovin, T.M. 2007. Ligand-conjugated quantum dots monitor antigen uptake and processing by dendritic cells. *Nano Lett.* **7**: 970-977.
- Cann, A.D., y Kohanski, R.A. 1997. Cis-autophosphorylation of juxtamembrane tyrosines in the insulin receptor kinase domain. *Biochemistry* **36**: 7681-7689.
- Carpentier, J.L., Van Obberghen, E., Gorden, P. y Orci, L. 1981. Surface redistribution of ^{125}I -insulin in cultured human lymphocytes. *J. Cell Biol.* **91**: 17-25.
- Carpentier, J.L., Fehlmann, M., Van Obberghen, E., Gorden, P. y Orci, L. 1985. Redistribution of ^{125}I -insulin in the surface of rat hepatocytes as a function of dissociation time. *Diabetes* **24**: 1002-1007.
- Carpentier, J.L., Gazzano, H., Van Obberghen, E., Fehlmann, M., Freychet, P. y Orci, L. 1986. Intracellular pathway followed by the insulin receptor covalently coupled to ^{125}I -photoreactive insulin during internalization and recycling. *J. Cell Biol.* **102**: 989-996.
- Carpentier, J.L. 1993. The journey of the insulin receptor into the cell: from cellular biology to pathophysiology. *Histochemistry* **100**:169-184.
- Ceresa, B.P., Kao, A.W., Santeler, S.R. y Pessin, J.E. 1998. Inhibition of clathrin mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3862-3870.
- Ceresa, B.P. y Pessin, J.E. 1998. Insulin regulation of the Ras activation/ inactivation cycle. *Mol. Cell Biochem.* **182**: 23-29.
- Chaika, O.V., Chaika, N., Volle, D.J., Hayashi, H., Ebina, Y., Wang, L.M., Pierce, J.H., y Lewis, R.E. 1999. Mutation of tyrosine 960 within the insulin receptor juxtamembrane domain impairs glucose transport but does not inhibit ligand-mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-2 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 12075-12080.
- Chan, S.J. y Steiner, D.F. 2000. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *Am. Zool.* **40**: 213-222.

V. Referencias bibliográficas

- Chen, W., Evans, E.A., McEver, R.P. y Zhu, C. 2008. Monitoring receptor-ligand interactions between surfaces by thermal fluctuations. *Biophys. J.* **94**: 694-701.
- Chin, J.E., Dickens, M., Tavare, J.M. y Roth, R.A. 1993. Overexpression of protein kinase C isoenzymes alpha, beta I, gamma, and epsilon in cells overexpressing the insulin receptor. Effects on receptor phosphorylation and signaling. *J. Biol. Chem.* **268**: 6338-6347.
- Chow, J.C., Condorelli, G. y Smith, R.J. 1998. Insulin-like growth factor-I receptor internalization regulates signaling via the Shc/Mitogen-activated protein kinase pathway, but not the insulin receptor substrate-1 pathway. *J. Biol. Chem.* **273**: 4672-4680.
- Coba, M.P., Muñoz, M.C., Dominici, F.P., Toblli, J.E., Peña, C., Bartke, A. y Turyn, D. 2004. Increased *in vivo* phosphorylation of insulin receptor at serine 994 in the liver of obese insulin-resistant Zucker rats. *J. Endocrinol.* **182**: 433-444.
- Cohen, P. 2006. The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 867-873.
- Da Costa, S.A., Schumaker, L.M. y Ellis, M.J. 2000. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor, a bona fide tumor suppressor gene or just a promising candidate? *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **5**: 85-94.
- DeChiara, T.M., Efstratiadis, A. y Robertson, E.J. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* **345**: 78-80.
- del Rio, A., Pérez-Jiménez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernández, J.M. y Sheetz, M.P. 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* **323**: 638-641.
- De Meyts, P. y Shymko, R.M. 2000. Timing-dependent modulation of insulin mitogenic versus metabolic signalling. *Novartis Found. Symp.* **227**: 46-57.
- De Meyts, P. y Whittaker, J. 2002. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**: 769-783.
- De Meyts, P. 2004. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* **26**: 1351-1362.
- De Meyts, P. 2008. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem. Sci.* **33**: 376-384.
- Denley, A., Wallace, J.C., Cosgrove, L.J. y Forbes, B.E. 2003. The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Horm. Metab. Res.* **35**: 778-785.
- Denley, A., Bonython, E.R., Booker, G.W., Cosgrove, L.J., Forbes, B.E., Ward, C.W. y Wallace, J.C. 2004. Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol. Endocrinol.* **18**: 2502-2512.
- De Pirro, R., Forte, F., Bertoli, A., Greco, A.V. y Lauro, R. 1991. Changes in insulin receptors during oral contraception. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **52**: 29-33.

V. Referencias bibliográficas

- Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E.J., Dodson, G.G, Bing, X. y Markussen, J. 1991. X-ray analysis of the single chain B29-A1 peptide-linked insulin molecule. A completely inactive analogue. *J. Mol. Biol.* **220**: 425-433.
- Di Guglielmo, G.M., Baass, P.C., Ou, W.J., Posner, B.I. y Bergeron, J.J. 1994. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J.* **13**: 4269-4277.
- Discher, D.E., Janmey, P. y Wang, Y.L. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**: 1139-1143.
- Dou, T., Ji, C., Gu, S., Xu, J., Xu, J., Ying, K., Xie, Y. y Mao, Y. 2006. Co-evolutionary analysis of insulin/insulin like growth factor 1 signal pathway in vertebrate species. *Front. Biosci.* **11**: 380-388.
- Drakas, R., Tu, X. y Baserga, R. 2004. Control of cell size through phosphorylation of upstream binding factor 1 by nuclear phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 9272-9276.
- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J., Masiarz, F., Kan, Y.W., Goldfine, I.D., Roth, R.A. y Rutter, W.J. 1985. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* **40**: 747-758.
- Echarte, M.M., Bruno, L., Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M. y Pietrasanta, L.I. 2007. Quantitative single particle tracking of NGF-receptor complexes: transport is bidirectional but biased by longer retrograde run lengths. *FEBS Lett.* **581**: 2905-29013.
- Efstratiadis, A. 1998. Genetics of mouse growth. *Int. J. Dev. Biol.* **42**: 955-976.
- Ellis, M.J, Leav, B.A, Yang, Z., Rasmussen, A., Pearce, A., Zweibel, J.A., Lippman, M.E. y Cullen, K.J. 1996. Affinity for the insulin-like growth factor-II (IGF-II) receptor inhibits autocrine IGF-II activity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* **1**: 286-297.
- Entingh, A.J., Taniguchi, C.M. y Kahn, C.R. 2003. Bi-directional regulation of brown fat adipogenesis by the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **278**: 33377-33383.
- Evans, E. y Ritchie, K. 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.* **72**: 1541-1555.
- Evans, E.A. y Calderwood, D.A. 2007. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science* **316**: 1148-1153.
- Fan, J.Y., Carpentier, J.L., Gorden, P., Van Obberghen, E., Blackett, N.M., Grunfeld, C. y Orci, L. 1982. Receptor mediated endocytosis of insulin. The role of microvilli coated pits and coated vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **79**: 7788-7791.
- Fan, Q.R. y Hendrickson, W.A. 2005. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* **433**: 269-277.

V. Referencias bibliográficas

- Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshire, M.G., Harper, P.S. y Brook, J.D. 2002. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 805-814.
- Fay, F.S. 1997. Isometric contractile properties of single isolated smooth muscle cells. *Nature* **265**: 553-556.
- Fernández, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M. y Schlessinger, J. 1995. The Drosophila insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. *EMBO J.* **14**: 3373-3384.
- Florin, E.L. Moy, V.T. y Gaub, H.E. 1994. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* **264**: 415-417.
- Foti, M., Moukil, M.A., Dudognon, P. y Carpentier, J.L. 2004. Insulin and IGF-1 receptor trafficking and signaling. *Novartis. Found. Symp.* **262**:125-147.
- Foti, M., Porcheron, G., Fournier, M., Maeder, C. y Carpentier, J.L. 2007. The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **104**: 1242-1247.
- Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I.D., Belfiore, A. y Vigneri, R. 1999. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 3278-3288.
- Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., Pezzino, V., Squatrito, S., Belfiore, A. y Vigneri, R. 2008. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch. Physiol. Biochem.* **114**: 23-37.
- Frattali, A.L. y Pessin, J.E. 1993. Relationship between α subunit ligand occupancy and β subunit autophosphorylation in insulin/insulin-like growth factor- 1 hybrid receptor. *J. Biol. Chem.* **268**: 7393-7400.
- Frittitta, L., Vigneri, R., Papa, V., Goldfine, I.D., Grasso, G. y Trischitta, V. 1993. Structural and functional studies of IRs in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **25**: 73-82.
- Fritz, J., Katopidis, A.G., Kolbinger, F. y Anselmetti, D. 1998. Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 12283-12288.
- Gadella, T.W.J. Jr. y Jovin, T.M. 1995. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J. Cell Biol.* **129**: 1543-1558.
- Ganchev, D.N., Rijkers, D.T., Snel, M.M., Killian, J.A. y de Kruijff, B. 2004. Strength of integration of transmembrane alpha-helical peptides in lipid bilayers as determined by atomic force spectroscopy. *Biochemistry* **43**: 14987-14993.
- George, N., Pick, H., Vogel, H., Johnsson, N. y Johnsson, K.J. 2004. Specific labeling of cell surface proteins with chemically diverse compounds *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 8896-8897.

V. Referencias bibliográficas

- Gerber, C. y Lang, H.P. 2006. How the doors to the nanoworld were opened. *Nat. Nanotechnol.* **1**: 3-5.
- Gliemann, J. y Gammeltoft, S. 1974. The biological activity and the binding affinity of modified insulins determined on isolated rat fat cells. *Diabetologia.* **10**: 105-113.
- Goldstein, B.J. y Dudley, A.L. 1990. The rat insulin receptor: primary structure and conservation of tissuespecific alternative messenger RNA splicing. *Mol. Endocrinol.* **4**: 235-244.
- Grandbois, M., Beyer, M., Rief, M., Clausen-Schaumann, H. y Gaub, H.E. 1999. How strong is a covalent bond? *Science* **283**: 1727-1730.
- Grimes, M.L., Zhou, J., Beattie, E.C., Yuen, E.C., Hall, D.E., Valletta, J.S., Topp, K.S., LaVail, J.H., Bunnett, N.W. y Mobley, W.C. 1996. Endocytosis of activated TrkA: Evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J. Neurosci.* **16**: 7950-7964.
- Gumbiner, B.M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 622-634.
- Gustafson, T.A., He, W., Craparo, A., Schaub, C.D., y O'Neill, T.J. 1995. Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol. Cell Biol.* **15**: 2500-2508.
- Haft, C.R., Sierra, M.L., Hamer, I., Carpentier, J.L. y Taylor, S.I. 1998. Analysis of the juxtamembrane dileucine motif in the insulin receptor. *Endocrinology* **139**: 1618-1629.
- Hagen, G.M., Caarls, W., Thomas, M., Hill, A., Lidke, K., Rieger, B., Fritsch, C., van Geest, B., Jovin, T.M. y Arndt-Jovin, D.J. 2007. Biological applications of an LCoS-based Programmable Array Microscope (PAM). *Proc. SPIE.* **6441**: 64410S1-12.
- Hagen, G.M., Caarls, W., Lidke, K., de Vries, A.H.B., Fritsch, C., Barisas, B.G., Arndt-Jovin, D.J. y Jovin, T.M. 2009. Photoconversion and FRAP measurements in arbitrary regions of interest using a Programmable Array Microscope. *Microsc. Res. Tech.* **72**: 431-440.
- Hamer, I., Foti, M., Emkey, R., Cordier-Bussat, M., Philippe, J., De Meyts, P., Maeder, C., Kahn, C.R. y Carpentier, J.L. 2002. An arginine to cysteine (252) mutation in insulin receptors from a patient with severe insulin resistance inhibits receptor internalization but preserves signalling events. *Diabetologia* **45**: 657-667.
- Han, S.W., Mieda, S., Nakamura, C., Kihara, T., Nakamura, N. y Miyake, J. 2008. Successive detection of insulin-like growth factor-II bound to receptors on a living cell surface using an AFM. *J. Mol. Recognition* DOI:10.1002/jmr.994
- Hansen, B.F., Danielsen, G.M., Drejer, K., Sørensen, A.R., Wiberg, F.C., Klein, H.H. y Lundemose, A.G. 1996. Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem. J.* **315** (Pt 1): 271-279.

V. Referencias bibliográficas

- Hansen, T., Bjørbaek, C., Vestergaard, H., Grønskov, K., Bak, J.F. y Pedersen, O. 1993. Expression of insulin receptor spliced variants and their functional correlates in muscle from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**: 1500-1505.
- Hari, J. y Roth, R.A. 1987. Defective internalization of insulin and its receptor in cells expressing mutated insulin receptors lacking kinase activity. *J. Biol. Chem.* **262**: 15341-15344.
- Haring, H.U., Kellerer, M. y Mosthaf, L. 1994. Modulation of insulin receptor signalling: significance of altered receptor isoform patterns and mechanism of hyperglycaemia-induced receptor modulation. *Diabetologia* **4**: S149-154.
- Heintzmann, R., Hanley, Q.S., Arndt-Jovin, D.J. y Jovin, T.M. 2001. A dual path programmable array microscope (PAM): simultaneous acquisition of conjugate and non-conjugate images. *J. Microscopy* **204**: 119-135.
- Helenius, J., Heisenberg, C.P., Gaub, H.E. y Müller, D.J. 2008. Single-cell force spectroscopy. *J. Cell Sci.* **121**: 1785-1791.
- Hernández-Sánchez, C., Mansilla, A., de la Rosa, E.J. y de Pablo, F. 2006. Pro-insulin in development: new roles for an ancient pro-hormone. *Diabetologia* **49**: 1142-1150.
- Hernández-Sánchez, C., Mansilla, A., de Pablo, F. y Zardoya, R. 2008. Evolution of the insulin receptor family and receptor isoform expression in vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1043-1053.
- Hinterdorfer, P. y Dufrêne, Y.F. 2006. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat. Methods* **3**: 347-355.
- Holt, L.J. y Siddle, K. 2005. Grb10 and Grb14: Enigmatic regulators of insulin action - And more? *Biochem. J.* **388**: 393-406.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P.C., Cervera, P. y Le Bouc, Y. 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421**: 182-187.
- Honegger, A., Dull, T. J., Bellot, F., Obberghen, E. V., Szapary, D., Schmidt, A., Ullrich, A. y Schlessinger, J. 1988. Biological activities of EGF receptor mutants with individually altered autophosphorylation sites. *EMBO J.* **7**: 3045-3052.
- Huang, Z., Bodkin, N.L., Ortmeier, H.K., Hansen, B.C. y Shuldiner, A.R. 1994. Hyperinsulinemia is associated with altered insulin receptor mRNA splicing in muscle of the spontaneously obese diabetic rhesus monkey. *J. Clin. Invest.* **94**: 1289-1296.
- Hubbard, S.R., Wei, L. y Hendrickson, W.A. 1994. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372**: 746-754.
- Hubbard, S.R. 1997. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J.* **16**: 5572-5581.

V. Referencias bibliográficas

- Hubbard, S.R. y Till, J.H. 2000. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 373-398.
- Hubbard, S.R. y Miller, W.T. 2007. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**: 117-123.
- Hutter, J.L. y Bechhoefer, J. 1993. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.* **64**: 1868-1873.
- Ish-Shalom, D., Christoffersen, C.T., Vorwerk, P., Sacerdoti-Sierra, N., Shymko, R.M., Naor, D. y De Meyts, P. 1997. Mitogenic properties of insulin and insulin analogues mediated by the insulin receptor. *Diabetologia* **2** (Suppl 40): S25–S31.
- Jacquier, V., Prummer, V., Segura, J.M, Pick, H. y Vogel, H. 2006. Visualizing odorant receptor trafficking in living cells down to the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103** (39): 14325-14330.
- Jares Erijman, E.A. y Jovin, T.M. 2003. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* **21**: 1387-1395.
- Jensen, P.E. y Wilkinson, K.D. 1989. Probing the structure of processed antigen by using biotin and avidin. Mhc-dependent inhibition of responses to selected biotinyl-insulin derivatives. *J. Immunology* **143**: 3423-3429.
- Jensen, M., Hansen, B., De Meyts, P., Schäffer, L. y Ursø, B. 2007. Activation of the insulin receptor by insulin and a synthetic peptide leads to divergent metabolic and mitogenic signaling and responses. *J. Biol. Chem.* **282**: 35179-35186.
- Jensen, M. y De Meyts, P. 2009. Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitamins and Hormones* **80**: 51-75.
- Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P., Ward, C.W. y Burgess, A.W. 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* **284**: 31-53.
- Junker, J.P., Ziegler, F. y Rief, M. 2009. Ligand-dependent equilibrium fluctuations of single calmodulin molecules. *Science* **323**: 633-637.
- Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Tobe, K., Ueki, K., Yachi, M., Akanuma, Y., Stephens, R.M., Kaplan, D., Yazaki, Y. y Kadowaki, T. 1995. The role of the NPXY motif in the insulin receptor in tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and Shc. *Endocrinology* **136**: 3437-3443.
- Kalli, K.R., Falowo, O.I., Bale, L.K., Zschunke, M.A., Roche, P.C. y Conover, C.A. 2002. Functional IRs on human epithelial ovarian carcinoma cells: implications for IGF-II mitogenic signaling. *Endocrinology* **143**: 3259-3267.
- Kamba, T., Tam, B.Y.Y., Hashizume, H., Haskell, A., Sennino, B., Mancuso, M.R., Norberg, S.M., O'Brien, S.M., Davis, R.B., Gowen, L.C., Anderson, K.D., Thurston, G., Joho, S., Springer, M.L., Kuo, C.J., y McDonald, D.M. 2006. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am. J. Physiol.* **290**: H560-H576.

V. Referencias bibliográficas

- Kantelhardt, S., Caarls, W., de Vries, A.H.V., Hagen, G.M., Jovin, T.M., Schulz-Schaeffer, W., Rohde, V., Giese, A. y Arndt-Jovin, D.J. 2010. Specific visualization of glioma cells in living low-grade tumor tissue. *Plos One* **5** (6): e11323. doi:10.1371/journal.pone.0011323.
- Kaplan, S.A. 1984. The insulin receptor. *J. Pediatr.* **104**: 327-336.
- Karin, M., Liu, Z. y Zandi, E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 240-246.
- Kasuga, M., Fujita-Yamaguchi, Y., Blithe, D.L., White, M.F. y Kahn, C.R. 1983. Characterization of the insulin receptor kinase purified from human placental membranes. *J. Biol. Chem.* **258**: 10973-10980.
- Kedrov, A., Appel, M., Baumann, H., Ziegler, C. y Müller, D.J. 2008. Examining the dynamic energy landscape of an antiporter upon inhibitor binding. *J. Mol. Biol.* **375**: 1258-1266.
- Kellerer, M., Lammers, R., Ermel, B., Tippmer, S., Vogt, B., Obermaier-Kusser, B., Ullrich, A. y Haring, H.U. 1992. Distinct alpha-subunit structures of human insulin receptor A and B variants determine differences in tyrosine kinase activities. *Biochemistry* **31**: 4588-4596.
- Kellerer, M., Sesti, G., Seffer, E., Obermaier-Kusser, B., Pongratz, D.E., Mosthaf, L. y Häring, H.U. 1993. Altered pattern of insulin receptor isotypes in skeletal muscle membranes of type 2 (noninsulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetologia* **36**: 628-632.
- Kienberger, F., Kada, G., Gruber, H.J., Pastushenko, V.P., Riener, C., Trieb, M., Knaus, H.G., Schindler, H. y Hinterdorfer, P. 2000. Recognition force spectroscopy studies of the NTA-His6 bond. *Single Mol.* **1**: 59-65.
- Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y. y Ruvkun, G. 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **277**: 942-946.
- Kosaki, A. y Webster, N.J. 1993. Effect of dexamethasone on the alternative splicing of the insulin receptor mRNA and insulin action in HepG2 hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 21990-21996.
- Kosaki, A., Pillay, T.S., Xu, L. y Webster, N.J. 1995. The B isoform of the insulin receptor signals more efficiently than the A isoform in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 20816-20823.
- Kosaki, A., Nelson, J. y Webster, N.J. 1998. Identification of intron and exon sequences involved in alternative splicing of insulin receptor pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **273**: 10331-10337.
- Koshio, O., Akanuma, Y. y Kasuga, M. 1989. Identification of a phosphorylation site of the rat insulin receptor catalyzed by protein kinase C in an intact cell. *FEBS Lett.* **254**: 22-24.
- Kossiakoff, A.A. 2004. The structural basis for biological signaling, regulation, and specificity in the growth hormone-prolactin system of hormones and receptors. *Adv. Protein Chem.* **68**: 147-169.
- Kremers, G.J., Goedhart, J., van Munster, E.R. y Gadella, W.J. 2006. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster Radius. *Biochemistry* **45**: 6570-6580.

V. Referencias bibliográficas

- Kristensen, C., Wiberg, F.C. y Andersen, A.S. 1999. Specificity of insulin and insulin-like growth factor I receptors investigated using chimeric mini-receptors: role of C-terminal of receptor α subunit. *J. Biol. Chem.* **274**: 37351-37356.
- Kropf, M., Reya, G., Glausera, L., Kulangaraa, K., Johnsson, K. y Hirling, H. 2008. Subunit-specific surface mobility of differentially labeled AMPA receptor subunits. *European J. Cell Biology* **87**: 763-778.
- Kurtzhals, P., Schäffer, L., Sørensen, A., Kristensen, C., Jonassen, I., Schmid, C. y Trub, T. 2000. Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes* **49**: 999-1005.
- Ladd, A.N., Charlet, N. y Cooper, T.A. 2001. The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol. Cell Biol.* **21**: 1285-1296.
- Lawrence, M.C., McKern, N.M. y Ward, C.W. 2007. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**: 699-705.
- Lecuit, T. y Lenne, P.F. 2007. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 633-644.
- Lee, G.U., Kidwell, D.A. y Colton, R.J. 1994. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. *Langmuir* **10**: 354-357.
- Lee, S., Mandic, J. y Van Vliet, K.J. 2007. Chemomechanical mapping of ligand-receptor binding kinetics on cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 9609-9614.
- Leibiger, B., Leibiger, I.B., Moede, T., Kemper, S., Kulkarni, R.N., Kahn, C.R., de Vargas, L.M. y Berggren, P.O. 2001. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell* **7**: 559-570.
- Levy, D. y Carpenter, F.H. 1967. The synthesis of triaminoacyl-insulins and the use of the t-butylloxycarbonyl group for the reversible blocking of the amino groups of insulin. *Biochemistry* **6**: 3559-3568.
- Levy, D. 1973. The synthesis of several tert-butylloxycarbonyl derivatives of insulin. *Biochem. Biophys. Acta* **328**: 107-113.
- Li, F., Redick, S.D., Erickson, H.P. y Moy, V.T. 2003. Force measurements of the $\alpha 5\beta 1$ integrin-fibronectin interaction. *Biophys. J.* **84**: 1252-1262.
- Li, L., Chen, S., Oh, S. y Jiang, S. 2002. In situ single-molecule detection of antibody-antigen binding by tapping-mode atomic force microscopy. *Anal. Chem.* **74**: 6017-6022.
- Li, L.S., Babendure, J.L., Sinha, S.C., Olefsky, J.M. y Lerner, R.A. 2005. Synthesis and evaluation of photolabile insulin prodrugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15**: 3917-3920.
- Lidke, D.S., Nagy, P., Heintzmann, R., Arndt-Jovin, D.J., Post, J., Grecco, H., Jares-Erijman, E.A. y Jovin, T.M. 2004. Quantum dot ligands reveal EGFR dynamics in living cells. *Nat. Biotechnol.* **22**: 198-203.

V. Referencias bibliográficas

- Lidke, D.S., Lidke, K., Rieger, B., Jovin, T.M. y Arndt-Jovin, D.J. 2005. Reaching out for signals: filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors. *J. Cell. Biol.* **170**: 619-626.
- Lidke, D.S., Nagy, P., Heintzmann, R., Jovin, T.M. y Arndt-Jovin, D.J. 2007. Biotin-ligand complexes with streptavidin quantum dots for in vivo cell labeling of membrane receptors. *Meth. Mol. Biol.* **374**: 69-80.
- Liu, F. y Roth, R.A. 1994. Identification of serines-1035/1037 in the kinase domain of the insulin receptor as protein kinase C alpha mediated phosphorylation sites. *FEBS Lett.* **352**: 389-392.
- Louvi, A., Accili, D. y Efstratiadis, A. 1997. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev. Biol.* **189**: 33-48.
- Maegawa, H., McClain, D.A., Freidenberg, G., Olefsky, J.M., Napier, M., Lipari, T., Dull, T.J., Lee, J. y Ullrich, A. 1988. Properties of a human insulin receptor with a COOH-terminal truncation. II. Truncated receptors have normal kinase activity but are defective in signaling metabolic effects. *J. Biol. Chem.* **263**: 8912-8917.
- Marks, K. y Nolan, G. 2006. Chemical labeling strategies for cell biology. *Nat. Methods* **3**: 591-596.
- Markussen, J., Halstrom, J., Wiberg, F.C. y Schäffer, L. 1991. Immobilized insulin for high capacity affinity chromatography of insulin receptors. *J. Biol. Chem.* **266**: 18814-18818.
- McClain, D.A., Maegawa, H., Lee, J., Dull, T.J., Ullrich, A. y Olefsky, J.M. 1987. A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biologic activity and does not undergo endocytosis. *J. Biol. Chem.* **262**: 14663-14671.
- McClain, D.A. 1991. Different ligand affinities of the two human insulin receptor splice variants are reflected in parallel changes in sensitivity for insulin action. *Mol Endocrinol.* **5**: 734-739.
- McKeon, C., Moncada, V., Pham, T., Salvatore, P., Kadowaki, T., Accili, D. y Taylor, S.I. 1990. Structural and functional analysis of the insulin receptor promoter. *Mol. Endocrinol.* **4**: 647-656.
- McKern, N.M., Lawrence, M.C., Streltsov, V.A., Lou, M.Z., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Elleman, T.C., Richards, K.M., Bentley, J.D., Pilling, P.A., Hoyne, P.A., Cartledge, K.A., Pham, T.M., Lewis, J.L., Sankovich, S.E., Stoichevska, V., Da Silva, E., Robinson, C.P., Frenkel, M.J., Sparrow, L.G., Fernley, R.T., Epa, V.C. y Ward, C.W. 2006. Structure of the insulin receptor ectodomain homodimer reveals an unexpected folded-over arrangement of the N- and C-terminal halves. *Nature* **443**: 218-221.
- Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R. y Mattoussi, H. 2005. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Materials* **4** (6): 435-446.
- Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K. y Evans, E. 1999. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* **397**: 50-53.
- Meyer, B., Martínez, K., Segura, J.M., Pascoal, P., Hovius, R., George, N., Jonson, K. y Vogel, H. 2006. Covalent labeling of cell-surface proteins for in-vivo FRET studies. *FEBS Lett.* **580**: 1654-1658. (a).

V. Referencias bibliográficas

- Meyer, B., Segura, J.M., Martínez, K., Hovius, R., George, N., Johnsson, K. y Vogel, H. 2006. FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103** (7): 2138–2143. (b).
- Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A. y Swanson, M.S. 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG) (n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J*. **19**: 4439-4448.
- Moffitt, J.R., Chemla, Y.R., Smith, S.B. y Bustamante, C. 2008. Recent advances in optical tweezers. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 205-228.
- Moller, D.E., Yolota, A., Caro, J.F. y Flier, J.S. 1989. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol. Endocrinol.* **3**:1263-1269.
- Monje, P., Marinissen, M.J. y Gutkind, J.S. 2003. Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol. Cell. Biol.* **23** (19): 7030-7043.
- Mora, A., Komander, D., van Aalten, D.M. y Alessi, D.R. 2004. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**: 161-170.
- Morgan, D.O., Edman, J.C., Standring, D.N., Fried, V.A., Smith, M.C., Roth, R.A. y Rutter, W.J. 1987. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* **329**: 301-307.
- Morrione, A., Valentinis, B., Xu, S.Q., Yumet, G., Louvi, A., Efstratiadis, A. y Baserga, R. 1997. Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 3777-3782.
- Mosthaf, L., Grako, K., Dull, T.J., Coussens, L., Ullrich, A. y Mc Clain D.A. 1990. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J*. **9**: 2409-2413.
- Mosthaf, L., Vogt, B., Haring, H.U. y Ullrich, A. 1991. Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 4728-4730.
- Moy, V.T., Florin, E.L. y Gaub, H.E. 1994. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science* **266**: 257-259.
- Muller, D., Huang, G.C., Amiel, S., Jones, P.M. y Persaud, S.J. 2007. Gene expression heterogeneity in human islet endocrine cells in vitro: the insulin signalling cascade. *Diabetologia* **50**: 1239-1242.
- Müller, D.J. y Dufrêne, Y.F. 2008. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nat. Nanotechnol.* **3**: 261-269.
- Müller, D.J., Helenius, J., Alsteens, D. y Dufrêne, Y.F. 2009. Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat. Chem.Biol.* **5**: 383-390.

V. Referencias bibliográficas

- Nakae, J., Kido, Y. y Accili, D. 2001. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr. Rev.* **22**: 818-835.
- Nakagawa, S.H., Zhao, M., Hua, Q., Hu, S.Q., Wan, Z., Jia, W. y Weiss, M.A. 2005. Chiral mutagenesis of insulin. Foldability and function are inversely regulated by a stereospecific switch in the B chain. *Biochemistry* **44**: 4984-4999.
- Nef, S., Verma-Kurvari, S., Merenmies, J., Vassalli, J.D., Efstratiadis, A., Accili, D. y Parada, L.F. 2003. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* **426**: 291-295.
- Neuman, K.C. y Nagy, A.K. 2008. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat. Methods* **5**: 491-505.
- Nevado, C., Valverde, A.M. y Benito, M. 2006. Role of insulin receptor in the regulation of glucose uptake in neonatal hepatocytes. *Endocrinology* **147**: 3709-3718.
- Nevado, C., Benito, M. y Valverde, A.M. 2008. Role of insulin receptor and balance in insulin receptor isoforms A and B in regulation of apoptosis in simian virus 40-immortalized neonatal hepatocytes. *Mol. Biol. Cell* **19**: 1185-1198.
- Norgren, S., Zierath, J., Galuska, D., Wallberg-Henriksson, H. y Luthman, H. 1993. Differences in the ratio of RNA encoding two isoforms of the insulin receptor between control and NIDDM patients. The RNA variant without exon 11 predominates in both groups. *Diabetes* **42**: 675-681.
- Oesterhelt, F., Pfeiffer, M., Engel, A., Gaub, H.E. y Müller, D.J. 2000. Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science* **288**: 143-146.
- Olson, T.S., Bamberger, M.J. y Lane, M.D. 1988. Post-translational changes in tertiary and quaternary structure of the insulin pro-receptor: correlation with acquisition of function. *J. Biol. Chem.* **263**: 7342-7351.
- Ottensmeyer, F.P., Beniac, D.R., Luo, R.Z.T. y Yip, P. 2000. Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry* **39**: 12103-12112.
- Pandini, G., Vigneri, R., Costantino, A., Frasca, F., Ippolito, A., Fujita-Yamaguchi, Y., Siddle, K., Goldfine, I.D. y Belfiore, A. 1999. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clin. Cancer Res.* **5**: 1935-1944.
- Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R. y Belfiore, A. 2002. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J. Biol. Chem.* **277**: 39684-39695.
- Pandini, G., Medico, E., Conte, E., Sciacca, L., Vigneri, R. y Belfiore, A. 2003. Differential gene expression induced by insulin and insulin-like growth factor-II through the insulin receptor isoform A. *J. Biol. Chem.* **278**: 42178-42189.

V. Referencias bibliográficas

- Papa, V., Pezzino, V., Costantino, A., Belfiore, A., Giuffrida, D., Frittitta, L., Vannelli, G.B., Brand, R., Goldfine, I.D. y Vigneri, R. 1990. Elevated insulin receptor content in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* **86**: 1503-1510.
- Papa, V., Gliozzo, B., Clark, G.M., McGuire, W.L., Moore, D., Fujita-Yamaguchi, Y., Vigneri, R., Goldfine, I.D. y Pezzino, V. 1993. Insulin-like growth factor-I receptors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. *Cancer Res.* **53**: 3736-3740.
- Park, C.R. 2001. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **25**: 311-323.
- Parpal, S., Karlsson, M., Thorn, H. y Straålfors, P. 2001. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate- 1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol. Chem.* **276**: 9670-9678.
- Pashmforoush, M., Chan, S.J. y Steiner, D.F. 1996. Structure and expression of the insulin-like peptide receptor from amphioxus. *Mol. Endocrinol.* **10**: 857-866.
- Pastore, S., Mascia, F., Mariotti, F., Dattilo, C., Mariani, V. y Girolomoni, G. 2005. ERK1/2 regulates epidermal chemokine expression and skin inflammation. *J. Immunology* **174**: 5047-5056.
- Patti, M.E. y Kahn, C.R. 1998. The insulin receptor, a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **9**: 89-109.
- Pezzino, V., Papa, V., Trischitta, V., Brunetti, A., Goodman, P.A., Treutelaar, M.K., Williams, J.A., Maddux, B.A., Vigneri, R. y Goldfine, I.D. 1989. Human insulin receptor radioimmunoassay: applicability to insulin-resistant states. *Am. J. Physiol.* **257**: E451-E457.
- Piazzesi, G., Reconditi, M., Linari, M., Lucii, L., Bianco, P., Brunello, E., Decostre, V., Stewart, A., Gore, D.V., Irving, T.C., Irving, M. y Lombardi, V. 2007. Skeletal muscle performance determined by modulation of number of myosin motors rather than motor force or stroke size. *Cell* **131**: 784-795.
- Plum, L., Belgardt, B.F. y Brüning, J.C. 2006. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* **116**: 1761-1766.
- Pol, A., Calvo, M. y Enrich, C. 1998. Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett.* **441**: 34-38.
- Puchner, E.M., Alexandrovich, A., Kho, A.L., Hensen, U., Schäfer, L.V., Brandmeier, B., Gräter, F., Grubmüller, H., Gaub, H.E. y Gautel, M. 2008. Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 13385-13390.
- Pullen, R.A., Lindsay, D.G., Wood, S.P., Tickle, I.J., Blundell, T.L., Wollmer, A., Krail, G., Brandehurg, D., Zahn, H., Gliemann, J. y Gammeltoft, S. 1976. Receptor binding region of insulin. *Nature* **259**: 369-373

V. Referencias bibliográficas

- Reynet, C., Caron, M., Magre, J., Cherqui, G., Clanser, E., Picard, J. y Capeau, J. 1990. Mutation of tyrosine residues 1162 and 1163 of the insulin receptor affects hormone and receptor internalization. *Mol. Endocrinol.* **4**: 304-311.
- Reynet, C., Caron, M., Magré, J., Picard, J., Cherqui, G. y Capeau, J. 1994. Insulin receptor autophosphorylation sites tyrosinea 1162 and 1163 control both insulin-dependent and insulin-independent receptor internalization pathways. *Cellular Signaling* **6**: 35-45.
- Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernández, J.M. y Gaub, H.E. 1997. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **276**: 1109-1112.
- Rizzo, M.A., Shome, K., Watkins, S.C. y Romero, G. 2000. The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J. Biol. Chem.* **275**: 23911-23918.
- Ros, R., Schwesinger, F., Anselmetti, D., Kubon, M., Schafer, R., Pluckthun, A. y Tiefenaueret, L. 1998. Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 7402-7405.
- Rosenfeld, R.G. y Roberts, C.T. 1999. The IGF system: molecular biology, physiology and clinical applications. Totowa (NJ): Humana Press.
- Rotsch, C. y Radmacher, M. 2000. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* **78**: 520-535.
- Roux, P.P. y Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 320-344.
- Russell, D.S., Gherzi, R., Johnson, E.L., Chou, C.K. y Rosen, O.M. 1987. The protein-tyrosine kinase activity of the insulin receptor is necessary for insulin-mediated receptor down-regulation. *J. Biol. Chem.* **262**: 11833-11840.
- Ruvkun, G. y Hobert, O. 1998. The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **282**: 2033-2041.
- Saltiel, A.R. y Kahn, C.R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**: 799-806.
- Samani, A.A., Yakar, S., LeRoith, D. y Brodt, P. 2007. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr. Rev.* **28**: 20-47.
- Sambrook, J. y Russell, D.L. 2006. The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli* "Ultra Competent" Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot3944.
- Savkur, R.S., Philips, A.V. y Cooper, T.A. 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* **29**: 40-47
- Schäffer, L. 1994. A model for insulin binding to the insulin receptor. *Eur. J. Biochem.* **221**: 1127-1132.

V. Referencias bibliográficas

- Schlessinger, J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**: 669-672.
- Schlüter, H., Meissner, M., van der Giet, M., Tepel, M., Bachmann, J., Groß, I., Nordhoff, E., Karas, M., Spieker, C., Witzel, H. y Zidek, W. 1995. Coenzyme A glutathione disulfide. A potent vasoconstrictor derived from the adrenal gland. *Circulation Res.* **76**: 675-680.
- Schmitz-Peiffer, C. 2002. Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **967**: 146-157.
- Schwesinger, F., Ros, R., Strunz, T., Anselmetti, D., Guntherodt, H.J., Honegger, A., Jermutus, L., Tiefenauer, L., Pluckthun, A. 2000. Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 9972-9977.
- Sciacca, L., Costantino, A., Pandini, G., Mineo, R., Frasca, F., Scalia, P., Sbraccia, P., Goldfine, I.D., Vigneri, R. y Belfiore, A. 1999. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* **18**: 2471-2479.
- Sciacca, L., Mineo, R., Pandini, G., Murabito, A., Vigneri, R. y Belfiore, A. 2002. In IGF-I receptor-deficient leiomyosarcoma cells autocrine IGF-II induces cell invasion and protection from apoptosis via the insulin receptor isoform A. *Oncogene* **21**: 8240-8250.
- Sebastian, S., Settleman, J., Reshkin, S.J., Azzariti, A., Bellizzi, A. y Paradiso, A. 2006. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochem. Biophys. Acta.* **1766**: 120-139.
- Seino, S. y Bell, G.I. 1989. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**: 312-316.
- Seino, S., Seino, M., Nishi, S. y Bell, G.I. 1989. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 114-118.
- Sesti, G., Marini, M.A., Tullio, A.N., Montemurro, A., Borboni, P., Fusco, A., Accili D. y Lauro, R. 1991. Altered expression of the two naturally occurring human insulin receptor variants in isolated adipocytes of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 1419-1424.
- Shahin, V., Ludwig, Y., Schafer, C., Nikova, D. y Oberleithner, H. 2005. Glucocorticoids remodel nuclear envelope structure and permeability. *J. Cell Sci.* **118**: 2881-2889.
- Shaulian, E. y Karin, M. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**: 2390-2400.
- Shaulian, E. y Karin, M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **4**: E131-E136.
- Sheetz, M.P. 2001. Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 392-396.
- Shi, Q., Chien, Y.H. y Leckband, D. 2008. Biophysical properties of cadherin bonds do not predict cell sorting. *J. Biol. Chem.* **283**: 28454-28463.

V. Referencias bibliográficas

- Shier, P. y Watt, V.M. 1989. Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *J. Biol. Chem.* **264**: 14605-14608.
- Sielaff, I., Arnold, A., Godin, G., Tugulu, S., Klok, H.A. y Johnsson, K. 2006. Protein function microarrays based on self-immobilizing and self-labeling fusion proteins. *Chembiochem.* **7**: 194-202.
- Slaaby, R., Schäffer, L., Lautrup-Larsen, I., Andersen, A.S., Shaw, A.C., Mathiasen, I.S. y Brandt, J. 2006. Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant. *J. Biol. Chem.* **281**: 25869-25874.
- Slade, A., Luh, J., Ho, S. y Yip, C.M. 2002. Single molecule imaging of supported planar lipid bilayer – reconstituted human insulin receptors by in situ scanning probe microscopy. *J. Struct. Biol.* **137**: 283-291.
- Soos, M.A., Siddle, K., Baron, M.D., Heward, J.M., Luzio, J.P., Bellatin, J. y Lennox, E.S. 1986. Monoclonal antibodies reacting with multiple epitopes on the human insulin receptor. *Biochem. J.* **235**: 199-208.
- Soos, M.A. y Siddle, K. 1989. Immunological relationships between receptors for insulin and insulin-like growth factor I. Evidence for structural heterogeneity of insulin-like growth factor I receptors involving hybrids with IRs. *Biochem. J.* **263**: 553-563.
- Soos, M.A., Whittaker, J., Lammers, R., Ullrich, A. y Siddle, K. 1990. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem. J.* **270**: 383-390.
- Soos, M.A., Field, C.E. y Siddle, K. 1993. Purified hybrid insulin/ insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *Biochem. J.* **290**: 419-426.
- Sorkin, A., Eriksson, A., Heldin, C.H., Westermark, B. y Claesson-Welsh, L. 1993. Pool of ligand-bound platelet-derived growth factor beta-receptors remain activated and tyrosine phosphorylated after internalization. *J. Cell Physiol.* **156**: 373-382.
- Sorkin, A., McClure, M., Huang, F. y Carter, R. 2000. Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr. Biol.* **10**: 1395-1398.
- Stewart, C.E. y Rotwein, P. 1996. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev.* **76**: 1005-1026.
- Stockhorst, U., de Fries, D., Steingrueber, H.J. y Scherbaum, W.A. 2004. Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiol. Behav.* **83**: 47-54.
- Strack, V., Hennige, A.M., Krützfeldt, J., Bossenmaier, B., Klein, H.H., Kellerer, M., Lammers, R. y Häring, H.U. 2000. Serine residues 994 and 1023/25 are important for insulin receptor kinase inhibition by protein kinase C isoforms beta2 and theta. *Diabetologia* **43**: 443-449.

V. Referencias bibliográficas

- Stroh, C., Wang, H., Bash, R., Ashcroft, B., Nelson, J., Gruber, H., Lohr, D., Lindsay, S.M., Hinterdorfer, P. 2004. Single-molecule recognition imaging microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**: 12503-12507.
- Strunz, T., Oroszlan, K., Schumakovitch, I. Güntherodt, H.G. y Hegner, M. 2000. Model energy landscapes and the force-induced dissociation of ligand receptor bonds. *Biophys. J.* **79**: 1206-1212.
- Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J. y White, M.F. 1991. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**: 73-77.
- Surinya, K.H., Molina, L., Soos, M.A., Brandt, J., Kristensen, C. y Siddle, K. 2002. Role of insulin receptor dimerization domains in ligand binding, cooperativity, and modulation by anti-receptor antibodies. *J. Biol. Chem.* **277**: 16718-16725
- Sutter, N.B., Bustamante, C.D., Chase, K., Gray, M.M., Zhao, K., Zhu, L., Padhukasahasram, B., Karlins, E., Davis, S., Jones, P.G., Quignon, P., Johnson, G.S., Parker, H.G., Fretwell, N., Mosher, D.S., Lawler, D.F., Satyaraj, E., Nordborg, M., Lark, K.G., Wayne, R.K. y Ostrander, E.A. 2007. A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs. *Science* **316**: 112-115.
- Taguchi, A. y White, M.F. 2008. Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. *Annu. Rev. Physiol.* **70**: 191-212.
- Takata, Y., Webster, N.J.G. y Olefsky, J.M. 1991. Mutation of the two carboxyl-terminal tyrosines results in an insulin receptor with normal metabolic signaling but enhanced mitogenic signaling properties. *J. Biol. Chem.* **266**: 9135-9139.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. y Kahn, C.R. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 85-96.
- Thies, R.S., Ullrich, A. y McClain, D.A. 1989. Augmented mitogenesis and impaired metabolic signaling mediated by a truncated insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **264**:12820-12825.
- Tissenbaum, H.A., Ruvkun, G. 1998. An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **148**: 703-717.
- Tsai, Y.J., Rottero, A., Chow, D.D., Hwang, K.J., Lee, V.H.L., Zhu, G. y Chan, K.K. 1997. Synthesis and purification of NB1-palmitoyl insulin. *J. Pharm. Sci.* **86** (11): 1264-1268.
- Ueki, K., Kondo, T., y Kahn, C.R. 2004. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol. Cell Biol.* **24**: 5434-5446.
- Uhles, S., Moede, T., Leibiger, B., Berggren, P.O. y Leibiger, I.B. 2003. Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains. *J. Cell Biol.* **163**: 1327-1337.
- Uhles, S., Moede, T., Leibiger, B., Berggren, P.O. y Leibiger, I.B. 2007. Selective gene activation by spatial segregation of insulin receptor B signaling. *FASEB J.* **21**: 1609-1621.

V. Referencias bibliográficas

- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, M. y Ramachandran, J. 1985. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature (London)*. **313**: 756-761.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., Jacobs, S., Francke, U., Ramachandran, J. y Fujita Yamaguchi, Y. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J*. **5**: 2503-2512.
- Ullrich, A. y Schlessinger, J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212
- Van Schravendijk, C.F., Foiries, A., Hooghe-Peters, E.L., Rogiers, V., De Meyts, P., Sodoyez, J.C. y Pipeleers, D.G. 1985. Pancreatic hormone receptors on islet cells. *Endocrinology* **117**: 841-848.
- Vella, V., Sciacca, L., Pandini, G., Mineo, R., Squatrito, S., Vigneri, R. y Belfiore, A. 2001. The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Mol. Pathol.* **54**: 121-124.
- Vella, V., Pandini, G., Sciacca, L., Mineo, R., Vigneri, R., Pezzino, V., et al. 2002. A novel autocrine loop involving IGF-II and the insulin receptor isoform-A stimulates growth of thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**: 245-254.
- Vieira, A.V., Lamaze, C. y Schmid, S.L. 1996. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* **274**: 2086-2089.
- Vivanco, I. y Sawyers, C.L. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat. Reviews Cancer* **2**: 489-501.
- Vogel, V. y Sheetz, M. 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 265-275.
- Vogt, B., Carrascosa, J.M., Ermel, B., Ullrich, A. y Haring, H.U. 1991. The two isotypes of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**: 1013-1018.
- Vyas, Y.M., Maniar, H., Lyddane, C.E., Sadelain, M., Dupont, B. 2004. Ligand binding to inhibitory killer cell Ig-like receptors induce colocalization with Src homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase 1 and interruption of ongoing activation signals. *J. Immunol.* **173**: 1571-1578.
- Wan, Z.L. Xu, B., Huang, K., Chu, Y.C., Li, B., Nakagawa, S.H., Qu, Y., Hu, S.Q., Katsoyannis, P.G. y Weiss, M.A. 2004. Enhancing the activity of insulin at the receptor interface: crystal structure and photo-cross-linking of A8 analogues. *Biochemistry* **43**: 16119-16133.
- Wan, Z.L., Huang, K. Xu, B. Hu, S.Q, Wang, S., Chu, Y.C., Katsoyannis, P.G. y Weis, M.A. 2005. Diabetes-associated mutations in human insulin: crystal structure and photo-cross-linking studies of A-chain variant insulin *Wakayama*. *Biochemistry* **44**: 5000-5016.

V. Referencias bibliográficas

- Wang, X., Proud, C.G. 2006. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* **21**: 362-369.
- Ward, C.W., Lawrence, M.C., Streltsova, V.A., Adams, T.E. y Mc Kern, N.M. 2007. The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation. *Trends Biochem. Sci.* **32**: 129-137.
- Webster, N.J., Resnik, J.L., Reichart, D.B., Strauss, B., Haas, M. y Seely, B.L. 1996. Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: a possible mechanism for receptor overexpression in breast cancer. *Cancer Res.* **56**: 2781-2788.
- White, M.F., Livingston, J.N., Backer, J.M., Lauris, V., Dull, T.J., Ullrich, A., y Kahn, C.R. 1988 (a). Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* **54**: 641-649.
- White, M.F., Shoelson, S.E., Keutmann, H., y Kahn, C.R. 1988 (b). A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **263**: 2969-2980.
- White, M.F. 1997. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* **40** Suppl. 2: S2-S17.
- White, M.F. 1998. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* **182**: 3-11.
- Whittaker, J., Groth, A.V., Mynarcik, D.C., Pluzek, L., Gadsboll, V.L. y Whittaker, L. J. 2001. Alanine scanning mutagenesis of a type 1 insulin-like growth factor receptor ligand binding site. *J. Biol. Chem.* **276**: 43980-43986.
- Whittaker, J., Sørensen, H., Gadsboll, V.L. y Hinrichsen, J. 2002. Comparison of the functional insulin binding epitopes of the A and B isoforms of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **277**: 47380-47384.
- Wiegmann, K., Schütze, S., Machleidt, T., Witte, D. y Krönke, M. 1994. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* **78**: 1005-1015.
- Wilden, P.A., Backer, J.M., Kahn, C.R., Cahill, D.A., Schroeder, G.J. y White, M.F. 1990. The insulin receptor with phenylalanine replacing tyrosine-1146 provides evidence for separate signals regulating cellular metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 3358-3362.
- Wilden, P.A., Siddle, K., Haring, E., Backer, J.M., White, M.F., y Kahn, C.R. 1992. The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. *J. Biol. Chem.* **267**: 13719-13727.
- Wu, Y., Cui, K., Miyoshi, K., Hennighausen, L., Green, J.E., Setser, J., LeRoith, D. y Yakar, S. 2003. Reduced circulating insulin-like growth factor I levels delay the onset of chemically and genetically induced mammary tumors. *Cancer Res.* **63**: 4384-4388.

V. Referencias bibliográficas

- Xu, B., Hu, S.Q., Chu, Y.C., Huang, K., Nakagawa, S.H., Whittaker, J., Katsoyannis, P.G. y Weiss, M.A. 2004. Diabetes-associated mutations in insulin identify invariant receptor contacts. *Biochemistry* **43**: 8356-8372.
- Yamaguchi, Y., Flier, J.S., Yokota, A., Benecke, H., Backer, J.M. y Moller, D.E. 1991. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* **129**: 2058-2066.
- Yamaguchi, Y., Flier, J.S., Benecke, H., Ransil, B.J. y Moller, D.E. 1993. Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology* **132**: 1132-1138.
- Yamamoto-Honda, R., Koshio, O., Tobe, K., Shibasaki, Y., Momomura, K., Odawara, M., Kadowaki, T., Takaku, F., Akanuma, Y. y Kasuga, M. 1990. Phosphorylation state and biological function of a mutant human insulin receptor Val996. *J. Biol. Chem.* **265**: 14777-14783.
- Yarden, Y. y Ullrich, A. 1988. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 443-478.
- Yarden, Y. y Sliwkowski, M.X. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 127-137.
- Yin, J., Straight, P., McLoughlin, S., Zheou, Z., Lin, A.J., Golan, D.E., Kelleher, N., Kolter, R. y Walsh, C.T. 2005. Labeling proteins with small molecules by site-specific posttranslational modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 1815-1820. (a).
- Yin, J., Lin, A.J., Buckett, P.D., Wessling-Resnick, M., Golan, D.E., y Walsh, C.T. 2005. Single-cell FRET imaging of transferrin receptor trafficking dynamics by Sfp-catalyzed site-specific protein labeling. *Chemistry & Biology* **12**: 999-1006. (b).
- Yip, C.M., Yip, C.C. y Ward, M.D. 1998. Direct force measurements of insulin monomer–monomer interactions. *Biochemistry* **37**: 5439-5449.
- Youngren, J.F. 2007. Regulation of insulin receptor function. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 873-891.
- Zhang, X.H., Bogorin, D.F. y Moy, V.T. 2004. Molecular basis of the dynamic strength of the sialyl Lewis X-selectin interaction. *Chem. Phys. Chem.* **5**: 175-182.
- Zhou Z., Cironi, P., Lin, A.J., Xu, Y., Hrvatin, S., Golan, D.E., Silver, P., Walsh, C.T. y Yin, J. 2007. Genetically encoded short peptide tags for orthogonal protein labeling by Sfp and AcpS phosphopantetheinyl transferases. *ACS Chemical Biology* **2**: 337-334.

PUBLICACIONES

Parte del trabajo de tesis aquí presentado dio origen a las siguientes publicaciones:

“Differential endocytosis and signaling dynamics of insulin receptor variants IR-A and IR-B” Jimena Giudice, Federico Coluccio Leskow, Donna J. Arndt-Jovin, Thomas M. Jovin y Elizabeth A. Jares-Erijman*. *Journal of Cell Science*. 2011. Aceptado para su publicación.

“Dominant negative insulin receptor reveals differences in IR-A/IR-B signaling. Non-stochastically hybrid formation at the plasma membrane” Jimena Giudice, Donna J. Jovin, Thomas M. Jovin, Federico Coluccio Leskow* y Elizabeth A. Jares-Erijman*. Manuscrito en preparación.

“Endocytosis and signalling of quantum-dot tagged complexes of IGF-II through insulin receptors splice variants A and B” Jimena Giudice, Francisco Guaimas, Federico Coluccio Leskow* y Elizabeth A. Jares-Erijman*. Manuscrito en preparación.

“Single molecule force spectroscopy reveals differences in the ligand-receptor interaction between insulin receptor splice variants IR-A and IR-B” Jimena Giudice[#], Catalina von Bilderling[#], Federico Coluccio Leskow, Lía I. Pietrasanta* y Elizabeth A. Jares-Erijman*. Manuscrito en preparación.

[#] estos autores contribuyeron igualmente

* autor corresponsal

Premios

Parte del trabajo de tesis aquí presentado dio origen a los siguientes premios:

Premio Bernardo A. Houssay. 2010. Sociedad Argentina de Biología.

“Las dos variantes de splicing del receptor de insulina muestran diferencias en su dinámica de endocitosis y señalización mitogénica y metabólica” Jimena Giudice, Thomas M. Jovin, Federico Coluccio Leskow y Elizabeth A. Jares-Erijman.

Special award for outstanding presentation at The First South American Spring Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine. 2010.

“Differential spatio-temporal dynamics of endocytosis and signaling of insulin receptor A and B” Giudice J., Coluccio Leskow F., Arndt-Jovin D., Jovin T. y Jares-Erijman E.A.

Mejor presentación de la sesión de Endocrinología y Metabolismo en la XI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biología. 2009.

“Labeling the extracellular domain of insulin receptor splice variants in living cells” Giudice J., Coluccio Leskow F., Arndt-Jovin D., Jovin T. y Jares-Erijman E.A.