



FACULTAT D'ENOLOGIA
Universitat Rovira i Virgili



Laura Piñeiro Alonso

Historia evolutiva de la Uroplaquina 3c y su expresión en la superficie ocular humana sana y patológica

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado de Biotecnología

Tutor: Javier Ugarte Chicote

Tarragona, 17 de junio de 2019

ÍNDICE

1. INFORMACIÓN DEL CENTRO	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 UROPLAQUINAS EN EL UROTELIO	3
3.2 FUNCIONES DE LAS UROPLAQUINAS Y ENFERMEDADES RELACIONADAS	7
3.2.1 UROPLAQUINAS Y CÁNCER	8
3.3 EVOLUCIÓN DE LAS UROPLAQUINAS	9
3.4 UROPLAQUINAS EN SUPERFICIE OCULAR	11
3.4.1 ESTRUCTURA DE LA SUPERFICIE OCULAR	12
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
5. METODOLOGÍA	16
5.1 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE UPK3a, UPK3b Y UPK3c	16
5.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS Y ALINEAMIENTOS	16
5.3 ANÁLISIS DE ESTs	17
5.4 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y PROCESAMIENTO	17
5.4.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	17
5.4.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	18
5.5 DEGLICOSILACIONES DE LAS MUESTRAS	19
5.6 WESTERN-BLOT	19
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
6.1 ANÁLISIS ORIGEN DE UPK3c	21
6.2 EVOLUCIÓN DE LA SECUENCIA DE UPK3c	24
6.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UPK3c EN HUMANOS	27
6.3.1 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LA EXPRESIÓN DE UPK3c	30
6.3.2 GLICOSILACIÓN DE UPK3c TRANSFECTADA	31
6.3.3 GLICOSILACIÓN DE UPK3c EN CÓRNEA SANA Y PATOLÓGICA	33
7. CONCLUSIONES	36
8. BIBLIOGRAFÍA	38
9. AUTOEVALUACIÓN	40
10. ANEXOS	41
ANEXO 1	41
ANEXO 2	41
ANEXO 3	41
ANEXO 4	43
ANEXO 5	43

1. INFORMACIÓN DEL CENTRO

El trabajo realizado se ha centrado en una de las líneas de investigación del grupo Biología Molecular del Urotelio Sano y Patológico perteneciente al *Institut d'Investigació Sanitària Pere i Virgili* (IISPV).

El IISPV se creó a partir de un convenio de colaboración científica entre el Instituto Catalán de la Salud, el Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII, el Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, el Hospital Universitario Sant Joan de Reus, el Instituto Pere Mata y la Universidad Rovira i Virgili.

El IISPV está dirigido por un Patronato que se encarga de la administración y gestión, disposición y gravamen de bienes, y representación de la Fundación. La presidenta del Patronato es la Sra. Alba Vergés Bosch.

El principal objetivo del IISPV es mejorar la salud y el bienestar de la población a través de la investigación en el ámbito sanitario. Para ello, el IISPV es competitivo en tres ámbitos estratégicos de investigación principales: Nutrición y Metabolismo, Neurociencias y Salud mental, y Salud y Medioambiente. Además, el IISPV cuenta también con grupos de investigación centrados en otros ámbitos del campo biosanitario. En todas las áreas, el IISPV dispone de grupos relevantes y de prestigio nacional.

El grupo de investigación donde he desarrollado mi Trabajo de Fin de Grado es el grupo de Biología Molecular del Urotelio Sano y Patológico. El objetivo principal de este grupo es el estudio de la biología molecular del epitelio de la vejiga (urotelio) a través del análisis de proteínas relevantes como las uroplaquinas en la biología del urotelio sano, pero también en el patológico. Dentro del grupo de las uroplaquinas, recientemente se ha descubierto la Uroplaquina 3c en la que se centra este trabajo.

2. RESUMEN

Las uroplaquinas (UPK) son proteínas integrales de membrana que constituyen los principales componentes de las placas uroteliales. Estas placas recubren la superficie apical del urotelio y son las responsables de su impermeabilidad.

Se distinguen dos superfamilias de uroplaquinas: las uroplaquinas de la familia de las tetraspaninas y las uroplaquinas asociadas a tetraspaninas. Dentro de este último grupo se ha descrito una nueva uroplaquina, la UPK3c, que se expresa en humanos y cuyo origen es posterior al resto de uroplaquinas.

Para comprender mejor el origen y la evolución de la secuencia de UPK3c, se realizaron varios análisis de las secuencias de UPK3a, UPK3b y UPK3c en diferentes clases de vertebrados. Se ha observado que el origen de UPK3c tuvo lugar a partir de una duplicación en la secuencia de UPK3b en el ancestro común de aves/reptiles y mamíferos. Además, la secuencia de esta uroplaquina ha sufrido una serie de modificaciones a lo largo de su historia evolutiva hasta llegar a humanos.

Por otra parte, como consecuencia de la colonización del medio terrestre por parte de los vertebrados acuáticos, la córnea sufrió una serie de cambios para adaptarse a la vida terrestre. Esta transición coincide con el momento evolutivo en el que se origina UPK3c y, además, al estudiar la expresión de esta uroplaquina en los tejidos humanos se observó que esta se localiza también en la superficie ocular. Este hecho convierte la expresión de UPK3c en ojo en un objeto de estudio interesante.

La UPK3c no solo se expresa en tejido ocular sano sino que se ha encontrado también en patologías de la superficie ocular como pterigion y queratocono. A partir del análisis de UPK3c mediante Western-blot en muestras de superficie ocular humana sana y patológica, se observó que el patrón de glicosilación de esta uroplaquina se encuentra alterado en pterigion y queratocono. Además, su expresión en queratocono es significativamente superior que en pterigion.

Palabras clave: Uroplaquinas, UPK3c, córnea, pterigion, queratocono

3. INTRODUCCIÓN

3.1 UROPLAQUINAS EN EL UROTELIO

El urotelio es un epitelio estratificado altamente especializado que recubre el tracto urinario, desde la pelvis renal hasta la uretra. Está formado por una capa interna de células denominada capa basal, una capa intermedia y, por último, una capa apical (Wu *et al.*, 2009) (Fig. 1).

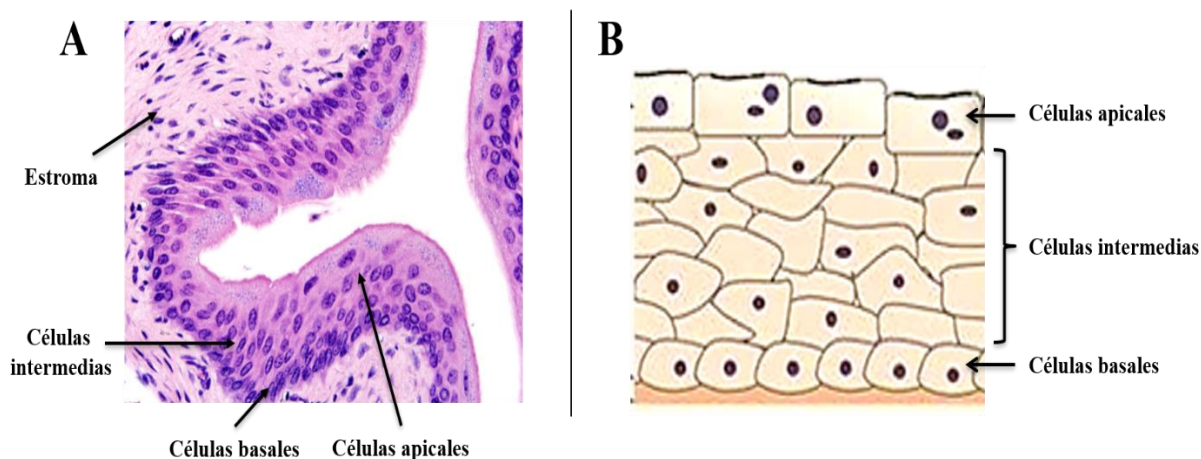


Figura 1. Arquitectura tisular del urotelio donde se observan las tres capas que conforman este epitelio.

(A) Sección de urotelio con tinción de Hematoxilina-Eosina donde se pueden observar las tres capas que componen el urotelio. Las células *umbrella* en la parte más apical, a continuación, se encuentran las células intermedias y, por último, en la parte más interna se encuentran las células basales. (B) Adaptación de la figura de Kątnik-Prastowska, I. *et al.* (2014) de la estructura del urotelio.

La principal función del urotelio es proteger los tejidos de las sustancias tóxicas que contiene la orina formando una barrera impermeable que evita el paso de agua, iones y moléculas entre la orina y la sangre. Una de las características que presenta este epitelio y que, además, le permite realizar su función es su alta flexibilidad, ya que el urotelio necesita adaptarse a los cambios de volumen durante todo el ciclo de micción (Wu *et al.*, 2009).

La responsable de este alto grado de impermeabilidad y flexibilidad que presenta el urotelio es la capa apical. Esta capa está formada por células superficiales o *umbrella* que son células altamente diferenciadas y polarizadas (Fig. 2). Estas células *umbrella* se caracterizan porque tanto su tamaño como su morfología dependen del volumen de la vejiga, presentan un aspecto escamoso cuando la vejiga está llena y son cuboidales cuando no lo está.

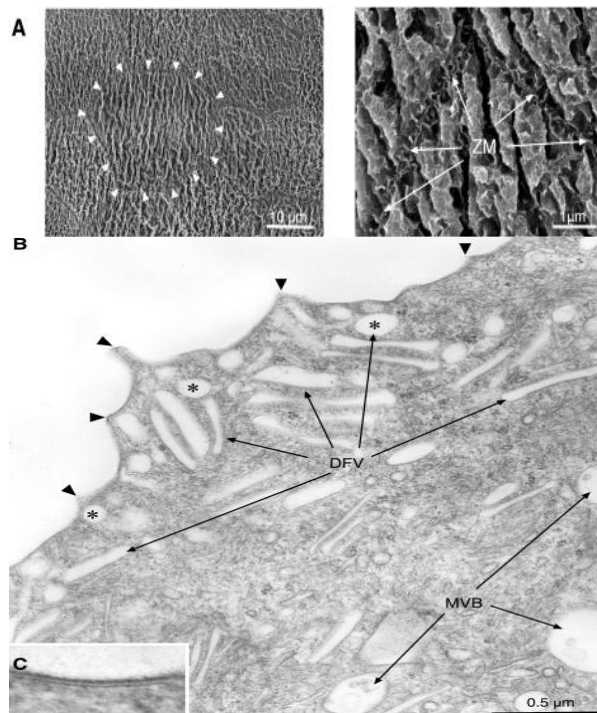


Figura 2. Estructura de las células *umbrella*.

(A) *Izquierda*: Superficie apical del urotelio donde se pueden observar las células *umbrella* cuyos bordes se encuentran marcados mediante puntas de flecha. *Derecha*: membrana apical que separa unas células *umbrella* de otras. (B) Célula *umbrella* donde se pueden observar vesículas fusiformes (DFV) marcadas con flechas y las regiones bisagra que separan las placas uroepiteliales marcadas con puntas de flecha. (C) Superficie apical de una célula *umbrella* donde se puede observar la membrana de unidad asimétrica (AUM) (Khandelwal *et al.*, 2009).

Las células superficiales o *umbrella* contienen dos dominios de membrana distintos, un dominio apical y uno basolateral delimitados por uniones estrechas (Khandelwal *et al.*, 2009) (Fig. 2). En mamíferos, la membrana apical de las células *umbrella* está cubierta por unas estructuras rígidas que reciben el nombre de placas uroteliales y que se encuentran separadas entre sí por regiones de bisagra intermedias (Fig. 2). Se ha visto que estas placas son las principales responsables de la impermeabilidad del urotelio (Wu *et al.*, 2009). En estas placas uroteliales, la lámina externa de la membrana plasmática es dos veces más gruesa que la interna formando una unidad asimétrica de membrana (AUM) (Fig. 2). Esto se debe a que las placas uroteliales están compuestas por unas estructuras cristalinas de 16 nm empaquetadas hexagonalmente y que se encuentran dispuestas formando un anillo interno y uno externo (Khandelwal *et al.*, 2009) (Fig. 3).

Los principales componentes de las placas uroteliales de los mamíferos son una familia de proteínas integrales de membrana denominadas uroplaquinas (UPKs) (Wu *et al.*, 2009).

Existen dos grandes grupos de uroplaquinas: las uroplaquinas de la familia de las tetraspaninas y las uroplaquinas asociadas a tetraspaninas (Desalle *et al.*, 2014).

El grupo de las uroplaquinas de la familia de las tetraspaninas está compuesto por las UPK1a y UPK1b. La familia de las tetraspaninas está constituida también por una gran variedad de antígenos de diferenciación de leucocitos como el CD9 o el CD27. Como indica el nombre de esta familia, las tetraspaninas contienen cuatro dominios transmembrana (TMD), son proteínas que atraviesan la membrana cuatro veces, con un dominio mayor y uno menor que se extiende extracelularmente. Se ha visto que UPK1a y UPK1b contienen en su secuencia varios residuos de aminoácidos conservados lo que sugiere que pueden desempeñar un papel importante en diferentes procesos celulares (Lee, 2011).

En cuanto a las uroplaquinas asociadas a tetraspaninas, en las placas uroteliales este grupo está constituido por las UPK2a, UPK3a y UPK3b. Estas uroplaquinas contienen un solo TMD. Se ha observado que UPK2a, UPK3a y UPK3b comparten una secuencia de 12 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de este TMD, lo que evidencia que estas tres uroplaquinas están relacionadas.

En general, las funciones de las uroplaquinas están fuertemente ligadas a cómo se ensamblan para formar las placas uroteliales y el transporte de estas hasta la superficie apical (Wu *et al.*, 2009).

Después de ser sintetizadas en el Retículo endoplasmático (RE), las uroplaquinas sufren un proceso de glicosilación y forman dos heterodímeros específicos: UPK1a/UPK2a y UPK1b/UPK3a o UPK1b/UPK3b (Fig. 3 y 4). La formación de estos heterodímeros es necesaria para que las uroplaquinas puedan salir del RE. Además, también deben sufrir una serie de cambios conformacionales. Todo esto permite la formación de partículas de 16 nm en el Aparato de Golgi a partir del ensamblaje de los heterodímeros (Fig. 3). Estas partículas se agregan formando estructuras cristalinas cada vez más grandes que finalmente migran hacia la superficie celular apical donde se fusionan con la membrana plasmática. Esto conlleva a que el 90% de la superficie urotelial esté cubierta de placas uroteliales (Lee, 2011). Además, se ha visto que el anillo interno de la matriz cristalina se encuentra formado por seis heterodímeros de UPK1a/UPK2a mientras que el anillo externo está compuesto por seis heterodímeros de UPK1b/UPK3a o de UPK1b/UPK3b (Wu *et al.*, 2009) (Fig. 3).

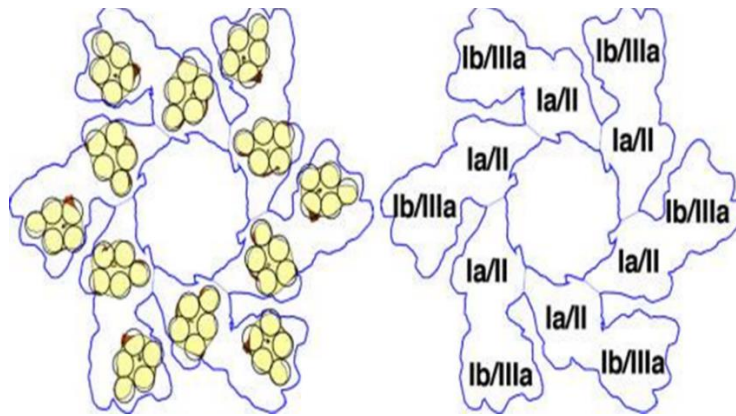


Figura 3. Estructura de la partícula cristalina de 16 nm.

Modelo de la estructura cristalina de 16 nm cuyos anillos se encuentran compuestos de uroplaquinas agrupadas hexagonalmente. Los subdominios internos están formados por los heterodímeros de UPK1a y UPK2a, mientras que los dominios externos están compuestos por UPK1b y UPK3a (UPK3b es minoritaria) (Wu *et al.*, 2009).

Un caso particular es el de la UPK1b, esta uroplaquina es capaz de salir del RE y migrar hasta la superficie apical por sí sola sin la necesidad de formar un heterodímero. Esto puede llegar a explicar por qué la UPK1b puede expresarse por sí misma en otros tejidos que no sean el urotelio, como puede ser la córnea y el epitelio respiratorio (Wu *et al.*, 2009).

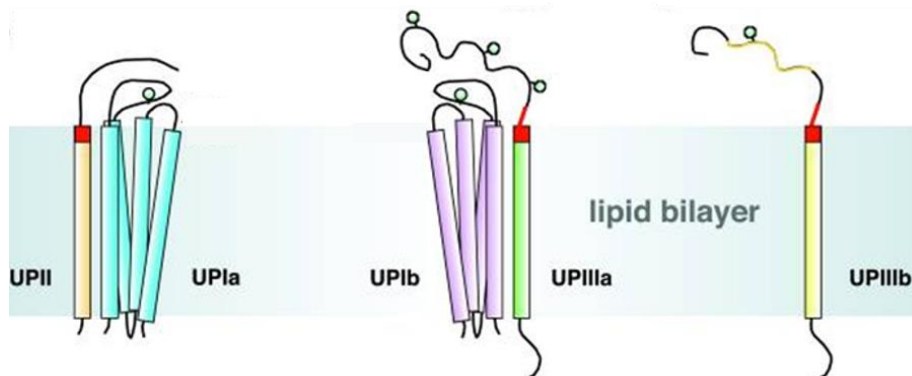


Figura 4. Formación de heterodímeros entre los miembros de las superfamilias de uroplaquinas.

Durante la migración de las uroplaquinas desde el RE hasta la superficie, las uroplaquinas deben formar heterodímeros específicos. UPK1a forma un heterodímero específico con UPK2a mientras que UPK1b tiene la capacidad de formar heterodímeros con UPK3a y UPK3b. La línea roja que contienen UPK2a, UPK3a y UPK3b indica la secuencia conservada de 12 aminoácidos. Los círculos de color azul marcan los residuos de N-glicanos. (Khandelwal *et al.*, 2009).

El urotelio es un tejido altamente glicosilado, la arquitectura de las placas uroteliales y su función están relacionadas con la glicosilación de las uroplaquinas. Inmediatamente después de su síntesis en el RE, las uroplaquinas incorporan glicanos ricos en manosa.

En mamíferos, UPK1a, UPK1b y UPK3a se encuentran altamente glicosiladas, las glicosilaciones que presentan estas uroplaquinas son N-glicosilaciones (Kątnik-Prastowska, I *et al.*, 2014) (Fig. 5).

En cuanto a la UPK2a, esta uroplaquina se sintetiza en forma de precursor no glicosilado, prepro-UPK2a, que sufre una serie de modificaciones hasta llegar a la forma madura de UPK2a. En el RE se corta la secuencia señal de prepro-UPK2a generando un propéptido que se glicosila. Por último, la pro-UPK2a llega al *Trans-Golgi Network* (TGN) donde se produce la escisión del propéptido glicosilado dando lugar a la UPK2 madura. La UPK2a es la única uroplaquina de las cuatro principales que no se encuentra glicosilada en el urotelio de mamíferos (Kątnik-Prastowska, I *et al.*, 2014).

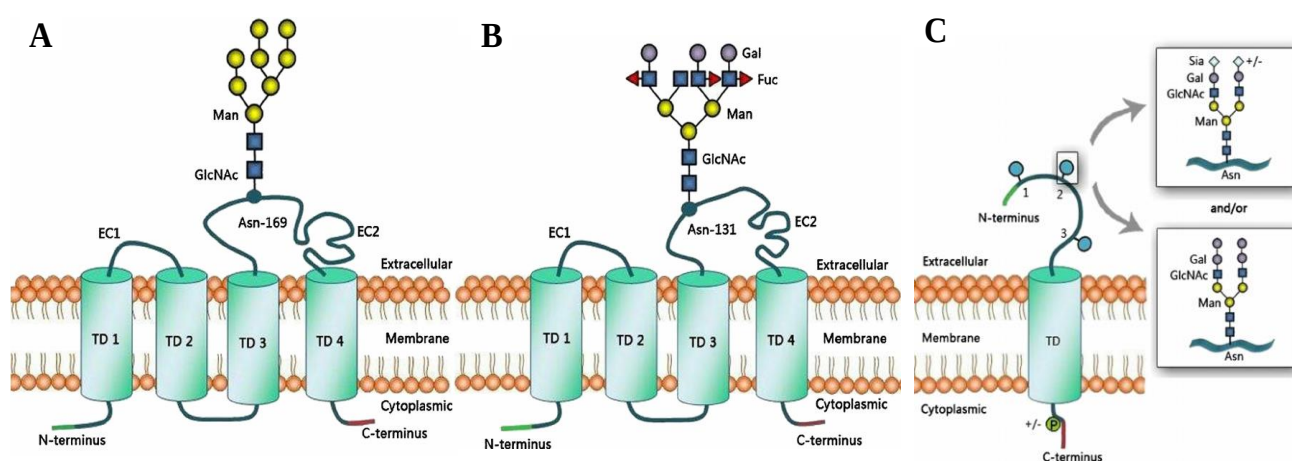


Figura 5. UPK1a , UPK1b y UPK3a uroplaquinas pertenecientes a la familia de las tetraspaninas.

UPK1a y UPK1b son tetraspaninas, ambas contienen cuatro dominios transmembrana (TMD). **(A)** UPK1a contiene un complejo glicosilado rico en residuos de manosa unido a Asn-169. **(B)** UPK1b contiene un complejo glicosilado con varios residuos de fucosa y galactosa unido a Asn-131 **(C)** UPK3a se encuentra altamente glicosilada. (Kątnik-Prastowska, I *et al.*, 2014).

3.2 FUNCIONES DE LAS UROPLAQUINAS Y ENFERMEDADES RELACIONADAS

En mamíferos, las secuencias de aminoácidos de las distintas uroplaquinas se encuentran muy conservadas, lo que sugiere que estas desempeñan un papel importante en el epitelio de la vejiga. Además de la función de barrera de impermeabilidad, se ha visto que las placas uroteliales formadas por las uroplaquinas actúan como un sitio de anclaje del citoesqueleto a la superficie apical y son un importante marcador de diferenciación urotelial (Lee, 2011). Esto último se debe a que las uroplaquinas se sintetizan en las

células superficiales que, como ya se ha mencionado anteriormente, son células diferenciadas mientras que las células que conforman la capa basal y la intermedia no se encuentran diferenciadas.

Estudios con ratones *knockout* para UPK2a y UPK3a han demostrado que la ausencia de alguna de estas dos uroplaquinas favorece la aparición de reflujo vesicoureteral severo (RVU), de hidrofrenosis y de una función renal alterada. No obstante, una vez analizados los SNP de las cuatro UPKs principales de las placas, se observó que ninguno de los SNP estudiados podían asociarse con el RVU (Wu *et al.*, 2009). Por otra parte, sí se comprobó que varias mutaciones en la UPK3a estaban relacionadas con la aparición de hipodisplasia renal que conlleva un desarrollo anormal del riñón (Schönfelder *et al.*, 2006).

Otra de las características que presentan las uroplaquinas es su función en la adhesión e invasión de *E. coli* uropatogénica (UPEC), la cual produce aproximadamente el 90% de las infecciones del tracto urinario en mamíferos. Estudios con la adhesina recombinante de UPEC, FimH/FimC, han permitido identificar a UPK1a y a UPK1b como receptores de la superficie urotelial para este microorganismo. Estas uroplaquinas pueden unirse de forma eficaz a la adhesina FimH de *E. coli* y, en consecuencia, facilitar la adhesión de UPEC en el tracto urinario de mamíferos (Wu *et al.*, 2009).

3.2.1 UROPLAQUINAS Y CÁNCER

El cáncer urotelial es uno de los cánceres con mayor incidencia a nivel mundial. Aproximadamente el 90% de los carcinomas uroteliales se producen en la vejiga, el resto tienen lugar en el uréter y en el sistema de recolección renal (Kątnik-Prastowska *et al.*, 2014).

Las uroplaquinas pueden actuar como marcadores tumorales gracias a que se encuentran altamente conservadas y se expresan de forma abundante en el urotelio. De esta forma, la detección de uroplaquinas puede tener un valor significativo en el diagnóstico de carcinomas de origen urotelial. La Q-PCR es una de las técnicas más sensibles y que mejores resultados proporciona en la detección de metástasis en los ganglios linfáticos a través de la identificación de las uroplaquinas. Además, la técnica de Q-PCR permite hallar micrometástasis mediante la detección de ARNm de las uroplaquinas en muestras de sangre. No obstante, la expresión de las uroplaquinas no se puede correlacionar siempre con el grado patológico del cáncer ya que no se ha comprobado que su expresión disminuya en la progresión del cáncer (Wu *et al.*, 2009).

3.3 EVOLUCIÓN DE LAS UROPLAQUINAS

A pesar de lo que se pensaba en un primer momento, las uroplaquinas no se encuentran solo en el urotelio de mamíferos. Para comprender mejor la evolución que han sufrido las secuencias de las uroplaquinas y su origen, *Desalle et al (2014)* analizaron el genoma completo de los principales grupos de cordados con el objetivo de localizar y analizar secuencias relacionadas con las uroplaquinas.

El reino animal está formado por un amplio grupo de organismos divididos según su organización en diferentes filos, entre ellos, el filo *Chordata*. Los cordados pueden dividirse en tres subfilos, los cefalocordados, los urocordados y los vertebrados. Estos últimos, los vertebrados, se originaron hace 500 millones de años y, en la actualidad, representan la mayor parte de las especies del filo *Chordata* (Fig. 6). Los peces sin mandíbula son los primeros vertebrados que aparecieron en el planeta y reciben el nombre de *Agnatha*. De esta superclase de peces solo sobreviven dos especies, la lamprea y el mixino (*Satoh et al., 2014*).

A partir del estudio del genoma de varias especies de urocordados, cefalocordados y vertebrados, se han identificado los *Agnatha* como los primeros organismos que contienen secuencias de uroplaquinas en su genoma. En ninguno de los genomas de las especies estudiadas pertenecientes al subfilo de los urocordados y de los cefalocordados se han localizado secuencias relacionadas con las uroplaquinas. De esta forma, la presencia de secuencias de uroplaquinas en *Agnatha*, que son los vertebrados más primitivos, demuestra que las uroplaquinas se originaron hace 500 millones de años en el ancestro común de los vertebrados (*Desalle et al., 2014*).

Las uroplaquinas han evolucionado desde su origen hasta obtener las diferentes clases que se conocen en la actualidad. No obstante, su presencia no es la misma en todas las especies de vertebrados (Fig. 6).

Las uroplaquinas pertenecientes a la familia de las tetraspaninas, UPK1a y UPK1b, son proteínas de membrana involucradas en procesos celulares importantes como la señalización celular. Las secuencias de estas dos uroplaquinas se han localizado en el genoma de todos los vertebrados analizados (Fig. 6). No obstante, las tetraspaninas no son exclusivas de estos organismos ya que también se han encontrado secuencias de estas proteínas de membrana en el genoma de plantas (*Reimann et al., 2017*).

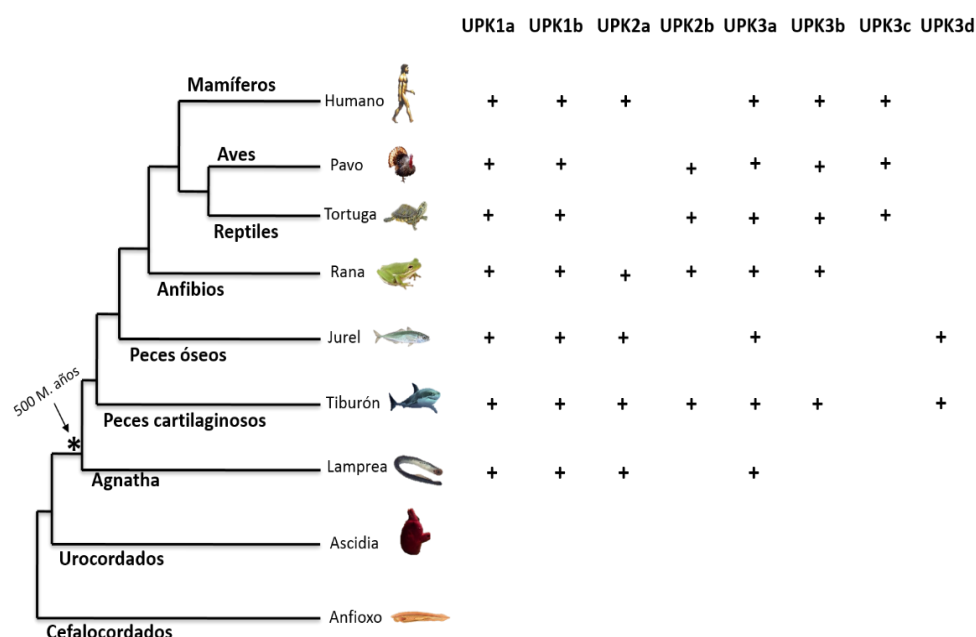


Figura 6. Presencia de secuencias de las diferentes clases de uroplaquinas en el árbol filogenético de los cordados.

El asterisco (*) marca el origen de los vertebrados; M= millón. Localización de las secuencias asociadas a uroplaquinas en el genoma secuenciado de diferentes especies pertenecientes a las subfamilias de los cefalocordados, los urocordados y los vertebrados. Adaptación figura de *Desalle et al (2014)*.

En cuanto a las uroplaquinas asociadas a tetraspaninas, gracias al análisis del genoma completo de diferentes vertebrados realizado por *Desalle et al (2014)* se hallaron tres uroplaquinas hasta entonces desconocidas, la UPK2b, la UPK3c y la UPK3d.

Dentro de las UPK2s, la UPK2a se encuentra en *Agnatha*, peces cartilaginosos, peces óseos, anfibios y mamíferos (Fig. 6). Por su parte, la UPK2b se encuentra en peces cartilaginosos, anfibios, aves y reptiles. Cabe destacar que, a diferencia de la UPK2a, la secuencia de UPK2b no se ha localizado en el genoma humano (Fig. 6). En algunas clases de vertebrados, como los anfibios, UPK2a y UPK2b coexisten, mientras que en otras especies solo se han encontrado una de las dos UPK2s. La existencia siempre como mínimo de UPK2a o UPK2b en las diferentes especies, permite que entre ambas, las UPK2s se encuentren en todos los vertebrados.

Dentro de las UPK3s, la UPK3a se expresa en todas las clases de vertebrados al igual que UPK1a y UPK1b. La UPK3b se encuentra en todos los vertebrados excepto en peces óseos y *Agnatha* (Fig. 6). La UPK3c se encuentra en mamíferos, aves y reptiles. Por último, la UPK3d se halla exclusivamente en peces óseos y peces cartilaginosos (Fig. 6).

A pesar de que las uroplaquinas presentan un patrón de localización en el genoma de los vertebrados diferente entre ellas, los miembros de los dos heterodímeros (UPK1a/UPK2a y UPK1b/UPK3a o UPK3b) están presentes en las mismas especies (Fig. 6). La localización de sus secuencias en los mismos organismos permite sugerir que hubo una coevolución entre los miembros de estos heterodímeros.

De las tres nuevas uroplaquinas descritas por *Desalle et al (2014)*, UPK3c es la única que se expresa en humanos. El origen de esta uroplaquina tuvo lugar durante el proceso de colonización de la vida terrestre por parte de los vertebrados, ya que la secuencia de UPK3c se ha hallado solo en el genoma de organismos terrestres, mientras que en el resto de vertebrados no se ha podido localizar. Además, el origen de UPK3c en este momento de la evolución se ve reforzado con el estudio del genoma de los anfibios, que representan un estado intermedio entre la vida acuática y terrestre y donde tampoco se localizaron secuencias relacionadas con UPK3c.

3.4 UROPLAQUINAS EN SUPERFICIE OCULAR

Las uroplaquinas son los principales componentes de las placas uroteliales, sin embargo, estas proteínas se encuentran en el genoma de organismos que carecen de urotelio. Este hecho sugiere que las uroplaquinas no solo participan en la formación y funcionamiento del urotelio sino que, además, deben realizar otras funciones no específicas de este tejido.

Estudios de Western-blot y PCR han permitido detectar la expresión la UPK1b en el tejido ocular humano. A pesar de que UPK1b forma un heterodímero con UPK3a o UPK3b, esta tetraspanina es la única uroplaquina cuya secuencia se ha descrito en el tejido corneal y la conjuntiva. Esto puede explicarse porque la UPK1b es la única uroplaquina, descrita hasta ahora, que puede abandonar el RE sin formar un heterodímero. Además, otra diferencia entre los tejidos de la superficie ocular y el urotelio es la baja expresión de UPK1b en las células más apicales tanto en el tejido corneal como en el conjuntival, mientras que en el urotelio la células más superficiales son las que contienen mayor concentración de UPK1b (*Adachi et al., 2000*).

El papel de la UPK1b en la superficie ocular es todavía desconocido aunque puede estar relacionado con la función que realiza en el urotelio. Por lo tanto, UPK1b puede ayudar al tejido corneal a resistir contra las presiones intraoculares y exteriores que sufra el ojo. Además, UPK1b puede ayudar a defender y prevenir la superficie ocular contra la

infección bacteriana, ya que esta uroplaquina tiene la capacidad de unirse a *E. coli*. De esta forma, la unión de UPK1b a *E. coli* facilita la eliminación de este patógeno por parte del sistema inmune (Adachi *et al.*, 2000).

3.4.1 ESTRUCTURA DE LA SUPERFICIE OCULAR

El ojo es una esfera llena de líquido cuya pared está compuesta por tres capas: la retina, el tracto uveal y la esclerótica (Kels *et al.*, 2015) (Fig. 7).

La retina es la capa más interna del ojo, es la única capa que contiene neuronas sensibles a la luz. La capa adyacente a la retina es el tracto uveal que se encuentra dividido en coroides, cuerpo ciliar e iris. Por último, la capa más externa es la esclerótica que cubre la mayor parte del globo ocular. En la parte frontal del ojo, esta capa se transforma en la córnea (Kels *et al.*, 2015) (Fig. 7).

La córnea se encuentra en la cara externa de la esfera ocular y sus principales objetivos son proteger las estructuras internas del ojo y permitir la refracción y transmisión de los rayos de luz. En humanos, la córnea está formada por cinco capas: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (Sridhar, 2018) (Fig. 7).

El epitelio de la córnea está compuesto por varias capas de células uniformes que actúan como una barrera para el paso de iones y microorganismos. La segunda capa es la membrana de Bowman. A pesar del nombre que recibe, esta capa no es una membrana verdadera sino una estructura acelular formada principalmente por colágeno tipo I y V. Justo detrás de esta membrana se encuentra el estroma que representa aproximadamente el 80% de la estructura de la córnea. El estroma no se puede regenerar, si se daña acaba dando lugar a una cicatriz. Después del estroma se encuentra la membrana de Descemet, formada también por componentes acelulares, principalmente por fibras de colágeno tipo IV y laminina. Por último, la capa más interna de la córnea es el endotelio formado por una monocapa de células metabólicamente activas (Sridhar, 2018) (Fig. 7).

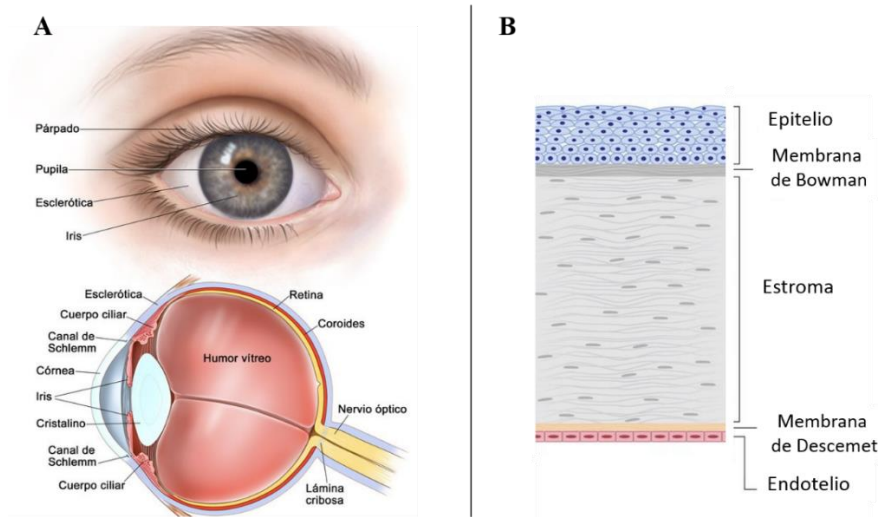


Figura 7. Estructura de la superficie ocular.

(A) Anatomía del globo ocular donde se pueden observar las tres capas que forman este tejido (retina, tracto uveal y esclerótica) y sus respectivos componentes. **(B)** Esquema de las cinco capas que conforman la córnea.

3.4.2 PATOLOGÍAS DE LA SUPERFICIE OCULAR: PTERIGION Y QUERATOCONO

Después de las cataratas y el glaucoma, las patologías de la córnea representan la tercera causa de ceguera en el mundo. No obstante, los mecanismos fisiopatológicos de la mayoría de las patologías que causan la ceguera solo se conocen parcialmente. Por ello, la caracterización molecular de proteínas con altos niveles de expresión y/o con una expresión diferencial en la córnea y que, además, estén relacionadas directa o indirectamente con la señalización celular permitiría conocer un poco más sobre la vía molecular de estas patologías (Semba *et al.*, 2013).

El pterigion es una patología de la superficie ocular que se caracteriza por una proliferación fibrovascular de la conjuntiva sobre el tejido corneal periférico. Se produce una cicatrización sobre la superficie del ojo que puede conllevar a la pérdida de visión o diplopía (Fig. 8). Varios estudios sugieren que uno de los principales causantes del desarrollo de esta patología es la radiación ultravioleta (UV). De esta forma, se ha visto que la incidencia de pterigion se incrementa en las poblaciones cercanas al ecuador donde existe una mayor exposición a la luz UV y, por lo tanto, mayor riesgo de sufrir esta patología (Kim *et al.*, 2016).

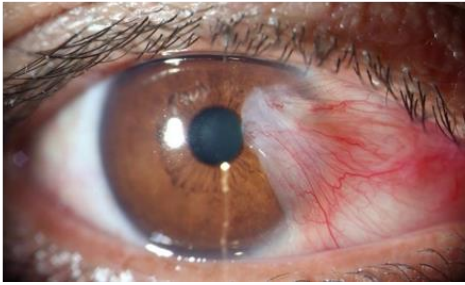
A**B**

Figura 8. Ejemplo de pterigion y queratocono en la superficie ocular de un individuo.

(A) Paciente con pterigion. En la superficie del globo ocular se puede observar el crecimiento anormal de la conjuntiva sobre la córnea. **(B)** Paciente con queratoconos. Se puede observar cómo la córnea se encuentra abultada hacia delante con la parte interna más estrecha que los extremos simulando la forma de un cono.

El queratocono es un trastorno progresivo en el que la organización del colágeno de la córnea sufre una serie de cambios que acaban provocando el adelgazamiento y abultamiento de la misma (Fig. 8). El queratocono es la distrofia corneal más frecuente, varios estudios sugieren que se trata de una patología multifactorial en la que no solo intervienen factores genéticos sino también ambientales. Además, si no se trata el queratocono puede acabar provocando un deterioro visual e incluso una ectasia corneal (Mukhtar *et al.*, 2018).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La UPK3c se originó en el ancestro común de aves/reptiles y mamíferos a partir de una duplicación de alguno de los miembros de la familia de las uroplaquinas asociadas a tetraspaninas.

Por otro lado, el origen de UPK3c tuvo lugar durante la transición de la vida acuática hacia la vida terrestre por parte de los vertebrados. Este proceso provocó que la córnea sufriese una serie de cambios para adaptarse al medio terrestre y poder focalizar la luz procedente del aire al interior del ojo. Además, dentro de la superfamilia de las uroplaquinas, se ha descrito la expresión de UPK1b en la córnea. Dado el momento en el que se originó UPK3c y la localización de UPK1b en córnea, UPK3c podría expresarse en la superficie ocular y su expresión podría verse alterada en la superficie ocular patológica.

Para comprobar esto, se propusieron los siguientes objetivos:

- Estudiar las posibles relaciones evolutivas que pueden existir entre UPK3c y el resto de miembros de la familia de las uroplaquinas asociadas a tetraspaninas.
- Analizar la evolución que ha experimentado la secuencia de UPK3c desde su origen hasta humanos.
- Determinar si UPK3c se expresa en córnea humana.
- Comparar la expresión de UPK3c en la superficie ocular humana sana y patológica.

5. METODOLOGÍA

5.1 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE UPK3a, UPK3b Y UPK3c

Para la obtención de las secuencias de los genes UPK3b (NM_030570.3) y UPK3c (KF150200.1) humanas se utilizó la base de datos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias de ambas uroplaquinas se copiaron en formato FASTA.

El estudio de estos dos genes, UPK3b y UPK3c, y su localización en el genoma de humano, chimpancé, gorila y orangután se realizó a través del servidor UCSC (<https://genome.ucsc.edu>). Se utilizaron los ensamblajes Susie_PABv2/ponAbe3 para orangután, GSMRT3/goGOR5 para gorila, Clint_PTRv2/panTRO6 para chimpancé y GRch38/hg38 para humano.

Para analizar la evolución que ha tenido la secuencia de UPK3c en el genoma de diferentes especies de vertebrados se utilizó el servidor Ensembl (www.ensembl.org). Esta base de datos contiene mapas genéticos que permiten determinar la posición de genes concretos, en este caso UPK3b y UPK3c. Una vez analizado el *loci* del cromosoma donde se encuentran UPK3b y UPK3c, se seleccionaron cuatro genes colindantes (ALKBH4, DTX2, YWHAG y Hspb1) y se estudió la sintenia de este *loci* en seis especies de vertebrados (xenopus, pavo, zarigüeya, gato, ratón y orangután).

Finalmente, las secuencias de aminoácidos de UPK3a, UPK3b y UPK3c de gallina, zarigüeya, ratón y humano se obtuvieron a partir del material suplementario aportado por *Desalle et al.* (2014).

5.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS Y ALINEAMIENTOS

Las secuencias de UPK3a, UPK3b y UPK3c se alinearon con el objetivo de buscar similitudes que permitan conocer mejor el posible origen de UPK3c. Los alineamientos de las secuencias de UPK3a, UPK3b y UPK3c se realizaron con el servidor MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server>). Además, se realizó el cálculo del porcentaje de identidad que comparten estas tres uroplaquinas en gallina a través del servidor Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Se utilizó el mismo servidor para el porcentaje de identidad de las tres copias de UPK3c en humanos.

La traducción de estas tres copias de UPK3c en humanos se realizó a través del servidor EMBOSS Transeq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/).

La predicción de los posibles sitios de N-glicosilación en UPK3c humana se realizó con el servidor NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) mientras que para la predicción de los dominios transmembrana de UPK3a, UPK3b y UPK3c se utilizó el servidor TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). La determinación del péptido señal se llevó acabo con el servidor SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y el cálculo del peso molecular de la proteína de UPK3c se realizó con el servidor Protein Molecular Weight (https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html).

5.3 ANÁLISIS DE ESTs

Para analizar los tejidos humanos donde podría llegar a expresarse la UPK3c se llevó a cabo una búsqueda de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) utilizando el primer exón de esta uroplaquina en la base de datos NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov>).

5.4 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y PROCESAMIENTO

5.4.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de córnea, pterigion y queratocono se obtuvieron a partir de la colección de muestras del Biobanc HUIJ23-Node Biobanc HTVC.

La colección de muestras se elaboró según el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre. Por su parte, los datos obtenidos de los pacientes han sido trabajados acorde a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y según el Reglamento 2016/676 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de Abril de 2016. Además, el grupo Biología Molecular del Urotelio Sano y Patológico tiene aprobado por parte del CEIC del HUIJXXIII la recogida de muestras (UPK_EYE 082/2017) acorde a lo establecido en este proyecto. Todas las muestras fueron recogidas con el correspondiente consentimiento informado del paciente.

Los criterios que se establecieron para incorporar pacientes dentro del estudio fueron los siguientes:

Inclusión: pacientes con patologías oculares de pterigion y queratocono.

Exclusión:

-Dentro del grupo de pacientes con pterigion, se excluyeron los pacientes con invasión corneal inferior a 2 mm y evidencia de no crecimiento, agudeza visual > 0.7 con corrección y sin evidencia de displasia.

-Respecto al grupo de pacientes con queratocono, se excluyeron los pacientes con agudeza visual > 0.4 con o sin corrección, infección ocular activa, antecedente herpético corneal o intraocular en los últimos dos años.

Las muestras se obtuvieron a partir de intervenciones quirúrgicas como trasplantes de córnea de todas las capas, de las capas posteriores o de las anteriores, en el caso de los queratoconos, o bien a partir de las cirugías de pterigion. En los trasplantes se pudieron recoger dos muestras: los excedentes de córnea donante y la córnea receptora con una patología o que ha sido rechazada en un trasplante anterior. Respecto a las cirugías de pterigion, se obtuvo una sola muestra por intervención.

Una vez extraídas las muestras, estas se recogieron en microtubos con *RNA later* y se almacenaron a -80°C en el Biobanc HUIJ23-Node Biobanc HTVC hasta su posterior procesamiento y estudio.

5.4.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Previamente a la determinación de los niveles de expresión proteica de UPK3c, se realizó la extracción de la proteína.

En primer lugar, se pesaron todas las muestras recogidas en microtubos en una balanza analítica, se retiró el *RNA later*, se lavaron las muestras con PBS dos veces y se añadió un tampón de lisis (TrisHCl 25 mM, pH 7; EDTA 2mM y SDS 2%). Para obtener el lisado celular, las muestras se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación con nieve carbónica y baño a 37°C respectivamente. A continuación, se realizaron cuatro ciclos de sonicación de 10 segundos cada uno y amplitud 50. Por último, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 15000 g.

Una vez el contenido proteico se recuperó del sobrenadante, se realizó la cuantificación de la proteína recuperada utilizando el kit comercial *Pierce Protein BCA assay*, acorde a las instrucciones del proveedor (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos).

Para determinar la concentración de proteína recuperada se preparó una recta patrón entre 0 y 40 µg totales de BSA y se midió la absorbancia a 540 nm.

Una vez determinada la concentración de proteína, se ajustó la concentración del resto de contenido proteico recuperado que no se utilizó para la cuantificación de proteínas, para el análisis de la expresión proteica a través del Western-blot. Para ello, se añadió a los microtubos con el extracto proteico tampón de lisis y tampón de carga y se colocaron en un baño de agua a 100 °C durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se congelaron a -80 °C hasta la realización del Western-blot.

5.5 DEGLICOSILACIONES DE LAS MUESTRAS

El contenido proteico de córnea, pterigion y queratocono se deglicosiló utilizando las enzimas, Endo H o PNGase F (New England Biolabs, Estados Unidos). Para ello, primero se desnaturalizó el lisado proteico de las muestras incubando entre 10 o 18 µg del extracto proteico recuperado en un buffer desnaturalizante (5% SDS y 0.4 M DTT) durante 10 minutos a 100 °C. A continuación, se realizó el proceso de deglicosilación en el que se añadieron al volumen de reacción anterior, 167 U de enzima y 0.5 M de citrato de sodio (pH: 5.5) cuando se utilizó la Endo H. En el caso de PNGase F, se añadieron 0.5 M de fosfato de sodio (pH: 7.5), 1% de NP40 y las mismas unidades de enzima. Por último, las reacciones se incubaron durante 1 hora a 37 °C y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

Como control positivo de la expresión de UPK3c se utilizó un lisado celular de esta uroplaquina, que había sido sobre expresada en una línea celular que no expresaba UPK3c de forma endógena. Este lisado celular de UPK3c había sido previamente preparado por el grupo de investigación. La línea celular en la que se transfectó UPK3c era la T24 de carcinoma de vejiga. Para la clonación de UPK3c, se utilizó el plásmido Pcs2+ como vector de expresión..

5.6 WESTERN-BLOT

El contenido proteico procedente de la sobreexpresión de UPK3c en la línea celular T24 y de las muestras de córnea, pterigion y queratoconos deglicosilado se separó mediante electroforesis. Para ello, se cargaron 18 o 25 µg de muestra deglicosilada o sin deglicosilar respectivamente en Mini-PROTEAN® Precast Gels del 10% (BioRad, Estados Unidos).

Una vez separadas las proteínas se llevó a cabo su transferencia sobre una membrana de nitrocelulosa para realizar la detección. En este caso, se utilizaron Trans-blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packs 0.2 µm (BioRad, Estados Unidos). Para la transferencia se utilizó Trans-blot Turbo Transfer System (BioRad, Estados Unidos) a 1.3 A y 25 V. Además, como control de carga se tiñó la membrana de nitrocelulosa con Ponceau S solution (Sigma Aldrich, Estados Unidos) durante 10 minutos. Una vez pasados los 10 minutos, la membrana se destiñó con PBS-Tween 0.1%.

Antes de realizar la incubación, las membranas fueron bloqueadas con una solución de PBS-Tween 0.1% y 3% de leche descremada durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se llevó a cabo la incubación de la membrana con anticuerpo primario contra UPK3c (Origene, Estados Unidos) a una dilución 1:2000 y a 4 °C durante la noche. Posteriormente, se incubó la membrana con anticuerpos secundarios ECL anti-conejo conjugados a HRP (Amershan Biosciences, Estados Unidos) a temperatura ambiente durante 1 hora y en agitación, a una dilución 1:2000. Ambos anticuerpos fueron preparados en PBS 1% de leche descremada. En los casos en los que se utilizó β-actina como control de carga, la incubación de la membrana se realizó primero con anticuerpo primario contra β-actina (Sigma Aldrich, Estados Unidos) a temperatura ambiente durante 1 hora y en agitación y, posteriormente, con anticuerpo secundario anti-ratón a una dilución 1:2000.

Una vez incubada la membrana con los anticuerpos primarios y secundarios, se procedió a la visualización de la expresión proteica. En este caso se utilizó SuperSignal™ West Femto Maximum Sensibility Substrate o SuperSignal West Pico Plus (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desalle et al (2014) identificaron tres nuevas uroplaquinas, UPK2b, UPK3c y UPK3d, de las cuales solo la UPK3c se expresa en humanos. La expresión de esta uroplaquina en humanos la convierte en un objeto de estudio interesante ya que existe poca información sobre el papel que desempeña la UPK3c en nuestro organismo. Para entender mejor las posibles funciones de UPK3c, se realiza un estudio sobre su origen y evolución.

6.1 ANÁLISIS ORIGEN DE UPK3c

UPK3a, UPK3b y UPK3c son los tres miembros de la superfamilia de UPK3s que se expresan desde aves y reptiles hasta humanos. Con el objetivo de estudiar si el origen de UPK3c se encuentra vinculado a UPK3a o UPK3b, se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de estas tres uroplaquinas en gallina, zarigüeya, ratón y humano (Fig. 9).

La comparación entre la secuencia de UPK3c y las secuencias de las otras dos uroplaquinas, UPK3a y UPK3b, en gallina permitió observar un mayor grado de similitud entre UPK3c y UPK3b, comparten una identidad del 55.83%, mientras que entre UPK3c y UPK3a el porcentaje es inferior, comparten un 45.04% (Anexo 1). La identidad que comparte UPK3c con UPK3b puede sugerir que existe una relación evolutiva más cercana entre ambas.

Además de esta similitud entre sus secuencias, UPK3b y UPK3c se encuentran en el mismo cromosoma. En el caso del ser humano, ambas se localizan en el cromosoma 7 mientras que UPK3a se ubica en el cromosoma 22. De esta forma, se ve reforzada la idea de un posible nexo evolutivo entre estas dos uroplaquinas. UPK3c solo se expresa en aves, reptiles y mamíferos, por lo tanto, es posible que esta uroplaquina se haya originado a partir de una duplicación de UPK3b, en el ancestro común de estas tres clases de vertebrados.

UPK3b también está relacionada con UPK3a, ya que ambas uroplaquinas, contienen una secuencia de 12 aminoácidos altamente conservada en el extremo N-terminal del dominio TMD. A pesar de que UPK3c no contiene esta secuencia, en el caso de la gallina se puede observar cómo algunos aminoácidos aún se encuentran conservados (Fig. 9).

UPK3c.humano AAPEHISYVPQLSNDTL-AGRLTLSTFTLEQPLGQFSSHN-ISDLDTIWLVLVVALSNATQSFTAPR 65
 UPK3c.ratón ---ESINYAPQLLGATL-EGRLTQSTFTLEQPLGQFKNVN-LSDDPIWLVLVVAHSNAQNFTAPR 65
 UPK3c.zarigüeya ---EPINYTPAITREPL-EGSITSTFTLDQPNQFNGSG-ISLDDIWLVLVAFSNAQSFFPPQ 65
 UPK3c.gallina ---DKLSYKPTLVGGNV-EGRMTGSTFVLEQPRCVFDSYS-TA---NIWLVLVATRAQMNAF-NDS 65

UPK3b.humano ---ELVPYTPQITAWDL-EGKVTATTSFLEQPRCVFDGL--ASASDTVWLVLVAFSNAISRGFQNP 65
 UPK3b.ratón ---DLIAYVPQITAWDL-EGKITATTSFLEQPRCVFDEH--VSTKDTIWLVLVAFSNAISRDVFNPQ 65
 UPK3b.zarigüeya ---DQIPYTPQISALAL-EGKVTATTSFLEQPRCIFSEL--AAPADAVWLVLVAFSNAITEDFNP 65
 UPK3b.gallina ---ALLPYVPRVAPGAM-PGKVTATTFVLERPRCIFDPF--ANASDAVWLAVAFADAISAFKNPT 65

UPK3a.humano ---AVNLQPQLASVTFATNNPTLTVA-LEKPLCMFDSKEALTGTHEVYLYVLVDSAISRNASVQ 65
 UPK3a.ratón ---TVNLQPQLASVTFATNNPTLTVA-LEKPLCMFDSSEPLSGSYEVLYAMVDSAMSRNVSVQ 65
 UPK3a.zarigüeya ---AVDLEPQMASITFATNNPTLTIT-LEKPFMFPNASNLGNVSYEYVLYVMENSISVRYAVIK 65
 UPK3a.gallina ---DQSMKPQLAAPELATNNPTLTVA-LEKPFMFDSSLHPNKSIAIYLYVMKSSANTISSVVT 65

UPK3c.humano TNQDIP--APANF-SQRGYYLTLRANRVLY-----QT-----RGQLHVLVRVGN 130
 UPK3c.ratón KVEDRH--APANF-DRNGYYLTLRANRVHY---KGGQP-----DSQRLVLRVGN 130
 UPK3c.zarigüeya SAQDIP--YAATF-LDKKYLTIRASRDLY---SSKRG-----SQGISVLRVGN 130
 UPK3c.gallina AQPGMEWSFQRFPTNTSAYLTLGAMQYHY---GCKP-----DRELTVLRVGS 130

UPK3b.humano TLADIP--ASPQL-LTDGHYMTLPLSPDQL---PCGDP-----MAGSGGAPVLRVGH 130
 UPK3b.ratón TAAKIP--TFPQL-LTDGHYMTLPLSLDQL---PCEDL-----TGGSGGVPVLRVGN 130
 UPK3b.zarigüeya TAAEIP--SYTEL-SSSFYMTLKLSPDLY---PCEEE-----DIAVLRVGS 130
 UPK3b.gallina SSAEVP--PYEGL-PTARAYMTLQMAAAAY---GCSAP-----GAALVRVGG 130

UPK3a.humano DSTNTP--LGSTF-LQTEGGRTGPYKAVFDLIP--SDLPSLDAIGDVSKASQILNAYLVRV 130
 UPK3a.ratón DSAGVP--LSTTF-RQTQGGSGPYKAAAFDLTP--GDLPSLDVAGDVTQASEILNAYLVRV 130
 UPK3a.zarigüeya NNRSFP--INSTF-QETAGGQAPYKAASFILPQ--GDLPNLDEAGDVSKVAEILSAYLVRV 130
 UPK3a.gallina DSSSKP--LDSTF-QQTHGGHLGPYKAASFDPVNC--VSPPRADAGDINKVSDVLKQYLRV 130

UPK3c.humano HCQP---TKIGCNHPLPGPGPYRVKFLVMN-DEG-PVAETKWSDDLRLQQAQALRAV---PGPQS 195
 UPK3c.ratón NCSL---ESQGCNSPLPGAGPYRVKFLAMS-AEG-PVAETLWSEIYLQQAQTFREA---PGSQG 195
 UPK3c.zarigüeya NC-----TRSDCNKPLPGPGPYRVKFLVMN-TNG-PVAGTNWSEIDTLRKVEFSES---RPPSKS 195
 UPK3c.gallina GCADN-ISVFNCCNGPLPGPGPYRVKFLALN-GSE-PTATTEWSGPITLKTAREPQSIPGMGARS 195

UPK3b.humano GCHQ---QPFCCNAPLPFGPGPYRVKFLVMD-TRGSPRAETKWSDPITLHQGKTPGSIDTWGRRS 195
 UPK3b.ratón GCYQ---RPFCCNAPLPFGPGPYRVKFLVMD-AAGPPKAETKWSNPIYLHQGKNPNSIDTWGRRS 195
 UPK3b.zarigüeya NCLRN-LSQEYCCNAPLLAPGPGPYRVKFLVMD-NNGQPKAETWWSDPITLNQKDPKRSIDTWGRRS 195
 UPK3b.gallina ACHG---RAPCCNGPLPSPGPGPYRVKFLLMG-CGG-PAETKWSDPILLRRARSLSTIDTTPARRS 195

UPK3a.humano TCLWDPNFQGLCCNAPLSAATEYRFKYVLVNMSTGLVEDQTLWSDPIRTNQITPYSTIDTWGRRS 195
 UPK3a.ratón TCFWDPNFQGLCCNPPLTAATEYRFKYVLVNMSTGLVQDQTLWSDPIWTNRPPIPYSAIDTWGRRS 195
 UPK3a.zarigüeya YCSLNPNFKGTCCNPPLTRATEYRFKYVLINPSSGFVEDQTLWSDPIRTNQISPYLEIDTWGRRS 195
 UPK3a.gallina TCLYDPNFDLVCCNPPLAPDTTYRFKYVLVNTTEGIVKQDQTLWSDPIKTRAKKLPKIDTWGRRS 195

UPK3c.humano PGTVVIIAAILSILLAVLLTVLLAVLIYT-C 225
 UPK3c.ratón KGTVVIIAAILSILLAILLVVFLVVISAC-C 225
 UPK3c.zarigüeya AGTIVIIAAILSILLSILLFALVALLVYT-C 225
 UPK3c.gallina GAVIAITAILSIVLLAILLAALLATLC---S 225

UPK3b.humano GGMIVITSILSSLAGLLLLLAFLAASTMR-F 225
 UPK3b.ratón GCMIVITSILSALAGLLLLLAFLAASTTR-F 225
 UPK3b.zarigüeya GCMIVITSILSTFAGLLVIAFLIASTVQ-F 225
 UPK3b.gallina STAVVIAAILASLGAALAMAVLGAV---G 225

UPK3a.humano GGMIVITSILGSLPFFLLVGFAGAIASLV 225
 UPK3a.ratón GGMIVITSILGSLPFFLLVGFAGAIILSFV 225
 UPK3a.zarigüeya GAMIVITSILSTLVFLLVGFAGAVIFSFV 225
 UPK3a.gallina GGMIVITSILSVSVFLLLAGLLASVFSALV 225

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de UPK3a, UPK3b y UPK3c.

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de UPK3a, UPK3b y UPK3c en mamíferos (humano, ratón y zarigüeya) y aves (gallina) a través del servidor MAFFT. En la figura no aparecen representados los exones 1 y 6 de las secuencias de las tres uroplaquinas. Las letras de color azul y negro representan los exones. Las letras de color rojo marcan las uniones entre los exones. El color amarillo marca las cisteínas que participan en la formación de puentes disulfuro. El color azul claro señala la secuencia conservada de 12 aminoácidos. Por último, las letras marcadas con el color verde indican el dominio transmembrana.

Por otro lado, las cisteínas establecen uniones covalentes por parejas entre ellas dando lugar a puentes disulfuro. En UPK3a y UPK3b hay cuatro cisteínas que participan en la formación de puentes disulfuro mientras que en UPK3c en mamíferos solamente hay dos. Al igual que con la secuencia conservada de 12 aminoácidos, en la UPK3c de gallina se mantienen las otras dos cisteínas perdidas en mamíferos. Esto se debe a que su secuencia se encuentra más cerca evolutivamente al ancestro común de aves/reptiles y mamíferos. Dado que las cisteínas tienden a formar puentes disulfuro por parejas, este patrón de

conservación de cisteínas permite establecer que las cisteínas 1 y 2 forman un puente disulfuro mientras que las cisteínas 3 y 4 forman otro puente disulfuro (Fig. 9).

Por lo tanto, se refuerza la idea del origen de UPK3c en el ancestro común de aves/reptiles y mamíferos. Así, la UPK3c en el genoma de gallina mantiene algunos aminoácidos de la secuencia conservada del extremo N-terminal y los dos puentes disulfuro, mientras que en mamíferos como la zarigüeya, el ratón y el ser humano la secuencia conservada y uno de los dos puentes disulfuro se ha perdido.

Para confirmar si el origen de UPK3c se encuentra vinculado a UPK3b, se analizó el genoma de aves, reptiles y mamíferos, los cuales expresan UPK3b y UPK3c (Fig. 10). Además, para tener una visión más amplia de la historia evolutiva de estas dos uroplaquinas, se estudió el genoma de los anfibios, que solo expresan UPK3b, pero que representan el eslabón previo a los vertebrados terrestres (Fig. 10).

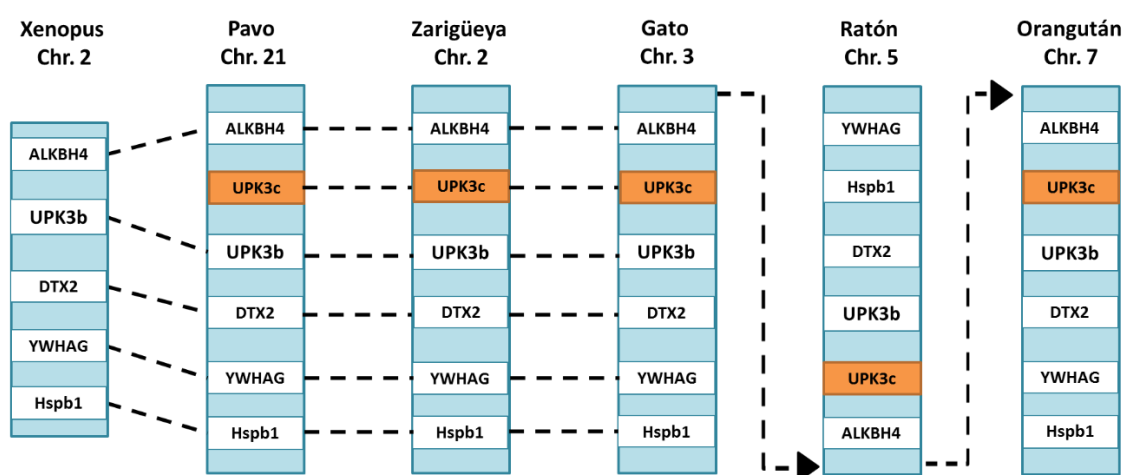


Figura 10. Bloque de genes conservado, entre los que se encuentra UPK3b y UPK3c, en el cromosoma de seis especies distintas de vertebrados.

Estudio de la sintenia en seis especies distintas de vertebrados (xenopus, pavo, zarigüeya, gato, ratón y orangután). Se puede observar que en todos los cromosomas hay un bloque de genes que se conserva, lo que permite comprobar que el origen de UPK3c se debe a una duplicación en el gen de UPK3b.

El término “sintenia” se utiliza para describir la conservación de bloques ordenados de genes entre cromosomas de especies diferentes. En el genoma de las seis especies estudiadas, desde la rana (xenopus) hasta el orangután, se observaron varios genes cuya localización se conserva próxima a la secuencia de UPK3b (Fig. 10). Dentro de este grupo de genes se encuentran ALKBH4, DTX2, YWHAG y Hspb1 que, junto con UPK3b conforman un bloque conservado.

En los cromosomas de rana y de pavo estudiados se observa el mismo bloque de genes adyacentes a UPK3b pero, en el caso del genoma del pavo, a este bloque se incorpora un nuevo gen, UPK3c, contiguo a la secuencia de UPK3b (Fig. 10). Al analizar los cromosomas de las cuatro especies restantes (zarigüeya, gato, ratón y orangután) se puede comprobar cómo el bloque de genes observado en los dos organismos anteriores (rana y pavo) se mantiene. Además, dentro de este bloque, la secuencia de UPK3c se mantiene siempre próxima a la secuencia de UPK3b (Fig. 10). Por lo tanto, este análisis junto con la conservación de los dos puentes disulfuro y una parte de la secuencia de 12 aminoácidos en gallina, demuestra que UPK3c se originó a partir de la duplicación de la secuencia de UPK3b, en el ancestro común de aves/reptiles y mamíferos.

No obstante, la sintenia entre los cromosomas de estas seis especies de vertebrados se encuentra levemente alterada en ratón y orangután. Esta variación en la estructura del bloque que contiene UPK3b y UPK3c es consecuencia del cambio de localización de estos genes, ya que se ubican en cromosomas distintos en cada especie. Se puede observar cómo este bloque de genes se encuentra invertido en el cromosoma 5 de ratón respecto a los cromosomas del resto de especies analizadas. De esta forma, se cambia el sentido en el que se encuentran dispuestas las secuencias génicas, pero los genes que se encuentran adyacentes a UPK3b siguen siendo los mismos que en el resto de especies estudiadas (Fig. 10).

6.2 EVOLUCIÓN DE LA SECUENCIA DE UPK3c

Para analizar la evolución de la secuencia de UPK3c en mayor detalle, se estudiaron UPK3c y UPK3b en primates superiores, desde orangután hasta humano. A partir de la base de datos de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC) se obtuvo información del número de copias y posición de ambos genes en el cromosoma 7 de orangután, gorila, chimpancé y humano (véase Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Secuencias de UPK3b en el cromosoma 7 de humano, chimpancé, gorila y orangután.

ESPECIE	CROMOSOMA	CADENA	INICIO	FINAL	IDENTIDAD
HUMANO	Chr.7	+	76510653	76515251	100%
CHIMPANCÉ	Chr.7	+	68141871	68146167	99,2%
GORILA	CYUI01002214v1	+	12442	16957	98,0%
ORANGUTÁN	Chr.7	-	5919939	5924510	96,0%

Tabla 2. Secuencias de UPK3c en el cromosoma 7 de humano, chimpancé, gorila y orangután.

ESPECIE	CROMOSOMA	CADENA	INICIO	FINAL	IDENTIDAD
HUMANO	Chr.7	-	102637525	102642741	100%
	Chr.7	-	102538417	102543636	99,9%
	Chr.7	-	43984995	43990207	97,9%
CHIMPANCÉ	Chr.7	-	98726890	98782102	99,0%
	Chr.7	-	44298446	44303715	98,5%
GORILA	CYUI01015540v1	+	1787551	1792711	98,3%
	CYUI01015965v1	-	60336	65533	98,0%
ORANGUTÁN	Chr.7	-	5895994	5901491	97,0%

Durante la evolución de los primates, el cromosoma 7 ha sufrido una serie de reordenamientos intracromosómicos (Müller *et al.*, 2004). Estas reorganizaciones cromosómicas son las responsables de las diferencias en la localización de las secuencias de UPK3b y UPK3c entre orangután, gorila, chimpancé y humano (Fig. 11).

El orangután es el primer eslabón de la rama evolutiva de los grandes primates y el único que posee una sola copia de UPK3b y UPK3c. Los dos genes se localizan en la región 7p22.1, muy próxima al telómero del cromosoma (Fig. 11).

La siguiente especie estudiada es el gorila. A partir de la base de datos UCSC se obtuvieron *scaffolds* de UPK3b y UPK3c, pero no se consiguió la localización exacta de estas uroplaquinas (véase Tabla 1 y 2). No obstante, la estructura del cromosoma 7 en humanos y chimpancé está bastante conservada, por lo tanto, a partir de estos dos primates se puede llegar a deducir la localización de UPK3b y UPK3c en gorilas. Durante la evolución de los primates superiores, en el cromosoma 7 tuvo lugar una inversión pericéntrica en el ancestro común de gorilas, chimpancés y humanos entre los *loci* 7p22.1 y 7q21.3, y una inversión paracéntrica entre los *loci* 7q11.23 y 7q22.1 en el ancestro común de chimpancés y humanos (Müller *et al.*, 2004). Estos dos reordenamientos permiten determinar que las secuencias de UPK3b y UPK3c en gorila se encuentran en la región 7q11.23 (Fig. 11). Por otra parte, el cromosoma 7 de chimpancé y humano posee una segunda copia de la secuencia de UPK3c en el brazo corto del cromosoma. En ambas especies esta uroplaquina se encuentra en la región p13, lo que permite deducir, gracias a la conservación del cromosoma 7 en primates, que el genoma de gorila contiene la segunda copia de UPK3c en esta misma localización (Fig. 11).

El chimpancé es el género de primates vivos más cercano al ser humano. La localización de UPK3b y UPK3c en las mismas regiones cromosómicas es uno de los varios ejemplos de estructuras conservadas entre chimpancé y humanos. En el chimpancé, la secuencia de UPK3b se encuentra en la región 7q11.23, igual que en el cromosoma de gorila, sin embargo, UPK3c ha cambiado de localización respecto al genoma de gorila como consecuencia de una inversión paracéntrica, y su secuencia se encuentra en la región 7q22.1 (Fig. 11).

En humanos, la localización de estas dos uroplaquinas se mantiene en las mismas regiones cromosómicas que en chimpancé, pero la secuencia de UPK3c vuelve a duplicarse aumentando a tres el número de copias de esta uroplaquina en humanos (Fig. 11).

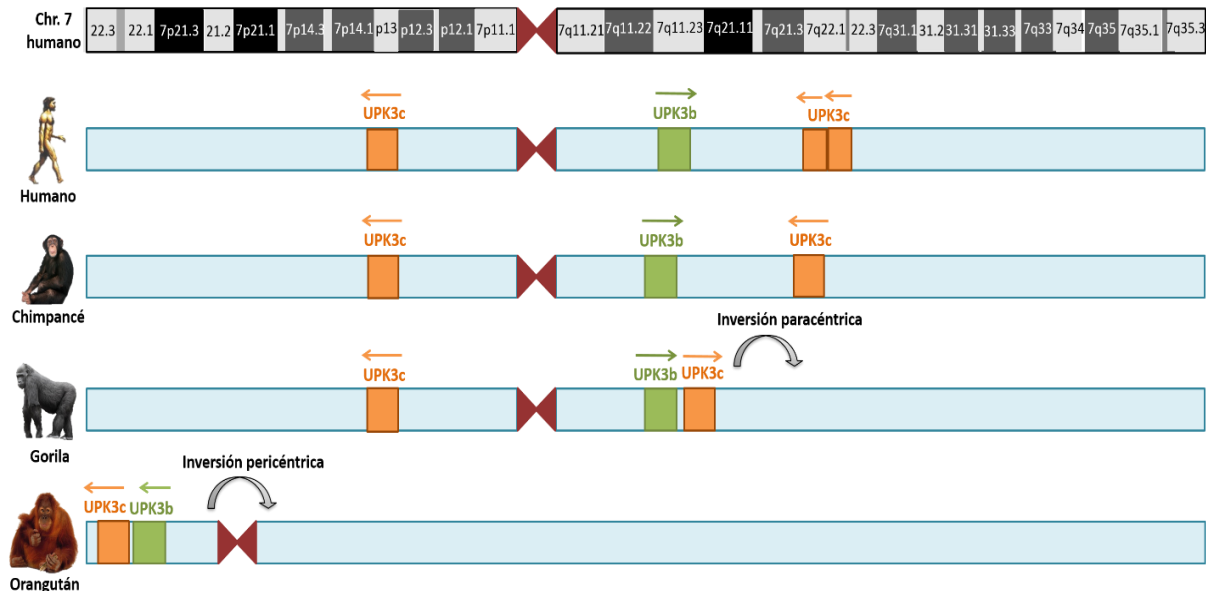


Figura 11. Análisis de las secuencias de UPK3b y UPK3c en el cromosoma 7 de humano, chimpancé, gorila y orangután.

Durante la evolución de los grandes primates, se produjeron varios reordenamientos en el cromosoma 7 de estas especies. Estas reorganizaciones han provocado modificaciones en las secuencias de varios genes, entre ellos, UPK3b y UPK3c, cuyas localizaciones y número de copias han variado a lo largo de la evolución. Los cuadros naranjas indican la ubicación de UPK3c en el cromosoma, los cuadros verdes marcan la posición de UPK3b y los triángulos rojos representan los centrómeros en cada cromosoma. Se puede observar cómo en orangután solo hay una copia de UPK3b y UPK3c mientras que gorila y chimpancé contienen dos copias de UPK3c y los humanos tres. Además, también se produjo una modificación de la localización de la secuencia de estas dos uroplaquinas en el cromosoma 7 debido a una inversión pericéntrica y una paracéntrica en el ancestro común de gorilas, chimpancés y humanos y en el ancestro común de chimpancés y humanos respectivamente.

Por lo tanto, desde su origen a partir de la duplicación de la secuencia de UPK3b en el ancestro común de aves/reptiles y mamíferos, la secuencia de UPK3c ha ido evolucionando.

Además de haber sufrido varias traslocaciones dentro del mismo cromosoma, también se ha incrementado el número de copias de esta uroplaquina dentro del genoma (Fig. 11). De esta forma, mientras el cromosoma 7 de orangután posee una sola copia de UPK3c, este mismo cromosoma en humanos contiene tres copias de UPK3c. Este aumento se debe a las duplicaciones que se produjeron en diferentes puntos del cromosoma 7, entre ellas, una duplicación en la región 7q22.1 en humanos dando lugar a dos copias de UPK3c en esta región cromosómica (Müller *et al.*, 2004) (Fig. 11). No obstante, la copia de UPK3c en la región p13 en humano, chimpancé y gorila no puede explicarse por las inversiones paracéntricas o pericéntricas anteriormente descritas.

6.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UPK3c EN HUMANOS

En el estudio de las copias de UPK3c humanas, se llevó a cabo el alineamiento de las tres secuencias completas de esta uroplaquina, localizadas en diferentes regiones del cromosoma 7, para poder analizar la variación que han sufrido estas secuencias a lo largo de la evolución (Fig. 12).

Las dos secuencias de UPK3c ubicadas en 7q22.1, UPK3c.I y UPK3c.II, comparten una identidad del 99.87% (Anexo 2). Esto se debe a que presentan la misma secuencia de nucleótidos excepto en la posición 532, donde se ha producido una transversión, en este caso, entre citosina y adenina (C-A) (Fig. 12). Sin embargo, esta mutación puntual es silenciosa, por lo tanto, ambas secuencias dan lugar a la misma proteína (Fig. 13).

La tercera copia de UPK3c se encuentra en el locus 7p13 y comparte una identidad del 97.35% y 97.47% con UPK3c.I y UPK3c.II respectivamente (Anexo 2).

Estas diferencias en el grado de identidad que se observan entre las tres copias de UPK3c en humanos se deben a que la copia ubicada en el locus 7p13 presenta 15 mutaciones puntuales (10 transversiones y 5 transiciones) y la inserción de un nucleótido en la posición 21, lo que da lugar un cambio en el marco de lectura (Fig. 12 y 13).

```

UPK3c . I      ATGGACAACAGCTGGAGGCTTGGCCCGCATAGGGCTCTCTGCGGGACAGTCCCAGCTGCTAGTGTGCTGTTGCTGCTACTGACCCG 90
UPK3c . II     ATGGACAACAGCTGGAGGCTTGGCCCGCATAGGGCTCTCTGCGGGACAGTCCCAGCTGCTAGTGTGCTGTTGCTGCTACTGACCCG 90
UPK3c . III    ATGGACAACAGCTGGAGGCTTGGCCCGCATAGGGCTCTCTGCGGGACAGTCCCAGCTGCTAGTGTGCTGTTGCTGCTACTGACCCG 90
*****
UPK3c . I      TGTCCAGCCTGGGACAGAGCTGGCTGCCAGAGCACATCAGCTATGTGCCCAGCTCTCAAACGACACCTGGCGGGGAGGCTCACCCT 180
UPK3c . II     TGTCCAGCCTGGGACAGAGCTGGCTGCCAGAGCACATCAGCTATGTGCCCAGCTCTCAAACGACACCTGGCGGGGAGGCTCACCCT 180
UPK3c . III    TGTCCAGCCTGGGACAGAGCTGGCTGCCAGAGCACATCAGCTATGTGCCCAGCTCTCAAACGACACCTGGCGGGGAGGCTCACCCT 180
*****
UPK3c . I      GTCCACCTTCACGCTGGAGCAGCCTCTAGGCCAGTTCAGCAGCCACAACATCTCTGACTTGGATACCATCTGGCTGGTGGCCCTCAG 270
UPK3c . II     GTCCACCTTCACGCTGGAGCAGCCTCTAGGCCAGTTCAGCAGCCACAACATCTCTGACTTGGATACCATCTGGCTGGTGGCCCTCAG 270
UPK3c . III    GTCCACCTTCACGCTGGAGCAGCCTCTAGGCCAGTTCAGCAGCCACAACATCTCTGACTTGGATACCATCTGGCTGGTGGCCCTCAG 270
*****
UPK3c . I      CAACGCCACCCAGAGCTTCACGGCCCCACGGACAACACAGGACATCCCTGCTCCTGCCAATTCTCCAGAGGGGGCTACTATCTCACACT 360
UPK3c . II     CAACGCCACCCAGAGCTTCACGGCCCCACGGACAACACAGGACATCCCTGCTCCTGCCAATTCTCCAGAGGGGGCTACTATCTCACACT 360
UPK3c . III    CAACGCCACCCAGAGCTTCACGGCCCCACGGACAACACAGGACATCCCTGCTCCTGCCAATTCTCCAGAGGGGGCTACTATCTCACACT 360
*****
UPK3c . I      GAGGGCCAACCGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCCAGTCCATGTCCTCCGCTCGGCAATGATACCCACTGCCAACCAAAAAATTGG 450
UPK3c . II     GAGGGCCAACCGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCCAGTCCATGTCCTCCGCTCGGCAATGATACCCACTGCCAACCAAAAAATTGG 450
UPK3c . III    GAGGGCCAACCGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCCAGTCCATGTCCTCCGCTCGGCAATGATACCCACTGCCAACCAAAAAATTGG 450
*****
UPK3c . I      CTGCAACCATCCCTACCAGGACCCGCCCTACAGGCTGAAGTTCCTGGTGATGAATGACAAGGACCCGTGGCTGAAACAAGTGGTC 540
UPK3c . II     CTGCAACCATCCCTACCAGGACCCGCCCTACAGGCTGAAGTTCCTGGTGATGAATGACAAGGACCCGTGGCTGAAACAAGTGGTC 540
UPK3c . III    CTGCAACCATCCCTACCAGGACCCGCCCTACAGGCTGAAGTTCCTGGTGATGAATGACAAGGACCCGTGGCTGAAACAAGTGGTC 540
*****
UPK3c . I      CAGCACACTCGCTGCAGCAAGCCAGGCACTTCGGGCTGTCCCGGGCCCCAGAGCCCGGGCACCGTGGTCATCATCGCCATCCTGTC 630
UPK3c . II     CAGCACACTCGCTGCAGCAAGCCAGGCACTTCGGGCTGTCCCGGGCCCCAGAGCCCGGGCACCGTGGTCATCATCGCCATCCTGTC 630
UPK3c . III    CAGCACACTCGCTGCAGCAAGCCAGGCACTTCGGGCTGTCCCGGGCCCCAGAGCCCGGGCACCGTGGTCATCATCGCCATCCTGTC 630
*****
UPK3c . I      TATCCTCCTGGCCGTCTCCTCAGGTCCTCCTGGCTGTGCTCATATACACTGCTTCAACAGCTGCAGGAGCACTTCCTATCAGGCCC 720
UPK3c . II     TATCCTCCTGGCCGTCTCCTCAGGTCCTCCTGGCTGTGCTCATATACACTGCTTCAACAGCTGCAGGAGCACTTCCTATCAGGCCC 720
UPK3c . III    TATCCTCCTGGCCGTCTCCTCAGGTCCTCCTGGCTGTGCTCATATACACTGCTTCAACAGCTGCAGGAGCACTTCCTATCAGGCCC 720
*****
UPK3c . I      AGAGGAGCCAGGGAGTGTGAGAAGATACACCACGCACCTCGCGTTCAGCACTCCGCCAGGGGGTTCCTGA 792
UPK3c . II     AGAGGAGCCAGGGAGTGTGAGAAGATACACCACGCACCTCGCGTTCAGCACTCCGCCAGGGGGTTCCTGA 792
UPK3c . III    AGAGGAGCCAGGGAGTGTGAGAAGATACACCACGCACCTCGCGTTCAGCACTCCGCCAGGGGGTTCCTGA 792
*****

```

Figura 12. Alineamiento de las secuencias completas de las tres copias de UPK3c localizadas en el cromosoma 7 humano.

Alineamiento de las secuencias de las tres copias de UPK3c. UPK3c.I es la copia localizada en 7q22.1 más cercana al centrómero y UPK3c.II es la copia más cercana al telómero. Por su parte, UPK3c.III representa la copia ubicada en 7p13. Estos alineamientos se realizaron en la base de datos MAFFT a partir de las secuencias CDS obtenidas en la página Ensembl y muestran el grado de similitud que presentan las tres secuencias entre ellas. Debajo de las tres secuencias hay representado un asterisco (*), si hay identidad, o un punto (.), si hay un cambio de nucleótido o inserción. Las letras marcadas en color lila representan las mutaciones puntuales entre UPK3c.III y UPK3c.I / UPK3c.II, las letras marcadas en color verde representan las mutaciones puntuales entre UPK3c.I y UPK3c.II. Por último, el color rojo señala la inserción de un nucleótido en UPK3c.III.

Todas las mutaciones que presenta la secuencia de UPK3c.III conducen a la síntesis de una proteína diferente y más pequeña que la producida por las dos copias de UPK3c situadas en el locus 7q22.1, ya que la secuencia de aminoácidos es diferente. Además, tiene lugar la aparición de un codón de terminación prematuro en la posición 234 (Fig. 13). De esta forma, la copia de UPK3c, situada en 7p13, da lugar a una proteína truncada que es degradada selectivamente a través del mecanismo *nonsense-mediated decay* y, por lo tanto, que no se expresará.

UPK3c . I	MDNSWRLGPAIGLSAGQSQLLVSLLLLTRVQPGTDVAAP E H I S Y V P Q L S N D T L A G R L T L S T F T L E Q P L G Q F S S H N I S D L D T I W L V V A L S N A T Q S F T A P R T N Q D I P A P A N F S Q R G Y Y L T L R A N R V L Y Q T R G Q L H V L R V G N D T H C Q P T K I G C N H P L P G P G P Y R V K F L V M N D E G P V A E T K W S S D T R L Q Q A Q A L R A V P G P Q S P G T V V I I A I L S I L L A V L L T V L L A V L I Y T C F N S C R S T S L S G P E E A G S V R R Y T T H L A F S T P A E G A S *
UPK3c . II	MDNSWRLGPAIGLSAGQSQLLVSLLLLTRVQPGTDVAAP E H I S Y V P Q L S N D T L A G R L T L S T F T L E Q P L G Q F S S H N I S D L D T I W L V V A L S N A T Q S F T A P R T N Q D I P A P A N F S Q R G Y Y L T L R A N R V L Y Q T R G Q L H V L R V G N D T H C Q P T K I G C N H P L P G P G P Y R V K F L V M N D E G P V A E T K W S S D T R L Q Q A Q A L R A V P G P Q S P G T V V I I A I L S I L L A V L L T V L L A V L I Y T C F N S C R S T S L S G P E E A G S V R R Y T T H L A F S T P A E G A S *
UPK3c . III	MDNSWRLGSPSHRALCGTVPAASVAVAATDFCPAWDRRGCPRAHQLCAPALKRHPGGEAHP VHLHAGAASRFVQQPQHL * L G Y H L A G G G P Q Q R H P E L H G P T D K P G H P C S C Q L L P E G L L S H T E G Q P G A V P G Q R P A P C P C W Q * Y P L P T N K N W L Q P S P T R T E P L Q G E V P G D E * Q R T R G * N K V V Q Q H S P A A S P G T S G C P W P P E P G H R G H R H P V Y P P G R R P H G P P G C A H I Q L L Q Q L Q E H F P I R P R G D R E C E K I H H A P R V Q H S G R G G F L X

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de las tres copias de UPK3c ubicadas en el cromosoma 7 humano.

Las dos copias localizadas en la región 7q22.1 (UPK3c.I y UPK3c.II) codifican para la misma proteína ya que sus secuencias de aminoácidos son idénticas. La secuencia de aminoácidos producida por la tercera copia de UPK3c (UPK3c.III) es diferente a las otras dos y genera una proteína de menor tamaño debido a la presencia de un codón de terminación prematuro (marcado con el asterisco rojo).

La alta similitud entre las secuencias de UPK3c.I y UPK3c.II, 99.87%, refuerza la idea de que el origen de estas dos secuencias se debe a una duplicación en la región 7q22.1 en el genoma de humanos. Por el contrario, el menor grado de identidad entre UPK3c.III y UPK3c.I/UPK3c.II, 97 % aproximadamente, demuestra que esta copia surgió en un periodo anterior y que, durante la evolución de los primates, ha ido divergiendo hasta dar lugar a una secuencia que no produce una proteína funcional. De esta forma, solo los niveles de expresión de las copias UPK3c.I y UPK3c.II se convierten en un objeto de estudio interesante, ya que son las únicas copias de UPK3c humana que se expresan potencialmente produciendo ambas la misma proteína funcional.

6.3.1 ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA EXPRESIÓN DE UPK3c

Las uroplaquinas están presentes en el genoma de organismos que no contienen urotelio, por lo tanto, su expresión no debería limitarse solo a este epitelio. Con el objetivo de estudiar la expresión de UPK3c en los diferentes tejidos humanos, se llevó a cabo una búsqueda de ESTs de UPK3c.I y UPK3c.II (Anexo 3).

Se obtuvieron un total de 62 ESTs de los cuales solo 6 corresponden a vejiga (Fig. 14). De esta forma, la expresión de UPK3c no se limita al urotelio sino que se expresa en una gran variedad de tejidos como el cerebro, la placenta o el ojo. De todos los tejidos estudiados, el ojo es el que presenta una mayor expresión de UPK3c ya que se encontraron un total de 12 ESTs (Fig. 14).

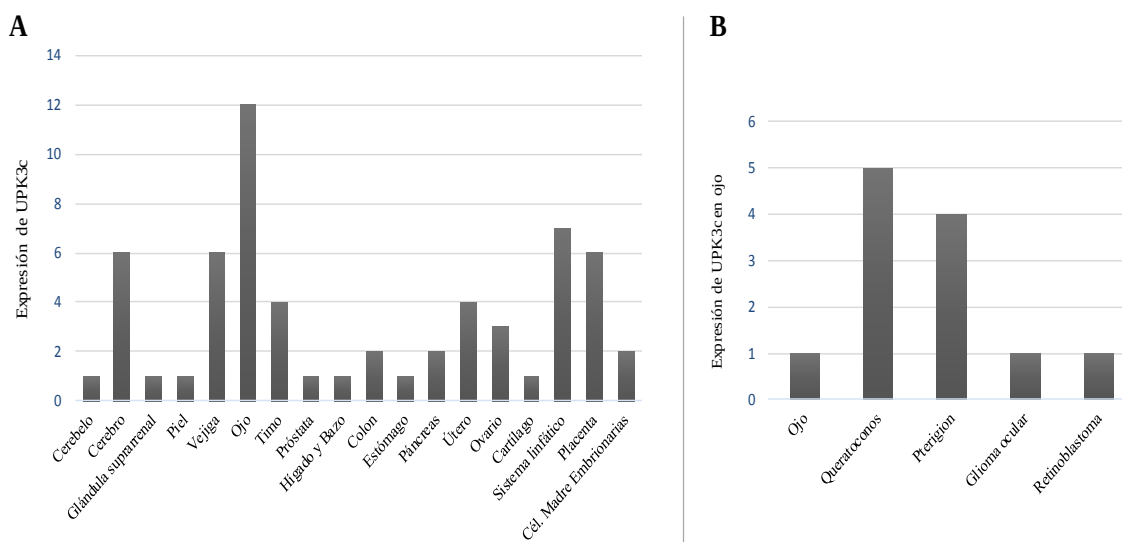


Figura 14. Análisis del nivel de expresión de UPK3c a partir de la búsqueda de ESTs.

(A) Estudio de los niveles de expresión de UPK3c en los tejidos humanos. El ojo es el órgano que presenta un mayor nivel de expresión de UPK3c con 12 ESTs frente a los 6 ESTs localizados en la vejiga.

(B) Análisis de la expresión de UPK3c en el tejido ocular. La mayor parte de los ESTs encontrados en ojo pertenecen a tejido patológico. Las patologías que presentan una mayor expresión de UPK3c son el queratocono y el pterigion.

De los 12 ESTs encontrados en el tejido ocular, solo un EST corresponde a ojo sano mientras que el resto pertenecen a tejido ocular patológico. El queratocono y el pterigion son las patologías oculares que contienen mayor número de ESTs, 5 y 4 respectivamente, seguidas del glioma ocular y retinoblastoma (Fig. 14).

La UPK3c no es la única uroplaquina que se expresa en el tejido ocular, ya que varios estudios han descrito la expresión de UPK1b en córnea y conjuntiva. La función que realiza UPK1b en la superficie ocular es todavía desconocida aunque se postula que ayuda

al sistema inmune en la eliminación de *E. coli* previniendo la infección bacteriana en el ojo (Adachi *et al.*, 2000). La alta expresión de UPK3c, sobre todo, en pterigion y queratocono podría indicar que esta uroplaquina tiene un papel importante en este tejido.

6.3.2 GLICOSILACIÓN DE UPK3c TRANSFECTADA

Todas las uroplaquinas humanas, excepto UPK2a, se encuentran altamente N-glicosiladas (Kątnik-Prastowska, I *et al.*, 2014). La N-glicosilación consiste en la unión de un oligosacárido o glicano a un átomo de nitrógeno, normalmente de un residuo de asparagina (Asn). En humanos, todas las proteínas N-glicosiladas, como las uroplaquinas, presentan una estructura común formada por la Asn unida a dos moléculas de N-acetilglucosaminas (GlcNAc) y estas, a su vez, unidas a tres manosas (Gornik, O *et al.*, 2016).

Para estudiar el posible estado de glicosilación de UPK3c, esta uroplaquina fue transfectada en una línea celular de T24, que no expresa UPK3c de forma endógena, y tratada con dos tipos de glicosidasas diferentes: Endoglicosidasa H (Endo H) y Péptido N-glicosidasa (PNGase F). Endo H actúa sobre los oligosacáridos ricos en manosas pero no puede escindir glicanos complejos. Esta glicosidasa corta el enlace entre las dos N-acetilglucosaminas, dejando un residuo de GlcNAc unido a la Asn. Por el contrario, PNGase F actúa sobre el enlace entre el nitrógeno de la Asn y GlcNAc de forma que esta glicosidasa no deja ningún residuo unido al esqueleto proteico (Gornik, O *et al.*, 2016).

Para la detección de UPK3c y estudio de su estado de glicosilación, se llevó a cabo un Western-blot del extracto proteico sin deglicosilar, deglicosilado con Endo H y deglicosilado con PNGase F. En el primer carril del Western-blot, que corresponde a las muestras sin deglicosilar, se pueden observar dos bandas con distinto peso molecular (Fig. 15). La banda de menor peso molecular, 28 KDa aproximadamente, podría corresponder a la UPK3c sin modificaciones post-traduccionales, ya que este peso molecular corresponde con el peso teórico de la UPK3c. La banda de mayor peso, 43 KDa, correspondería a la UPK3c modificada post-traduccionally con N-glicosilaciones ya que al tratar la UPK3c con las dos glicosidasas esta banda desaparece (Fig. 15). Esta capacidad de ambas glicosidasas para deglicosilar UPK3c demuestra que esta uroplaquina no presenta una estructura de glicanos compleja sino que está compuesta principalmente de manosas, ya que la Endo H solo puede actuar sobre este tipo de estructuras (Gornik, O *et al.*, 2016).

Al tratar las muestras con Endo H o PNGase F, el patrón de bandas de UPK3c se modifica (Fig. 15). En la UPK3c tratada con Endo H y PNGase F la banda de 28 KDa se mantiene aunque se aprecia un aumento significativo de la intensidad de la señal. Sin embargo, con Endo H aparece una segunda banda justo encima de la banda de 28 KDa, mientras que con PNGase F, esta banda no aparece. Esta banda que solo aparece con Endo H podría corresponder a la UPK3c deglicosilada con los residuos de GlcNAc que deja la Endo H al escindir el glicano (Fig. 15).

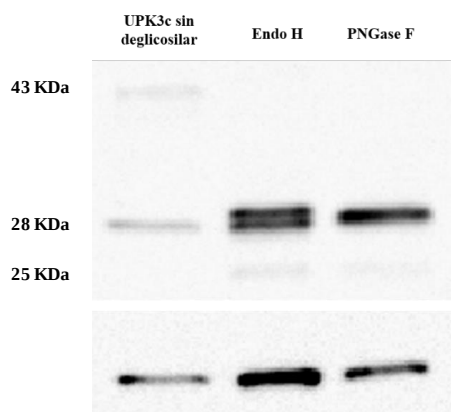


Figura 15. Expresión de UPK3c transfectada en la línea celular T24.

Primer carril: muestras sin deglicosilar donde se pueden observar dos bandas de distinto peso molecular. *Segundo carril:* muestras deglicosiladas con Endo H, se observan dos bandas con peso molecular cercano y una tercera banda con menor peso molecular. *Tercer carril:* muestras deglicosiladas con PNGase F, se pueden observar dos bandas de distinto peso molecular. *Panel inferior:* control de carga realizado con β -actina.

A partir de las predicciones realizadas con el servidor NetNGlyc, se pudo determinar que UPK3c contiene en su secuencia cinco sitios con una alta probabilidad de estar glicosilados, localizados en las posiciones 51, 76, 91, 110 y 140. Al tratar las muestras con Endo H estos cinco sitios podrían permanecer glicosilados conservando cada uno un residuo de GlcNAc. Cada residuo de GlcNAc tiene un peso molecular aproximado de 0.22 KDa y, en consecuencia, el peso molecular de UPK3c con estos residuos sería de aproximadamente 1 KDa más que UPK3c totalmente deglicosilada. Esto podría explicar la aparición de una banda justo encima de la banda de 28 KDa.

Por último, se puede observar una tercera banda de menor peso molecular, de 25 KDa, tanto con Endo H como con PNGase F. La diferencia en el peso molecular de las bandas de 28 KDa y 25 KDa podría sugerir que esta tercera banda corresponde a la UPK3c sin modificaciones post-traduccionales y, además, sin péptido señal (Fig. 15). Esto es debido

a que el péptido señal tiene un peso molecular aproximado de 3.5 KDa y, por lo tanto, coincide con la diferencia entre estas dos bandas.

El peso molecular de UPK3c glicosilada es de 43 KDa mientras que deglicosilada su peso molecular se reduce a 28 KDa, lo que indica que el peso total de sus glicosilaciones es de 15 KDa (Fig. 15). De esta forma, se puede comprobar que UPK3c se encuentra altamente glicosilada. Además, las glicosilaciones de UPK3c son sensibles tanto a Endo H como a PNGase F, lo que demuestra que esta proteína se encuentra N-glicosilada igual que UPK3a y UPK3b.

Por otra parte, la línea celular T24, al no expresar esta proteína de forma endógena, puede no estar preparada para realizar las modificaciones post-traduccionales que la UPK3c necesita y, por lo tanto, no poder asimilar el grado de glicosilación de esta uroplaquina. Esto podría explicar la aparición de tres estadios de maduración de UPK3c diferentes que corresponderían a UPK3c glicosilada con péptido señal, UPK3c glicosilada sin péptido señal y UPK3c deglicosilada con péptido señal.

6.3.3 GLICOSILACIÓN DE UPK3c EN CÓRNEA SANA Y PATOLÓGICA

El ojo es el órgano aparentemente con mayor nivel de expresión de UPK3c. A partir del extracto proteico obtenido de muestras de córnea sana, pterigion y queratocono se analizó la expresión y el grado de glicosilación de UPK3c.

En primer lugar, se estudió el estado de glicosilación de UPK3c en córnea sana a través de los resultados obtenidos del Western-blot realizado. A diferencia de las células T24 transfectadas, las células de la córnea expresan UPK3c endógenamente lo que se traduce en la aparición de una sola banda de aproximadamente 43 KDa que corresponde a la UPK3c glicosilada (Fig. 16). Además, en este caso, cuando la UPK3c es tratada con Endo H no desaparece la banda de 43 KDa lo que sugiere que las glicosilaciones de esta uroplaquina son resistentes a la acción de Endo H (Fig. 16).

Al contrario que con Endo H, cuando las muestras son tratadas con PNGase F sí se observa la desaparición de la banda de 43 KDa y la aparición de una banda de 25 KDa. Al comparar esta banda con las bandas obtenidas al tratar las células T24 transfectadas con PNGase F, se puede comprobar que esta banda corresponde a la UPK3c deglicosilada y sin péptido señal.

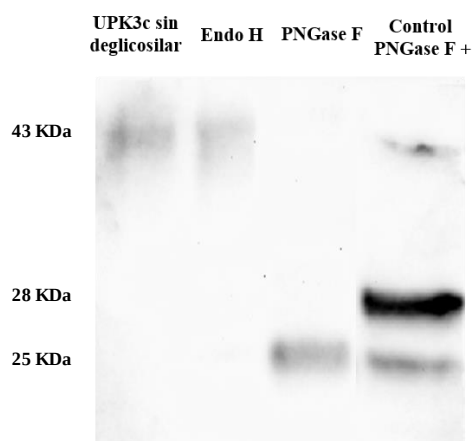


Figura 16. Expresión de UPK3c en muestras de córnea sana.

Primer carril: muestras de córnea sana sin deglicosilar donde se observa una sola banda de UPK3c glicosilada. *Segundo carril:* muestra tratada con Endo H, se mantiene la banda de UPK3c glicosilada. *Tercer carril:* muestra tratada con PNGase F, aparece una nueva banda que corresponde a la UPK3c sin modificaciones post-traduccionales y sin péptido señal. *Cuarto carril:* control positivo con una línea celular T24 transfectada con UPK3c y tratada con PNGase F. En este caso, como control de carga se tiñó la membrana con Ponceau S solution (Anexo 4).

Esta misma situación de resistencia y sensibilidad ha sido observada en UPK3b (Deng *et al.*, 2002). UPK3b muestra sensibilidad a Endo H solamente cuando no es cotransfectada con UPK1b, ya que se queda retenida en el RE y no acaba de madurar. No obstante, cuando es cotransfectada con UPK1b, la UPK3b solo es sensible a PNGase F. Por lo tanto, la sensibilidad de UPK3c transfectada en T24 a Endo H y PNGase F, y la resistencia a Endo H y sensibilidad a PNGase f en tejido endógeno podría indicar que UPK3c, igual que UPK3b, formaría un heterodímero de forma endógena que le permitiese completar su maduración y ser resistente a Endo H.

A continuación, se repitió el mismo procedimiento en muestras de pterigion y queratocono. Se puede comprobar que la UPK3c se expresa de forma endógena ya que en todas las muestras sin tratar con glicosidasas se observan bandas que corresponden a la UPK3c glicosilada (Fig. 17). No obstante, no se observa una sola banda de UPK3c glicosilada sino que se distinguen distintos grados de glicosilación de UPK3c (Fig. 17). En el caso de las muestras de pterigion no tratadas con PNGase F no se puede distinguir del todo si UPK3c se acaba expresando.

En las muestras de pterigion y queratocono tratadas con PNGase F se puede observar como las bandas detectadas sin tratar desaparecen. En este caso, aparece una nueva banda con un peso aproximado al de la banda de UPK3c deglicosilada y sin péptido señal de 25 KDa (Fig. 17).

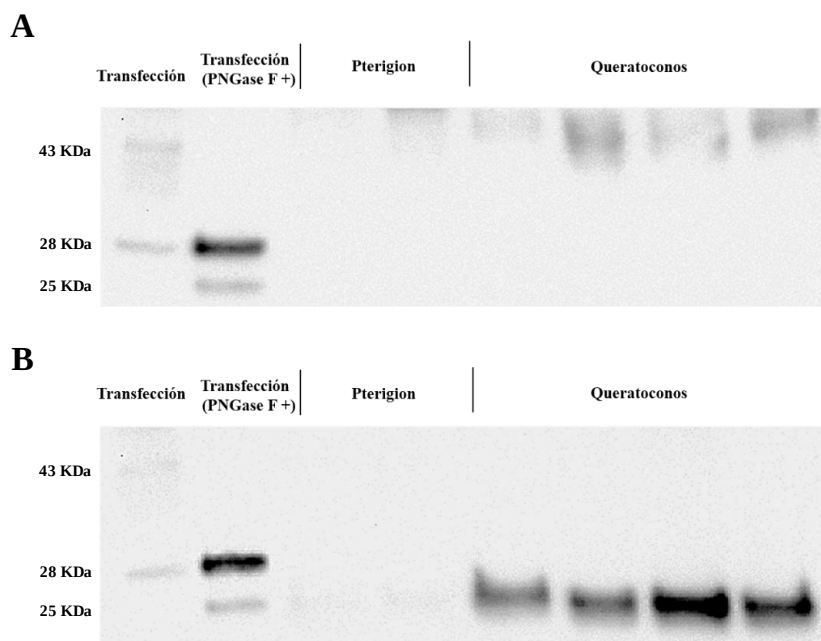


Figura 17. Resultados del Western-blot en células transfectadas con UPK3c y muestras de pterigion y queratocono.

(A) Muestras de pterigion y queratoconos sin deglicosilar donde se puede observar varias bandas de glicosilación. **(B)** Muestras de pterigion y queratoconos deglicosiladas con PNGase F.

Primer carril: línea celular T24 transfectada con UPK3c sin deglicosilar. *Segundo carril:* línea celular T24 deglicosilada con PNGase F. *Tercer y cuarto carril:* muestras de pterigion. *Quinto, sexto, séptimo y octavo carril:* muestras de queratoconos. Como control de carga se tiñó la membrana con Ponceau S solution (Anexo 5).

Es necesario destacar que en los pterigion tratados con PNGase F se acaba observando la banda de 25 KDa aunque con dificultad. Esto se debe a que en las muestras sin tratar con PNGase F se cargó mayor cantidad de proteína que en las muestras tratadas. De esta forma, en las muestras de pterigion tratadas sí hay UPK3c deglicosilada pero debido a la sensibilidad del anticuerpo anti-UPK3c se complica su detección (Anexo 5). No obstante, en las muestras de queratocono tratadas, UPK3c es claramente detectable (Fig. 17). Esto indica que la expresión de UPK3c en queratocono es significativamente mayor que en pterigion.

Por último, al comparar visualmente las membranas tratadas y sin tratar con PNGase F se puede observar que la detección de UPK3c es más fácil cuando estas han sido deglicosiladas (Fig. 17). Esto puede ser debido al alto grado de glicosilación que presenta UPK3c de forma natural y que puede llegar a interferir en la unión del anticuerpo a los diferentes epítomos.

7. CONCLUSIONES

La UPK3c pertenece a la familia de las uroplaquinas asociadas a tetraspaninas. Mientras las secuencias de todos los miembros de esta familia se han hallado en peces, anfibios y vertebrados terrestres, el origen de UPK3c es posterior y su secuencia solo se ha localizado en el genoma de organismos terrestres, concretamente en aves, reptiles y mamíferos.

Gracias al análisis de las secuencias de UPK3a y UPK3b, se ha comprobado que UPK3c comparte una fuerte relación evolutiva con UPK3b. En la secuencia de UPK3c de gallina se conservan los dos puentes disulfuro y varios residuos de la secuencia de 12 aminoácidos, ambos muy conservados en UPK3a y UPK3b. Además, la secuencia de UPK3c desde su origen, se ha mantenido próxima a UPK3b en todos los vertebrados terrestres. Todo esto permite confirmar que UPK3c se originó en el ancestro común de aves/reptiles y mamíferos a partir de la duplicación de la secuencia de UPK3b.

No obstante, a partir de los primates superiores la secuencia de UPK3c comienza a experimentar una serie de reordenamientos en su localización y un aumento en el número de copias. Estas modificaciones en el cromosoma provocan que la secuencia de UPK3c en humanos presente tres copias (UPK3c.I, UPK3c.II y UPK3c.III) localizadas en 7q22.1 y 7p13. Estas tres copias han experimentado la divergencia evolutiva esperada pero la formación de un codón de terminación prematuro en UPK3c.III conlleva a que de las tres copias de UPK3c en humanos, solo dos se expresen.

El origen de UPK3c tuvo lugar durante la colonización del medio terrestre por parte de los vertebrados. En esta transición de los vertebrados de la vida acuática hacia la terrestre, la córnea sufrió una serie de cambios para poder adaptarse al medio terrestre. En el agua esta membrana es casi irrelevante, ya que la luz viaja continuamente en medio acuoso y el poder de refracción de la lente es suficiente. Sin embargo, en la vida terrestre la córnea aumentó su grosor para incrementar su poder refractivo y así focalizar la luz desde el aire al interior del ojo, ya que el poder refractivo de la lente por sí sola no era suficiente. Hasta la fecha, la única uroplaquina descrita en córnea ha sido UPK1b. No obstante, gracias al análisis de ESTs se ha podido comprobar que esta uroplaquina no es la única que se expresa en el tejido ocular. La UPK3c también se expresa en el ojo y es el órgano que ha presentado un mayor nivel de ESTs, incluso por delante de vejiga.

Por lo tanto, considerando el momento en el que se origina UPK3c y su expresión en el ojo podría llegar a pensarse que UPK3c tuvo un papel importante en la adaptación de la córnea a la vida terrestre y que podría desarrollar un papel importante dentro de la estructura y función de la córnea de los vertebrados terrestres.

Mediante análisis de expresión de proteína se comprobó la expresión de UPK3c en la superficie ocular sana y patológica. Esta uroplaquina se encuentra altamente N-glicosilada, igual que UPK3a y UPK3b. Al analizar las muestras de superficie ocular patológica, en este caso muestras de pterigion y queratocono, se observa que el patrón de glicosilación varía. En las dos patologías aparecen distintos grados de glicosilación, de forma que en pterigion y queratocono se produce una alteración en la glicosilación de UPK3c. Finalmente, las muestras de queratocono presentan una mayor expresión de UPK3c que las de pterigion. Para comprobar que esto es debido a la naturaleza corneal de queratocono y conjuntival de pterigion, se necesitan más estudios. Al igual que el poder cuantificar la expresión de UPK3c en los tres tejidos para poder comparar los niveles de expresión entre ellos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, W., Okubo, K. and Kinoshita, S. (2000) 'Human uroplakin Ib in ocular surface epithelium', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (10), pp. 2900–2905.
- Deng, M. *et al.* (2002) 'Prediction of protein function using protein-protein interaction data', *Proceedings - IEEE Computer Society Bioinformatics Conference, CSB 2002*. IEEE, pp. 197–206. doi: 10.1109/CSB.2002.1039342.
- Desalle, R. *et al.* (2014) 'Generation of divergent uroplakin tetraspanins and their partners during vertebrate evolution: Identification of novel uroplakins', *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 13. doi: 10.1186/1471-2148-14-13.
- Gornik, O., Keser, T. and Lauc, G. (2016) 'Separation and purification of glycans out of glycoproteins', *Sample Preparation Techniques for Soil, Plant and Animal Samples*, Humana Press, New York, NY, pp. 377–388. doi: 10.1007/978-1-4939-3185-9_27
- Kątnik-Prastowska, I., Lis, J. and Matejuk, A. (2014) 'Glycosylation of uroplakins. Implications for bladder physiopathology', *Glycoconjugate Journal*, 31(9), pp. 623–636. doi: 10.1007/s10719-014-9564-4.
- Kels, B. D., Grzybowski, A. and Grant-Kels, J. M. (2015) 'Human ocular anatomy', *Clinics in Dermatology*, 33(2), pp. 140–146.
doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.10.006
- Khandelwal, P., Abraham, S. N. and Apodaca, G. (2009) 'Cell biology and physiology of the uroepithelium.', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. American Physiological Society, 297(6), pp. F1477-F1501.
doi: 10.1152/ajprenal.00327.2009.
- Kim, K. W., Park, S. H. and Kim, J. C. (2016) 'Fibroblast biology in pterygia', *Experimental Eye Research*. Elsevier Ltd, 142, pp. 32–39.
doi: 10.1016/j.exer.2015.01.010.
- Lee, G. (2011) 'Uroplakins in the lower urinary tract', *International Neurourology Journal*, 15(1), pp. 4–12. doi: 10.5213/inj.2011.15.1.4.
- Mukhtar, S. and Ambati, B. K. (2018) 'Pediatric keratoconus: a review of the literature.', *International ophthalmology*, 38(5), pp. 2257–2266.
doi: 10.1007/s10792-017-0699-8.

- Müller, S. *et al.* (2004) 'The evolutionary history of human chromosome 7', *Genomics*, 84(3), pp. 458–467. doi: 10.1016/j.ygeno.2004.05.005.
- Reimann, R., Kost, B. and Dettmer, J. (2017) 'Tetraspanins in plants', *Frontiers in Plant Science*, 8, p. 545. doi: 10.3389/fpls.2017.00545.
- Satoh, N., Rokhsar, D. and Nishikawa, T. (2014) 'Chordate evolution and the three-phylum system', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1794), p. 20141729. doi: 10.1098/rspb.2014.1729.
- Schönfelder, E. *et al.* (2006) 'Mutations in uroplakin IIIa are a rare cause of renal hypodysplasia in humans', *American Journal of Kidney Diseases*. Elsevier, 47(6), pp. 1004–1012. doi: 10.1053/j.ajkd.2006.02.177.
- Semba, R. D. *et al.* (2013) 'The human eye proteome project: perspectives on an emerging proteome', *Proteomics*. NIH Public Access, 13(16), pp. 2500–2511. doi: 10.1002/PMIC.201300075.
- Sridhar, M. S. (2018) 'Anatomy of cornea and ocular surface.', *Indian journal of ophthalmology*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 66(2), pp. 190–194. doi: 10.4103/ijo.IJO_646_17.
- Wu, X. R. *et al.* (2009) 'Uroplakins in urothelial biology, function, and disease', *Kidney International*, 75(11), pp. 1153–1165. doi: 10.1038/ki.2009.73.

9. AUTOEVALUACIÓN

Formar parte de una de las líneas de investigación del grupo Biología Molecular del Urotelio Sano y Patológico ha sido una experiencia muy positiva. El trabajo realizado durante estos meses en el *Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili* me ha permitido tener una visión más amplia de cómo es trabajar en un laboratorio de investigación.

Elaborar este trabajo me ha permitido consolidar numerosos conceptos teóricos y prácticos que he aprendido durante estos cuatro años, como la identificación de proteínas mediante Western-blot o el análisis de secuencias génicas a través de diferentes herramientas bioinformáticas. Además, también he podido reforzar mi capacidad para poder interpretar adecuadamente los resultados obtenidos.

Por otro lado, la biología del urotelio y, en particular, las uroplaquinas son un tema poco conocido con un número limitado de artículos que hablen sobre ellas. De esta forma, este trabajo me ha permitido mejorar en la búsqueda de información, a la hora de saber encontrar la bibliografía más correcta y actualizada.

Por último, me gustaría agradecer a los miembros del grupo de Biología Molecular del Urotelio Sano y Patológico por darme la oportunidad de desarrollar mi Trabajo de Fin de Grado en base a una de sus líneas de investigación. No obstante, me gustaría destacar el papel que ha tenido el Dr. Javier Ugarte en la realización de este trabajo. Desde el primer día me ha transmitido todos sus conocimientos sobre las uroplaquinas, la biología evolutiva y las técnicas bioinformáticas lo que me ha permitido, además de poder desarrollar adecuadamente este proyecto, ampliar mis conocimientos en estos campos. De esta forma, sería injusto no destacar toda la ayuda y apoyo que he recibido por su parte, fundamental para la elaboración de este trabajo.

10. ANEXOS

ANEXO 1: COMPARACIÓN SECUENCIAS DE UPK3a, UPK3b Y UPK3c

Tabla A1. Porcentaje de identidad entre UPK3a, UPK3b y UPK3c en gallina.

	UPK3A	UPK3B	UPK3C
UPK3A	100.00	45.04	44.00
UPK3B	45.04	100.00	55.83
UPK3C	44.00	55.83	100.00

ANEXO 2: COMPARACIÓN DE LAS COPIAS UPK3c.I, UPK3c.II Y UPK3c.III

Tabla A2. Porcentaje de identidad entre UPK3c.I, UPK3c.II y UPK3c.III.

	UPK3C.I	UPK3C.II	UPK3C.III
UPK3C.I	100.00	99.87	97.35
UPK3C.II	99.87	100.00	97.47
UPK3C.III	97.35	97.47	100.00

ANEXO 3: ESTUDIO DE ESTs

Tabla A3. Búsqueda de ESTs en los diferentes tejidos humanos. Las variantes de UPK3c no identificadas aparecen indicadas con un guion (-).

EST REFERENCE	TEJIDO/ÓRGANO	UPK3C COPIA (I/II)
BM724442.1	Ojo	-
CV574749.1	Ojo Queratocono	UPK3c.I
CV571894.1	Ojo Queratocono	UPK3c.I
CV570067.1	Ojo Queratocono	UPK3c.I
CV571740.1	Ojo Queratocono	UPK3c.I
CV570877.1	Ojo Queratocono	UPK3c.I
DR422125.1	Ojo Pterigion	UPK3c.I
DR422867.1	Ojo Pterigion	UPK3c.I
DR423533.1	Ojo Pterigion	UPK3c.I
DR421655.1	Ojo Pterigion	UPK3c.I
BF526909.1	Ojo Glioblastoma	UPK3c.I
BE783282.1	Ojo Retinoblastoma	-
BM563522.1	Cerebro	UPK3c.II
DN993120.1	Cerebro	-
AA077375.1	Cerebro	-

BI488409.1	Cerebro	-
BM549578	Cerebro	-
DA220394.1	Cerebro	-
DA093536.1	Cerebelo	-
AL520850.3	Glándula Suprarrenal	-
BF923489.1	Tumor sistema nervioso	-
BG741801.1	Piel	-
BG9446215.1	Tumor Vejiga	UPK3c.II
BQ300930.1	Tumor Vejiga	-
BF738937.1	Tumor Vejiga	-
BF737438.1	Tumor Vejiga	-
BQ301028.1	Tumor Vejiga	-
BF736830.1	Tumor Vejiga	-
HY084937.1	Timo	-
HY092696.1	Timo	-
HY063262.1	Timo	-
BX457259.2	Timo	-
DA878206.1	Próstata	-
R07794.1	Hígado y Bazo	-
BF816477.1	Colon	-
BF758159.1	Colon	-
AA603194.1	Tumor Estómago	-
BE735985.1	Tumor Páncreas	UPK3c.I
BE736087.1	Tumor Páncreas	UPK3c.II
DB249571	Útero	UPK3c.I
BF914307.1	Tumor Útero	-
BF912925.1	Tumor Útero	-
BF912921.1	Tumor Útero	-
BU553932.1	Ovario	UPK3c.I
BF038709.1	Tumor Ovario	UPK3c.II
BF032261.1	Tumor Ovario	-
DC424984.1	Cartílago	-
CR980593.1	Linfocito T	UPK3c.I
CR994138.1	Linfocito T	UPK3c.I
BM847378.1	Nódulo Linfático	-
BM843730.1	Nódulo Linfático	-
BE241615.1	Nódulo Linfático	-
BG177266.1	Linfoma	-
BI907605.1	Leucocito	-
DA855203.1	Placenta	UPK3c.I
AL544559.3	Placenta	-
AL544513.3	Placenta	-
BX404896.2	Placenta	-
R28399.1	Placenta	-
BG008280.1	Placenta	-
CN348520.1	Cél. Madre Embrionarias	UPK3c.I
HX401706.1	Cél. Madre Embrionarias	UPK3c.I

ANEXO 4: CONTROL DE CARGA DE WESTERN-BLOT EN CÓRNEA SANA

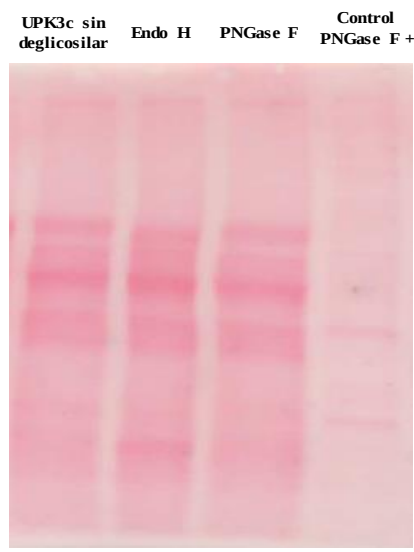


Figura A1. Membrana teñida con *Ponceau S solution* como control de carga en el análisis de córnea sana

ANEXO 5: CONTROL DE CARGA DE WESTERN-BLOT EN PTERIGION Y QUERATOCONO

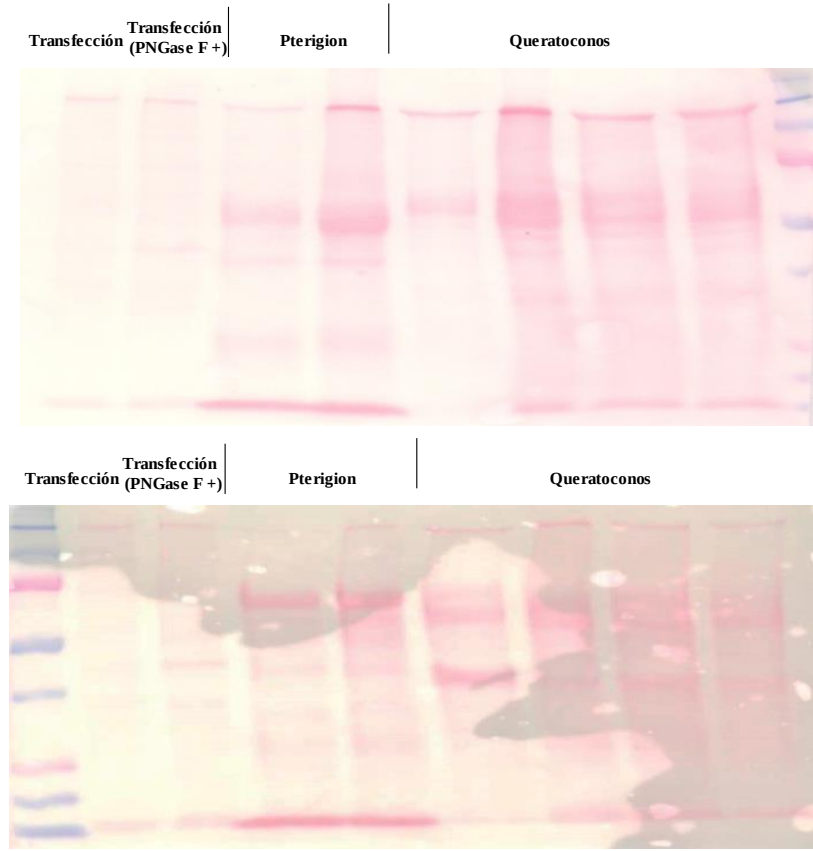


Figura A2. Membrana teñida con *Ponceau S solution* como control de carga en el análisis de muestras transfectadas con UPK3c en T24 pterigion y queratoconos glicosiladas y deglicosiladas. Se puede observar la aparición de bandas en todos los carriles, incluso en los de pterigion.