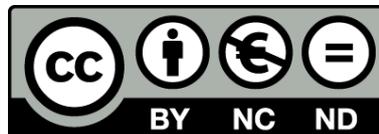




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Rac1 y Calmodulina regulan la dinámica de membrana durante la endocitosis independiente de Clatrina

David Soriano Castell



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**

BARCELONA, ENERO 2016

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**RAC1 Y CALMODULINA REGULAN LA DINÁMICA DE
MEMBRANA DURANTE LA ENDOCITOSIS
INDEPENDIENTE DE CLATRINA**

MEMORIA PRESENTADA POR

David Soriano Castell

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOMEDICINA

POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL DR. FRANCESC TEBAR RAMON, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, INMUNOLOGIA I NEUROCIENCIAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERISTAT DE BARCELONA.

El interesado,

Director y tutor de Tesis,

David Soriano Castell

Francesc Tebar Ramon

Als meus pares,

A les meues germanes i germans,

“La teoría es asesinada tarde o temprano por la experiencia”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Existe más abajo una versión también en catalán (o valenciano) para quien lo prefiera.

Después de cinco años, que, sinceramente, han pasado volando, uno podría decir que hacer un doctorado es un duro camino con penas y glorias. Pero por mucho que me esfuerzo, no consigo recordar las penas. Solo las glorias, en forma de risas, trabajo, amigos y estrellas (Damm), acuden a mi cabeza ahora que echo la vista atrás. Las estrellas vienen solas si te sientas en el Petit Pas; el trabajo solo necesita algo de ganas y haber estudiado; las risas, bueno, ya me conocéis, no necesito demasiado si quiero reírme; pero todo eso, sin amigos..., aah amigo!. Los amigos son los que convierten esas pequeñas cosas en glorias. Y de amigos me voy con la bolsa llena.

Puede que este apartado sea el más importante de la tesis. Lo que hay en ella lo he hecho yo, y si, la he escrito yo. Yo me he pasado unos cien millones de horas en el microscopio (más o menos), aunque tardé apenas unos minutos en tomar las imágenes que aquí aparecen. Pero uno solo no puede hacer esto. Necesita hablar y discutir, contrastar con otros locos las locuras que se le ocurren. Que le den consejos, que escuchen tus maldiciones cuando los geles de acrilamida no hacen su trabajo, o que aguanten tus silbidos como quien aguanta a un loro con verborrea. Y esos sois vosotros, a los que dirijo estas palabras (las únicas que la mayoría leeréis en este pequeño libro).

El máximo responsable de que yo esté escribiendo esto no es otro que Salva. Tú sembraste en mí la semilla de la ciencia cuando apenas sabía sumar y restar. Aquella admiración infantil que sentía por ti, casi siempre a muchos kilómetros, es ahora la admiración de un hermano ya crecido, que se torna agradecimiento por haberme marcado el camino hasta aquí. Quién sabe si algún día ese camino en la ciencia se encontrará con el tuyo, pero en cualquier caso, siempre habrá un atajo que los una. Nos queda mucho tiempo para hablar de ciencia, de Dios y de la vida, y estoy seguro de que lo vamos a aprovechar.

El segundo escalón del podio (o puede que haya un empate en el primero) es sin duda para Siscu. De ti he aprendido todo lo que sé de esto. Las horas que pasé en el microscopio fueron un instante comparado con las que hemos pasado discutiendo, hipotetizando, elucubrando, tergiversando, y en ocasiones, incluso resolviendo y encontrando respuestas. Pero mentiría si dijera que esto ha sido solo una relación profesional o académica. También hemos pasado muchos momentos hablando de fútbol o política, riéndonos casi de cualquier cosa, y bueno, puedo decir que has sido también un buen amigo. Ah! También he aprendido que una apuesta contigo, es una apuesta perdida.

Elsa Meneses, o Elsaca Puntas, dentro del lab nos hemos reído mucho, e incluso hemos trabajado juntos en alguna pequeña ocasión. Sin ti, estos dos últimos años en el lab habrían sido un poco más largos. Fuera del lab también nos hemos reído mucho; coño!, incluso hemos llorado. Por todo eso, te has convertido en una de las personas más importantes en mi tesis, ¿qué digo en mi tesis? también en mi vida. Cuando llegaste al lab no sabías muy bien ni como me llamaba, ¿quién sabe? a lo mejor incluso creías que era de los Postigo. Ahora confío en que mi nombre no se te olvide, porque siempre que piense en los años del doctorado, yo me acordaré del tuyo (de tu nombre, no de tu doctorado). En definitiva, mi agradecimiento hacia ti no cabe en estas líneas, pero estoy seguro de que lo conoces de sobra.

No soy muy bueno en esto de expresar con palabras lo mucho que agradezco a todos vosotros el apoyo y la amistad que me habéis regalado. Pero podría ocupar cien páginas fácilmente y todavía no lo habría dicho todo, así que por eso y también por el pánico a dejarme a alguien en el tintero, seré muy breve en palabras, aunque seguro sabréis que esa brevedad no se corresponde con la infinita gratitud que siento hacia vosotros.

Los post-docs, Carles y Marta, me habéis dedicado vuestro tiempo siempre que os he pedido vuestro valioso consejo, ayudándome mucho a mejorar la calidad de este trabajo. Cuando me asalte la duda, echaré de menos encontraros siempre tras esa puerta de cristal...

...y vuestros jefes, Carles Enrich y Albert Pol. Por vosotros siento el mayor respeto hacia la experiencia y la madurez científica, pero también cabe un poco de risa y broma con una copa de cava o una buena cerveza en la mano. Gracias por vuestros consejos, y sobretodo Albert, gracias por aguantar tantas horas de palique entre Siscu y yo detrás de la oreja.

María y Alba, los pilares del día a día, las que te guían en esas primeras semanas en las que vas perdido y no sabes ni dónde estás sentado. María, por ti siempre tendré un pequeño espacio en mí para la espiritualidad, pero poquito, eh? Y tu Alba, recuerda que el día más corto del año no es más que el principio del camino hacia el día más largo.

Las Siscu's Girls, Iona y Maite. Contigo, Maite, no he compartido tanto como me gustaría, pero el camino que he recorrido lo empezaste tú, y junto a ti, Iona, ese mismo camino se me ha hecho muy fácil de recorrer contigo al lado (y eso que el ordenador lo tenías solo tú).

Anna y Ana, las chicas con las que más cafés me he tomado (nunca he sido muy de cafés tampoco). Habéis sido, no, sois mis amigas casi desde que os conocí, y si me lo permitís, seguiremos siéndolo hasta que la muerte os lleve. Gracias por ser mis confidentes y por dejarme a mí ser el vuestro. Es posible que hayáis sido una de las piedras "triangulares" de esta tesis (si Ana, ahora te toca a ti).

Català, català, si no te l'ha fet, te la farà. Tenemos toda la vida, Albert H., para que cumplas este refrán, porque de momento lo único que has hecho es un amigo para siempre. Gracias por los consejos científicos, por las risas y por las cervezas (creo que todavía hay alguna apuesta impagada), y gracias también por cederme el puesto de macho alfa, creo que me he ocupado bien de ellas y no han notado la diferencia.

También han sido importantes Andrea y Adam. Con vosotros he compartido muchas horas hablando no solo de ciencia. También de cine, de política, y como no, de deportes. Me ha gustado compartir todo ello contigo, Andrea, desde el otro lado de la bahía. Forza Depor! Y Adam Kassan, no sé si llegarás a leer esto, pero no puedo dejar de agradecer las conversaciones sobre ciencia y religión y sobre la vida, y aunque fue poco tiempo el que compartimos, fue bastante para considerarte un buen amigo y dedicarte aquí algunas líneas.

Las Enrich's Girls que me faltan, Meri y Sandra. Os merecéis también buena parte de mi agradecimiento. Aunque quizás no hayamos llegado a formar lazos fuertes entre nosotros, el aprecio que os tengo no se mide ni con la regla para medir papel Whatman, y os agradezco mucho que hayáis estado ahí siempre que os he necesitado.

No me olvido de todos los másteres y "erásmuses". Celia, María, Bárbara o Camilla. Y como no!, Frede i Albert!. No sabéis cuanto he echado de menos las charlas y las risas en nuestra bahía desde que dejé el lab, y cuanto las seguiré echando de menos. Y sobre todo a Albert, sabes que sin ti alguna pata de esta tesis estaría un poco coja. Gracias.

Todo el grupo de las Neus, muchísimas gracias. Ojala hubiéramos compartido también el lab. Lo que sí que compartimos, además de seminarios y algo de material, fueron muchos buenos momentos fuera del lab, que espero que puedan volver a repetirse muchas veces más (a los seminarios sí que no iré, creo).

Tampoco me olvido de ese gran alicantino que vive en el ala oeste. David, que aparte del nombre tienes muchas otras cosas geniales. Recordaré con cariño todos esos momentos de cigarrillo, de conversaciones y batallitas, y de birras en el bar. A ver si algún día nos vemos en el Carrer Nou del Convent y nos comemos una buena paella.

Y ahí están también las chicas del confo, Maria, Anna y Elisenda (y el Dani). Que importantes habéis sido durante esta tesis. Agradezco de corazón todas las horas invertidas en mejorar las condiciones del microscopio y en dar consejos para que las largas sesiones de fotos se hicieran algo más cortas.

Teresita, Alba Llopis, Alba Gómez, Marta Sánchez, Atilla o Eulàlia. Todos han sido importantes en algún momento durante esta tesis y también quiero dejaros un

pequeño espacio en estas páginas. Gracias por compartir cenas, risas, cervezas o las tres cosas.

También mencionaré a las chicas y chicos del Centre d'estudis Neo. En esas pequeñas aulas he dejado un puñadito de buenos compañeros de clase, de buenos amigos a los que seguro que vuelvo a ver muchas veces más.

Mi familia ha sido y es el pilar de cualquier cosa que haya hecho en mi vida. Y aunque durante esta tesis no la he tenido tan cerca como hubiera querido, los he sentido tan cerca como siempre. Gracias a mis padres, a Jaume, que me ha acompañado en el día a día mientras escribía esta tesis, a Pepito, Vicent, Carlos, Vero y Raquel, a cuñadas y cuñados, sobrinas y sobrinos y tías y tíos. Sin todos vosotros puede que ahora estuviese cargando ladrillos en una carretilla (y ganando mucho más dinero!).

Y por último, no me puedo olvidar de aquella que con sus enormes brazos ha sacudido todo este cóctel, para que todos estos años fueran de los mejores de mi vida. Hablo de Barcelona. Eras mi ciudad favorita antes de conocerte, y ahora que te conozco lo eres aún más. En ti he trabajado, he ido de fiesta, he paseado, solo o acompañado, a pie o en bici (miles de kilómetros), y gracias a ti todo ha salido a pedir de boca. No te muevas del sitio, porque ten por seguro que algún día volveré, y puede que ya no me marche.

Vaya, pues al final me he liado y no he sido tan breve como pretendía. Ahí queda pues parte de mi agradecimiento, la que se puede expresar con letras. La otra parte ya la sabéis.

Gracias a todos y hasta siempre!

David

“Las cosas buenas no hace falta entenderlas”

Andy Dufresne, cadena perpetua.

AGRAÏMENTS

Després de cinc anys, que, sincerament, han passat volant, un podria dir que fer un doctorat és un dur camí amb penes i glòries. Però per molt que m'esforce, no aconseguisc recordar les penes. Només les glòries, en forma de rialles, treball, amics i estrelles (Damm), venen al meu cap ara que mire enrere. Les estrelles vénen soles si alces el braç al Petit Pas; el treball només necessita una mica de ganes i haver estudiat; les rialles, bé, ja em coneixeu, no necessite molt si vull riure; però tot això, sense amics ..., aah amic!. Els amics són els que converteixen aquestes xicotetes coses en glòries. I d'amics me'n vaig amb la bossa plena.

Pot ser que aquest apartat siga el més important de la tesi. El que hi ha en ella ho he fet jo, i si, l'he escrit jo. Jo m'he passat uns cent milions d'hores al microscopi (més o menys), encara que vaig tardar només uns minuts a prendre les imatges que ací apareixen. Però un sol no pot fer això. Necessita parlar i discutir, contrastar amb altres bojos les bogeries que se li ocorren. Que li donen consells, que escolten les teues malediccions quan els gels d'acrilamida no fan la seua feina, o que aguanten els teus xiulets com qui aguanta a un lloro amb verborrea. I aquests sou vosaltres, als que dirigisc aquestes paraules (les úniques que la majoria llegireu en aquest xicotet llibre).

El màxim responsable que jo estiga escrivint açò no és un altre que el Salva. Tu vas sembrar en mi la llavor de la ciència quan pràcticament no sabia sumar i restar. Aquella admiració infantil que sentia per tu, quasi sempre a molts quilòmetres, és ara l'admiració d'un germà ja crescut, que es torna agraïment per haver-me marcat el camí fins ací. Qui sap si algun dia aquest camí en la ciència es trobarà amb el teu, però en qualsevol cas, sempre hi haurà un caminet secundari que els enganxe. Ens queda molt de temps per parlar de ciència, de Déu i de la vida, i estic segur que ho aprofitarem.

El segon graó del podi (o pot ser que hi haja un empat en el primer) és sens dubte per al Siscu. De tu he après tot el que sé d'açò. Les hores que vaig passar al microscopi van ser un instant comparat amb les que hem passat discutint, hipotetitzant, elucubrant, tergiversant, i en ocasions, fins i tot resolent i trobant respostes. Però mentiria si diguera que açò ha sigut només una relació professional o acadèmica. També hem passat molts moments parlant de futbol o política, rient-nos pràcticament de qualsevol cosa, i bé, puc dir que has sigut també un bon amic. Ah! També he après que una aposta amb tu, és una aposta perduda.

La Elsa Meneses, o Elsaca Puntetes, dins el lab ens hem rigut molt, i fins i tot hem treballat junts en alguna xicoteta ocasió. Sense tu, aquests dos últims anys al lab haurien sigut una miqueta més llargs. Fora del lab també hem rigut molt; cony!, fins i tot hem plorat. Per tot això, t'has convertit en una de les persones més importants en la meua tesi, què dic en la meua tesi? també en la meua vida. Quan vas arribar

al lab no sabies molt bé ni com em deia, qui sap? potser fins i tot creies que era dels Postigo. Ara confie que el meu nom no se t'oblidi, perquè sempre que en el futur pense en els anys del doctorat, jo m'enrecordaré del teu (del teu nom, no del teu doctorat). En definitiva, el meu agraïment cap a tu no cap en aquestes línies, però estic segur que el coneixes de sobres.

No sóc molt bo en això d'expressar amb paraules el molt que agraiïsc a tots vosaltres el suport i l'amistat que m'heu regalat. Però podria ocupar cent pàgines fàcilment i encara no ho hauria dit tot, així que per això i també pel pànic a deixar-me a algú en el tinter, seré molt breu en paraules, encara que segur sabreu que aquesta brevetat no es correspon amb la infinita gratitud que sent cap a vosaltres.

Els post-docs, el Carles i la Marta, m'heu dedicat el vostre temps sempre que us he demanat el vostre valuós consell, ajudant-me molt a millorar la qualitat d'aquest treball. Quan m'assalte el dubte, trobaré a faltar trobar-vos sempre a l'altre costat d'aquesta porta de vidre ...

... I els vostres jefes, el Carles Enrich i l'Albert Pol. Per vosaltres sent el major respecte cap a l'experiència i la maduresa científica, però també hi cap una mica de riure i broma amb una copa de cava o una bona cervesa a la mà. Gràcies pels vostres consells, i sobretot Albert, gràcies per aguantar tantes hores de palique entre Siscu i jo darrere de l'orella.

La Maria i l'Alba, els pilars del dia a dia, les que et guien en aquestes primeres setmanes en què vas perdut i no saps ni on estàs assegut. Maria, per tu sempre tindrà un xicotet espai en mi per a la espiritualitat, però poquet, eh? I tu Alba, recorda que el dia més curt de l'any no és més que el principi del camí cap al dia més llarg.

Les Siscu's Girls, la Iona i la Maite. Amb tu, Maite, no he compartit tant com m'agradaria, però el camí que he recorregut el vas començar tu, i amb tu, Iona, aquest mateix camí se m'ha fet molt fàcil de recórrer amb tu al costat (i això que l'ordinador el tenies només tu).

L'Anna i l'Ana, les xiques amb les que més cafès m'he pres (mai he sigut molt de cafès tampoc). Heu sigut, no, sou les meues amigues pràcticament des que us vaig conèixer, i si m'ho permeteu, seguirem sent-ho fins que la mort us porti. Gràcies per ser les meues confidents i per deixar-me a mi ser el vostre. És possible que hàgiu sigut una de les pedres "triangulars" d'aquesta tesi (si Ana, ara et toca a tu).

Català, català, si no te l'ha fet, te la farà. Tenim tota la vida, Albert H., perquè faces realitat aquest refrany, perquè de moment l'única cosa que has fet és un amic per sempre. Gràcies pels consells científics, pels riures i per les cerveses (crec que encara hi ha alguna aposta impagada), i gràcies també per cedir-me el lloc de mascle alfa, crec que m'he ocupat bé d'elles i no han notat la diferència.

També han estat importants l'Andrea i l'Adam. Amb vosaltres he compartit moltes hores parlant no només de ciència. També de cinema, de política, i com no, d'esports. M'ha agradat compartir tot això amb tu, Andrea, des de l'altre costat de la badia. Forza Depor! I Adam Kassan, no sé si arribaràs a llegir això, però no puc deixar d'agrair les converses sobre ciència i religió i sobre la vida, i encara que va ser poc temps el que vam compartir, va ser bastant per considerar-te un bon amic i dedicar-te ací algunes línies .

Les Enrich's Girls que em falten, la Meri i la Sandra. Us mereixeu també bona part del meu agraïment. Encara que potser no hàgim arribat a formar llaços forts entre nosaltres, l'estima que us tinc no es mesura ni amb el regle per mesurar paper Whatman, i us agraïsc molt que hagueu estat ahí sempre que us he necessitat.

No m'oblidi de tots els màsters i "erásmuses". La Cèlia, la Maria, la Bàrbara o la Camilla. I com no!, el Frede i l'Albert!. No sabeu el que he trobat a faltar les xerrades i els riures a la nostra badia des que vaig deixar el lab, i com les seguiré trobant a faltar. I sobretot a l'Albert, saps que sense tu alguna pota d'aquesta tesi estaria una mica coixa. Gràcies.

Tot el grup de les/els Neus, moltíssimes gràcies. Tant de bo haguérem compartit també el lab. El que sí que vam compartir, a banda de seminaris i una mica de material, van ser molts bons moments fora del lab, que espere que pugam tornar a repetir moltes vegades més (als seminaris sí que no aniré, crec).

Tampoc m'oblidi d'aquest gran alacantí que viu en l'ala oest. El David, que a part del nom tens moltes altres coses genials. Recordaré amb afecte tots aquests moments de cigarret, de converses i batalletes, i de birres al bar. A vore si algun dia ens veiem al carrer Nou del Convent i ens mengem una bona paella.

I ací hi ha també les xiques del confo, la Maria, l'Anna i l'Elisenda (i el Dani). Que importants heu sigut durant aquesta tesi. Agraïsc de cor totes les hores invertides en millorar les condicions del microscopi i en donar consells perquè les llargues sessions de fotos es feren una miqueta més curtes.

La Teresita, l'Alba Llopis, l'Alba Gómez, la Marta Sánchez, l'Atilla o la Eulàlia. Tots han sigut importants en algun moment durant aquesta tesi i també vull deixar-vos un xicotet espai en aquestes pàgines. Gràcies per compartir sopars, rialles, cerveses o les tres coses.

També esmentaré a les xiques i xics del Centre d'estudis Neo. En aquestes xicotetes aules he deixat un grapat de bons companys de classe, de bons amics als que de ben segur que tornaré a vore moltes vegades més.

La meua família ha sigut i és el pilar de qualsevol cosa que he fet a la vida. I encara que durant aquesta tesi no l'he tingut tan a prop com haguera volgut, els he sentit tan a prop com sempre. Gràcies als meus pares, a Jaume, que m'ha acompanyat en

el dia a dia mentre escrivia aquesta tesi, a Pepito, Vicent, Carlos, Vero i Raquel, a cunyades i cunyats, nebodes i nebots i ties i tios. Sense tots vosaltres pot ser que ara estiguera carregant rajoles en un carretó (i guanyant molt més diners!).

I finalment no em puc oblidar d'aquella que amb els seus enormes braços ha sacsejat tot aquest còctel, perquè tots aquests anys foren dels millors de la meua vida. Parle de Barcelona. Eres la meua ciutat favorita abans de conèixer-te, i ara que et conec ho ets encara més. En tu he treballat, he anat de festa, he passejat, sol o acompanyat, a peu o en bici (milers de quilòmetres), i gràcies a tu tot ha eixit a *pedir de boca*. No et mogues del lloc, perquè tin per segur que algun dia tornaré, i pot ser que ja no me'n vaja.

Vaja, doncs al final m'he embolicat i no he sigut tan breu com pretenia. Ací queda doncs part del meu agraïment, la que es pot expressar amb lletres. L'altra part ja la sabeu.

Gràcies a tots i fins sempre!

David

“Les coses bones no cal entendre-les”

Andy Dufresne, cadena perpetua.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	27
INTRODUCCIÓN	33
1. Endocitosis	33
1.1. Endocitosis dependiente de clatrina	34
1.2. Fagocitosis	36
1.3. Macropinocitosis	37
1.4. Endocitosis independiente de clatrina	38
1.4.1. Endocitosis mediada por caveolina	39
1.4.2. Endocitosis tipo CLIC/GEEC	41
1.4.3. Endocitosis dependiente de Arf6	42
1.5. Endocitosis y citoesqueleto	44
1.6. Remodelación de la membrana plasmática	45
1.6.1. Proteínas con dominios BAR	46
1.6.2. La dinamina	47
1.6.3. Fosfatidilinositoles en la remodelación de membrana	51
1.7. Tráfico tubular de membranas	53
1.7.1. Transporte tubular en la vía endocítica	55
2. RhoGTPasas	57
2.1. Generalidades	57
2.2. Rac1	60
2.2.1. Efectores de Rac1 e implicación en procesos celulares	62
2.2.1.1. PAK	62
2.2.1.2. POR1	64
2.2.1.3. Efectores relacionados con PI(4,5)P ₂ : PIP5K, PLC y PI3K	65
2.3. Rho	67
2.3.1. Efectores de RhoA e implicación en procesos celulares	68

2.3.1.1.	ROCK	68
2.3.1.2.	Otros efectores de Rho	70
2.4.	Balance entre Rac1 y RhoA	72
2.4.1.	Inhibición recíproca entre Rac1 y RhoA	72
2.4.2.	RhoGTPasas e integrinas	74
2.4.2.1.	Regulación recíproca	74
2.4.2.2.	Internalización y tráfico de integrinas	76
3.	Calmodulina	79
3.1.	Proteínas de unión a CaM (CaMBPs)	80
3.1.1.	Las GTPasas como CaMBPs	81
3.2.	CaM en el tráfico de membrana	82
3.3.	CaM y PKC	83
MATERIALES Y MÉTODOS		89
1.	Materiales	89
1.1.	Reactivos	89
1.2.	Anticuerpos	89
2.	Métodos	91
2.1.	Cultivos celulares	91
2.2.	DNA	91
2.2.1.	Plásmidos	91
2.2.2.	Transfección	94
2.3.	RNA	94
2.4.	Técnicas bioquímicas	95
2.4.1.	Análisis de proteínas	95
2.4.1.1.	Cuantificación proteica	95
2.4.1.2.	Electroforesis	95
2.4.1.3.	<i>Western blot</i>	96
2.4.2.	Inmunoprecipitación	96

2.4.3.	Ensayo de <i>pull down</i>	98
2.4.3.1.	Transformación en <i>E. coli</i> , expresión y purificación de la proteína GST-ROCK1-725-1024	98
2.4.3.2.	<i>Pull-down</i>	98
2.5.	Técnicas de microscopía	99
2.5.1.	Inmuncitofluorescencia	99
2.5.1.1.	Internalización de β 1-integrina	100
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS		105
RESULTADOS		107
CAPÍTULO I		111
1.	Estudio de la implicación de Rac1 y PI(4,5)P₂ en la formación de estructuras tubulares de membrana: regulación por CaM	111
1.1.	Las tubulaciones inducidas por el tratamiento con W13 son debidas a la inhibición específica de la CaM	111
1.2.	La inhibición de CaM incrementa la interacción entre Rac1 y PIP5K	112
1.3.	Papel de PI(4,5)P ₂ en la inducción de túbulos durante la inhibición de CaM	113
1.3.1.	Presencia y requerimiento de PI(4,5)P ₂	114
1.3.2.	La acción de la dinamina es necesaria para la formación de los túbulos	114
1.3.3.	Importancia de la PKC	116
1.4.	La activación constitutiva de Rac1 inhibe las tubulaciones inducidas por PI(4,5)P	118
1.5.	Las tubulaciones son ricas en PACSIN2, una proteína con dominio BAR	121
CAPÍTULO II		125
2.	Relevancia fisiológica de las tubulaciones de membrana: internalización de β1-integrina	125
2.1.	Los túbulos inducidos por W13 contienen β 1-integrina	125
2.2.	La entrada a través de los túbulos altera el tráfico intracelular de β 1-integrina	126

2.3.	La formación de túbulos incrementa la entrada neta de β 1-integrina	128
2.4.	Efecto de la expresión de Rac1G12V sobre la internalización de β 1-integrina	128
CAPÍTULO III		133
3.	Regulación de las tubulaciones por Rac1: maquinaria molecular implicada	133
3.1.	Regulación de los niveles de PI(4,5)P ₂	133
3.1.1.	Papel de la PI3K	134
3.1.2.	Papel de la PLC	135
3.2.	Regulación del citoesqueleto y su importancia en la formación o inhibición de las tubulaciones	137
3.2.1.	Rac1G12V-A37 y Rac1G12V-A56 actúan diferencialmente sobre el citoesqueleto de actina	138
3.2.2.	La despolimerización de actina permite la formación de túbulos en presencia de Rac1 activo	139
3.2.2.1.	Papel del citoesqueleto de tubulina en la formación de los túbulos	140
3.2.3.	Participación de cortactina	141
3.2.3.1.	Translocación de la cortactina a la periferia celular inducida por Rac1	142
3.2.3.2.	La cortactina es necesaria en la inhibición de los túbulos por parte del Rac1 activo	143
3.2.3.3.	La translocación de cortactina a la periferia celular inducida por Rac1 requiere POR1	144
3.2.3.4.	Rac1 impide las tubulaciones a través de POR1 y ROCK1	147
3.2.4.	Papel de ROCK1	149
3.2.4.1.	Análisis de la interacción entre Rac1 y ROCK1 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	150
3.2.4.2.	ROCK1 es activado por Rac1, estimulando la vía de activación de la actomiosina	151
3.2.4.3.	La miosina está implicada en la inhibición de los túbulos por el Rac1 activo	152

DISCUSIÓN	157
1. Estudio de la implicación de Rac1 y PI(4,5)P ₂ en la formación de estructuras tubulares de membrana: regulación por CaM	157
2. Relevancia fisiológica de las tubulaciones de membrana	161
3. Regulación de las tubulaciones por Rac1: maquinaria molecular implicada	167
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFÍA	179

ABREVIATURAS

ADF: Actin Depolymerizing Factor

AP2: Adaptor Protein 2

Arf: ADP-ribosylation factor

BAR: Bin-Amphiphysin-Rvs

CaM: Calmodulin

CaMBP: Calmodulin Binding Protein

Cav1: Caveolin 1

CCP: Clathrin-Coated Pit

CCV: Clathrin-Coated Vesicle

CIE: Clathrin-independent Endocytosis

CLIC/GEEC: CLathrin-Independent Carriers/GPI-AP Enriched Early endosomal Compartment

CDE: Clathrin-Dependent Endocytosis

CoIP: Co-ImmunoPrecipitation

CTxB: Cholera Toxin B

DAG: DiAcylGlycerol

DLP: Dynamin-Like Protein

EE: Early Endosome

EEA1: Early endosome Antigen 1

EGF: Epidermal Growth Factor

Abreviaturas

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

GAP: GTPase-Activating Protein

GDI: GDP Dissociation Inhibitor

GDP: Guanine-DiPhosphate

GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor

GFP: Green Fluorescent Protein

GPI: GlycosylPhosphatidyl-Inositol

GPI-AP: GlycosylPhosphatidyl-Inositol-Associated Protein

GST: Gluthatione-S-Transferase

GTP: Guanine-TriPhosphate

LatA: Latrunculin A

MARCKS: Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate

MEC: Matrix Extra-Cellular

MHC-I: Major Histocompatibility Complex-I

MLC: Myosin Light Chain

MLCK: Myosin Light Chain Kinase

MLCP: Myosin Light Chain Phosphatase

MT: Microtubule

PAK: p21-Activated Kinase

PH: Pleckstrin Homology

PI3K: PhosphatidyInositol 3-Kinase

PIP: PhosphatidyInositol Phosphate

PIP5K: Phosphatidylinositol 5-Kinase

PKC: Protein Kinase C

PLC: PhosphoLipase C

POR: Partner Of Rac

PRD: Proline-Rich Domain

RBD: Rho-Binding Domain

Rac: Rac-related C3 botulinum toxin substrate

ROCK: Rho-associated Kinase

SH3: Src Homology 3

siRNA: small interference RNA

TC: Tubular Carriers

TfR: Transferrin Receptor

TTC: Tubular Transport Carriers

W13: N-(4-aminobutyl)-5-chloro-2-naphtalenesulfonamide

WASP: Wiscott-Aldrich Syndrome Protein

WB: Western Blot



INTRODUCCIÓN



1. Endocitosis

La cara externa de la membrana plasmática es el elemento a través del cual la célula puede comunicarse con el ambiente que le rodea. Por medio de la endocitosis se forman nuevas membranas internas a partir de la membrana plasmática, permitiendo la regulación de su composición, la captación de proteínas transmembrana o lípidos de membrana, nutrientes, ligandos, proteínas, solutos,

Vía	Morfología y tamaño	Proteínas de cubierta	Dependencia de dinamina	GTPasas pequeñas involucradas	Cargos internalizados	Proteínas reguladoras o asociadas
Fagocitosis	Cargo-dependiente >500 nm	No	No	Rac1/RhoA/Cdc42 (dependiendo del tipo)	Patógenos, células apoptóticas	Actina, Arp2/3, forminas, PI3K, WASP, WAVE, anfiisina, coronina, etc
Macropinocitosis	Ondulada 0.2-10 µm	No	En algunos casos	Rac1, Cdc42, Arf6, Rab5	RTKs, fluidos, bacterias	Actina, Arp2/3, cortactina, PI3K, Src, Pak1, Ras, etc
CDE	Vesicular 150-200 nm	Clatrina	Si	Rab5	RTKs, GPCR, TfR, LDLR, virus, etc	AP-2, epsinas, Eps15, intersectina, anfiisina, etc
Dependiente de caveolina	Forma de omega 50-120 nm	Caveolina1 y 2	Si	No está claro	Proteínas de unión a GPI, CTxB, SV40, TGF-βR, etc	PTRF/cavina1, SDPR/cavina2, SRBC/cavina3, MURC/cavina4, Src
CLIC/GEEC	Tubular	No	No	Cdc42, Arf1	Fluidos, membrana, proteínas de unión a GPI	Actina, GRAF1, ARHGAP10
IL-2Rβ	Vesicular 50-100 nm	No	Si	RhoA, Rac1	IL-2Rβ, receptor de γc-citokina	Pak1 y 2, cortactina, N-WASP
Dependiente de Arf6	Tubular	No	No, de momento	Arf6	MHC I-II, CD59, CD55, Glut1, AchR	Ninguna, de momento
Dependiente de flotilina	Vesicular	Flotilina 1 y 2	No	Ninguna	CTxB, CD59, proteoglicanos, DAT, EAAT2	Ninguna, de momento

Tabla 1. Las rutas endocíticas conocidas, sus características físicas y la maquinaria molecular implicada. De sus siglas en inglés: CLIC, portadores independientes de clatrina; GEEC, compartimento endosomal temprano enriquecido en GPI-AP; RTK, receptor de tirosina quinasa; GPCR, receptor asociado a proteína G; TfR, receptor de transferrina; LDLR, receptor de lipoproteína de baja densidad; DAB2, disabled-2; ARH, hipercolesterolemia autosómica recesiva; CTxB, toxina colérica B; SV40, simian virus 40; GPI, glicosilphosphatidilinositol; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; TGF-R, receptor del factor de crecimiento transformante; PTRF, factor de la polimerasa y liberación de transcrito; SDPR, respuesta a la privación de serum; SRBC, producto génico relacionado con Sdr que une c-quinasa; MURC, proteína coiled-coil restringida a músculo; CtBP1, proteína de unión al COOH-terminal 1; DAT, transportador de dopamina; EAAT2, transportador de glutamato glial; AchR, receptor de acetilcholine. Modificada de Sigismund *et al*, 2012 ¹.

fluidos o cuerpos sólidos de gran tamaño, como patógenos e incluso células intactas. La regulación de la endocitosis por parte de la célula permite el control de muchos procesos como la nutrición, las vías de señalización, el reciclaje de membrana, la mitosis o la migración celular. Sin embargo, la endocitosis no es un

único proceso simple y universal, sino un complejo sistema de múltiples rutas de entrada interconectadas, cuya regulación requiere de una complicada red de factores para su correcto funcionamiento espacio-temporal.

Según el volumen que se internalice, podemos hablar de endocitosis a gran escala o de pinocitosis. La endocitosis a gran escala incluye la fagocitosis, en la que se produce la entrada de partículas sólidas de gran tamaño, y la macropinocitosis, con entrada de grandes volúmenes líquidos. La pinocitosis, en cambio, es la endocitosis de pequeños volúmenes o solutos. Dentro de este último tipo, existen dos vías principales según la maquinaria molecular implicada, y son la vía mediada por clatrina (CDE, *Clathrin-dependent endocytosis*) y la vía independiente de clatrina (CIE). La primera de ellas es la ruta endocítica mejor caracterizada y se conocen bien los mecanismos implicados. Sin embargo, la vía independiente de clatrina es un grupo heterogéneo de rutas de entrada cuyo conocimiento es todavía muy deficiente. No obstante, el número de estudios publicados sobre ésta vía ha aumentado exponencialmente en los últimos años, lo que ha permitido hacer algunas clasificaciones según su dependencia de dinamina, la presencia de proteínas de cubierta como la caveolina o la dependencia de GTPasas pequeñas. En la tabla 1 se expone la complejidad molecular de cada una de las vías de internalización conocidas ¹, las cuales se expondrán a continuación.

1.1. Endocitosis dependiente de clatrina

La CDE fue la primera ruta endocítica descrita²⁻⁴ y la mejor caracterizada. El material es internalizado desde la membrana plasmática mediante la formación de invaginaciones (CCP, *clathrin-coated pits*) y vesículas (CCV, *clathrin-coated vesicles*) recubiertas de clatrina. Esta proteína es un trímero de tres cadenas pesadas, cada una de las cuales se asocia con una cadena ligera. La estructura resultante de esta asociación recibe el nombre de *triskelion* (figura 1). Cuando la clatrina se ensambla durante la endocitosis, el centro de cada triskelion forma uno de los vértices de un poliedro con lados hexagonales y pentagonales, que es la cubierta de las CCPs y la CCVs, la cual puede acomodarse en un gran rango de curvaturas dependiendo del número de triskelia que formen parte de la estructura.

Para la formación de esta cubierta en el inicio del proceso, la clatrina no se une directamente a la membrana plasmática, sino que se asocia a un amplio rango de proteínas adaptadoras y accesorias, que pueden ser diferentes según el tipo celular e incluso dependiendo del cargo que vaya a internalizarse. Todas estas proteínas adaptadoras son citoplasmáticas, y son reclutadas a la vesícula nascente. La secuencia comienza con el reclutamiento de proteínas de unión a fosfatidilinositol-

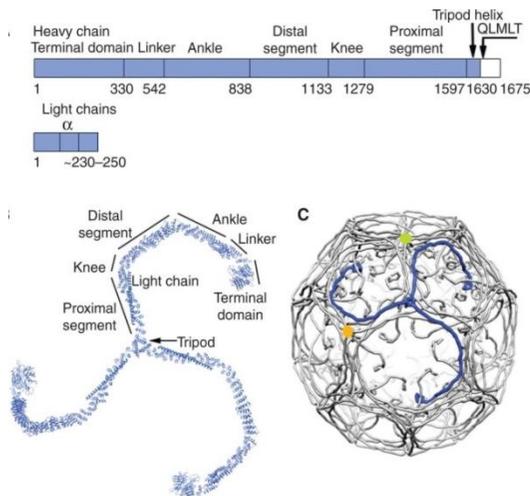


Figura 1. Estructura del triskelion de clatrina. Se muestran las cadenas pesada y ligera de la clatrina y la estructura tridimensional en forma de trípode o *triskelion* adoptada tras su ensamblaje. Modificado de Xing *et al*, 2010 ⁵.

4,5-bifosfato [PI(4,5)P₂], que es un factor clave en la endocitosis mediada por clatrina, entre las que se encuentra la proteína adaptadora 2 (AP2) ^{6,7}. La AP2 recluta a la clatrina, que polimeriza para formar la cubierta y estabilizar la curvatura de la CCP. La escisión de la CCV a partir de la CCP requiere de la acción de la GTPasa dinamina ⁸, que es reclutada al cuello de la CCP por proteínas con dominios BAR (*Bin-Amphiphysin-Rvs*). Estas proteínas contribuyen a la estabilización de la curvatura, sobretodo en la región del cuello de la CCP. La polimerización de la dinamina conlleva la hidrólisis de GTP y la escisión para formar la CCV. La polimerización de actina mediada por el reclutamiento de Arp2/3 puede contribuir en ocasiones a generar la fuerza mecánica necesaria para la escisión ⁹. Se ha descrito que la polimerización de actina no es necesaria en la entrada de algunos cargos por la vía mediada por clatrina ¹⁰, pero si se requiere para este tipo de endocitosis en levaduras ¹¹. Una vez formada la CCV, la red de clatrina de la cubierta se desensambla nuevamente en triskelia con la ayuda de la proteína

ATPasa HSC70 (*Heat shock cognate 70*) y de la auxilina ¹², cuyo reclutamiento es facilitado por la endofilina, una proteína con dominio BAR, y la sinaptojanina, que modifica los niveles de fosfoinosítoles en la membrana ¹³. Todo ello da lugar a una vesícula desnuda que puede ahora fusionarse con los endosomas tempranos (EEs), permitiendo a la clatrina ser reclutada nuevamente allá donde sea necesaria (figura 2).

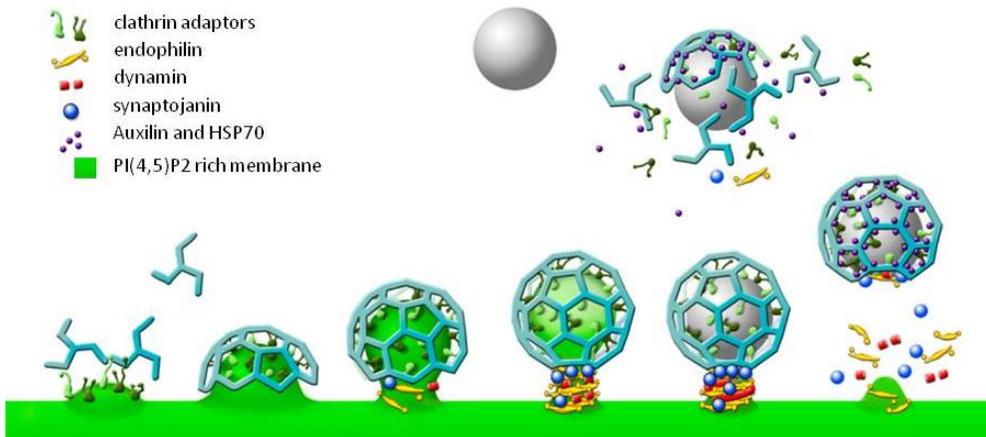


Figura 2. Representación simplificada del proceso de endocitosis mediada por clatrina. La maduración de una CCP hasta la formación de una CCV y la desestructuración de la cubierta de clatrina se produce mediante la acción secuencial de diversas proteínas adaptadoras y accesorias, además de la participación de fosfoinosítoles como PI(4,5)P₂. Modificado de Milosevic *et al*, 2011 ¹⁴.

La endocitosis mediada por clatrina controla la internalización, tanto constitutiva como inducida por la unión de un ligando, de muchos receptores implicados en diversos procesos celulares clave, como la diferenciación, la homeostasis o el crecimiento celular ¹⁵, pero también es aprovechada por bacterias, virus o toxinas como vía de entrada a la célula ¹⁶⁻¹⁹. Ejemplos paradigmáticos de endocitosis constitutiva dependiente de clatrina son las del receptor de transferrina (TfR) o del LDLR ^{20,21}. Receptores que se internalizan tras una inducción por la unión de su ligando son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el receptor adrenérgico β_2 ^{22,23}.

1.2. Fagocitosis

La fagocitosis se define como la internalización de partículas mayores de 500 nm y requiere del reconocimiento y unión por receptores de la superficie celular. Este tipo

de endocitosis es llevado a cabo generalmente por células fagocíticas profesionales, como neutrófilos, macrófagos o células dendríticas, que ingieren cuerpos extraños como bacterias, virus o células fúngicas, así como cuerpos derivados de células apoptóticas.

Los fosfolípidos juegan un papel importante en la regulación de la señalización que conduce al proceso fagocítico. El PI(4,5)P₂ se encuentra en bajas cantidades en la cara interna de la membrana plasmática de fagocitos en reposo. Después del reconocimiento de la partícula por un receptor, los niveles de PI(4,5)P₂ aumentan, induciendo protrusiones de membrana (pseudópodos), que formarán la estructura que englobará la partícula fagocitada, para luego disminuir y dar paso al incremento de PI(3,4,5)P₃²⁴⁻²⁶. Estos cambios facilitan la remodelación del citoesqueleto de actina subyacente a la membrana plasmática. La polimerización de la actina durante la fagocitosis es regulada por las GTPasas Rac1 y Cdc42, que activan proteínas involucradas en la polimerización y ramificación de los filamentos de actina (F-actina), como Arp2/3 o WASP (*Wiskott-Aldrich síndrome protein*), lo que permite la extensión de los pseudópodos para englobar por completo la partícula²⁷. Tras la escisión de la membrana plasmática, el fagosoma recién formado se dirige hacia los lisosomas, para formar el fagolisosoma, donde la partícula será digerida²⁸.

1.3. Macropinocitosis

La macropinocitosis es una ruta para la ingesta no selectiva de grandes volúmenes, macromoléculas en solución e incluso partículas sólidas como virus o bacterias y que tiene lugar en muchos tipos celulares. De forma constitutiva en ocasiones, o después de la estimulación con factores de crecimiento en la mayoría de los casos, la polimerización de actina en el córtex celular favorece la formación de ondulaciones o *ruffles* en la membrana plasmática ricas en actina. Estos *ruffles* se extienden hacia el exterior de la célula hasta cerrarse sobre sí mismos, fusionando su cresta con la membrana plasmática y englobando así el material, dando lugar al macropinosoma²⁹ (figura 3). Este proceso es regulado por la acción de la PI3K, la cual a su vez regula GTPasas como Rac1 y Cdc42, que mediante efectores como WASP, Arp2/3 o Pak1 (*p21-activated kinase*), y junto a moléculas como PI(4,5)P₂,

regulan la reordenación del citoesqueleto de actina y la remodelación de la membrana plasmática necesarias para la formación del macropinosoma^{30,31}.

1.4. Endocitosis independiente de clatrina

La fagocitosis y la macropinocitosis no se han incluido en este apartado, pese a que son procesos que no requieren clatrina y comparten gran parte de la maquinaria molecular implicada en algunos procesos independientes de clatrina, especialmente

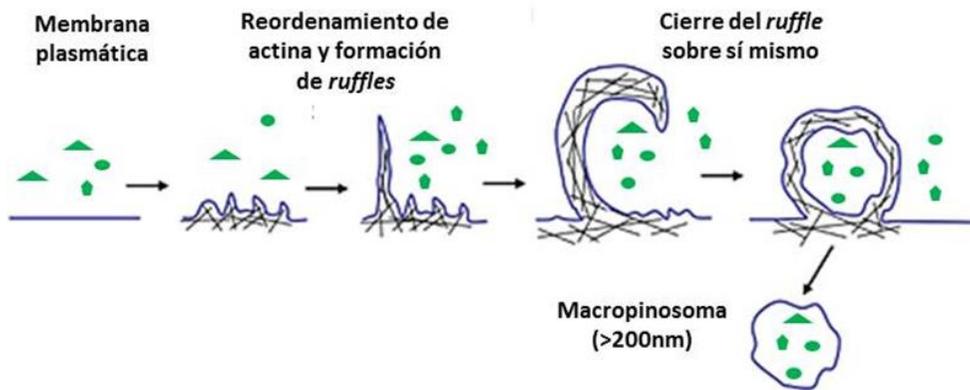


Figura 3. Macropinocitosis. Esquema simplificado de la formación de un macropinosoma. En azul se muestra la membrana plasmática y en negro el citoesqueleto de actina (adaptado de Lim and Gleeson, 2011)²⁹.

en lo relativo a la dinámica del citoesqueleto de actina. Sin embargo, pueden considerarse vías marcadamente separadas por la gran cantidad de material que internalizan en comparación con las demás vías conocidas que no están mediadas por clatrina, y por tanto, hemos creído conveniente su inclusión en otros apartados.

Hasta la década de 1990, la existencia de vías de internalización independientes de clatrina (CIE) era todavía controvertida. Pero la aparición de diversos estudios que describían procesos de endocitosis en los que la clatrina parecía no estar involucrada sugería que podía haber sucesos de internalización que no utilizaran la maquinaria molecular típicamente relacionada con la CDE^{32,33}. La primera CIE descrita fue la vía dependiente de caveolina³⁴, aunque esta vía, al igual que la vía de clatrina, dependía de la acción de la dinamina³⁵. Sin embargo, pronto se describieron nuevas rutas de entrada que eran independientes tanto de clatrina como de caveolina³³. El conocimiento de estas vías desde entonces ha ido en

aumento hasta hoy ³⁶, caracterizándose diversas vías, constitutivas o inducidas, y con diferentes requerimientos moleculares. Ello demuestra que las vesículas pueden ser formadas a partir de invaginaciones de la membrana plasmática sin la acción de la clatrina, e incluso de la caveolina o la dinamina, mediante la participación de elementos como el citoesqueleto de actina o proteínas que inducen o son sensibles a la curvatura, como las proteínas con dominios BAR.

1.4.1. Endocitosis mediada por caveolina

En 1972 se propuso el modelo de mosaico fluido para definir la naturaleza de la membrana plasmática ³⁷. Este modelo postulaba la existencia de una distribución más o menos homogénea de proteínas y fosfolípidos, y que dichos elementos podían difundir lateralmente de forma libre a lo largo de la membrana. Pero en la década de 1980 surgieron estudios en los que se describía una distribución de la membrana en forma de microdominios, que estaban enriquecidos en diversas clases de lípidos y proteínas ³⁸. Estos microdominios fueron denominados *lipid rafts* o balsas lipídicas. Son dominios enriquecidos en glicoesfingolípidos, colesterol y PI(4,5)P₂, que ‘flotan’ en el resto de la membrana plasmática, menos ordenada. Tienen un tamaño medio que ronda los 50 nm de diámetro, aunque puede oscilar entre los 10 y los 200 nm, con una fluidez menor que la de la membrana de su entorno.

Las caveolas son consideradas una forma específica de balsa lipídica, también enriquecida en esfingolípidos y colesterol. Son invaginaciones de la membrana plasmática en forma de *omega*, fácilmente reconocibles por microscopía electrónica (figura 4A y B), cuya aparición depende de la presencia de la caveolina. Existen 3 caveolinas diferentes en mamíferos. La caveolina-3 es específica de células musculares, y la caveolina-1 y -2 se expresan de forma ubicua, aunque es la expresión de la caveolina-1 la que determina la aparición de caveolas invaginadas ³⁹ y la presencia de una cubierta de aspecto estriado (figura 4B). La caveolina-1 se une a unas proteínas adaptadoras llamadas cavininas ⁴⁰, que facilitan su polimerización, acumulándose aproximadamente 150 moléculas de caveolina-1 en cada caveola. El colesterol es esencial para la formación de estas estructuras y su eliminación de la membrana plasmática mediante agentes como la filipina es suficiente para desensamblar la cubierta de caveolina y promover la desaparición

de las invaginaciones³⁴. Al igual que en la vía dependiente de clatrina, la dinamina es esencial para la escisión y formación de vesículas a partir de las caveolas.

Se cree que existen dos tipos diferenciados de caveolas, uno de ellos, predominante, tiene una naturaleza estática, aunque con cierto grado de dinamismo, y el otro, menos abundante, es altamente dinámico, con una continua liberación y fusión con la membrana plasmática^{41,42}.

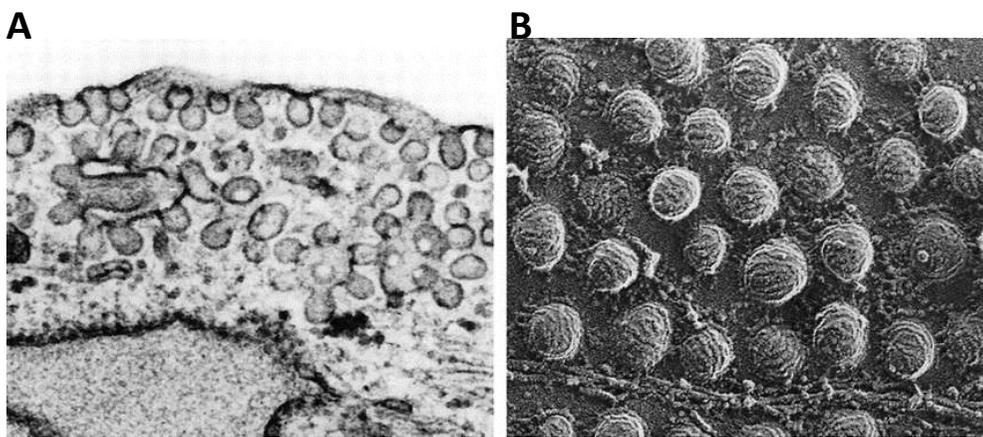


Figura 4. Imágenes de microscopía electrónica de caveolas en fibroblastos. (A) Micrografía electrónica de transmisión de una sección fina. **(B)** Micrografía electrónica de grabado por congelación (*freeze-etch*), donde se puede ver la cara interna de la membrana plasmática. Adaptado de Shaul & Anderson, 2008⁴³.

Las caveolas están implicadas en la internalización de varios marcadores⁴⁴. Así, por ejemplo, aunque las caveolas pueden permanecer durante largos periodos en la membrana plasmática, la activación de las integrinas puede inducir la endocitosis de caveolas e inducir por tanto su propia internalización y la reducción de integrinas en la membrana⁴⁵. Su entrada también puede ser estimulada por el virus SV40, que aprovecha la vía dependiente de caveolina para entrar en la célula. Algunas proteínas que regulan la entrada del virus SV40, al igual que la propia integrina, están implicadas en la adhesión celular, y son un claro vínculo entre ésta y la endocitosis dependiente de caveolina. Las caveolas tienen también una implicación en la transcitosis en células endoteliales, habiéndose descrito un papel en el transporte transcelular de la albumina⁴⁶. Asimismo, esta vía es usada también por algunas toxinas como la toxina colérica (CTxB), aunque la inhibición de la caveolina-1 no inhibe por completo su entrada⁴⁷. Se ha descrito la implicación del

citoesqueleto de actina en muchos procesos de endocitosis relacionados con las caveolas, como el de la internalización del virus SV40 ya comentado ⁴⁸. La actina juega un papel clave en la formación de las vesículas caveolares y su despolimerización local en el córtex celular parece necesaria para la translocación de los caveosomas escindidos hacia el interior del citosol.

Además de la endocitosis, la caveolina-1 está también implicada en la transducción de señales y en la homeostasis de colesterol ^{49,50}, aunque en estos casos se ha descrito un papel de la caveolina-1 tanto en presencia como en ausencia de caveolas.

1.4.2. Endocitosis tipo CLIC/GEEC

Se han descrito en eucariotas más de 200 proteínas que están ancladas a la membrana mediante un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estas proteínas ancladas a GPI (GPI-AP) se encuentran en la cara externa de la membrana plasmática y carecen de extensiones citosólicas, por lo que no son capaces de interactuar directamente con otras proteínas del interior de la célula. Las GPI-AP son más abundantes en las balsas lipídicas y raramente se encuentran en zonas donde se produce la endocitosis dependiente de clatrina o de caveolina, pero sin embargo, su endocitosis parece necesaria para que puedan ejercer su función ^{51,52}. Muchas GPI-APs son receptores de algunos virus, bacterias y toxinas, y después de su unión pueden ser internalizadas ^{53,54}, por lo que es importante conocer los mecanismos de esta vía de endocitosis. Esta vía ha recibido el nombre de CLIC/GEEC (*CLathrin-Independent Carriers/GPI-AP Enriched Early endosomal Compartment*). Los GEECs son estructuras endosomales enriquecidas en GPI-AP y se cree que son el resultado de la fusión de CLICs con morfología túbulo-vesicular provenientes de la membrana plasmática ⁵⁵. Se ha descrito que la internalización por la vía CLIC/GEEC es dependiente de la acción de la RhoGTPasa Cdc42 y de la presencia de colesterol e independiente de clatrina y de dinamina ⁵⁶, y pese a que se ha descrito la presencia de caveolina en las estructuras endosomales de tipo GEEC, probablemente debido a su afinidad por membranas marcadamente curvadas, su acción parece innecesaria para el funcionamiento de esta vía de internalización.

Algunos estudios indican que la organización de las GPI-AP en la membrana plasmática durante su endocitosis podría no ser debida a propiedades específicas de estas proteínas y los lípidos a los que se anclan, sino a una exclusión de las zonas de membrana donde tiene lugar la organización y formación de los CCPs durante la endocitosis dependiente de clatrina, ya que parece más importante el tamaño de la proteína que la naturaleza del GPI para que la GPI-AP sea internalizada hacia los GEECs y excluida de la vía de clatrina ⁵⁷.

Uno de los elementos importantes para el funcionamiento de la vía CLIC/GEEC es la proteína GRAF1, que contiene un dominio BAR y es necesaria para generar la curvatura de las estructuras tubulares de esta ruta endocítica ⁵⁸. Como hemos comentado anteriormente, otra proteína clave es Cdc42. La polimerización de actina dependiente de Cdc42 es un factor necesario para la función de la vía, ya que ésta es inhibida por agentes de disrupción de la actina o por la expresión del dominante negativo Cdc42-N17 ⁵⁹. Además, la depleción de colesterol, otro elemento clave para la vía de CLIC/GEEC, inhibe la activación de Cdc42 y su reclutamiento a la membrana plasmática, por lo que esta ruta de entrada parece estar controlada por la polimerización de actina en la membrana dependiente de la acción de Cdc42, cuya activación es sensible al colesterol ⁵⁶.

Además de su implicación en la endocitosis de GPI-APs, la vía CLIC/GEEC parece ser la principal vía de entrada de membrana y de fase fluida, y parece tener un importante papel en el reciclaje de membrana, activándose por ejemplo en el borde anterior de las células migrantes ⁶⁰.

1.4.3. Endocitosis dependiente de Arf6

Arf6 es una GTPasa pequeña que está localizada en la membrana plasmática y en los compartimentos endosomales, y regula el tráfico de membranas además de la dinámica del citoesqueleto de actina ⁶¹. Como todas las GTPasas, Arf6 puede alternar entre un estado activo, unido a GTP e inducido por proteínas GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*), y un estado inactivo unido a GDP e inducido por proteínas GAP (*GTPase-Activating protein*). Aunque la vía de internalización dependiente de Arf6 tiene muchos puntos en común con la vía de CLIC/GEEC, como la importancia de las balsas lipídicas, la morfología a veces tubular de las

estructuras endocíticas o la internalización por la vía de Arf6 de algunas GPI-APs, estas dos vías parecen ser rutas distintas de tráfico de membrana. Arf6 es uno de los principales activadores de PIP5K en la membrana plasmática y por tanto puede aumentar los niveles de PI(4,5)P₂, regulando así tanto la CDE ⁶², como las vías independientes de clatrina.

La vía dependiente de Arf6 está relacionada con la internalización, tráfico intracelular y reciclaje de vuelta a la membrana plasmática de diversas proteínas como CD59 (una GPI-AP), MHC-I, E-caderina, el receptor de poli-Ig, o la β1-integrina ⁶⁴⁻⁶⁶. La regulación por Arf6 del tráfico de β1-integrina tiene gran influencia en la capacidad de migración e invasión celular. Se ha descrito que la β1-integrina

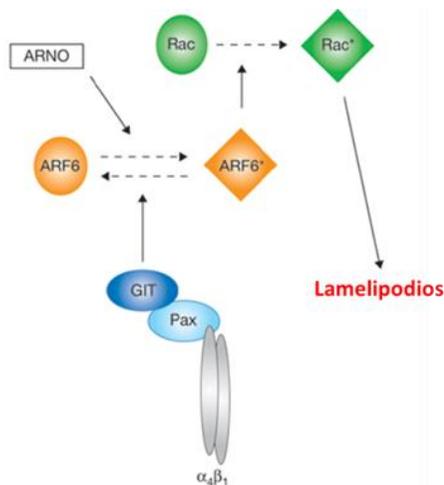


Figura 5. Arf6 regula la migración celular mediante el tráfico de integrinas y la activación de Rac1. Esquema simplificado de la relación entre la integrina en las adhesiones focales y la activación de Rac1 por parte de Arf6. La integrina induce la inactivación de Arf6 y Rac1 mediante la formación de un complejo con paxilina y GIT, una GAP de Arf6, inhibiendo así la formación de lamelipodios. (ARNO: Arf6-GEF). Modificado de Nishiya *et al*, 2005 ⁶³.

puede encontrarse en endosomas de reciclaje regulados por Arf6, los cuales no pueden ser reciclados hacia la membrana plasmática cuando Arf6 es inhibido ⁶⁷. Además, la inhibición de ACAP1, una GAP de Arf6, inhibe el reciclaje de integrina y la migración celular ⁶⁸, lo que parece indicar que el ciclo activación/desactivación de Arf6 es necesario para su acción sobre la endocitosis y el reciclaje. Un factor clave en la regulación del tráfico de membranas y la migración celular es la capacidad de Arf6 para regular la dinámica del citoesqueleto de actina, y dicha regulación viene dada en parte por la relación de Arf6 y Rac1. Arf6 puede inducir la translocación de Rac1 a la membrana plasmática y regular su activación, dando lugar a reordenamientos del citoesqueleto de actina ⁶⁹. De hecho, la inhibición de Arf6 por parte de un complejo formado por la integrina unida a elementos de las adhesiones

focales como la paxilina, y a proteínas GAP de Arf6, inhibe en última instancia la formación de estructuras migratorias dependientes de Rac1, como los lamelipodios, durante la migración celular⁶³ (figura 5). Por tanto, la internalización de integrinas puede a su vez estimular la migración celular.

1.5. Endocitosis y citoesqueleto

La F-actina y los microtúbulos (MTs) poseen una polaridad intrínseca, que es utilizada por proteínas motoras para moverse a lo largo de los filamentos del citoesqueleto^{70,71}. La actina es una proteína globular presente ubicuamente en eucariotas, capaz de formar estructuras filamentosas dinámicas (F-actina), constituyendo la mayor parte del citoesqueleto. La F-actina puede asociarse con un gran número de proteínas que regulan su tasa de ensamblaje y desensamblaje, así como su reorganización en estructuras más complejas, como haces o redes entrecruzadas. Muchos de los procesos de reordenación del citoesqueleto de actina se producen en las regiones subyacentes a la membrana plasmática, donde puede participar en procesos de remodelación de membrana durante la migración, la determinación de la morfología celular o la endocitosis. Los componentes del citoesqueleto de actina participan en muchos tipos de endocitosis, como la CDE, la endocitosis dependiente de caveolas, la vía CLIC/GEEC, la macropinocitosis o la fagocitosis^{24,30,48,56,72,73}. La participación de la actina en la endocitosis se ha observado desde levaduras hasta mamíferos, lo que sugiere que la maquinaria relacionada con la dinámica de actina participa en la mayoría, sino todas, las vías de internalización, pudiendo jugar un papel similar en todas ellas.

Hay evidencias de que la actina es necesaria en varios estadios de la CDE durante la formación de las CCVs, proveyendo primero un andamiaje para el ensamblaje de la maquinaria endocítica, luego la fuerza necesaria para la constricción y fisión de la vesícula y más tarde la fuerza para el transporte hacia el interior de la célula en asociación con proteínas motoras, principalmente miosinas⁷⁴⁻⁷⁷. Las miosinas pueden ser reclutadas a microdominios de membrana. Por ejemplo, la miosina 1b se localiza en regiones de la membrana plasmática ricas en PI(4,5)P₂⁷⁸. Otras miosinas, como la miosina VI se asocia con proteínas adaptadoras de la CDE durante la internalización⁷⁹. En la endocitosis del virus SV40, que utiliza la vía

dependiente de caveolina, también se ha observado una participación similar del citoesqueleto de actina a lo largo de todo el proceso de internalización ⁴⁸. Se ha descrito también la asociación de varias proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina con los procesos de fagocitosis y macropinocitosis, así como la participación de varias proteínas reguladoras de actina como son las GTPasas o la PI3K ³¹.

Los MTs son elementos filamentosos importantes en la localización de orgánulos, así como en el transporte de material entre ellos. A diferencia del transporte a lo largo de la F-actina, el transporte por MTs es relativamente rápido, con una velocidad aproximada de 1 $\mu\text{m/s}$. La quinesina y la dineína son proteínas motoras que se encargan del transporte a lo largo de los MTs hacia la periferia celular o hacia el centro, respectivamente, transportando material a grandes distancias dentro de la célula ⁸⁰. Está bien descrito que los MTs y las proteínas motoras de MTs son capaces de deformar o moldear las membranas celulares y pueden relacionarse estrechamente con las membranas endosomales, siendo claves para la organización y función del sistema endosomal ⁸¹. Sin embargo, se cree que no participan en los estadios tempranos de la endocitosis durante la invaginación y formación de vesículas desde la membrana plasmática.

No obstante, los MTs y sus proteínas motoras pueden actuar junto a la actina y las miosinas para promover la tubulación de la membrana, mediante proteínas que son capaces de asociar ambos elementos del citoesqueleto, como WASH, WHAMM o mDia1 ⁸²⁻⁸⁴. Estas proteínas pueden colaborar llevando las invaginaciones tubulares (o TTCs, véase apartado 1.7 de la introducción), elongados mediante mecanismos dependiente de actina, hacia los “camino” de MTs, facilitando su unión con proteínas motoras como quinesina o dineína.

1.6. Remodelación de la membrana plasmática

Muchos procesos celulares requieren cambios rápidos y dinámicos de la membrana plasmática para formar estructuras esenciales para su funcionamiento. La remodelación de la membrana es un aspecto fundamental no solo en la endocitosis sino también en la migración celular, la mitosis o la señalización. La capacidad de la

célula para acometer estos cambios depende en gran medida de la composición y distribución lipídica y proteica de la membrana.

1.6.1. Proteínas con dominios BAR

Existen numerosas proteínas que contienen dominios de unión a lípidos y a membranas más o menos conservados en todas las células eucariotas. La mayoría de ellas están implicadas en procesos como el tráfico de membranas, la señalización celular y la migración, y juegan un importante papel en la remodelación y la relación entre las diferentes membranas de la célula.

Unos de los dominios más comúnmente presentes en las proteínas de unión a membrana son los dominios de la familia BAR (*Bin-Amphiphysin-Rvs161/167*). Todas estas proteínas comparten un dominio BAR en el extremo N-terminal, susceptible de adoptar una estructura homodimérica de 6 α -hélices con una

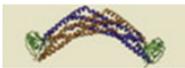
Dominio BAR	Estructura 3D	Proteínas BAR
BAR clásico		Arfaptinas, ICA69, PICK1, DNMBP
N-BAR		Anfifisinas/BINs, endofilinas/BIFs, nadrinas
BAR-PH		Oligofreninas, APPLs, GRAFs, centaurina- β
PX-BAR		nexinas 1,2,5,6,9
F-BAR		Toca-1, FBP17, CIP4 FCHO1, FCHO2, Fes/Fer kinasas, sindapinas (PACSIN), srGAPs, PSTPIP-1, PSTPIP-2
I-BAR		IRSp53, MIM, IRTKS

Tabla 2. Los diferentes tipos de dominios BAR. Se muestra la estructura tridimensional y algunas de las proteínas que los contienen. Adaptada de Frost *et al*, 2009⁸⁵.

curvatura que contiene residuos con carga positiva posicionados en la parte cóncava, y que interaccionan con fosfolípidos de membrana cargados negativamente. Existen varias subfamilias clasificadas según su secuencia o su estructura y grado de curvatura que generan: las BAR clásicas, las N-BAR (*N-*

terminal amphipathic α -helix BAR), las BAR-PH (*pleckstrin homology*), las BAR-PX (*PhoX*), las F-BAR (*Fes-CIP4*) y las I-BAR (*inverse-BAR*), que presentan los residuos positivos en la cara convexa (tabla 2). Como se puede ver en la tabla, todas las proteínas BAR están intrínsecamente curvadas y esto les permite generar determinadas curvaturas, estabilizar la curvatura generada por otras fuerzas o detectar curvaturas para después reclutar otras proteínas BAR que las propaguen. Se ha descrito la implicación de proteínas BAR en la generación y estabilización de la curvatura de membrana de túbulos endocíticos, túbulos-T de células musculares, endosomas, filopodios, mitocondrias, podosomas o anillos contráctiles ^{58,86-91}.

Muchas proteínas BAR también actúan como nexo de unión entre la membrana y el citoesqueleto subyacente. Por ejemplo, algunas proteínas BAR son capaces de unirse a WASP y activar así el factor de nucleación de actina Arp2/3 ⁹². Otras actúan como efectores o reguladores de algunas RhoGTPasas como Cdc42, regulando la polimerización de actina durante la endocitosis ⁹³.

1.6.2. La dinamina

La dinamina es el primer miembro descubierto de la superfamilia a la que también pertenecen las *Dynamamin-Like Proteins* (DLPs), OPA1, las proteínas Mx y las mitofusinas. Como hemos expuesto en apartados anteriores, la generación de una vesícula endocítica requiere de la formación de una invaginación mediante el reclutamiento de proteínas desde el citosol, y la posterior escisión. La proteína mejor descrita que lleva a cabo esta función es la dinamina. Sin embargo, la dinamina y los demás miembros de su superfamilia, no solo están implicados en la fisión de vesículas, sino que se han relacionado con el tráfico de vesículas, la fisión y fusión de orgánulos, la citoquinesis o la acción antiviral ⁹⁴⁻⁹⁷. Todos los miembros de la superfamilia de las dinaminas son GTPasas de las denominadas grandes, cuyo dominio GTPasa consta de unos 300 aminoácidos. Además de este dominio, contienen también un dominio medio, un dominio PH, a través del cual interacciona con la membrana mediante la unión a PI(4,5)P₂, un dominio efector GED (*GTPase Effector Domain*), que es el encargado de la oligomerización y la regulación de la actividad GTPasa, y un dominio PRD (*proline-Rich Domain*), a través del cual interacciona con proteínas que contienen el dominio SH3 (figura 6).

La unidad básica de la dinamina está formada por un dímero, y la oligomerización de estos dímeros es necesaria para su actividad GTPasa. La dinamina se caracteriza por tener una baja afinidad por GTP, pero una todavía menor afinidad por GDP, por lo que, bajo condiciones fisiológicas, la dinamina suele estar unida a GTP. Por ello, la oligomerización actúa como las proteínas GAP de las GTPasa pequeñas, activando la actividad GTPasa intrínseca de la dinamina. Además, a diferencia de las GTPasas pequeñas, la dinamina puede interactuar con muchas proteínas con dominios SH3, como la cortactina o algunas proteínas BAR, tanto en su estado unido a GTP como a GDP. El inicio de la oligomerización está regulado por el reclutamiento de la dinamina a dominios de membrana ricos en PI(4,5)P₂ y otros fosfolípidos, principalmente mediante su dominio PH, siendo su afinidad por estos lípidos mayor cuando la dinamina comienza a oligomerizar. El incremento de PI(4,5)P₂ en la membrana puede ser una señal de reclutamiento y polimerización para la dinamina.

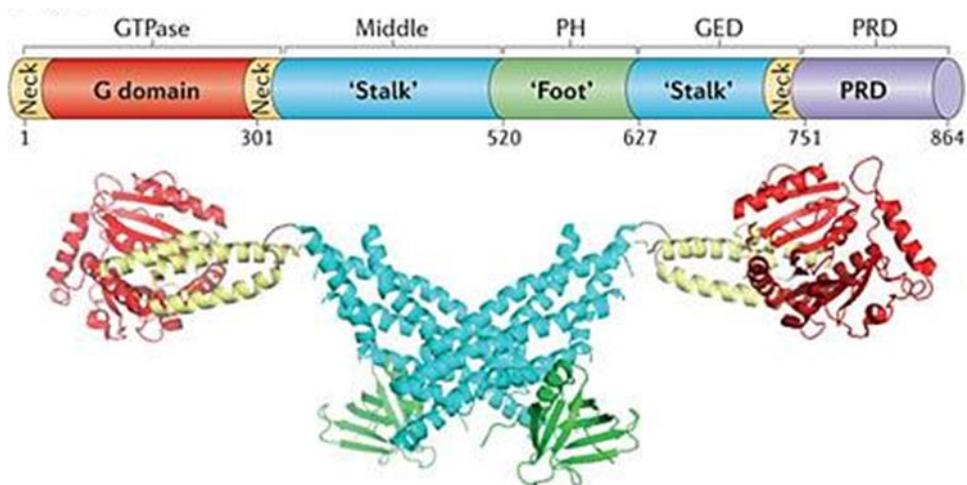


Figura 6. Representación de la organización de los dominios de la dinamina. Se muestra la estructura lineal de una molécula de dinamina y la estructura cristalina de un dímero, correspondiéndose con los colores de la representación lineal. Adaptado de Ferguson & de Camilli⁹⁸

Se han propuesto dos modelos sobre como la dinamina produce la fisión de las vesículas. Se cree que cuando la dinamina oligomeriza alrededor del cuello de una invaginación endocítica, su reorganización estructural hacia una estructura helicoidal debida a la hidrólisis de GTP, genera la constricción y la posterior escisión (modelo de constricción o *pinchase*)⁹⁹, o bien produce un estiramiento del cuello,

con la consiguiente rotura y separación de la vesícula de la membrana plasmática (modelo de estiramiento o *popase*)¹⁰⁰. Praefcke y McMahon han propuesto un modelo según el cual la dinamina podría fisurar o tubular la membrana dependiendo de la velocidad de la hidrólisis de GTP¹⁰¹ (figura 7).

Algunos estudios demuestran que algunas proteínas BAR son necesarias para el reclutamiento de dinamina hacia los sitios de endocitosis, y que el reclutamiento de las proteínas BAR depende recíprocamente de su unión previa a dinamina¹⁰². La implicación de las proteínas BAR en la actividad de la dinamina va desde la interacción directa, hasta la modulación de su actividad GTPasa, vinculando el grado de curvatura de la membrana con la actividad de la dinamina¹⁰³.

Se ha descrito que, durante la CDE, la dinamina interactúa con elementos implicados en la dinámica del citoesqueleto de actina, o incluso con la propia actina^{104,105}.

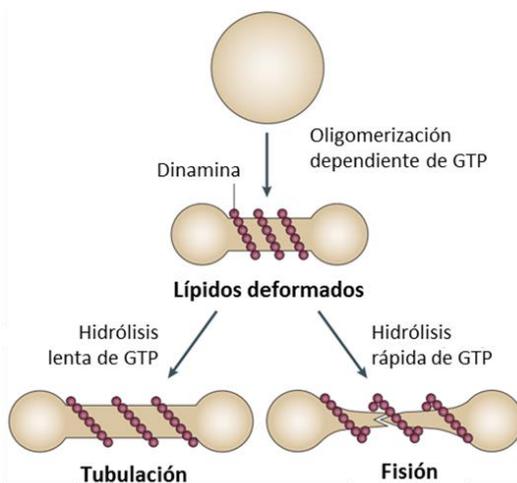


Figura 7. Representación esquemática de la unión de la dinamina a una vesícula lipídica. La oligomerización conduce a la formación de una hélice y el moldeamiento de una estructura tubular. La hidrólisis lenta o no cooperativa del GTP induciría una extensión de la hélice y el estiramiento del túbulo. La hidrólisis rápida y cooperativa conduciría a un repentino estiramiento de la hélice y la consecuente rotura y fisión del tubo lipídico. Adaptado de Praefcke & McMahon¹⁰¹

Además, se ha observado dinamina co-localizando con reguladores de actina como WASP o Arp2/3 en estructuras no relacionadas con la endocitosis, como lamelipodios¹⁰⁶, ondulaciones de membrana¹⁰⁷, invadopodios¹⁰⁸ o podosomas⁸⁸, todas ellas relacionadas también con las GTPasas Rac1 y Cdc42. Otra proteína estrechamente relacionada con estas GTPasas es la cortactina, que contiene un dominio SH3, que puede unirse al dominio PRD de la dinamina, y colabora con ésta en la polimerización y ramificación de la F-actina durante la endocitosis, o la

formación de estructuras ricas en actina en células estimuladas con factores de crecimiento ^{72,107}. Además del dominio SH3, la cortactina contiene una serie de repeticiones de unión a F-actina, y un dominio de unión a Arp3, lo que le permite estimular la nucleación de F-actina dependiente de Arp2/3 ¹⁰⁹. Se ha descrito que la cortactina es esencial tanto durante la CDE como en algunos tipos de CIE, siendo una de las pocas proteínas, sino la única, que vinculan la dinamina con el citoesqueleto de actina durante procesos endocíticos dependientes e independientes de clatrina. Se ha propuesto un modelo en el que dinamina, cortactina, Arp2/3 y la F-actina constituyen un complejo que vincula la endocitosis con la dinámica del citoesqueleto (figura 8).

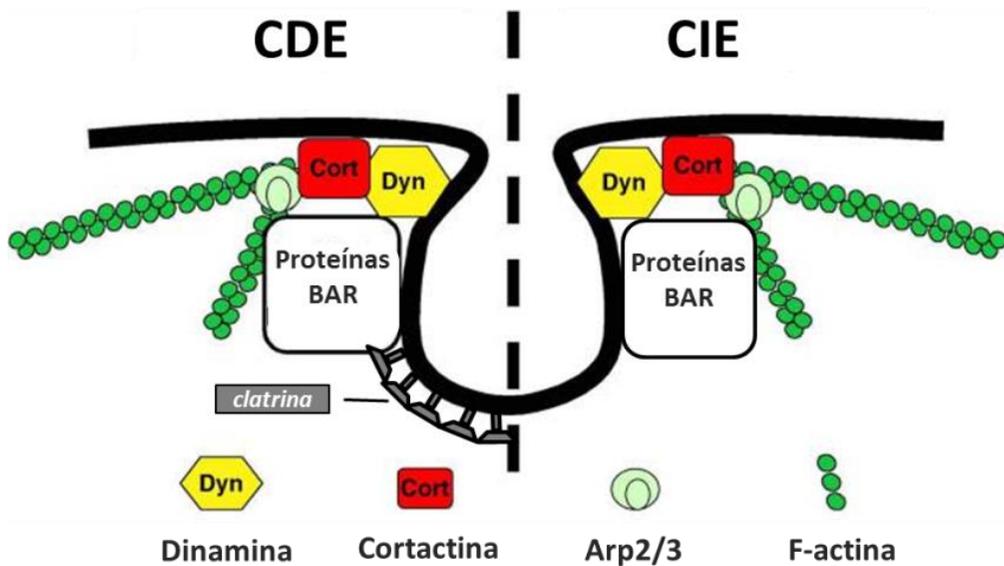


Figura 8. Modelo de la participación de dinamina, cortactina y las proteínas BAR en la endocitosis. El reclutamiento de dinamina, cortactina y proteínas BAR, y la participación de Arp2/3 en la nucleación de filamentos de actina en los sitios de endocitosis podrían controlar la remodelación de la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina durante la endocitosis dependiente e independiente de clatrina, colaborando en la invaginación, elongación y/o escisión de la membrana ⁷².

Por tanto, la dinamina y sus proteínas asociadas, como por ejemplo las proteínas con dominios SH3, a menudo actúan conjuntamente para llevar a cabo la remodelación de la membrana y la reorganización del citoesqueleto de actina.

1.6.3. Fosfatidilinositoles en la remodelación de membrana

El fosfatidilinositol (PI) y sus derivados fosforilados conocidos como fosfoinosítidos se encuentran concentrados en la cara citosólica de las membranas celulares. El PI se sintetiza en el retículo endoplásmico (RE) y es llevado al resto de membranas mediante el transporte vesicular o a través de proteínas transportadoras. Mediante la fosforilación o defosforilación en las posiciones 3, 4 y 5 del grupo inositol, se generan siete especies de fosfoinosítidos (figura 9). Todos estos derivados tienen

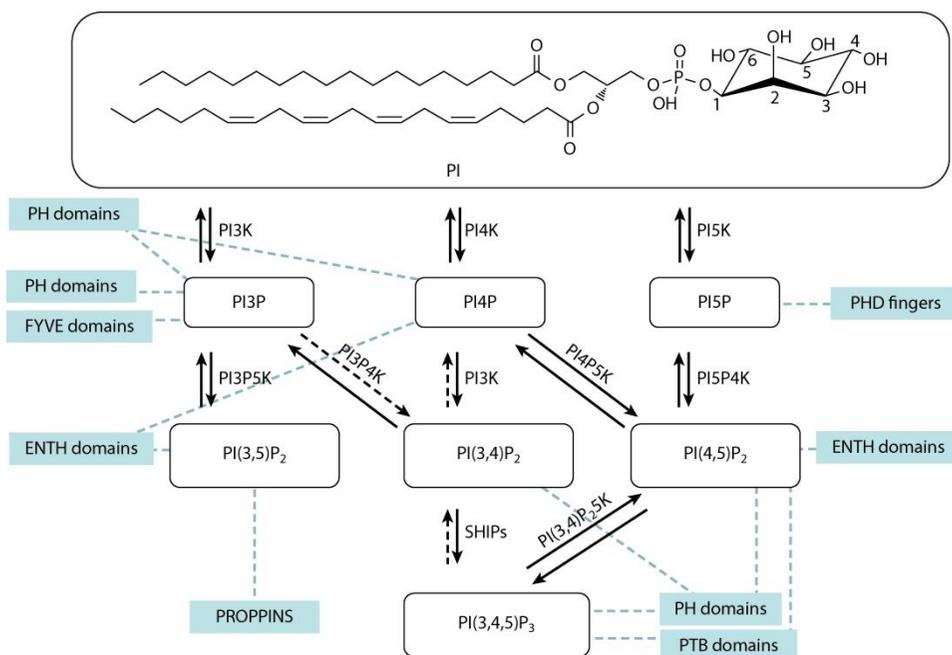


Figura 9. Metabolismo de los fosfoinosítidos. Se muestra la estructura molecular del fosfatidilinositol, y se indican los enzimas que generan cada una de las siete especies de fosfoinosítidos derivados. En azul se indican los dominios proteicos capaces de unirse a cada una de las especies fosforiladas ¹¹⁰.

diferentes funciones en la regulación de procesos celulares estrechamente ligados a las membranas celulares ¹¹¹. PI(4)P y PI(4,5)P₂ representan la mayor parte de los fosfoinosítidos en células de mamífero, y cada una de las especies es característica de un tipo de membrana, confiriéndole una identidad característica y regulando diferentes procesos celulares. Los PIPs ejercen su función a través de la unión y reclutamiento de proteínas citosólicas hacia las membranas, pero también mediante la unión a los dominios citosólicos de proteínas transmembrana. Normalmente, la

unión de estas proteínas a los PIPs implica interacciones electrostáticas con las cargas negativas de los fosfatos del inositol. Los dominios de unión a PIPs pueden ser regiones no estructuradas en las que hay agrupados residuos básicos, o pueden encontrarse en dominios organizados que reconocen los diferentes derivados. La especificidad de unión a PIPs de estos dominios (figura 9), permite una regulación espacio-temporal de las proteínas que los contienen.

Tanto los PIPs como los enzimas implicados en su metabolismo, están distribuidos específicamente en diferentes membranas de la célula. Por ejemplo, PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ se encuentran básicamente en la membrana plasmática donde regulan procesos importantes como la generación de segundos mensajeros, la exocitosis, la endocitosis o la reorganización del citoesqueleto de actina. PI(3)P se encuentra en los EEs y en los cuerpos multivesiculares. PI(4)P es el más abundante en el aparato de Golgi y PI(3,5)P₂ se localiza en endosomas tardíos y lisosomas¹¹².

Como hemos comentado, PI(4,5)P₂ es uno de los fosfoinosítidos más abundantes e importantes de la célula. PI(4,5)P₂ puede regular por sí mismo un gran número de procesos celulares como la movilidad, la obertura de canales iónicos, la exocitosis o el tráfico vesicular, regulando un gran número de proteínas cuya interacción con la membrana depende de la unión a PI(4,5)P₂¹¹³⁻¹¹⁵. PI(4,5)P₂ es especialmente importante en varios tipos de endocitosis. Muchas proteínas endocíticas contienen lugares de unión para este lípido, y sin esta unión, la endocitosis es inhibida. Durante la CDE, la concentración de PI(4,5)P₂ antes de la endocitosis aumenta. Una vez formada la vesícula, éste pierde el PI(4,5)P₂, a través de la acción de fosfatasas como la sinaptojanina, cambiando la composición lipídica y permitiendo la fusión de la vesícula con los compartimentos endosomales tempranos¹¹⁶. Asimismo, la hidrólisis de PI(4,5)P₂ es esencial para el control de la remodelación del citoesqueleto de actina durante la fagocitosis²⁴. Por tanto, no solo la presencia sino la dinámica del incremento y desaparición de PI(4,5)P₂ es el factor clave para su acción reguladora sobre el tráfico de membranas.

PI(4,5)P₂ puede ser también regulado a través de la proteína quinasa C (PKC). El principal sustrato de esta quinasa es (*Myristoylated alanine-rich C kinase substrate*). Esta proteína puede unirse a la membrana plasmática a través de un dominio básico que interacciona electrostáticamente con fosfolípidos como PI(4,5)P₂¹¹⁷.

Cuando la PKC fosforila algunos residuos de serina dentro del dominio básico, se rompe la interacción electrostática y provoca la translocación de MARCKS al citosol ¹¹⁸. Tras la defosforilación, MARCKS puede asociarse de nuevo a PI(4,5)P₂ y translocarse a la membrana. La unión de MARCKS a PI(4,5)P₂ permite el secuestro de este lípido e impide la unión de otras proteínas de unión a PI(4,5)P₂. El ciclo de MARCKS entre la membrana y el citosol permite una rápida regulación de los niveles de PI(4,5)P₂ libre independiente de los enzimas implicados en su metabolismo.

1.7. Tráfico tubular de membranas

El flujo de membrana entre los orgánulos subcelulares es esencial para el mantenimiento de la homeostasis, y se lleva a cabo mediante los llamados portadores de carga (TC, *transport carriers*). Tras la salida desde una membrana donadora, los TCs deben poseer ya los marcadores que le permitirán ser direccionados a la membrana receptora adecuada. La morfología de los TCs puede variar en tamaño y complejidad desde pequeñas vesículas a grandes estructuras que contienen en ocasiones elementos tubulares que pueden alcanzar decenas de micrómetros ¹¹⁹⁻¹²¹. Estas estructuras, denominadas TTCs (*Tubular transport carriers*), se han observado cada vez en más procesos dentro de la célula, pero los mecanismos moleculares a través de los cuales nacen de unas membranas, viajan por la célula, y se fusionan con las membranas receptoras, es poco conocido ¹²².

La existencia de grandes complejos tubulares que transportan material de un lugar a otro en la célula se debe probablemente a la necesidad de transportar rápidamente grandes cantidades a distancias relativamente grandes. En este caso, un gran número de cargos pueden ser transportados mediante un solo TTC a través de los MTs, haciendo uso de pocas moléculas de proteínas motoras, en comparación con el transporte vesicular.

En el caso de los TTCs generados para la exportación constitutiva de material desde la red del *trans*-Golgi, Polishchuk *et al* ¹²³ proponen un modelo en tres pasos para su formación (figura 10). Inicialmente, la membrana debe curvarse para iniciar el nacimiento del túbulo, lo que requiere la participación de proteínas de curvatura y

moldeamiento de la membrana. Seguidamente, la estructura naciente debe elongarse mediante la acción dinámica de proteínas de andamiaje y del citoesqueleto. Por último, debe producirse la separación de la estructura de la membrana de origen. En ocasiones, esta separación puede no producirse, generando canales entre el compartimento donador y el receptor. Estos canales han sido propuestos para varios procesos de tráfico intracelular, como la vía endocítica del MHC-I o el transporte dentro del aparato de Golgi^{124,125}.

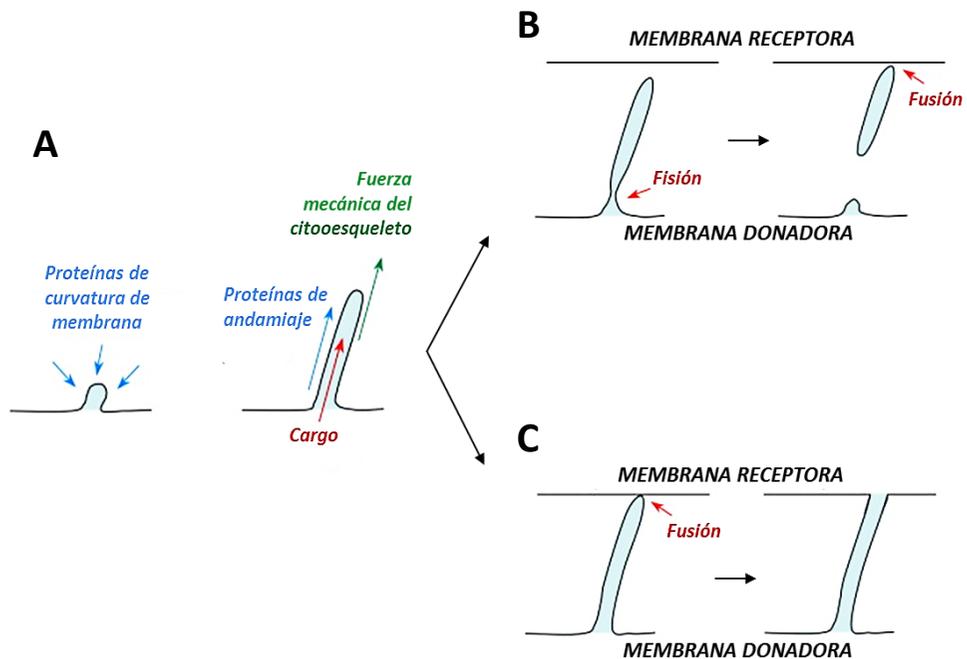


Figura 10. Mecanismos de formación de los transportadores tubulares. (A) Inicialmente se produce la invaginación incipiente de la membrana donadora, mediante la participación de proteínas que inducen y estabilizan la curvatura. Más tarde diversas proteínas de andamiaje y del citoesqueleto inducen la elongación del túbulo. Posteriormente, el túbulo puede separarse de la membrana donadora para ser llevado y fusionado con la membrana receptora (B), o bien continuar su elongación hasta fusionarse con la membrana receptora, sin separarse de la membrana de origen, dando lugar a un canal tubular entre ambas membranas (C). Adaptado de Polishchuck *et al*, 2009¹²⁶.

Además de estos, se han descrito ya numerosos procesos en los que se pueden observar estructuras TTC. Entre ellas, el transporte desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi, el transporte *post*-Golgi, o el transporte recíproco entre la membrana plasmática y los compartimentos endosomales. Curiosamente, muchas de las proteínas de curvatura y andamiaje, así como algunas GTPasas que participan en la regulación de estos TTCs, están también involucradas en los

procesos endocíticos mejor estudiados, como por ejemplo las proteínas BAR, Arf6 o la dinamina ¹²⁷⁻¹²⁹. Todas estas proteínas actúan reconociendo, generando o estabilizando la curvatura de membrana. Además, la actividad local de las enzimas modificadoras de lípidos es requerida para mantener la producción de lípidos específicos que favorecen esta conformación de las membranas, como el PI(4,5)P₂, necesario para la unión de las proteínas BAR o la dinamina. La acción de elementos del citoesqueleto, como la actina o los microtúbulos, así como proteínas motoras asociadas, como las miosinas, las quinesinas y las dineínas, suele estar involucrada en el proceso de elongación ¹³⁰.

1.7.1. Transporte tubular en la vía endocítica

El transporte a través de túbulos se ha observado en numerosos procesos endocíticos, ya sea desde la membrana plasmática o desde compartimentos endosomales. Aunque los TTCs apenas han sido observados durante la internalización dependiente de clatrina, la formación de invaginaciones tubulares primordiales facilita la generación de CCVs ^{131,132}. Sin embargo, la participación de TTCs en procesos endocíticos independientes de clatrina sí se ha descrito en numerosas ocasiones ^{124,133-135}.

Después de la internalización desde la membrana, los cargos deben ser rápidamente transportados a los compartimentos endocíticos tempranos y clasificados hacia el interior de la célula o bien reciclados de vuelta a la membrana plasmática. La entrada de estos cargos a la célula puede producirse mediante la invaginación de regiones ricas en PI(4,5)P₂ por proteínas de unión a este fosfolípido, generando túbulos que pueden escindirse para generar túbulos relativamente cortos, como es el caso de la vía de CLIC/GEEC ⁵⁸, o bien pueden elongarse para formar túbulos de gran longitud ¹³⁶⁻¹³⁸.

Los propios compartimentos endocíticos contienen también elementos vesiculares y tubulares, y ambos tipos pueden estar interconectados ^{139,140}. La parte vesicular contiene habitualmente una mezcla de proteínas endocitadas desde la membrana plasmática, mientras que las estructuras tubulares emanan desde la estructura vacuolar pero contienen cargos específicos y proteínas accesorias ¹²¹. El direccionamiento de los túbulos desde los endosomas hasta otros compartimentos

Endocitosis

está dirigido por proteínas BAR, que curvan las membranas para formar túbulos, y por proteínas de la familia SNX, que participan en el anclaje de estas estructuras al citoesqueleto de actina y microtúbulos. Estas redes túbulo-vesiculares se han descrito tanto en los compartimentos endosomales tempranos como en compartimentos de reciclaje, así como también en el sistema de endosomas tardíos.

2. RhoGTPasas

2.1. Generalidades

Las GTPasas son interruptores moleculares que oscilan entre dos estados conformacionales, uno activo unido a GTP y otro inactivo unido a GDP. Cuando la GTPasa está activada, es capaz de unir sus efectores y generar una respuesta hasta que la actividad GTPasa intrínseca es inducida, provocando la hidrólisis del GTP. Existen varios cientos de GTPasas en mamíferos, siendo la superfamilia Ras la más estudiada, de la que forman parte más de 100 proteínas pequeñas monoméricas. Esta superfamilia se divide en cinco grandes subfamilias: Ras, Rho, Ran, Arf y Rab¹⁴².

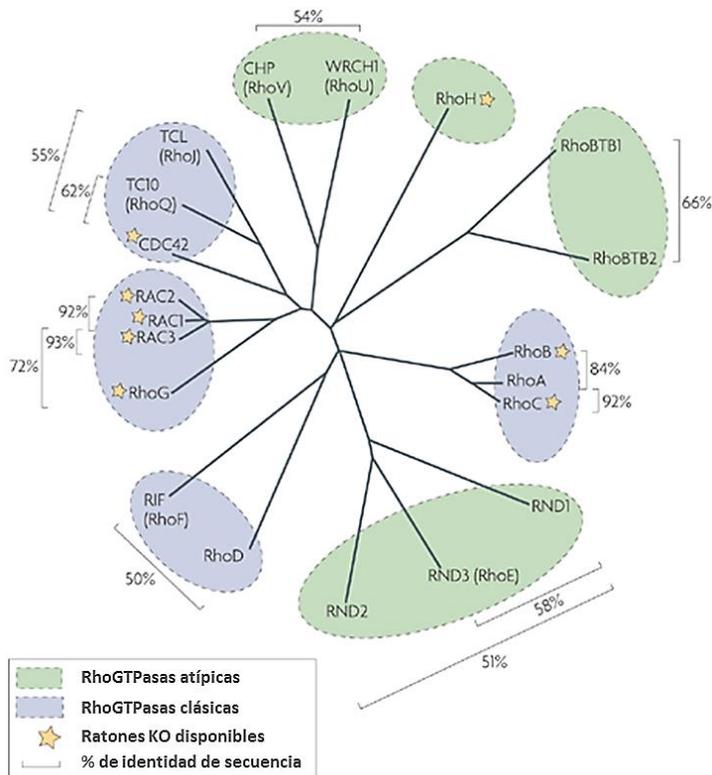


Figura 11. Árbol filogenético de la familia de las RhoGTPasas. Se muestra la relación entre las 8 subfamilias. Se encuentra una alta identidad de secuencia entre los miembros de las subfamilias de Rac y Rho, mientras que las otras familias poseen mucha menos similitud. Adaptado de Heasman y Ridley¹⁴¹.

La subfamilia Rho de GTPasas juega un papel crucial en la reorganización del citoesqueleto de actina y en el control de la expresión génica, y la primera en ser descubierta fue Rho. Su activación es inducida a menudo por receptores de la superficie celular, que se activan por la unión de citoquinas, tirosina-quinazas o la propia matriz extracelular¹⁴³. La familia Rho incluye 23 miembros, entre los que se encuentran RhoA, RhoB, RhoC, Rac1, Rac2 o Cdc42 (figura 11). Todas ellas poseen un alto grado de conservación en su secuencia de aminoácidos¹⁴⁴, y tienen en su mitad N-terminal una secuencia consenso responsable de la interacción con GTP o GDP, así como de la actividad GTPasa intrínseca. Pese a que existe cierto grado de entrecruzamiento en la activación de sus efectores, cada RhoGTPasa es responsable de la regulación de diferentes estructuras. Por ejemplo, RhoA modula la formación de fibras de estrés, mientras que Rac1 regula la formación de lamelipodios y ondulaciones de membrana y Cdc42 regula el desarrollo de filopodios.

La afinidad de las RhoGTPasas por el GDP/GTP es elevada y está en el orden de nano a picomolar. Esto se traduce en una tasa de disociación lenta de estos nucleótidos. Sin embargo, el intercambio de GDP a GTP debe producirse rápidamente, por lo que las RhoGTPasas necesitan factores que activen y faciliten este intercambio. Estos factores son las proteínas GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*). Para que las RhoGTPasas sean inactivadas necesitan de la acción de las GAP (*GTPase-Activating Protein*), que inducen la actividad GTPasa intrínseca de las GTPasas. Existen numerosas proteínas que actúan como GEFs y GAPs de las RhoGTPasas, y superan en número aproximadamente en 3 a 1 a sus dianas¹⁴⁵. Estas GEFs y GAPs incluyen diferentes dominios que les confieren especificidad en sus dianas o su localización (figura 12). Las GDI (*Guanine nucleotide-Dissociation Inhibitors*) son otro grupo de proteínas reguladoras de la actividad de las GTPasas.

Se han descrito aproximadamente unas 70 GEFs para la familia Rho, la mayoría de las cuales pertenecen a la familia Dbl, que contienen un dominio DH (*Dbl Homology*) seguido de un dominio PH (*Pleckstrin Homology*). El dominio PH está implicado en la localización subcelular del GEF, mientras que el dominio Dbl es responsable de la actividad catalítica de la proteína¹⁴⁶. Las GEFs catalizan la disociación del GDP modificando el sitio de unión al nucleótido, disminuyendo su

región efectora de la RhoGTPasa, y un dominio plegado C-terminal, que se une al grupo prenil. Aunque los mecanismos de acción de las GDI son poco conocidos, se han propuesto modelos según los cuales el dominio N-terminal se uniría primero a la GTPasa, y más tarde el dominio C-terminal capturaría el grupo prenil ¹⁵⁰ para extraer a la proteína de la membrana. Aunque normalmente las RhoGDI secuestran GTPasas unidas a GDP, se sabe que existe también un pool de RhoGTPasas unidas a GTP secuestradas en el citosol por RhoGDIs ¹⁵¹. El ciclo controlado por GEFs, GAPs y GDIs permite la regulación espacio-temporal de la actividad de la RhoGTPasas (figura 13).

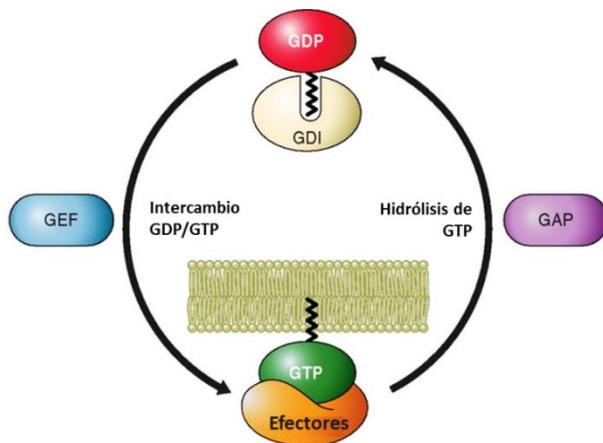


Figura 13. Ciclo de Regulación de las RhoGTPasas por las proteínas GEF, GAP y GDI. Adaptado de Cherfils y zeghouf ¹⁵².

2.2. Rac1

Basándose en la identidad de secuencia, RAC1, RAC2, RAC3 y RhoG forman parte de una misma subfamilia dentro de las RhoGTPasas. Rac1 es el miembro mejor estudiado y su actividad es crítica para el correcto funcionamiento de diversos procesos celulares como la pinocitosis, la fagocitosis, la migración, el crecimiento axonal, la diferenciación o el control de la expresión génica ¹⁴¹. Esta proteína se expresa de manera ubicua en mamíferos y los ratones geno-anulados (KO) de Rac1 no son capaces de superar las fases embrionarias tempranas ¹⁵³.

La proteína Rac1 contiene dos regiones denominadas *switch I* y *switch II*, donde se unen la mayoría de sus efectores. En el extremo C-terminal de la proteína se encuentra la región hipervariable, que posee dos dominios característicos: la región

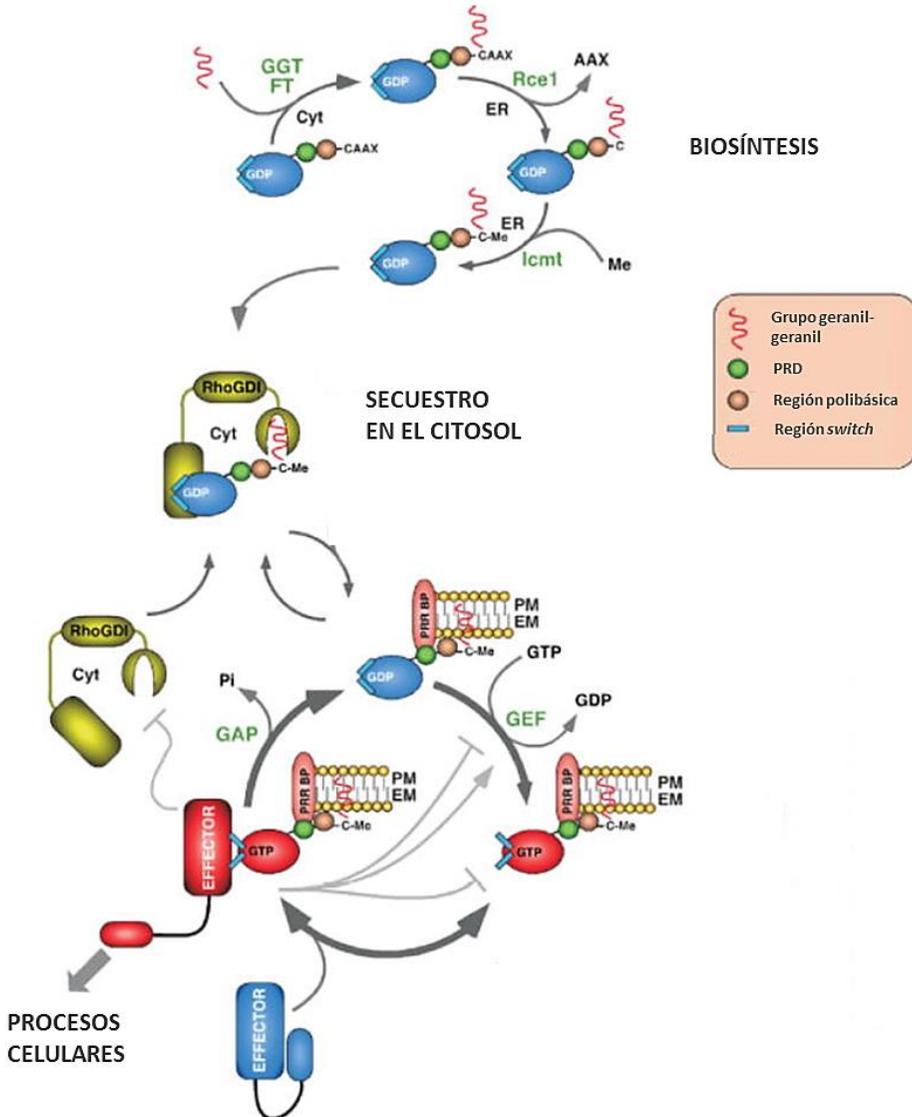


Figura 14. Representación esquemática del ciclo de síntesis, secuestro y regulación de la actividad de las RhoGTPasas. Tras ser sintetizado en el citosol (cyt), Rac1 sufre la incorporación de un grupo geranyl-geranyl en la cisteína de la caja CAAX. En el retículo (ER), la proteína pierde los tres últimos aminoácidos del extremo C-terminal, y adquiere un grupo metilo (Me). Posteriormente, Rac1 puede ser secuestrado en el citosol por RhoGDI hasta que un estímulo induzca su liberación y su translocación a la membrana, hacia donde es direccionado mediante la región polibásica. La inserción en la membrana se produce a través del grupo geranyl-geranyl. Las proteínas GEF y GAP se encargan de completar el ciclo de activación/desactivación de Rac1. Adaptado de Bustelo et al ¹⁵⁴.

polibásica, rica en aminoácidos cargados positivamente, y la denominada caja CAAX. Después de ser sintetizado en el citosol, Rac1 debe ser direccionado a la membrana plasmática para ejercer su función. Para ello, requiere de modificaciones post-traduccionales (figura 14). El primer paso es la incorporación, en el citosol, de un grupo geranil-geranil en la cisteína de la caja CAAX. Posteriormente es reclutada al retículo endoplásmico donde se eliminan los tres últimos aminoácidos de la caja CAAX y se añade un grupo metilo. La composición aminoacídica de la región polibásica es clave para el direccionamiento correcto de Rac1 a la membrana plasmática. De hecho, pequeñas diferencias en esta región entre Rac1, Rac2 y RhoG determinan destinos subcelulares diferentes para cada uno ^{155,156}. La presencia de un PRD (*Proline-Rich Domain*) cerca de la caja CAAX contribuye también al direccionamiento específico de Rac1 a las adhesiones focales ¹⁵⁷.

Después de estas modificaciones, Rac1 puede ser secuestrado en el citosol por las RhoGDIs. Como hemos comentado anteriormente, estas proteínas esconden el grupo geranil-geranil de la GTPasa, inhibiendo además el intercambio de GDP por GTP. Se ha descrito que Rac1 se asocia a la membrana en las balsas lipídicas, co-localizando con marcadores de estas regiones de la membrana ¹⁵⁸. En respuesta a ciertos estímulos, la afinidad de Rac1 por las balsas lipídicas, puede incrementar, provocando la liberación del geranil-geranil del RhoGDI, que junto a la región polibásica permite el direccionamiento hacia dominios específicos de la membrana ^{159,160}. Tras su inserción en la membrana plasmática, el ciclo de activación de Rac1 continúa con la acción de las proteínas GEF, que estimulan el cambio de GDP a GTP, y disponen a Rac1 para la unión y activación de sus efectores.

2.2.1. Efectores de Rac1 e implicación en procesos celulares

2.2.1.1. PAK

Rac1 activa numerosos efectores, implicados sobretodo en la remodelación del citoesqueleto de actina y en el control de la expresión génica. Uno de los mejor estudiados es la proteína PAK (*p21-activated kinase*), que puede ser activada también por Cdc42. Existen 3 principales isoformas de PAK llamadas PAK1, PAK2 y PAK3. Las tres contienen una extensión N-terminal que es el dominio regulador, donde se encuentran un número variable de motivos de unión a dominios SH3 según la isoforma. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio catalítico, que

está altamente conservado. Posee también un dominio de unión a Rac1/Cdc42, denominado PBD (*p21-binding domain*) o CRIB (*Cdc42 and Rac1 interactive binding*). PAK se encuentra formando homodímeros, donde el dominio regulador de un PAK se une e inhibe el dominio catalítico del otro ¹⁶¹. Cuando Rac1 (o Cdc42) se une al dominio PBD, separa el dímero y produce una serie de cambios conformacionales que conllevan la separación de los dominios inhibidores y la liberación del dominio catalítico, que puede ahora llevar a cabo su función quinasa ¹⁶². La activación iniciada por Rac1 requiere de fosforilaciones que mantienen el estado de activación ¹⁶³.

A través de Rac1, PAK es direccionado desde el citosol hacia estructuras corticales de actina, donde se activa para formar estructuras como lamelipodios, ondulaciones de membrana, o adhesiones focales ¹⁶⁴. En estudios con una versión de PAK constitutivamente activa se observa una pérdida de fibras de estrés y un incremento en el reciclaje y renovación de adhesiones focales ¹⁶⁵. PAK es reclutado al extremo anterior de células migrantes donde parece controlar la remodelación del citoesqueleto para provocar un avance de los lamelipodios ^{166,167}, lo cual es consistente con la activación de PAK por algunos quimio-atrayentes como la quimioquina CXCL1 ¹⁶⁸.

Una de las dianas más importantes de PAK es la LIM quinasa o LIMK. Esta quinasa está implicada en la regulación de la dinámica de actina a través de la fosforilación de ADF (*actin-depolymerizing factor*), también llamada cofilina. Al ser fosforilada, la cofilina ya no es capaz de inducir la despolimerización de la actina filamentosa (F-actina), y por tanto, ésta se estabiliza ¹⁶⁹. Otra de las dianas clave en la vía de señalización de PAK es la MLCK (*myosin light chain kinase*). Las miosinas son ATPasas activadas por actina, que convierten la energía del ATP en fuerza mecánica entre la actina y los filamentos de miosina, para crear tensión o contracción. La fosforilación de MLCK por PAK conduce a su inhibición, y como consecuencia de esta inhibición, se inhibe la capacidad de contracción de la miosina, lo cual puede contribuir a la inhibición de las fibras de estrés ¹⁷⁰. PAK también fosforila y activa a cortactina ^{171,172}. La cortactina es un activador de la polimerización de actina involucrado en numerosos procesos celulares. Contiene diversos dominios de unión a proteínas relacionadas con la actina, como el complejo Arp2/3 o la proteína WASP (*Wiskott-Aldrich síndrome protein*). También

es capaz de asociarse con la dinamina durante la endocitosis, donde ambas juegan un importante papel en la reordenación del citoesqueleto de actina ^{72,173}. Por ejemplo, la fosforilación de la cortactina en las serinas 405 y 418 es necesaria para que se produzca la endocitosis del IL-2R β (*interleukin-2 receptor β*), que utiliza una vía de entrada independiente de clatrina y caveolina. Sin embargo no afectan a la vía de clatrina ¹⁷⁴. Estas fosforilaciones dependen de una cascada que se inicia con Rac1, activando a PAK, que fosforila a la cortactina ¹⁷⁵.

PAK está también implicada en la regulación de un amplio rango de factores que están relacionados con procesos como la supervivencia celular, la mitosis o el movimiento celular (figura 15). Algunos ejemplos de ello son la filamina, relacionada con el entrecruzamiento de los filamentos de actina ¹⁷⁷, o la estatmina, que tiene un papel importante en la organización de los microtúbulos durante la mitosis ¹⁷⁸.

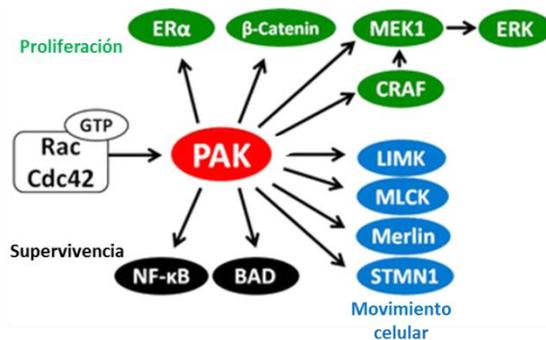


Figura 15. PAK activa diversas proteínas involucradas en procesos corriente abajo de las vías de Rac1 y Cdc42. La actividad de Rac1 y Cdc42 induce la fosforilación de PAK, desencadenando la activación de vías de señalización relacionadas con procesos como la migración, proliferación o supervivencia celular. Adaptado de Rudolph et al ¹⁷⁶.

2.2.1.2. POR1

No se conocen en profundidad los mecanismos de acción de la proteína POR1 (*Partner of Rac1*, también conocida como arfaptina 2), y su relación con Rac1 es todavía muy controvertida. POR1 fue identificada por vez primera en 1996 como una proteína que interactuaba con Rac1 *in vitro* y que era necesaria en la formación de ondulaciones de membrana dependientes de Rac1 ¹⁷⁹. POR1 es una proteína BAR que forma homodímeros. Cada monómero se compone de 3 hélices α antiparalelas. La interacción entre Rac1 y POR1 es dependiente de GTP ^{179,180}, y depende, al menos en parte, de las regiones *switch* de Rac1, ya que una mutación en el aminoácido 35 (T35A), inhibe la interacción. No obstante, un estudio describe, mediante el método de doble híbrido en levaduras, que POR1 es capaz de

interaccionar con Rac1 en su forma unida a GDP, pero no con la forma unida a GTP¹⁸¹.

Se ha descrito la interacción entre POR1 y Arf6, la cual es importante para la reordenación del citoesqueleto de actina y la membrana plasmática dependiente de Arf6 en la periferia celular¹⁸². También se cree que POR1 juega un papel importante en la relación entre las vías mediadas por Rac1 y Arf1, pues se ha descrito también como efector de este último, pudiendo competir ambas proteínas por la unión a POR1, ya que las interacciones de esta proteína a Rac1 y Arf1 son mutuamente excluyentes¹⁸³. Recientemente se ha propuesto que POR1 podría reclutar y elevar los niveles de Rac1 en regiones curvadas de la membrana plasmática, y activarlo localmente¹⁸⁴.

POR1 se ha visto implicado en la formación de agregados de huntingtina, relacionada con la Enfermedad de Huntington^{185,186}. También se ha relacionado la función de POR1 con la biogénesis de gránulos secretores en la red del *trans*-Golgi, donde interacciona con Arl1, pero no con proteínas Arf^{187,188}.

2.2.1.3. Efectores relacionados con PI(4,5)P₂: PIP5K, PLC y PI3K

El fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados (fosfoinosítidos) se encuentran en niveles relativamente bajos en las células, y por ello tienen un papel clave en la regulación de muchos procesos, dando identidad a las membranas celulares. Su metabolismo debe estar por tanto finamente regulado en el espacio y en el tiempo por la acción de diversas quinasas, fosfatasas y fosfolipasas, y las GTPasas pequeñas son uno de los principales reguladores de estas enzimas. Entre estas GTPasas, una de las más importantes en este aspecto es Rac1.

El fosfoinosítido mejor estudiado es el PI(4,5)P₂, del que ya hemos hablado en esta introducción y cuya formación es catalizada por la PIP5K mediante la fosforilación del PI(4)P en la posición 5 del inositol o por la PIP4K mediante la fosforilación del PI(5)P en la posición 4. Debido a que la concentración intracelular del PI(4)P es unas 10 veces mayor que la del PI(5)P, la acción de la PIP5K es de mayor importancia en la síntesis de PI(4,5)P₂. La PIP5K también puede fosforilar la posición 5 del PI(3)P o del PI(3,4)P₂ para formar PI(3,5)P₂ o PI(3,4,5)P₃, respectivamente.

Se ha descrito que Rac1 puede interaccionar y activar la PIP5K, al igual que otras GTPasas como Arf6, RhoA o Cdc42^{135,189}, y que esta unión es independiente del estado de activación de Rac1. Rac1 es capaz de reclutar PIP5K en la membrana plasmática, induciendo un incremento de PI(4,5)P₂, necesario para la regulación del citoesqueleto de actina dependiente de Rac1^{190,191}. Sin embargo, la unión de Rac1 a PIP5K solo aumenta su actividad quinasa en un 50%, por lo que la principal función de Rac1 podría ser la de translocar la PIP5K a la membrana plasmática¹⁹². Se ha visto que mutantes de Rac1 que atenúan la unión a PIP5K, impiden el reclutamiento de ésta hacia la membrana, y aunque la actividad quinasa no se ve afectada, la polimerización de actina dependiente de Rac1 está inhibida¹⁹².

El incremento de PI(4,5)P₂ producido por el direccionamiento de PIP5K a la membrana por parte de Rac1 puede activar algunos GEF, activando Rac1¹⁹³. Además, el PI(4,5)P₂ es una importante señal de direccionamiento para Rac1, ya que éste puede interaccionar con PI(4,5)P₂ mediante su región polibásica. Esta retroalimentación positiva puede generar dominios ricos en PI(4,5)P₂ en los lugares donde Rac1 está presente.

Sin embargo, Rac1 también puede inducir una reducción de los niveles de PI(4,5)P₂ mediante la activación de la PI3K, que fosforila PI(4,5)P₂ transformándolo en PI(3,4,5)P₃ o bien mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza PI(4,5)P₂ convirtiéndolo en diacil-glicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP₃). Estos dos últimos productos tienen un importante papel como segundos mensajeros intracelulares¹⁹⁴. Existen 13 isoformas de PLC, que se agrupan en seis familias: β, δ, γ, ε, ζ y η¹⁹⁵. Se ha descrito que Rac1 (así como Cdc42), pero no RhoA, puede unirse y activar la isoforma PLCβ₂, probablemente a través de su unión a los sitios *switch* de la GTPasa, ya que modificaciones en esta región, como la mutación F37A, tanto en Rac1 como en Cdc42, inhibe la activación de ésta PLC^{196,197}. También se ha demostrado una interacción directa de Rac1 con la isoforma PLCγ₁ en respuesta a la estimulación con EGF (*Epidermal growth factor*), entre el dominio SH3 de la PLC y el PRD de Rac1, y que esta interacción regula positivamente la formación de F-actina y la migración dependiente de Rac1¹⁹⁸. Esto demuestra que Rac1 regula la dinámica de actina controlando el balance entre la producción y la reducción de PI(4,5)P₂. Pero como se ha comentado anteriormente, esta reducción también puede producirse por la acción de la PI3K activada por Rac1. Este enzima

ha sido intensamente estudiado por ser el inicio de una vía de señalización estrechamente relacionada con muchos tipos de cáncer. En esta vía, la PI3K genera PI(3,4,5)P₃, que activa la quinasa Akt y otros efectores. Muchos estudios han revelado que en muchos cánceres, algunos de los elementos de la vía PI3K/AKT están sobreactivados, lo que la convierte en una diana en la terapia contra el cáncer. De hecho, la fosfatasa PTEN, que reduce los niveles del producto de la PI3K, es un conocido supresor de tumores¹⁹⁹. Se ha descrito que Rac1 es necesario para la activación de la vía PI3K/AKT y la migración celular en células MDA-MB-231 de cáncer de mama²⁰⁰. Asimismo, también se ha determinado que puede promover la supervivencia celular mediante la activación de esta vía²⁰¹. Además, la activación de PI3K y la consecuente producción de PI(3,4,5)P₃ es una conocida vía de activación de algunos GEF de Rac1, lo que conlleva un bucle de retroalimentación positiva entre Rac1 y PI3K^{202,203}.

2.3. Rho

RhoA, RhoB y RhoC forman parte de una misma subfamilia de RhoGTPasas. Aunque las tres proteínas fueron descubiertas simultáneamente, RhoA ha sido mucho más estudiada. Las tres Rho mantienen un alto grado de homología y algunas de sus funciones son redundantes, pero los patrones de expresión y muchas funciones son específicas de cada isoforma. Al igual que otros grupos de RhoGTPasas, las Rho oscilan entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP, y también se asocian con GEFs y GAPs para regular este ciclo. Después de ser sintetizadas, las Rho sufren modificaciones post-traduccionales muy similares a las sufridas por Rac1. La longitud del grupo prenil en las Rho difiere entre las isoformas: RhoA y RhoC sufren únicamente una geranil-geranilación, mientras que RhoB puede ser prenilado con un grupo farnesil de 15 carbonos o con un geranil-geranil de 20 carbonos. Estas diferencias permiten a las Rho localizarse en diferentes compartimentos subcelulares. Así, RhoB se localiza sobre todo en endosomas tardíos y lisosomas, mientras que RhoA y RhoC se encuentran principalmente en la membrana plasmática²⁰⁴. Las Rho también pueden asociarse a proteínas GDI, que inhiben su interacción con efectores y su actividad GTPasa intrínseca y las sequestran en el citosol¹⁴⁹. Tanto las proteínas GEF y GAP como los GDIs son a menudo específicos de cada isoforma, aunque

existe también cierta redundancia y solapamiento en la unión y acción de las proteínas reguladoras²⁰⁵⁻²⁰⁷.

Las proteínas Rho están involucradas en la regulación de diversas funciones celulares como la formación de adhesiones focales o fibras de estrés, la morfología celular, la adhesión celular o la citoquinesis¹⁵⁴. Estas funciones son llevadas a cabo mediante la activación de diversos efectores específicos, aunque algunos de ellos pueden ser activados también por otros miembros de la subfamilia de RhoGTPasas como Rac1 o Cdc42¹⁵⁴. Algunos de los efectores más importantes de las proteínas Rho son ROCK, mDia, PRK (también llamada PKN), rotekina o PKC ϵ ²⁰⁸.

2.3.1. Efectores de RhoA e implicación en procesos celulares

2.3.1.1. ROCK

ROCK (*Rho-associated serine/threonine kinase*) es el primer efector descubierto de Rho y desde entonces ha sido el más extensamente estudiado²⁰⁹. Existen dos isoformas de esta quinasa: ROCK1 (también llamada ROK β o p160ROCK) y ROCK2 (también conocida como ROK α). Ambas se unen a Rho unido a GTP^{210,211}. ROCK tiene un tamaño de 160 KDa y contiene un dominio quinasa en la parte N-terminal, una parte intermedia con una conformación en espiral enrollada (*coiled-coil region*) que incluye el dominio de unión a Rho (RBD) y un dominio PH en la parte C-terminal, que incluye también un dominio rico en cisteínas (CRD) (figura 16A). Los dominios en el extremo C-terminal pueden unirse al dominio quinasa y constituir una región autoinhibitoria, anulando la actividad quinasa de la proteína. Cuando Rho se une a ROCK, abre la proteína y la activa. Algunos lípidos como el ácido araquidónico pueden también activar ROCK independientemente de Rho²¹² (figura 16B). Asimismo, durante la apoptosis, la caspasa 3 puede cortar el extremo C-terminal de la isoforma ROCK1, impidiendo su autoinhibición²¹³.

Al igual que el efector de Rac1 PAK, ROCK puede fosforilar la LIMK, facilitando su acción sobre la cofilina. La LIMK fosforila la cofilina y la inhibe, impidiendo la despolimerización de la F-actina²¹⁴. Todo ello se traduce en un incremento en el número de filamentos de actina. Sin embargo, a diferencia de PAK, ROCK solo puede fosforilar a LIMK cuando la caspasa 3 ha cortado su extremo C-terminal, por

lo que es posible que la acción de ROCK sobre la cofilina sea importante solo durante la apoptosis ²¹⁵.

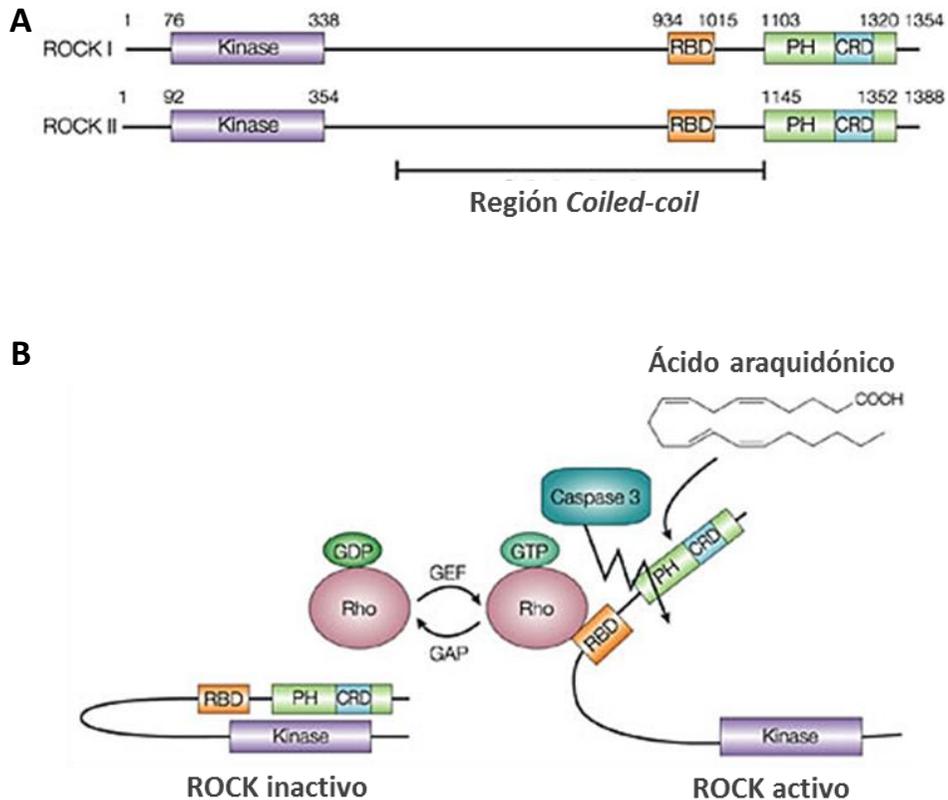


Figura 16. Estructura y activación de ROCK. (A) Estructura de ROCK1 y ROCK2. El dominio quinasa se encuentra en la parte N-terminal. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de unión a Rho, un dominio PH y una región rica en cisteínas. (B) Regulación de la función de ROCK. En su forma inactiva, la región N-terminal se pliega sobre el dominio quinasa, inhibiendo su actividad. La unión de Rho, la presencia de ácido araquidónico o la proteólisis por parte de la caspasa 3 durante la apoptosis puede activar la proteína. Adaptado de Riento y Ridley ²¹⁶.

ROCK también está involucrada en la regulación de la miosina. La asociación de la miosina con la actina (actomiosina) y su capacidad de contracción dependen en gran medida del estado de fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC, *myosin light chain*), el cual depende a su vez de dos principales enzimas, la MLCK (*myosin light chain kinase*) y la MLCP (*myosin light chain phosphatase*). La fosforilación de la MLC por parte de la MLCK aumenta la capacidad de la miosina para asociarse a la actina, mientras que su defosforilación por MLCP la reduce. La MLCP está compuesta por tres subunidades: PP1, que es la subunidad catalítica,

MYPT1, que se une a la MLC y una tercera subunidad de función desconocida²¹⁷. ROCK1 es capaz de fosforilar varios residuos de MYPT1^{218,219}, inhibiendo la capacidad de unión de la MLCP a la miosina, manteniendo así el nivel de fosforilación de la MLC necesario para la acción de la actomiosina, tanto en células musculares como no musculares²¹⁹⁻²²¹.

En las células no musculares, ROCK está implicado en el control de la dinámica del citoesqueleto de actina para formar fibras de estrés debido a que la miosina tiene una gran capacidad para entrecruzar las fibras de actina. También es importante en la regulación de la capacidad de contracción de la actomiosina. Todo ello tiene importancia en procesos como la adhesión celular, la migración, la mitosis o la apoptosis²²²⁻²²⁶. Además de LIMK y miosina, ROCK también regula directamente otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto, como la aducina, ERM (*ezrin-radixin-moesin*), NHE1 o la vimentina²²⁷⁻²³⁰.

2.3.1.2. Otros efectores de Rho

La PRK1 (también llamada PKN α) es una serina/treonina-quinasa que pertenece a la superfamilia de PKC, y fue uno de los primeros efectores de RhoA descubiertos²³¹. Es una proteína de unos 116 kDa con un dominio regulador en la mitad N-terminal y un dominio catalítico en la parte C-terminal de la proteína. La región catalítica posee un 50 % de homología con la región catalítica de la PKC, pero su región reguladora está menos conservada. Posee un dominio HR1 en el extremo N-terminal, a través del cual interacciona con Rho, aunque no es suficiente para su activación, ya que se requiere la región C-terminal para su activación por parte de RhoA^{232,233}. Se cree que la unión a la GTPasa anula un efecto autoinhibitorio similar al de ROCK²³⁴. De hecho, se observa también una activación proteolítica por medio de la caspasa 3^{235,236}. Sin embargo, a diferencia de ROCK y otras quinasas activadas por RhoGTPasas como PAK, PRK no parece sufrir dimerización o multimerización después de su unión con Rho²³⁷. Además de la activación, Rho puede también ser responsable de la localización de PRK²³⁸. Diversos estudios muestran que RhoB y Rac1 pueden también interactuar con el dominio HR1 de PRK^{237,239}, lo que indica que podría ser un efector compartido por las proteínas Rho y Rac²⁴⁰⁻²⁴². La diferente localización celular de Rac1 y RhoA permite que la quinasa sea activada en sitios y momentos distintos durante procesos celulares

como la migración. PRK fosforila varios elementos del citoesqueleto y está principalmente involucrado en el tráfico endosomal. En células de mamíferos, PRK actúa corriente debajo de Rho regulando varios procesos como el tráfico del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la expresión génica inducida por estrés o la formación de actina cortical²⁴³⁻²⁴⁵. La PRK1 interacciona con elementos relacionados con los filamentos intermedios y con la actina, como por ejemplo la vimentina, a la que posteriormente fosforila, o la α -actinina^{246,247}. También se ha relacionado a PRK1 con la enfermedad de Alzheimer, donde fosforila la proteína Tau, reduciendo su habilidad para unirse y ensamblar microtúbulos, y con algunos tipos de cáncer, como el de próstata o algunos cánceres inducidos por virus²⁴⁸⁻²⁵⁰.

Otro conocido efector de Rho es mDia, una proteína de unos 140 kDa que pertenece a la familia de las forminas, que poseen dominios FH (*Formin homology*), los cuales pueden interactuar con la profilina, una proteína que estimula la polimerización de actina. De hecho, se ha descrito que RhoA puede inducir la polimerización de actina facilitando la unión entre mDia y profilina^{251,252}. También es responsable de los efectos producidos por el estrés mecánico sobre la formación de adhesiones focales dependientes de actina²⁵³, y regula el alineamiento de las fibras de estrés y los microtúbulos direccionando estos últimos hacia las adhesiones focales^{224,225}. En contraste con ROCK, cuya principal función es estimular la contractilidad celular basada en la actomiosina, promoviendo la fosforilación de la MLC e incrementando la tensión del citoesqueleto, mDia promueve principalmente la polimerización de actina. Ambos efectores actúan conjuntamente controlando el reordenamiento del citoesqueleto para la estabilización de la morfología celular en reposo^{224,253}, aunque en ocasiones pueden también tener funciones antagónicas²⁵⁴. Existen evidencias de que mDia regula también el citoesqueleto de microtúbulos de manera dependiente de Rho, y que puede integrar el citoesqueleto de actina con el de microtúbulos^{84,255}. mDia induce la formación de microtúbulos estables promoviendo la formación de *caps* (capuchas o gorras) en el extremo mediante la unión directa a los microtúbulos²²⁵.

2.4. Balance entre Rac1 y RhoA

Como hemos visto, Rac1 estimula la polimerización de redes de actina en la periferia celular mediante la activación de PAK, cortactina, WAVE o Arp2/3, así como mediante la inhibición de la cofilina, para generar protrusiones y ondulaciones en la membrana plasmática. Por otro lado, RhoA induce la formación de fibras de estrés de actomiosina y otras estructuras contráctiles por medio de la activación de ROCK1 o mDia y su acción sobre la actina y la miosina. Muchos estudios describen una regulación recíproca entre las vías de Rac1 y RhoA durante diversos procesos celulares como la polarización, la adhesión o la migración celular, conduciendo en la mayoría de los casos a un antagonismo entre ambas GTPasas.

2.4.1. Inhibición recíproca entre Rac1 y RhoA

Numerosos estudios demuestran que Rac1 puede controlar directamente la actividad de RhoA (figura 16). Uno de ellos describe que Rac1 puede interactuar con p190RhoGAP, una proteína GAP de RhoA, y activarla, aumentando así la actividad GTPasa de RhoA y disminuyendo su actividad ²⁵⁶. Además de este mecanismo, Rac1 puede también aumentar la actividad de p190RhoGAP mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que inhiben fosfatasa específicas, manteniendo el nivel de fosforilación necesario para la acción de p190RhoGAP ²⁵⁷. Pero Rac1 también es capaz de inhibir RhoA mediante la activación de sus efectores. Por ejemplo, PAK regula negativamente la actividad de RhoA, fosforilando e inactivando p115RhoGEF, Net1 o PDZ-RhoGEF, tres GEFs específicas de RhoA ²⁵⁸⁻²⁶⁰. También se ha descrito que Rac1 es capaz de inhibir RhoA a través de la proteína p120, una catenina asociada a las cadherinas en las adhesiones célula-célula. Rac1 induce la translocación de la catenina p190 hacia las adhesiones, donde interactúa con p120 y provoca la inhibición local de RhoA ²⁶¹.

Por otro lado, Rac1 también puede ser inhibido por la acción de RhoA (figura 17). Se ha observado un incremento de la actividad de Rac1 después de inhibir ROCK1, que como hemos comentado, es el principal efector de RhoA, conduciendo a algunos fenotipos celulares característicos de la actividad de Rac1 ²⁶². De hecho, ROCK1 puede fosforilar FilGAP, un GAP específico de Rac1, activándolo ²⁶³.

ROCK1 también es capaz de activar indirectamente ArhGAP22, otra GAP de Rac1²⁶⁴. Se ha descrito que la acción contráctil de la actomiosina provocada por RhoA y ROCK1, induce la disociación de β -Pix, una GEF de Rac1, de las adhesiones focales e impide su unión a Rac1²⁶⁵. Esto demuestra la complejidad en la regulación recíproca entre Rac1 y RhoA.

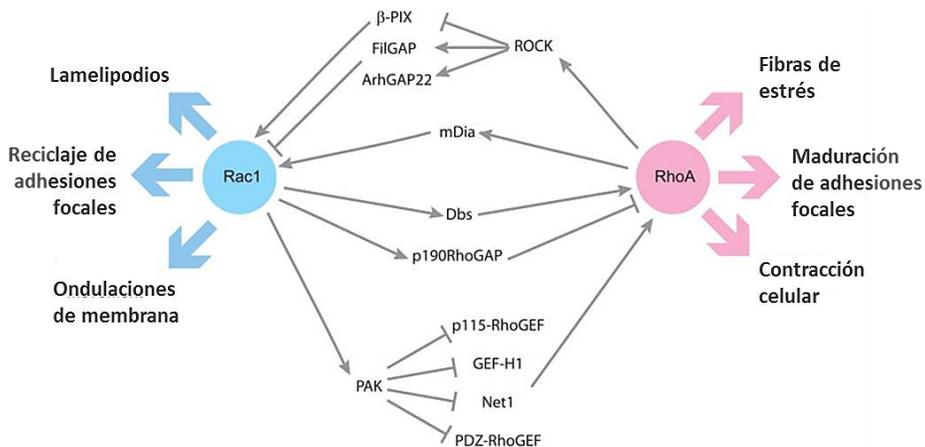


Figura 17. Antagonismo e inhibición recíproca entre Rac1 y RhoA. Mediante la activación o inhibición de proteínas GEF y GAP específicas, Rac1 y RhoA pueden inhibirse mutuamente en el espacio y en el tiempo para llevar a cabo procesos celulares en ocasiones antagónicas. Adaptado de Guilluy *et al*²⁶⁶.

Sin embargo, aunque existen numerosos estudios que confirman que Rac1 y RhoA tienen funciones opuestas, la regulación recíproca entre estas dos proteínas parece ser mucho más compleja, pudiéndose encontrar casos de regulación positiva o de efectores compartidos. Ambas proteínas pueden permanecer activas (o inactivas) en otros lugares diferentes de la célula durante la migración²⁶⁷. Así, por ejemplo, la activación de RhoA promueve tanto el desensamble de las adhesiones en el borde en retracción como la generación de la tensión necesaria a lo largo de la célula para restringir las protrusiones a la parte anterior y facilitar la acción de Rac1^{268,269}. Asimismo, se ha descrito que la inhibición de mDia, un conocido efector de RhoA, induce la inactivación de Rac1²⁵⁴ (figura 17). Rac1 y RhoA pueden compartir algunos efectores, aunque son regulados en diferentes momentos y localizaciones dentro de la célula. Por ejemplo, PRK2 puede interactuar y ser activada por ambas GTPasas²⁴⁰. Por su parte, la MLC, que como hemos visto es regulada positivamente por Rho, puede también ser regulada por Rac1, y esta regulación puede ser positiva o negativa según el tipo celular^{264,270,271}.

2.4.2. RhoGTPasas e integrinas

Son muchos los procesos celulares en los que se ha descrito un antagonismo entre Rac1 y RhoA. Durante la migración, la célula debe extenderse mediante protrusiones en el borde de avance, formando nuevas adhesiones y contrayendo el borde posterior. Todos estos cambios deben obedecer a una regulación espacio-temporal diferencial del citoesqueleto. Por ello, las RhoGTPasas juegan un papel clave en este proceso. En general se cree que Rac1 está más activo en el borde anterior²⁷², mientras que RhoA se activa preferentemente en el extremo posterior en retracción de las células en migración²⁷³. Esta compartimentalización de la regulación de las RhoGTPasas durante la migración es demostrada por el hecho de que, aunque es necesario que Rac1 esté activo en el borde de avance, una activación constitutiva de Rac1 a lo largo de la célula puede inhibir la migración^{274,275}.

2.4.2.1. Regulación recíproca

Las integrinas son heterodímeros que median la adhesión de la célula a proteínas de la MEC, como la fibronectina, la laminina o el colágeno. Se trata de combinaciones entre subunidades α y β que contienen un gran dominio extracelular de unión a ligandos, un dominio transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático que se une a proteínas de señalización o al citoesqueleto. Se han identificado 24 combinaciones heterodiméricas $\alpha\beta$ diferentes²⁷⁶. Las RhoGTPasas y las integrinas regulan frecuentemente los mismos procesos celulares. Además, las integrinas pueden regular directamente las RhoGTPasas y éstas, a su vez, regulan a las integrinas. De hecho, las diferencias en la actividad de Rho y Rac1 en células en suspensión son mucho menores, sugiriendo que su regulación diferencial es dependiente de la adhesión.

Algunos estudios demuestran que la actividad de Rac1 aumenta en respuesta a la adhesión mediada por integrinas¹⁵⁹, la cual incrementa el nivel de fosforilación de Vav1, una proteína GEF de Rac1, aumentando su actividad^{277,278}. Asimismo, la sobreexpresión de $\beta 1$ -integrina incrementa la actividad de Rac1 y la formación de lamelipodios²⁷⁹. Además, la adhesión mediada por integrinas puede regular la capacidad de Rac1 para unirse a sus efectores, pues la expresión del Rac1

constitutivamente activo es insuficiente para permitir la unión a PAK en células no adherentes ¹⁵⁹. Las integrinas pueden regular la actividad de Rac1 controlando la endocitosis y el reciclaje de las balsas lipídicas, inhibiendo su internalización y manteniendo el Rac1 activo en la membrana plasmática ¹⁵⁸. Contrariamente, durante las primeras fases de extensión de células sembradas sobre fibronectina, la actividad de RhoA se ve disminuida, para aumentar notablemente una vez la célula ha completado su extensión ²⁸⁰. Sin embargo, se ha descrito que la sobreexpresión de β 3-integrina aumenta la actividad de Rho y la formación de fibras de estrés ²⁷⁹, sugiriendo una regulación de RhoA más compleja, diferente según el tipo de integrina.

Algunos estudios describen como las RhoGTPasas pueden a su vez regular las adhesiones basadas en integrina. La inhibición de RhoA mediante la exozima C3 *botulinum* inhibe diversos procesos mediados por integrinas, como la agregación de plaquetas o linfocitos, así como la propia adhesión a fibronectina ²⁸¹⁻²⁸³. Las RhoGTPasas parecen no estar relacionadas con el control del estado de activación o la afinidad de las integrinas por sus ligandos, sino más bien por la modulación de su agrupamiento en *clusters*. De hecho, la *clusterización* de las integrinas en los contactos focales depende de la actividad de Rac1, mientras la *clusterización* en adhesiones focales maduras depende de RhoA ²⁸⁴. Debido a que las integrinas están vinculadas al citoesqueleto, las RhoGTPasas pueden regular su *clusterización* mediante efectores que controlan la polimerización de actina, la asociación de actina y miosina o las interacciones entre la actina y la membrana plasmática ^{285,286}. Rac1 promueve la formación de contactos y adhesiones incipientes y facilita la asociación de estas adhesiones a las protrusiones generadas por la polimerización de actina dependiente de Rac1. Por el contrario, RhoA induce la maduración de las adhesiones focales y su asociación con fibras de estrés ^{223,287}. Algunos estudios revelan que en ocasiones Rac1 puede impedir la activación de RhoA y la maduración de las adhesiones focales durante la extensión del borde de avance mediante la inhibición de p115RhoGEF ²⁵⁹.

Existen dos tipos de movimiento celular según la morfología que adopta la célula. El movimiento mesenquimal se caracteriza por una morfología de tipo fibroblasto, elongada, con una polaridad establecida, y que depende de la degradación de la matriz extracelular (MEC). Por su parte, el movimiento amebode es prácticamente

independiente de los contactos entre la célula y la MEC. En el caso del movimiento mesenquimal, la polarización de la célula se inicia con la activación de Rac1 para inducir la formación de lamelipodios en el borde de avance ²⁶⁹. Posteriormente se generan pequeñas adhesiones dependientes de integrina que permiten a la nueva protrusión anclarse al sustrato. El papel de RhoA en este tipo de movimiento es complejo, promoviendo principalmente la retracción de la cola posterior, aunque la inhibición de sus efectores a menudo no tiene efectos apreciables sobre esta clase de migración. Por el contrario, RhoA si es requerido durante el movimiento de tipo ameboide, siendo necesaria la contracción de la actina cortical dependiente de miosina, e inducida por ROCK, para promover la rápida remodelación del córtex celular característica de este tipo de movimiento. Por su parte, la polarización de la célula inducida por Rac1 y la degradación de la MEC no parecen necesarias para la migración de tipo ameboide.

2.4.2.2. Internalización y tráfico de integrinas

Las integrinas pueden ser internalizadas a través de vías dependientes e independientes de clatrina. Se sabe que un mismo tipo de heterodímero puede ser endocitado por más de una vía. Por ejemplo, algunos estudios describen la endocitosis de $\alpha 5\beta 1$ -integrina a través de la CDE y a través de la vía dependiente de caveolina ^{288,289}. Tras la endocitosis, las integrinas se dirigen hacia los EEs, donde se decide si serán dirigidas hacia los lisosomas para su degradación, o si, por el contrario, serán recicladas de vuelta a la membrana plasmática. Generalmente las integrinas no son degradadas, sino que son recicladas directamente o bien pasan por el compartimento de reciclaje perinuclear antes de volver a la membrana plasmática por la vía dependiente de RAB11 o de Arf6 ^{290,291}.

El reclutamiento de las integrinas hacia CCPs requiere por lo general la participación de proteínas adaptadoras. Éste es el caso de HAX1, una proteína involucrada en la CDE que se une directamente a la porción citoplasmática de la $\beta 6$ -integrina, y es necesaria para su internalización. Otros adaptadores de la vía de clatrina importantes para la internalización de algunas integrinas son las proteínas disabled (Dab) y Numb. Numb puede interactuar directamente con las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ y es necesario para su internalización clatrina-dependiente ²⁹². Dab, por su parte, está involucrado en la CDE de $\beta 1$ -integrina ²⁹³.

Como se ha comentado, las integrinas pueden también ser endocitadas por CIE. Se ha descrito por ejemplo que RAB21 puede activar la entrada de $\beta 1$ -integrina por vías alternativas ²⁸⁸. La vía dependiente de caveolina ha sido ampliamente relacionada con la internalización de integrinas ^{289,294}. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la CIE de integrina no se conocen bien en comparación con las vías de CDE.

Se ha descrito también un papel de la dinamina y los microtúbulos en el desensamble de las adhesiones focales y el tráfico de integrinas ²⁹⁵. Ezratty *et al* demuestran que los microtúbulos y la dinamina son requeridos para el desensamblaje de las adhesiones focales, en un proceso que se da en una situación de altos niveles de actividad de Rho. Además, muestran que la dinamina es necesaria para la migración direccionada de la célula, lo cual está en consonancia con el requerimiento de dinamina durante la desestructuración de las adhesiones focales y la internalización de las integrinas.

3. Calmodulina

La calmodulina (CaM) es el principal sensor de Ca^{2+} intracelular y está altamente conservado y ampliamente distribuido en todos los eucariotas. Se trata de una proteína de 148 aminoácidos y unos 17 kDa que modula numerosos procesos celulares mediante la interacción con proteínas de unión a CaM (CaMBP). Debido a la versatilidad del Ca^{2+} como segundo mensajero, no es de extrañar la gran cantidad de proteínas con la que la CaM es capaz de interaccionar, regulando muchos procesos celulares como la inflamación, el metabolismo, la apoptosis, la contracción muscular, la endocitosis o la respuesta inmune. La importancia de la CaM se pone de manifiesto con la existencia de tres genes independientes (*CALM* 1-3) dentro del genoma que codifican proteínas totalmente idénticas, además de la ausencia de cambios en su secuencia de aminoácidos desde la aparición de los vertebrados²⁹⁶.

Con los niveles de Ca^{2+} de una célula en reposo, la CaM se encuentra en su estado libre de Ca^{2+} , denominada apo-CaM. Cuando el Ca^{2+} incrementa en respuesta a una señal, la CaM se une a él y sufre un cambio conformacional (holo-CaM) que le permite unir y activar las CaMBPs (figura 18A). La CaM contiene dos dominios globulares de unión a Ca^{2+} , conectados por una secuencia intermedia que es una α -hélice de 28 aminoácidos. Cada dominio globular contiene 2 motivos *EF-hand*

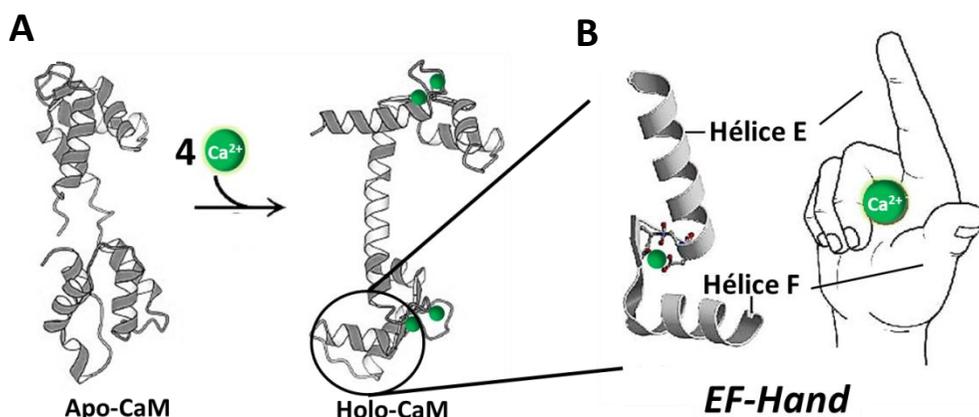


Figura 18. Estructura de la CaM y su dominio *EF-Hand*. (A) Representación del cambio conformacional de la CaM tras la unión de cuatro iones de Ca^{2+} . (B) Estructura 3D del dominio *EF-Hand*. Se muestra la analogía estructural con los dedos de una mano.

(figura 18B), cada uno de los cuales alberga un ambiente electronegativo idóneo para la unión de un ion de Ca^{2+} , lo que se traduce en la unión de 4 iones de Ca^{2+} en una molécula de CaM. El dominio *EF-hand* consta de 30 aminoácidos y consiste en una α -hélice en el extremo N-terminal (hélice E) y una α -hélice en el extremo C-terminal (hélice F), unidos por un dominio de unión a Ca^{2+} .

La concentración y localización subcelular de la CaM juega un papel importante en la regulación de su actividad. La CaM constituye alrededor de un 0.1% del total de proteína en la célula, y se expresa en mayor cantidad en células en división. La CaM se encuentra en el citosol y el núcleo. En respuesta a un aumento de Ca^{2+} la CaM sufre una redistribución desde el citosol hacia el núcleo²⁹⁷⁻²⁹⁹.

Para la inhibición de la CaM en la realización de experimentos se utilizan habitualmente las sulfonamidas de naftaleno. La N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftaleno-sulfonamida (W7) y sus derivados, entre los que se encuentra W13, se unen a CaM de manera dependiente de Ca^{2+} . La afinidad de esta interacción es elevada. Estos compuestos penetran a través de la membrana plasmática y tienen una localización subcelular similar a la de CaM, facilitando su acción específica *in vivo*³⁰⁰. Estos antagonistas de CaM se unen al complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ a través de interacciones hidrofóbicas, por lo que los derivados menos hidrofóbicos, como el W5 o el W12, son mucho menos eficientes en la inhibición de CaM utilizándose a menudo como controles del W7 y el W13, respectivamente.

3.1. Proteínas de unión a CaM (CaMBPs)

Las CaMBPs se pueden clasificar en varios grupos basándose en su modo de regulación en presencia o ausencia de Ca^{2+} . Las CaMBPs de clase A se unen irreversiblemente a CaM de una manera independiente de Ca^{2+} . Un ejemplo de este tipo es la fosforilasa quinasa. Las CaMBP de clase B unen CaM en ausencia de Ca^{2+} (Apo-CaM) y se disocian en presencia de Ca^{2+} . En este grupo se encuentran proteínas como la neuromodulina o la neurogranina. Las proteínas de este grupo pueden servir como reservorios de CaM a niveles de Ca^{2+} en reposo³⁰¹. En un tercer grupo (clase C) se incluyen la MLCK y la calcineurina. Éstas forman complejos de baja afinidad con la CaM a bajas concentraciones de Ca^{2+} . Cuando los niveles de Ca^{2+} aumentan, la afinidad por la CaM también lo hace y pueden

entonces ser activadas ^{302,303}. Las CaMBP de clase D solo se unen a la CaM en presencia de Ca^{2+} , pero en este caso la unión es inhibitoria. El grupo más convencional es la clase E. Las proteínas de este grupo son activadas por la CaM, y solo se unen a ella en presencia de Ca^{2+} . Estas proteínas son a menudo reguladas por algunas CaM-quinasas (CaMKs), que son las que forman el sexto y último grupo de CaMBP, la clase F ³⁰⁴.

Estudios estructurales de los complejos formados por CaM y alguna de las CaMBPs sugieren una gran diversidad en las interacciones de la CaM con sus proteínas efectoras ³⁰⁵. En el caso de la activación de las CaMKs I, II y IV, la CaMKK, la MLCK o la calcineurina, la interacción con CaM induce el desplazamiento de un dominio autoinhibitorio. En otro tipo de mecanismo de activación, la adenilato ciclasa, sufre un cambio conformacional tras la unión a CaM, y esto crea el centro activo del enzima ³⁰⁶. Por último, la interacción con CaM también puede promover la dimerización de algunas CaMBPs induciendo su activación. Este es el caso del canal iónico de potasio de baja conductancia, cuya dimerización inducida por CaM es dependiente de Ca^{2+} , y es necesaria para la abertura del canal ³⁰⁷.

3.1.1. Las GTPasas como CaMBPs

Se conoce un gran número de GTPasas que interactúan y pueden ser reguladas por CaM. Algunos ejemplos son el KRas4B, RalA, RalB, Rin, Rab3, Cdc42 o Rac1. Todas ellas unen CaM de manera dependiente de Ca^{2+} y la mayoría de ellas interactúan con CaM mediante regiones polibásicas que presentan en su extremo C-terminal. Rab3, Rac1 y Cdc42 poseen además dominios de unión específicos que no se encuentran en su extremo C-terminal.

La interacción de KRas4B con CaM requiere de la región *switch* II, la hélice $\alpha 5$ y la región hipervariable (que incluye la región polibásica y un grupo farnesil). Esta interacción se da en la membrana plasmática y evita la fosforilación de KRas4B en la Ser181 por parte de PKC lo que permite modular la actividad de KRas4B ³⁰⁸. En el caso de RalA y RalB, existe un segundo lugar de unión a CaM en su extremo N-terminal y han de estar preniladas para que se pueda dar la interacción, a parte de la secuencia de unos 18 aminoácidos en su extremo C-terminal. Aunque no se conocen muy bien las funciones de esta GTPasa, la interacción con CaM aumenta

la unión a GTP y bloquea la fosforilación de RalA por parte de PKA, PKG y PKC ³⁰⁹. La unión de la GTPasa Rab3 a CaM inhibe la exocitosis de vesículas secretoras en células neuronales y endocrinas, regulando la liberación de neurotransmisores y hormonas. Esta inhibición se debe a la separación de Rab3 de las membranas de las vesículas por parte de CaM ³¹⁰. También se ha descrito la interacción con CaM de las RhoGTPasas Rac1 y Cdc42. Ambas contienen una región entre los aminoácidos 151 y 164 esencial para la interacción con CaM, pero su unión tiene efectos opuestos en las dos GTPasas, activando a Rac1 y disminuyendo la actividad de Cdc42 ³¹¹. En nuestro laboratorio se ha descrito sin embargo, que la CaM puede interferir en la unión y activación de efectores de Rac1, como es el caso de la PIP5K ¹³⁵.

3.2. CaM en el tráfico de membranas

Muchos procesos relacionados con el transporte intracelular requieren Ca^{2+} , y algunos de ellos requieren tanto de Ca^{2+} como de CaM. Por ejemplo, la liberación de neurotransmisores y hormonas requiere de un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico ³¹². Se ha sugerido que la CaM puede ser un sensor importante durante la exocitosis. Aunque se sabe que la CaM no es esencial para la fusión de membranas en la exocitosis regulada en la mayoría de las células, si es requerida en algunos tipos celulares especializados, y podría tener también un papel regulador más general durante la exocitosis ³¹³. Se conoce bien el papel de la CaM en la exocitosis sináptica, durante la cual el Ca^{2+} aumenta y conduce a la activación, por parte de la CaM, de la CaMK II, que fosforila a las sinapsinas, lo que desencadena la liberación de las vesículas sinápticas inmovilizadas por el citoesqueleto ³¹⁴.

Diversos estudios han mostrado que la CaM es importante durante la endocitosis. Se ha descrito que la CaM tiene un papel en la regulación de la fusión de los EEs, que es inhibida por el tratamiento con W7 o W13, ambos antagonistas de CaM ^{315,316}. En células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), el W13 inhibe la transcitosis de la IgA y el reciclaje de transferrina, mientras que su internalización no está afectada. Todo el material endocitado desde la superficie celular se acumula en estructuras endocíticas excepcionalmente grandes, posiblemente derivadas de los EEs. Esto también ocurre con otros inhibidores de CaM, sugiriendo que ésta podría

regular el tráfico en el compartimento endocítico en células epiteliales polarizadas^{317,318}.

Nuestro grupo ha estudiado el papel que ejerce la CaM en el tráfico del EGFR. De manera similar a la IgA, W13 no afecta a la internalización del EGFR pero sí inhibe su degradación y reciclaje dando lugar a una acumulación en EEs de gran tamaño³¹⁹. Este efecto es debido a la acción de la PKC δ , que parece promover, cuando la CaM se inhibe con W13, la formación de una cubierta de F-actina sobre los EEs a través de la acción de la cortactina y Arp2/3, que impediría la salida de material^{320,321}.

3.3. CaM y PKC

Las isoformas de la PKC forman parte de una familia de serina/treonina quinasas activadas por lípidos e implicadas en numerosos procesos celulares. En humanos se conocen 10 isoformas diferentes. Las isoformas de PKC pertenecen a la familia de proteínas quinasas AGC (PKA, PKG, PKC). Los miembros de la familia de PKC se han clasificado en tres grupos según su homología y su capacidad para unir co-factores. El primero de ellos es la subfamilia de las PKCs clásicas (cPKC), a la que pertenecen la PKC α , β I, β II y γ , que son moduladas por Ca²⁺, DAG y fosfatidilserina (PS). El segundo grupo son las nuevas PKC (nPKC), donde se incluyen las isoformas δ , ϵ , η y θ , que son sensibles a DAG y PS pero no a Ca²⁺. Por último encontramos las PKC atípicas (aPKC), que son las PKC ζ y λ , que solo son reguladas por PS³²²⁻³²⁴. Estas isoformas son co-expresadas en muchos tipos celulares y responden de manera similar a diversos estímulos, por lo que es posible que exista cierta redundancia en sus funciones. Sin embargo, la localización subcelular específica de cada isoforma, las interacciones con otras proteínas o las modificaciones post-traduccionales pueden conferir a cada isoforma funciones únicas o incluso opuestas. La translocación de las cPKCs a la membrana plasmática suele estar ligada a su activación, y pueden ser translocadas específicamente a las balsas lipídicas³²⁵. La activación de las cPKCs está relacionada además con la producción de DAG. Sin embargo, la unión a este lípido no puede darse sin la unión previa a Ca²⁺³²³.

Existe numerosas proteínas de unión a PKC (C-KIPs, *PKC-interacting proteins*), que se dividen en cuatro grupos³²². El primero de ellos lo forman las proteínas que

direccionan las PKCs hacia sus activadores, como el sindecano 4, que aumenta la activación de PKC. El segundo grupo lo forman las proteínas que dirigen las PKCs hacia los diferentes compartimentos celulares. Los sustratos de PKC (STICKs, *substrates that interact with C-kinases*), junto a los RACKs (*receptors for activated C-kinases*), que confieren especificidad a las uniones de PKC con sus sustratos, y los RICKs (*receptors for inactive C-kinases*), que se unen a las PKCs inactivas, forman el tercer grupo. Algunos ejemplos de STICKs son MARCKS, vinculina o GAP43. El último grupo lo componen todas las proteínas que interactúan con PKC y que no pertenecen a ninguno de los tres grupos anteriores, como la PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*), que fosforila a PKC.

PKC y CaM comparten muchas proteínas de unión, y se unen por lo general al mismo sitio de unión de estas proteínas. Por ello, la interacción de la CaM con una C-KIP, impide la fosforilación por PKC. De igual manera, si PKC fosforila un sustrato, a menudo se inhibe la unión a CaM. Todo ello permite la regulación cruzada de las vías de señalización de CaM y PKC ³²². El ejemplo mejor estudiado de esta regulación cruzada es MARCKS, una abundante proteína capaz de unirse a actina, CaM o a la membrana plasmática, y que es el principal sustrato de PKC en muchos tipos celulares ³²⁶. Se ha descrito un papel de MARCKS en diversos procesos celulares como la migración, la adhesión o la reorganización del citoesqueleto de actina ³²⁷. En una célula en reposo, MARCKS se encuentra insertado en la membrana plasmática por medio de un grupo miristoil e interactúa electrostáticamente con lípidos de la membrana cargados negativamente, como el PI(4,5)P₂. Esta interacción se produce a través de su dominio efector que cuando es fosforilado por PKC disminuye su carga neta positiva, impidiendo la interacción electrostática y facilitando su translocación al citosol ^{118,328}. La fosforilación de MARCKS por PKC disminuye su afinidad por CaM, y la unión de Ca²⁺-CaM al dominio efector de MARCKS impide asimismo la fosforilación por PKC. Una bajada del Ca²⁺ intracelular o la inhibición de la CaM conllevarían por tanto un aumento en la fosforilación de MARCKS y una disminución de su asociación con la membrana plasmática ³²¹. Debido a su abundancia, se ha sugerido que MARCKS podría servir como reservorio para la CaM, liberándola tras un aumento de la actividad de PKC ³²⁹. Del mismo modo, MARCKS puede secuestrar el PI(4,5)P₂ presente en la membrana plasmática, y la activación de PKC, así como la inhibición de CaM y el

consecuente aumento de la fosforilación de MARCKS por PKC, pueden liberar PI(4,5)P₂, permitiendo su interacción con otras proteínas^{330,331}.



MATERIALES Y MÉTODOS



1. Materiales

1.1. Reactivos

En la tabla 1 se muestran los reactivos utilizados durante esta tesis, así como la concentración de trabajo, su función y la casa comercial.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	FUNCIÓN	CASA COMERCIAL
W13	5 µg/ml	Inhibidor de CaM	Calbiochem. 681636
W12	10 µg/ml	Análogo de W13	Calbiochem.
BAPTA	50 µM	Quelante de Ca ²⁺	Calbiochem. 196419
Calmidazolium	7.5 µg/ml	Inhibidor de CaM	Calbiochem. 208665
Esfingosina	0.5-10 µM	Mimético de esfingosina endógena	Sigma. S7049
PI(4,5)P₂ diC8	50 µM	Mimético de PI(4,5)P ₂ endógeno	Echelon Biosciences. P-4508
BIM	5 µM	Inhibidor de PKC	Calbiochem. 203290
TPA	100 nM	Activador de PKC	Sigma. P8139
Wortmanina	1 µM	Inhibidor de PI3K	Calbiochem. 681675
U73122	5 µM	Inhibidor de PLC	Calbiochem. 662035
Y27632	25 µM	Inhibidor de ROCK1	Sigma. Y0503
Blebistatina	50 µM	Inhibidor de miosina	Sigma. B0560
Dynasore	150 µM	Inhibidor de dinamina	Sigma. D7693
Latrunculina A	100 nM	Inhibidor de F-actina	Calbiochem. 428021
Faloidina-TRITC	0.04 U/ml	Detección de F-actina	Molecular Probes. R-415

Tabla 1. Productos utilizados en los tratamientos celulares.

1.2. Anticuerpos

A continuación se detallan los anticuerpos primarios y secundarios utilizados durante los experimentos de inmunocitofluorescencia y *western blot* (tablas 2 y 3).

Anticuerpo 1 ^{ario}	Especie	Dilución ICF	Dilución WB	Casa comercial
PI(4,5)P₂	Mo	1/500	-	Echelon. Z-A045
Cortactina	Mo	1/200	1/1000	Upstate. 05-180
β1-integrina	Ra	1/6	-	University of California SF. AIB2
EEA1	Mo	1/75	-	BD biosciences. 610457
GFP	Rb	-	1/500	Abcam. Ab290
RFP	Rb	-	1/1000	Genscript. A00682
ROCK1	Rb	-	1/2000	SIGMA. R6028
PACIN2	Rb	1/75	-	Abgent. AP8088b
p-MYPT1 (Thr696)	Go	-	1/100	Santa Cruz. sc-17556
Actina	Mo	-	1/5000	Abcam. Ab3280
Dinamina 2	Rb	-	1/1000	Abcam. Ab3457

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados. (ICF, inmunocitofluorescencia; WB, western blot; IP, inmunoprecipitación; mo, ratón; ra, rata; rb, conejo; go, goat)

Anticuerpo 2 ^{ario} ICF	fluoróforo	Dilución	Casa comercial
anti-mo-IgG	Alexa-fluor 488		Invitrogen. A21202
	Alexa-fluor 555	1/300	Invitrogen. A31570
	Alexa-fluor 647		Invitrogen. A21236
Anti-mo-IgM	Alexa-fluor488	1/300	Invitrogen. A21042
anti-Rb	Alexa-fluor 488		Invitrogen. A11034
	Alexa-fluor 555	1/300	Invitrogen. A31572
	Alexa-fluor 647		Invitrogen. A21245

Anticuerpo 2^{ario} WB

Anti-mo-HRP	1/3000	BioRad. 170-6516
Proteína-A-HRP	1/10000	Zymed. 10-1023
Anti-go-HRP	1/5000	Sigma. A5420

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados. (ICF, inmunocitofluorescencia; WB, western blot; mo, ratón; rb, conejo; go, cabra)

2. Métodos

2.1. Cultivos celulares

En la realización de los experimentos se han utilizado células COS1 y células Vero, provenientes de riñón de mono verde y de fibroblastos de riñón de mono respectivamente. Todas las células utilizadas han sido cultivadas a 37°C a una presión parcial de CO₂ del 5% en un ambiente estéril. El medio de cultivo DMEM (*High Glucose 4.5 g/l, Biological industries*) fue suplementado con aminoácidos no esenciales (*Mem-Eagle No essential amino acids solution 100x, Biological Industries, 1:100*), L-glutamina (4 mM), piruvato (*Sigma, 1 mM*), antibióticos (penicilina, 50 U/ml; Estreptomina 50 µg/ml) y suero fetal bovino (FBS, *Foetal Bovine Serum*) al 5% en el caso de las células COS1 y al 10% para las células Vero. Para ayunar las células, se incubaron en DMEM 0% FBS con el resto de suplementos durante 1 hora.

2.2. DNA

2.2.1. Plásmidos

Los diversos DNAs utilizados se resumen en la tabla 4. A continuación se detalla el diseño y clonaje de aquellos plásmidos realizados durante esta tesis:

- **GFP-Rac1G12V-A37 y Cherry-Rac1G12V-A37:** La mutación puntual F37A fue introducida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores 5'-CAG ATT CAC CGG TTT TCC ATC TAC CAT AAC ATT GGC AGA ATA ATT GTC AGC GAC AGT AGG G-3', con una sustitución de la fenilalanina 37 (TTT) por una alanina (GCT), y 5'- GGA CGA GCT GTA CAA GTC CCT CAT GCA GGC CAT CAA GTG-3', usando como molde el plásmido GFP-Rac1G12V. El producto de PCR fue digerido con *BsrGI* (sitio de restricción perteneciente al vector de expresión) y *BstXI* (sitio único de restricción interno en la secuencia de Rac1) e introducido en el vector GFP-Rac1. Posteriormente, el mutante fue subclonado en el vector Cherry-C1 mediante los enzimas de restricción *BsrGI* y *EcoRI*.
- **GFP-Rac1G12V-A56 y Cherry-Rac1G12V-A56:** La mutación puntual W56A fue introducida por PCR con los cebadores 5'- C AAT TAT TCT GCC AAT GTT

ATG GTA GAT GGA AAG CCA GTG AAT CTG GGC TTA GCG GAT ACA GCT GG-3', con una sustitución del triptófano 56 (TGG) por una alanina (GCG), y 5'-CAG TCA CGA TGA ATT CTT ACA ACA GCA GGC-3', usando como molde el GFP-Rac1. El producto de PCR fue digerido con *BstXI* y *EcoRI* e insertado en el vector GFP-Rac1G12V.

- **L10-GFP-Inp54pWT y L10-GFP-Inp54pD281A:** Estos constructos fueron clonados a partir de los plásmidos cedidos por el doctor Tobias Meyer³³² a través de *Addgene* (# 20155 y # 20156 respectivamente). En primer lugar se diseñó un plásmido que codificaba los diez primeros aminoácidos de la proteína Lck seguidos de la proteína GFP mediante PCR con los cebadores 5'-CGA ACA CCG GTC GCC ACC ATG GGC TGT GTC TGC AGC TCA AAC CCT GAA CAG CTA GCT GCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG-3' y 5'-TTT AAA GCA AGT AAA ACC TC-3', usando el vector EGFP-C1 como molde. El producto de la PCR fue insertado en el vector EGFP-C1 mediante la digestión con los enzimas *AgeI* y *EcoRI*. Posteriormente, los vectores CFP-FKBP-Inp54p y CFP-FKBP-Inp54p(D281A) procedentes de *Addgene* fueron digeridos con *EcoRI* y *BamHI* y el producto de la digestión fue insertado en el vector L10-EGFP-C1.
- **GST-ROCK1 725-1024:** Debido al gran tamaño de la proteína ROCK1 (160 kDa), que dificulta su clonaje y expresión, se diseñó una proteína que incluía desde el aminoácido 725 al 1024 de ROCK1, en el que se encuentra el dominio de unión a RhoA (RBD), excluyendo parte del dominio quinasa (aminoácidos 76-338) y el extremo C-terminal, que incluye un dominio *Pleckstrin Homology* (PH) y un dominio rico en cisteínas (CRD) (aminoácidos 1103-1320) (figura 16, Introducción). Para ello se realizó una PCR con los cebadores 5'-GAC CGG TGG ATC CCG GGC TGT ATT AGC TTT CTT TCT ATC-3' y 5'-CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC GTG-3', usando como molde el CFP-ROCK1-WT, amablemente cedido por el doctor Gareth Jones³³³. El producto de PCR resultante fue digerido con *XhoI* y *XmaI* e insertado en el vector CFP-N1. Posteriormente el plásmido fue digerido con *BglII* y *XmaI* y el inserto fue introducido en el plásmido pGEX-4T-2 digerido con *BamHI* y *XmaI*, para su expresión en bacterias.

- **GFP-POR1-WT y GFP-POR1-ΔC-terminal:** Se diseñó el cDNA de POR1 flanqueado por los sitios de restricción *BglII* y *EcoRI* para su síntesis a través de *Genscript Gene Synthesis* (New Jersey, USA) en el vector pUC59. Tras la digestión con *BglII* y *EcoRI*, el inserto fue introducido en el vector EGFP-C1, para producir el GFP-POR1-WT. Para la obtención de GFP-POR1-ΔC-terminal, el extremo C-terminal (aa_s 217 al 303) fue extraído mediante la digestión de GFP-POR1-WT con *Sall* y su posterior religación.

CONSTRUCTO	VECTOR	PROCEDENCIA
GFP-Membrane	pEGFPC1	Ref. ¹³⁵
Cherry-Membrane	mCherryC1	Ref. ¹³⁵
GFP-Rac1WT	pEGFPC1	Ref. ¹³⁵
GFP-Rac1G12V	pEGFPC1	Ref. ¹³⁵
Cherry-Rac1G12V	mCherryC1	Ref. ¹³⁵
GFP-Rac1G12V-A37	pEGFPC1	‡
Cherry-Rac1G12V-A37	mCherryC1	‡
GFP-Rac1G12V-A56	pEGFPC1	‡
Cherry-Rac1G12V-A56	mCherryC1	‡
GFP-PIP5K	pEGFPC1	Ref. ¹³⁵
Cherry-PIP5K	mCherryC1	Ref. ¹³⁵
L10-GFP-Inp54pWT	pEGFPC1	‡
L10-GFP-Inp54pD281A	pEGFPC1	‡
GST-ROCK1 725-1024	pGEX-4T-2	‡
GFP-POR1-WT	pEGFPC1	‡
GFP-POR1-ΔC-terminal	pEGFPC1	‡
Cortactina-WT	prcCMV	Ref. ³³⁴
Cortactina-ΔHPSH3	prcCMV	Ref. ³³⁴
HA-dinamina-K44A	pcDNA3.1	ATCC (MBA-93) ³³⁵

Tabla 4. Plásmidos utilizados para las transfecciones celulares. ‡ Plásmidos realizados durante esta tesis. Ver sección 2.2.1. de Materiales y Métodos.

2.2.2. Transfección

Para la expresión ectópica de proteínas en las células se utilizaron plásmidos purificados mediante un kit de purificación de DNA plasmídico (*Macherey-Nagel*, ref.740615.50). Los plásmidos purificados fueron transfectados mediante el kit de transfección *Effectene* (*Qiagen*, ref. 301427), en el caso de experimentos de microscopía, o el kit de transfección *Lipofectamine LTX* (*Invitrogen*, ref. 15338-100) para experimentos destinados al análisis bioquímico, siguiendo en ambos casos las especificaciones del fabricante. Los experimentos se realizaron 24 horas después de la transfección.

2.3. RNA

Para el silenciamiento de la expresión de genes endógenos se adquirieron RNAs pequeños de interferencia (siRNA), específicos para cada gen. Los siRNAs de ROCK1 y dinamina fueron adquiridos de *Ambion* (ref. 4390824 – s12097) y de *Santa Cruz BioTechnologies* (ref. sc-43736), respectivamente. La transfección se realizó mediante el kit RNAiMAX (*Invitrogen*, ref. 13778-075), y los experimentos se realizaron 48 horas después de la transfección.

Para la co-transfección de siRNA y DNA se llevó a cabo el protocolo de transfección inversa en células en suspensión del kit RNAiMAX, según recomienda el fabricante. El procedimiento se detalla a continuación:

- Sembrar células COS1 en una placa de 6 pocillos para una confluencia del 80% al día siguiente.
- En un tubo eppendorf mezclar 500 µl de Opti-MEM (*Gibco*) con el siRNA para una concentración de 25 nM. Añadir 0.8 µg de DNA.
- Añadir al tubo 5 µl de *Lipofectamine RNAiMAX reagent*. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Añadir la mezcla a las células recién sembradas.
- 24 horas después de la transfección, dividir las células para una confluencia del 80% al día siguiente.
- Realizar el experimento 48 horas después de la transfección.

2.4. Técnicas bioquímicas

2.4.1. Análisis de proteínas

2.4.1.1. Cuantificación proteica

La cuantificación de la concentración proteica de la muestra se realizó mediante la técnica de Bradford ³³⁶, utilizando el reactivo *BioRad Protein Assay* (BioRad). Esta técnica permite cuantificar pequeñas cantidades de proteína midiendo la absorbancia de la muestra de las longitudes de onda de 595 y 450 nm. Se extrapola la ratio de absorbancia de la muestra con la curva obtenida a través de soluciones de sero-albúmina bovina (BSA) de concentraciones conocidas.

2.4.1.2. Electroforesis

Tras la cuantificación proteica, las proteínas de la muestra se separan por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS. Esta técnica permite la separación de las proteínas según su peso molecular. Los geles de acrilamida constan de dos fases de diferente concentración:

- *Fase empaquetadora/concentradora*: tiene como objetivo la concentración de todas las proteínas en un mismo punto antes de que se alcance la fase resolutive. Se compone de un porcentaje de acrilamida del 5%.
- *Fase resolutive*: su función es separar las proteínas de la muestra según su peso molecular debido a un tamaño restrictivo de los poros del gel. El porcentaje de acrilamida puede ser variable en función del rango de resolución que se requiera, oscilando entre un 6 y un 15 %.

Antes de la carga de las muestras en el gel, éstas deben mezclarse con un tampón de muestra (TM-4X; 10% SDS, 40% glicerol, 4 mM DTT y 0.4 mg/ml de azul de bromofenol), en proporción 1:3 (tampón:muestra), lo que permite la desnaturalización de las proteínas y les confiere la misma carga negativa específica. Las muestras son entonces incubadas a 100°C durante 5 minutos, y posteriormente cargadas en el gel, y sometidas a 35 mA de intensidad eléctrica durante aproximadamente 1.5 horas.

2.4.1.3. **Western Blot**

Tras la separación, las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa (*BioRad*, poro 0.45 μm), donde pueden ser detectadas mediante anticuerpos específicos. La transferencia se realiza mediante la aplicación de una corriente eléctrica de 60 V durante 2 horas a 4°C. La membrana se somete entonces al protocolo de *western blot*:

- Se realiza un lavado de 5 minutos con TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.005 % Tween-20)
- Bloqueo de la membrana con TBS-T con 5% de leche en polvo desnatada durante 50 minutos
- Un lavado de 5 minutos con TBS-T
- Incubación del anticuerpo primario en TBS-T durante 2 horas (en el caso del anti-p-MYPT1, el anticuerpo primario fue incubado en solución de bloqueo).
- Tres lavados de 5 minutos con TBS-T
- Incubación del anticuerpo secundario conjugado con HRP (*Horseradish Peroxidase*) en TBS-T durante 0.5-1 hora, según el anticuerpo (en el caso del anti-p-MYPT1, el anticuerpo secundario fue incubado en solución de bloqueo)
- Tres lavados de 5 minutos con TBS-T.
- Un lavado de 5 minutos con TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl).
- Incubación con ECL (*Enhanced ChemiLuminiscence, Biological Industries*) durante 1 minuto
- Detección de la luz generada por la reacción del HRP del anticuerpo secundario y el ECL, mediante la exposición de un film fotográfico (*Super RX, Fujifilm*)

2.4.2. **Inmunoprecipitación**

La técnica de la inmunoprecipitación nos permite aislar una proteína de un lisado celular y analizar su abundancia o su interacción con otras proteínas, mediante el uso de anticuerpos específicos para dicha proteína. En esta tesis se utilizaron siempre anticuerpos procedentes de conejo en la realización de las

inmunoprecipitaciones. Los complejos antígeno-anticuerpo son precipitados por la unión del anticuerpo a la proteína A unida covalentemente a esferas magnéticas (*Dynabeads®Life Technologies*, ref. 10001D), que pueden ser entonces aisladas mediante el uso de un imán. Los lisados se obtuvieron con el tampón TGH (1 % Tritón X-100, 10 % glicerol, 50 mM Hepes pH 7.3, 50 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptina, 10 mg/ml aprotinina, 1 mM Na₃VO₄). El protocolo de la inmunoprecipitación se detalla a continuación:

- Las células son sembradas en placas de 100 mm de diámetro y tras las transfecciones y tratamientos correspondientes, las placas se colocan a 4°C y se lavan dos veces con PBS.
- Se añaden 700 µl de tampón TGH a cada placa y las células son recogidas mediante raspado, y colocadas en tubos eppendorf.
- Los extractos celulares se incuban en el tampón durante 15 minutos a 4°C en un rotor.
- Se centrifugan los tubos a 16000xg durante 15 minutos a 4°C. El pellet es descartado.
- Se añaden 1.5 µg de anticuerpo (anti-GFP, conejo. *Abcam*; anti-RFP, conejo. *Genscript*) a cada lisado y se incuba a 4°C durante 2 horas en un rotor.
- Se añaden 30 µl de la solución de esferas magnéticas conjugadas con proteína A y se incuba a 4°C durante 1 hora.
- Mediante el uso de un imán se aíslan las esferas del resto de la muestra. El sobrenadante, que será la fracción no unida, se recoge para un posterior análisis.
- Se lavan las esferas tres veces con tampón TGH con una concentración de NaCl de 150 mM, para eliminar el mayor número de interacciones inespecíficas.
- Se realiza un último lavado no astringente con TGH sin NaCl.
- Se añaden 40 µl de tampón de muestra TM 1X a las esferas y se incuban a 100°C durante 5 minutos, con el fin de inducir la separación de las proteínas de interés de las esferas, y desnaturalizarlas.
- Las muestras se cargan en un gel de poliacrilamida para su posterior análisis por *western blot*.

Durante el *western blot* podemos analizar tanto las proteínas inmunoprecipitadas mediante el anticuerpo utilizado, como las proteínas que interactúan con la proteína de interés, y que han sido co-inmunoprecipitadas. El análisis de la co-inmunoprecipitación nos permite estudiar las interacciones entre proteínas dentro de la célula, y como éstas varían después de tratamientos determinados.

2.4.3. Ensayo de *pull-down*

2.4.3.1. Transformación en *E. coli*, expresión y purificación de la proteína GST-ROCK1-725-1024

Bacterias BL21pLys, especializadas en la producción de proteína, fueron transformadas con el constructo GST-ROCK1-725-1024 clonado en pGEX-4T-2. Las bacterias fueron cultivadas en 200 mL de medio LB con ampicilina/cloranfenicol a 37°C. Cuando la densidad óptica del cultivo alcanzó niveles de entre 0.5 y 0.7 (OD, 595 nm), la expresión proteica fue inducida mediante la incubación con IPTG a 37°C (300 µM, 3 h). El cultivo fue centrifugado a 4°C (10 min, 5000 rpm) y el *pellet* obtenido fue almacenado a - 80°C, y posteriormente lisado con un tampón de lisis (10 mM Tris, 2 mM EDTA, 25% sacarosa) conteniendo inhibidores de proteasas. El lisado fue sonicado y centrifugado de nuevo a 4°C (20 min, 20000 X g) y la proteína GST-ROCK1-725-1024 se purificó del sobrenadante mediante esferas de glutationa-sefarosa (GE Healthcare).

2.4.3.2. *Pull-down*

Se transfectaron células COS1 con, GFP-Rac1G12V, GFP-Rac1G12V-A37, GFP-Rac1G12V-A56 o el vector GFP vacío como control negativo. Tras 24 horas de expresión, las células se lisaron a 4°C con tampón TGH (1 % Triton TX-100, 10 % glicerol, 50 mM Hepes) conteniendo inhibidores de proteasas y los lisados fueron incubados con GST-ROCK1-725-1024 unido a las esferas de glutationa-sefarosa a 4°C en agitación durante 2 horas. La presencia de interacción entre la proteína GST-ROCK1-725-1024 y las respectivas proteínas GFP fue determinada por *western blot*.

2.5. Técnicas de microscopía

2.5.1. Inmuncitofluorescencia

Mediante esta técnica es posible analizar la localización subcelular de proteínas o lípidos con el uso de anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios conjugados con moléculas fluorescentes, y su posterior análisis mediante microscopía de fluorescencia. A continuación se detalla el procedimiento utilizado:

- Las células son sembradas, y en su caso transfectadas, sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro.
- Tras los tratamientos correspondientes, lavar las células con PBS y fijarlas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos. Este paso se lleva a cabo a 37°C para facilitar la preservación de las estructuras tubulares de membrana.
- Lavar las células 2 veces con PBS.
- Permeabilizar con Tritón X-100 0.1% o con saponina 0.1% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar con PBS.
- Bloquear con BSA 1% en PBS durante 5-10 minutos.
- Lavar con BSA 0.1% en PBS.
- Incubar las células con el anticuerpo primario en una solución de BSA 0.1% en PBS durante 50 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar tres veces con BSA 0.1% en PBS.
- Incubar con el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo en una solución de BSA 0.1% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar tres veces con PBS.
- Lavar una vez con agua destilada.
- Montar los cubreobjetos sobre el portaobjetos con el medio de montaje mowiol.

2.5.1.1. Internalización de β 1-integrina

La dinámica de la internalización de β 1-integrina fue analizada mediante técnicas de inmunocitofluorescencia. La incubación del anticuerpo primario se realizó *in vivo* a 4°C, para inhibir su internalización durante la formación de los complejos antígeno-anticuerpo. A continuación se detalla el procedimiento utilizado:

- Células COS1 son sembradas y transfectadas con GFP-Mem o GFP-Rac1G12V sobre cubreobjetos.
- Tras 24 horas de expresión, las células se atemperan a 4°C, y a continuación se incuban con el anticuerpo primario anti- β 1-integrina (rata) durante 30 minutos.
- Lavar el exceso de anticuerpo con PBS e incubar las células a 37°C en presencia o ausencia de W13 y dejar internalizar el complejo antígeno-anticuerpo durante 25 minutos.
- Tras la internalización, lavar dos veces con PBS a 4°C.
- Realizar un lavado ácido (ácido acético glacial 0.5%, NaCl 0.5 M pH3.0) a 4°C durante 2 minutos, para eliminar el anticuerpo unido no internalizado.
- Lavar 2 veces con PBS.
- Fijar las células con paraformaldehído al 4% en PBS a 37°C (para evitar la rotura de los túbulos).
- Permeabilizar con Tritón X-100 0.1% en PBS durante 5 minutos.
- Bloquear con BSA 1% en PBS durante 10 minutos.
- Incubar anticuerpo secundario (anti-rata) conjugado con un fluoróforo durante 30 minutos.
- Análisis por microscopía de fluorescencia.

Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal espectral TCS SP5 (*Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania*), acoplado a una cámara DMI6000 (*Leica*). Se tomaron imágenes de varios planos del eje Z con el fin de abarcar la totalidad de la célula. El análisis de las imágenes se realizó con el programa ImageJ (*National Institute of Health*). Para determinar la cantidad de β 1-integrina internalizada en cada condición, se tuvieron en cuenta los valores de fluorescencia normalizados por unidad de área celular.

Con el fin de comparar los valores totales de internalización de células GFP-Rac1G12V y células GFP-Mem tras el tratamiento con W13, se combinaron los valores de internalización obtenidos de células con y sin túbulos en un mismo valor. Para ello se tuvo en cuenta el porcentaje medio obtenido para cada categoría en experimentos anteriores, que corresponden a un 70% de células sin túbulos y un 30% de células con túbulos, aplicando la siguiente fórmula:

$$I_T = (I_S \times r_S) + (I_C \times r_C)$$

Donde,

I_T = internalización media de la población **total** de células GFP-Mem tratadas con W13.

I_S = internalización media de células GFP-Mem **sin** túbulos tratadas con W13.

I_C = internalización media de células GFP-Mem **con** túbulos tratadas con W13.

r_S = 0.7 (ratio media de células GFP-Mem **sin** túbulos tratadas con W13).

r_C = 0.3 (ratio media de células GFP-Mem **con** túbulos tratadas con W13).

Mediante esta fórmula corregimos la desviación de los porcentajes de células con y sin túbulos debida al pequeño tamaño de la muestra obtenida mediante esta técnica.



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS



El fosfolípido PI(4,5)P₂ ha sido descrito ampliamente como un factor clave en la endocitosis. De hecho, numerosas proteínas endocíticas contienen dominios de unión específicos para PI(4,5)P₂. La dinámica de su metabolismo está finamente regulada por diversos enzimas que pueden fosforilarlo, defosforilarlo, hidrolizarlo o sintetizarlo a partir de precursores, cambiando su concentración en dominios específicos de la membrana. En los primeros pasos de la endocitosis, la concentración de PI(4,5)P₂ aumenta y recluta clatrina u otros tipos de proteínas de cubierta o asociadas a procesos de remodelación de membrana, dando lugar a una invaginación. Más tarde, los niveles de PI(4,5)P₂ deben reducirse para completar el proceso de formación de vesículas. En los últimos años, nuestro grupo ha descrito como la calmodulina (CaM) está regulando la interacción entre Rac1 y PIP5K, el principal enzima productor de PI(4,5)P₂. La inhibición de la CaM, que es el sensor de calcio (Ca²⁺) más importante en células no musculares, induce la formación de invaginaciones tubulares ricas en PI(4,5)P₂ provenientes de la membrana plasmática, que parecen formar parte de un proceso endocítico independiente de clatrina ¹³⁵. Sin embargo, también se observó que la sobreexpresión del Rac1 constitutivamente activo (Rac1G12V) inhibía las tubulaciones inducidas por la inhibición de CaM, lo que podría deberse a la acción de efectores de Rac1 relacionados con el metabolismo de PI(4,5)P₂, como la fosfolipasa C (PLC), o relacionados con la dinámica del citoesqueleto.

Los sitios de endocitosis están estrechamente ligados al citoesqueleto de actina, ya que éste puede contribuir a la deformación, invaginación o fisión de la membrana. La cortactina modula la dinámica del citoesqueleto de actina durante la CDE y la CIE ^{73,174,337}, en asociación con diversas proteínas como WASP, dinamina o Arp2/3 ^{72,107,173,174}. Es conocido que la cortactina requiere de Rac1 para ser translocada a la membrana plasmática pero no se conoce bien el mecanismo ^{338,339}. Asimismo, la tensión de la membrana plasmática es también un elemento clave en la regulación de la internalización, estimulándose la endocitosis en regiones con una baja tensión de membrana ^{340,341}. La miosina, en especial la miosina II de células no musculares, es, junto con la actina, uno de los principales reguladores de la tensión de membrana, especialmente durante la migración celular. Todo ello nos permite hipotetizar que la acción de las RhoGTPasas en general, y de Rac1 en particular, sobre la actina y la miosina durante la endocitosis y otros procesos celulares, podría

ser la responsable del impacto de Rac1G12V sobre los túbulos inducidos por PI(4,5)P₂.

La dinámica de las adhesiones focales, que vinculan el citoesqueleto con la matriz extracelular a través de la integrina, está también regulada por la endocitosis durante la migración celular^{67,68,291,293,342,343}. Existe además una estrecha regulación recíproca entre las RhoGTPasas y el tráfico de integrinas^{158,342,344-348}, que se extiende a lo largo del eje anteroposterior de la célula en migración, en el que generalmente Rac1 está activado en la parte anterior, y RhoA en la parte posterior. Por tanto, sería interesante analizar si el fenómeno endocítico que hemos observado durante la inhibición de la CaM, y que depende de la actividad de Rac1, puede ser un elemento regulador del tráfico de integrinas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la información relacionada encontrada en la bibliografía, se plantearon los tres principales objetivos de esta tesis doctoral:

- 1. Analizar la contribución de PI(4,5)P₂ en la generación de la red tubular inducida por la inhibición de la CaM.**
- 2. Determinar la relevancia de las tubulaciones en la internalización de integrina.**
- 3. Determinar el papel de Rac1 y sus efectores en la regulación de los túbulos.**



RESULTADOS



CAPÍTULO I

*Estudio de la implicación de Rac1 y PI(4,5)P₂ en la
formación de estructuras tubulares de membrana:
regulación por calmodulina*

CAPÍTULO I

1. Estudio de la implicación de Rac1 y PI(4,5)P₂ en la formación de estructuras tubulares de membrana: regulación por CaM

Tal como se ha comentado en la introducción y en los antecedentes, el tratamiento con W13 induce en las células la formación de una red tubular procedente de la membrana plasmática, conectada con el exterior y que parece estar relacionada con algunos tipos de endocitosis independientes de clatrina (CIE). Los trabajos previos del grupo sugerían un papel clave de Rac1, así como de PIP5K y su producto PI(4,5)P₂, en el proceso de tubulación observado. En este apartado se analiza la implicación de cada uno de estos elementos con mayor detalle.

1.1. Las tubulaciones inducidas por el tratamiento con W13 son debidas a la inhibición específica de la CaM

Los fenotipos producidos por el tratamiento con W13 son asumidos normalmente como una consecuencia de la inhibición de CaM. Sin embargo, al ser una base débil anfipática, esta molécula es capaz de unirse a los fosfolípidos ácidos de la cara interna de la membrana plasmática, modificando su potencial electrostático³⁴⁹, lo que podría provocar efectos fenotípicos independientes de la inhibición de CaM. Con el fin de descartar esta posibilidad, se analizó la formación de túbulos después de diversos tratamientos con moléculas químicamente similares al W13, pero sin efectos descritos sobre la CaM, así como con compuestos inhibidores de la misma que no guardan relación con el W13 en cuanto a sus características físico-químicas.

Se analizó por tanto el efecto de la molécula esfingosina, la cual a bajas concentraciones une más fuertemente los fosfolípidos ácidos que el W13 sin mostrar efectos sobre la CaM, así como el W12, químicamente muy similar al W13 pero también sin efectos demostrados sobre la CaM a las concentraciones utilizadas con el W13 en nuestros experimentos. Por otro lado se testó el efecto del

calmidazolium, otro inhibidor de CaM, y del BAPTA, un quelante de Ca²⁺, ion necesario para la acción de la proteína. El gráfico de la figura 1 muestra el porcentaje de células que presentan más de 5 túbulos, umbral establecido para considerar la aparición del fenotipo. El calmidazolium y el BAPTA indujeron la misma red tubular producida por W13, mientras que el W12 y la esfingosina no mostraron diferencias respecto a las células control. Estos resultados confirman que los túbulos inducidos por W13 son debidos a una inhibición específica de la CaM.

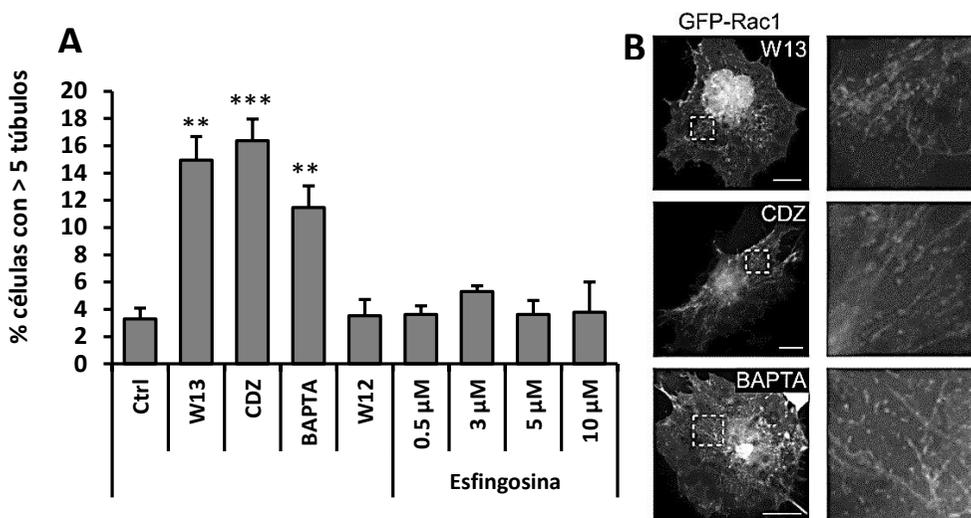
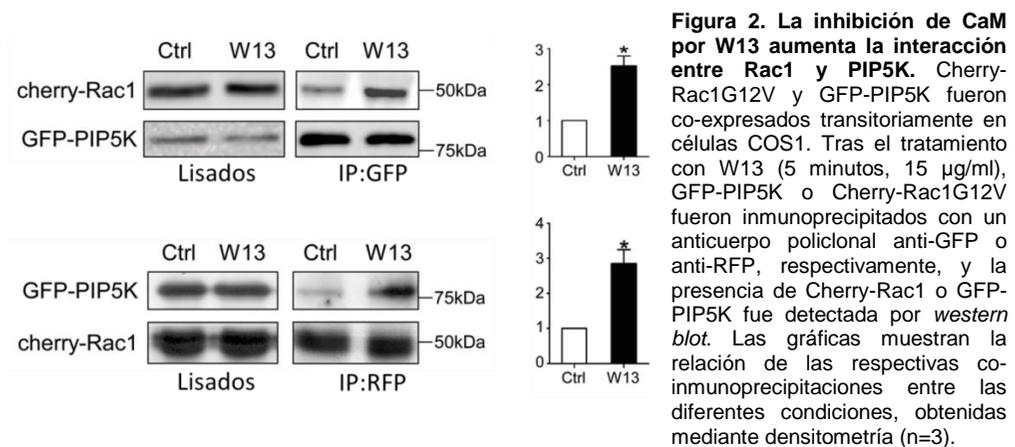


Figura 1. La inhibición específica de la CaM por W13 induce tubulaciones de membrana. (A) Células COS1 que expresaban GFP-Rac1 fueron tratadas con W13 (5 μg/ml), calmidazolium (CDZ, 7,5 μg/ml), W12 (10 μg/ml), BAPTA-AM (50 μM) o las concentraciones crecientes indicadas de esfingosina durante 20 min a 37°C. La gráfica muestra el porcentaje de células que presentaban más de 5 túbulos (media ± SEM de 3 experimentos independientes, n = 100 células). La significancia estadística entre las diferentes condiciones y el control correspondiente fue determinada mediante el test *t*-Student ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001. **(B)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células representativas, que expresaban GFP-Rac1, sometidas a los tratamientos indicados (barras, 10 μm).

1.2. La inhibición de CaM incrementa la interacción entre Rac1 y PIP5K

En los estudios previos del grupo se había determinado que la CaM, al interaccionar con la región polibásica del Rac1 activo, podía modular la interacción de éste con uno de sus efectores, PIP5K, enzima responsable de la síntesis de PI(4,5)P₂. Durante el transcurso de esta tesis, la interacción entre Rac1 y PIP5K se

ha analizado bioquímicamente con más detalle mediante co-inmunoprecipitaciones recíprocas en presencia o ausencia del inhibidor de CaM. Para ello se expresaron transitoriamente las proteínas Rac1G12V y PIP5K fusionadas con las proteínas fluorescentes Cherry y GFP respectivamente en células COS1. Tras 2 horas de ayuno, se inmunoprecitaron dichas proteínas con los anticuerpos anti-RFP y anti-GFP, y la presencia de Rac1G12V o PIP5K inmunoprecitadas o co-inmunoprecitadas fue detectada por *western blot* (Figura 2). Los resultados corroboran que la CaM interfiere en la interacción entre Rac1 y PIP5K, pues su inhibición induce una mayor interacción entre ambas proteínas.



1.3. Papel de PI(4,5)P₂ en la inducción de túbulos durante la inhibición de CaM

La inhibición de CaM produce efectos evidentes sobre la interacción entre Rac1 y PIP5K, lo cual podría alterar el metabolismo de PI(4,5)P₂, producto de PIP5K. Asimismo, en trabajos previos del grupo se demostró la implicación directa de este enzima en la formación de los túbulos de membrana, pues cuando se sobreexpresaba durante 24 horas causaba un efecto similar al tratamiento con W13¹³⁵. También se describió la presencia de PI(4,5)P₂ en los túbulos mediante la expresión transitoria de sondas específicas para dicho fosfolípido¹³⁵. Dichas observaciones hacían probable una posible relación entre las tubulaciones

inducidas por la inhibición de la CaM y la regulación de PI(4,5)P₂ y nos condujeron a estudiar con mayor detalle la implicación de este fosfolípido.

1.3.1. Presencia y requerimiento de PI(4,5)P₂

Como hemos comentado, la presencia de PI(4,5)P₂ en los túbulos ya fue descrita previamente en nuestro laboratorio. Con el objetivo de detectar con mayor precisión este fosfolípido en los túbulos, se realizó la detección del mismo mediante inmunocitofluorescencia, utilizando un anticuerpo específico contra PI(4,5)P₂, en células COS1 tratadas con W13 y que expresaban un marcador de membrana. En la figura 3A se puede apreciar claramente un marcaje específico en los túbulos, que indica la presencia de PI(4,5)P₂ en los mismos.

Con el fin de determinar si el aumento y presencia de PI(4,5)P₂ es causante directo del fenotipo tubular, y no es simplemente una consecuencia no relacionada con la formación de los túbulos inducidos por W13, se estudió el impacto de la adición directa de PI(4,5)P₂ exógeno en células COS1. Las células mostraron el mayor porcentaje de túbulos a una concentración de 50 μM de PI(4,5)P₂ (figura 3B), y a esta concentración se analizó estadísticamente el efecto sobre la formación de túbulos (figura 3C). La incubación con PI(4,5)P₂ indujo un porcentaje de células con túbulos similar al tratamiento con W13, lo cual indica una relación causa-efecto entre el aumento de este fosfolípido y la aparición de las tubulaciones. En la figura 3D se muestra una imagen representativa obtenida mediante microscopía confocal.

1.3.2. La acción de la dinamina es necesaria para la formación de los túbulos

La dinamina es una GTPasa grande implicada en la fisión de la membrana plasmática durante la endocitosis dependiente de clatrina (CDE) y en algunos tipos de CIE^{35,350,351}, así como en la fisión de orgánulos^{352,353}, citoquinesis^{95,354} e incluso en el reordenamiento del citoesqueleto de actina^{88,355}. Se ha descrito de hecho una relación estrecha entre la dinamina y la cortactina, una proteína relacionada con la actina, en procesos de endocitosis y durante la reordenación del citoesqueleto^{107,173}. Asimismo, hay estudios que demuestran que la dinamina puede inducir tubulaciones tanto en liposomas como en células vivas^{350,356}. Además, la dinamina

contiene un dominio PH de unión a PI(4,5)P₂, y este fosfolípido es importante para la acción de la proteína³⁵⁷. La relación de la dinamina con la endocitosis, y la importancia de PI(4,5)P₂ en su modo de acción nos llevó a analizar su papel en el proceso de tubulación inducido por este fosfolípido.

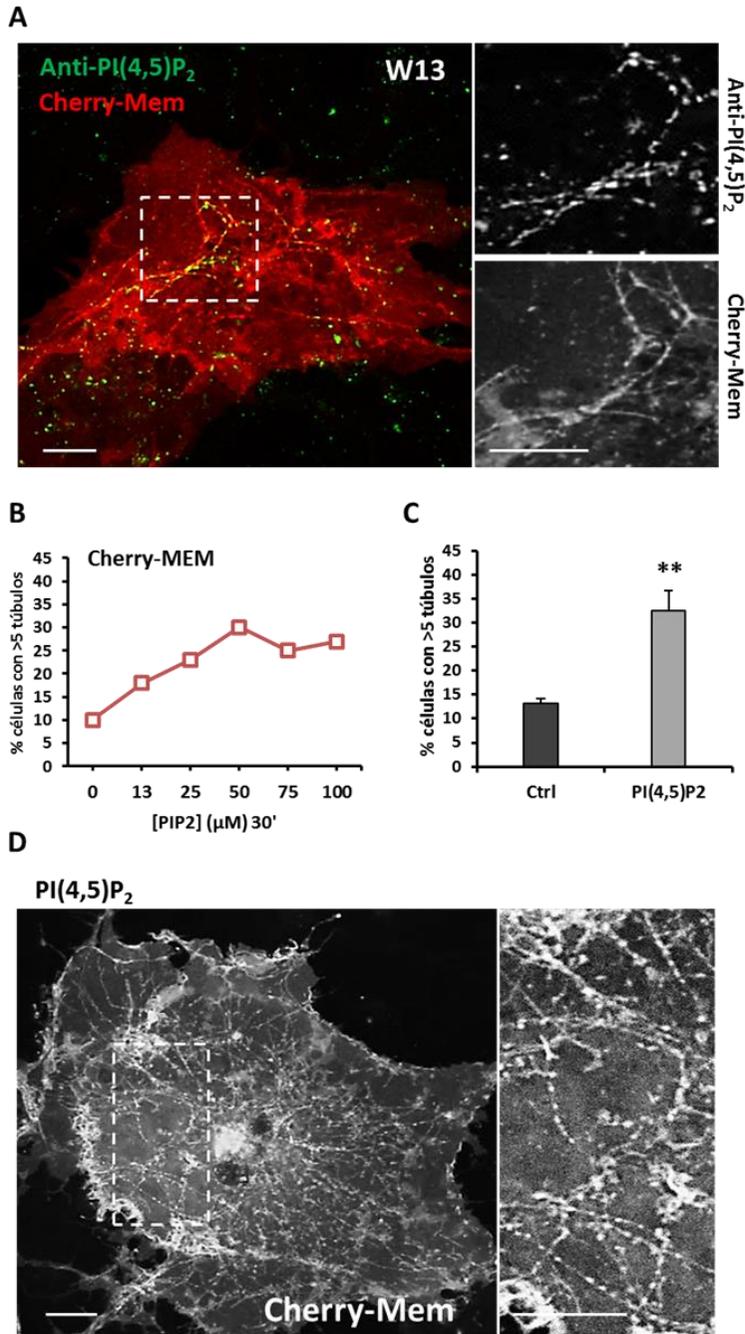


Figura 3. PI(4,5)P₂ se encuentra en los túbulos y es necesario y suficiente para su formación. (A) Células COS1 transfectadas con el marcador de membrana Cherry-Mem fueron tratadas con W13 (20 min, 5 µg/ml). El PI(4,5)P₂ fue detectado por inmunofluorescencia con un anticuerpo de ratón específico. **(B)** Células COS1 transfectadas con Cherry-Mem fueron incubadas con diferentes concentraciones de PI(4,5)P₂ exógeno durante 20 minutos y se cuantificó el porcentaje de células que presentaban túbulos. **(C)** Porcentaje de células con túbulos después de la incubación con PI(4,5)P₂ (20 min, 50 µM). Se muestra la media ± SEM de 4 experimentos independientes (n=100). La significancia estadística entre las diferentes condiciones fue determinada mediante el test *t*-Student ***p*<0.01. **(D)** Imagen representativa de una célula COS1 con túbulos después del tratamiento con PI(4,5)P₂. (barras, 10 µm).

Para ello se transfectaron células COS1 con el marcador de membrana Cherry-Mem, y se trataron con W13 durante 20 minutos, en presencia o ausencia de dynasore, un inhibidor químico de la dinamina, que impide su actividad GTPasa intrínseca y bloquea el ciclo GTP/GDP necesario para la acción de la dinamina. En paralelo también se expresó dinamina-K44A, que actúa como dominante negativo manteniendo a la dinamina constitutivamente unida a GDP (figura 4A). El tratamiento con dynasore redujo drásticamente el número de células con túbulos, tanto a nivel control como en presencia de W13. De igual modo, la expresión de dinamina-K44A redujo las tubulaciones en presencia de W13, aunque no tuvo ningún efecto a nivel control. Una tercera estrategia fue llevada a cabo para confirmar la importancia de la dinamina, silenciando la proteína mediante la transfección de un siRNA específico (figura 4B). 48 horas después de la co-transfección del siRNA y el marcador Cherry-Mem, las células fueron tratadas con W13. La ausencia de dinamina también redujo significativamente el número de células con túbulos. En contra de lo que cabía esperar, teniendo en cuenta la función mejor descrita de la dinamina, que es la fisión de las membranas durante la endocitosis, estos resultados demuestran que la dinamina no participa en la fisión de dichos túbulos impidiendo su elongación (la ausencia de dinamina no provocó mayor porcentaje de tubulaciones), sino que, por el contrario, los resultados demuestran que es completamente necesaria para su formación después del incremento de PI(4,5)P₂.

1.3.3. Importancia de la PKC

La proteína quinasa C (PKC) está estrechamente relacionada con la regulación de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática mediante la fosforilación de proteínas como MARCKS³⁵⁸, al permitir un aumento de la disponibilidad de este fosfolípido en la cara interna de la membrana plasmática debido a la translocación de MARCKS

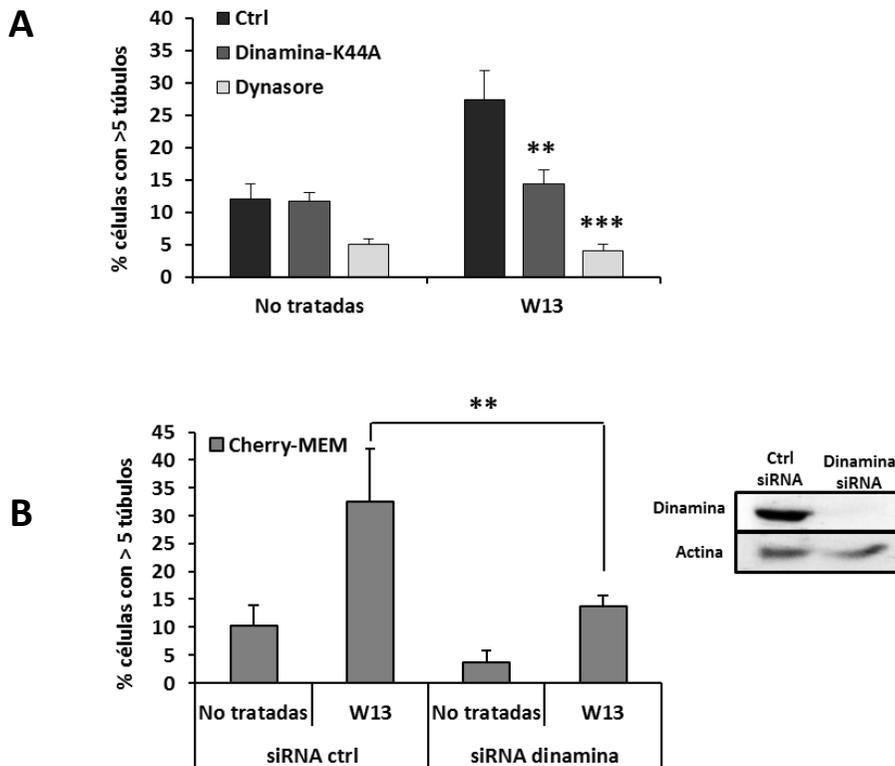


Figura 4. La formación de túbulos dependientes de PI(4,5)P₂ requiere la presencia de dinamina funcional. (A) Cuantificación de células CherryMem con túbulos tratadas o no con W13 en presencia de dynasore o de sobreexpresión de dinamina-K44A. **(B)** Cuantificación de células CherryMem con túbulos tratadas o no con W13 en presencia de siRNA específico de dinamina o con un siRNA no específico. En el panel derecho se muestran los niveles de expresión de dinamina detectada por *western blot* en cada condición. Se muestra la media \pm SEM 3 experimentos independientes (n=100 células). La significancia estadística entre los tratamientos y sus respectivos controles fue determinada mediante el test *t*-Student ** p <0.01, *** p <0.001.

hacia el citoplasma. Ambas proteínas están además relacionadas con la CaM en la regulación de PI(4,5)P₂³³¹. De hecho, la fosforilación de MARCKS por PKC impide la unión a CaM, y por el contrario la unión de CaM impide la fosforilación por PKC, generándose una regulación cruzada entre las vías de PKC y CaM. En trabajos previos del grupo se ha descrito que la inhibición de CaM induce un aumento en la fosforilación de MARCKS por PKC y provoca su translocación desde la membrana plasmática hacia el compartimento endocítico, concentrándose en los EEs³²¹. Para comprobar la implicación de PKC en la formación de los túbulos inducidos por W13, se transfectaron células COS1 con el marcador de membrana GFP-Mem y después de una hora de ayuno, se trataron con BIM o con TPA, inhibidor y activador de PKC

respectivamente, en presencia o ausencia del inhibidor de CaM (figura 5). La activación de PKC actuó sinérgicamente junto al W13, aumentando el número de células con tubulaciones, mientras que su inhibición anuló totalmente la formación de túbulos.

Estos resultados muestran que la actividad de la PKC facilita y es necesaria para la formación de estas estructuras, posiblemente a través de la fosforilación de MARCKS u otras proteínas, que podrían ser inhibidas por la unión de CaM, incrementando eventualmente la accesibilidad de PI(4,5)P₂. Esto constituiría otro posible mecanismo para el aumento de PI(4,5)P₂, además del producido por el aumento de la interacción entre Rac1 y PIP5K.

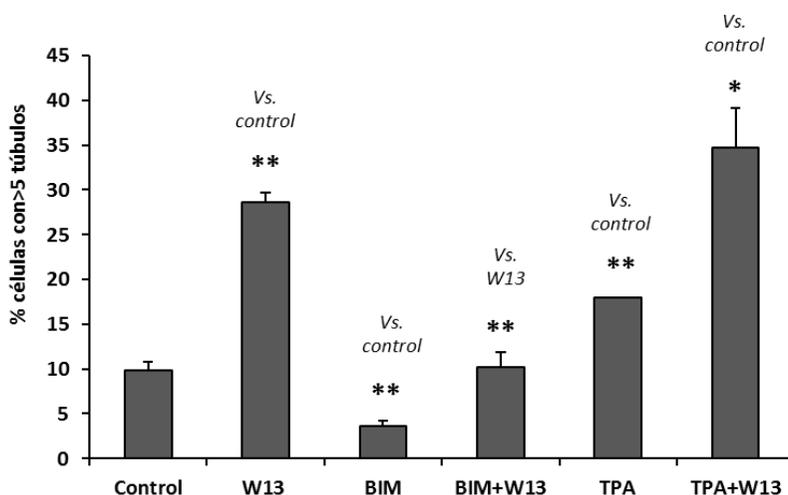


Figura 5. La actividad de PKC es necesaria para la formación de los túbulos. Células COS1 que expresaban GFP-Rac1 fueron tratadas con W13 (20 min, 5 µg/ml), BIM (30 min, 5 µM) o TPA (20 min, 100 nM) a 37°C. Se muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes (n = 100 células). La significancia estadística entre las diferentes condiciones fue determinada mediante el test *t*-Student *p*<0.05, **p*<0.01.

1.4. La activación constitutiva de Rac1 inhibe las tubulaciones inducidas por PI(4,5)P₂

Nuestro grupo ya había demostrado previamente que la expresión transitoria del dominante negativo de Rac1, el mutante T17N, era suficiente para inducir una red tubular similar a la producida por el tratamiento con W13, y que por el contrario, la expresión del Rac1-G12V, constitutivamente activo, era capaz de inhibir las

tubulaciones inducidas por esta droga ¹³⁵. Teniendo en cuenta la estrecha relación entre el aumento de PI(4,5)P₂ y el efecto tubulador del W13 descrita hasta el momento, se analizó si la inhibición de dicho efecto por parte del Rac1 activo se trasladaba también sobre el efecto homólogo de la sobreexpresión de PIP5K o la adición de PI(4,5)P₂ exógeno a las células. Para ello se expresó el Rac1G12V y/o la PIP5K en células COS1. Por otro lado, se incubaron células con PI(4,5)P₂ exógeno también en presencia o ausencia de Rac1-G12V expresado transitoriamente. Los resultados muestran como el Rac1 constitutivamente activo es capaz de inhibir también las tubulaciones producidas por estos dos tratamientos de una manera similar a como lo hace frente al tratamiento con W13 (figura 6), sugiriendo un proceso de inducción e inhibición tubular similar en los tres casos y confirmando de nuevo una implicación directa de PI(4,5)P₂ en el efecto de la inhibición de CaM.

Las balsas lipídicas son dominios altamente ordenados de la membrana plasmática ricos en algunos lípidos como colesterol o PI(4,5)P₂. Diversos estudios muestran que Rac1 co-localiza con marcadores típicos de las balsas lipídicas, y es co-purificado con las fracciones celulares correspondientes a estos dominios ^{158,359}.

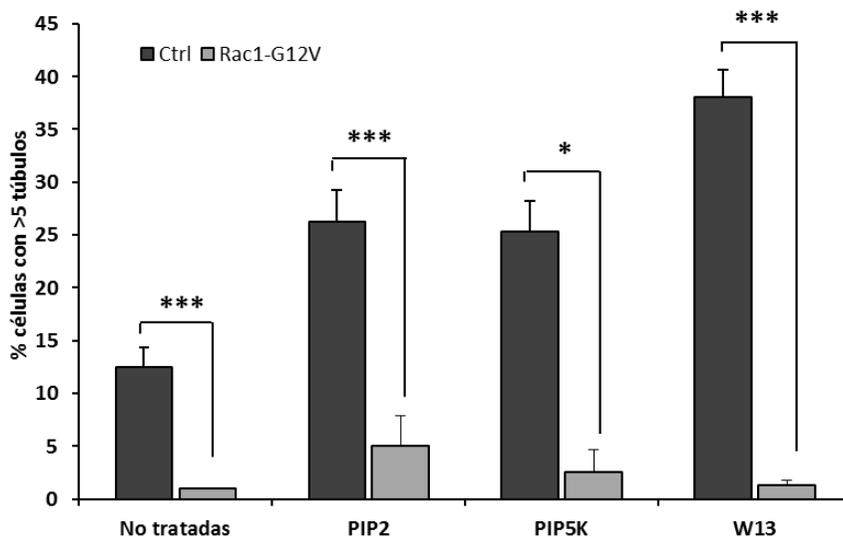


Figura 6. Rac1G12V inhibe las tubulaciones inducidas por el incremento de PI(4,5)P₂. Células COS1 que expresaban el marcador GFP-Mem (ctrl) o GFP-Rac1G12V fueron tratadas con PI(4,5)P₂ exógeno (20 min, 50 μM), W13 (20 min, 5 μg/ml) o co-transfectadas con PIP5K a 37°C. Se muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes (n = 100 células). La significancia estadística entre las diferentes condiciones fue determinada mediante el test t-Student: *p<0.05, ***p<0.001.

Además, la translocación de Rac1 a las balsas lipídicas está directamente relacionada con su actividad, la cual puede ser selectivamente inhibida localizándose en dominios no ordenados de la membrana plasmática³⁶⁰. Asimismo, en trabajos previos de nuestro grupo se determinó que las tubulaciones eran formaciones endocíticas correspondientes a vías CIE y que por tanto, podrían originarse en las balsas lipídicas^{61,135}.

Se analizó por tanto la importancia del PI(4,5)P₂ localizado específicamente en las balsas lipídicas durante la formación de los túbulos. Para ello se diseñó y expresó una fosfatasa específica de PI(4,5)P₂, proveniente de una levadura, fusionada a un péptido correspondiente a los 10 primeros aminoácidos de la proteína Lck (L10-GFP-PasaWT) y que es una señal de direccionamiento a las balsas lipídicas, con el fin de dirigir la fosfatasa específicamente a las mismas. Con ello conseguimos presumiblemente reducir los niveles de PI(4,5)P₂ solo en las balsas lipídicas, y analizar el efecto de su disminución sobre la inducción de los túbulos. Asimismo, expresamos una versión mutada no funcional de esta fosfatasa, con la mutación D281A (L10-GFP-PasaD281A), para descartar posibles efectos inespecíficos debidos a la expresión o localización de la proteína. La expresión de la fosfatasa

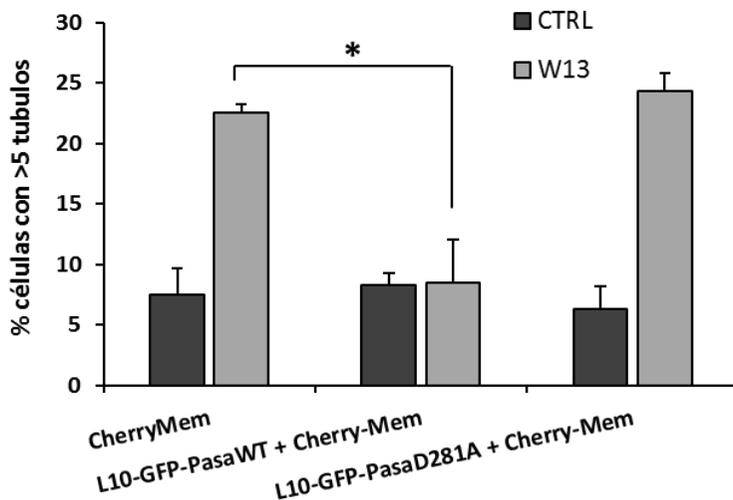


Figura 7. La expresión de una fosfatasa específica de PI(4,5)P₂, dirigida específicamente a balsas lipídicas, inhibe la formación de tubulaciones inducidas por W13. Células COS1 que expresaban Cherry-Mem y una fosfatasa específica de PI(4,5)P₂ en su forma salvaje (WT) o el mutante inactivo (D281A), dirigidas específicamente a las balsas lipídicas, fueron tratadas con W13 (20 min, 5 µg/ml). La gráfica muestra el porcentaje de células con más de 5 túbulos en las condiciones indicadas (media ± SEM de 3 experimentos independientes, n=100). La significancia estadística entre las diferentes condiciones fue determinada mediante el test t-Student ^{*}p<0.05.

salvaje anuló completamente las tubulaciones inducidas por la inhibición de CaM, mientras que la versión no funcional no produjo ningún efecto (figura 7). Este resultado sugiere que el W13 induce tubulaciones debido a un aumento de PI(4,5)P₂ y que es en las balsas lipídicas donde dicho aumento tiene un impacto sobre la formación de tubulaciones endocíticas.

1.5. Las tubulaciones son ricas en PACSIN2, una proteína con dominio BAR

Las proteínas de la familia BAR son proteínas de unión a lípidos, capaces de detectar, estabilizar y generar curvatura en las membranas celulares. Estas proteínas están intrínsecamente curvadas y se unen específicamente a diversos fosfolípidos, lo que determina la membrana diana para cada proteína BAR. La proteína PACSIN2 (*protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2*) es una proteína con dominio F-BAR, y su dominio SH3 en el extremo C-terminal media la interacción con diversas proteínas, como dinamina o proteínas relacionadas con el citoesqueleto. Además, esta proteína interacciona específicamente con fosfatidilserina (PS) y PI(4,5)P₂, generando y estabilizando la curvatura en membranas ricas en estos fosfolípidos³⁶¹. PACSIN2 se ha relacionado con la tubulación de la membrana plasmática durante la endocitosis mediada por caveolina y otras vías dependientes de las balsas lipídicas³⁶²⁻³⁶⁴, y se ha descrito que puede asociarse con Rac1 para regular la migración celular³⁶⁵.

Se analizó por tanto, si PACSIN2 estaba presente en las tubulaciones inducidas por la inhibición de la CaM. Para ello se llevó a cabo una inmunofluorescencia en células COS1 transfectadas con el marcador GFP-Mem. Tras 24 horas de expresión, las células fueron tratadas con W13 y el PACSIN2 fue detectado con un anticuerpo específico (figura 8A). PACSIN2 localizaba claramente en los túbulos inducidos por W13. El mismo experimento fue realizado en células COS1 que expresaban GFP-Rac1G12V, con el fin de comprobar si la activación constitutiva de Rac1 era también capaz de impedir la formación de túbulos PACSIN2-positivos (figura 8B). El tratamiento con W13 aumentó la cantidad de estructuras tubulares positivas para PACSIN2 en células control, y la expresión del Rac1

constitutivamente activo inhibió fuertemente su formación. Estos resultados sugieren que PACSIN2 podría estar participando en la estabilización o formación de los túbulos inducidos por W13, posiblemente mediante la unión a PI(4,5)P₂, aunque no se puede descartar la participación de otras proteínas con dominios BAR en el proceso.

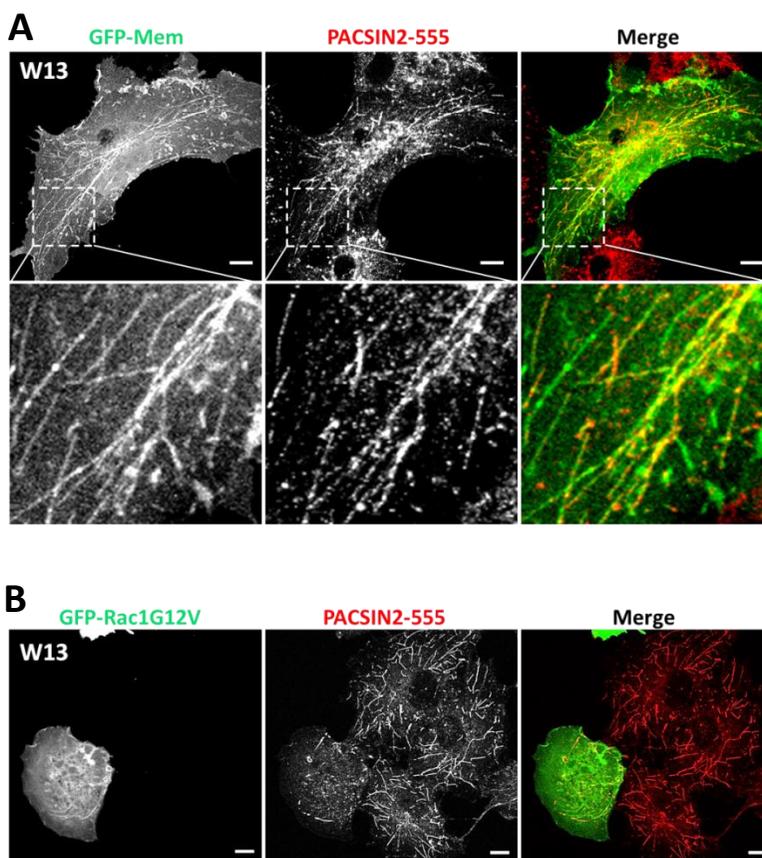


Figura 8. Los túbulos contienen PACSIN-2, una proteína con dominio F-BAR. Células COS-1 fueron transfectadas con GFP-Mem (A) o con GFP-Rac1G12V (B) y tratadas con W13 (20 min, 5 μg/ml) para inducir la formación de túbulos. La detección de PACSIN-2 se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia (barras, 10 μm).

En el siguiente capítulo se analizará el papel de Rac1, así como de las tubulaciones inducidas por el aumento de PI(4,5)P₂, en la internalización de integrinas, la cual se produce en parte a través de vías CIE. En el tercer y último capítulo se expondrá cómo la actividad de Rac1 inhibe las tubulaciones, así como los mecanismos moleculares implicados en dicha inhibición.

CAPÍTULO II

*Relevancia fisiológica de las tubulaciones de membrana:
internalización de β 1-integrina*

CAPÍTULO II

2. Relevancia fisiológica de las tubulaciones de membrana

En este apartado se analizarán las posibles funciones fisiológicas de las formaciones tubulares inducidas por el incremento de PI(4,5)P₂, centrándonos en su importancia en procesos endocíticos, y en especial en la internalización de β 1-integrina, relacionada en numerosos estudios con Rac1^{279,366-368}.

2.1. Los túbulos inducidos por W13 contienen β 1-integrina

Las integrinas son proteínas heterodiméricas transmembrana que funcionan como receptores de la matriz extracelular (MEC), y vinculan el citoesqueleto de actina intracelular con el exterior³⁶⁹. Con la combinación de 18 subunidades α y 8 β , existen 24 heterodímeros de integrina diferentes en mamíferos, que se expresan específicamente en diferentes células y tejidos, dando como resultado la regulación de diversos procesos celulares como proliferación, apoptosis, diferenciación y migración celular²⁷⁶. De hecho, la regulación del tráfico de integrinas, internalización y reciclaje, es fundamental en procesos de migración celular. Las

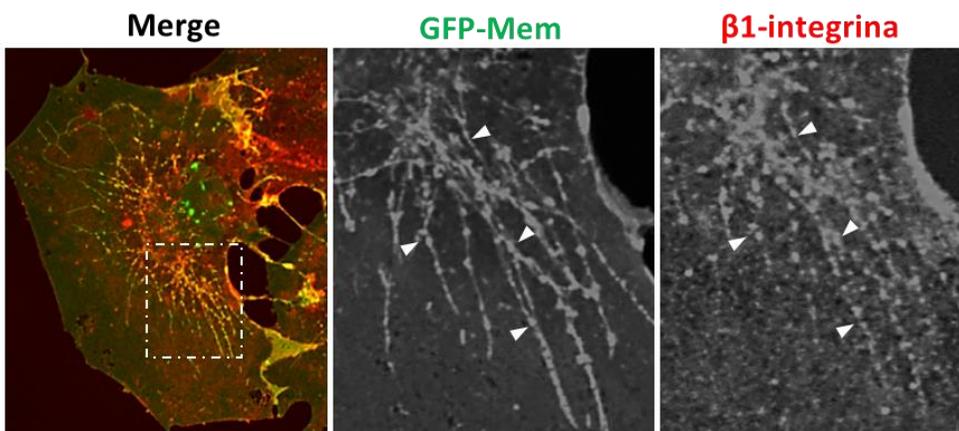


Figura 9. Presencia de β 1-integrina en túbulos inducidos por el aumento de PI(4,5)P₂. Células COS1 fueron transfectadas con el marcador de membrana GFP-Mem. Se incubaron las células con anticuerpo anti- β 1-integrina y se dejó internalizar durante 20 minutos, al tiempo que se indujo la formación de túbulos mediante el tratamiento con W13. El anticuerpo anti- β 1-integrina fue detectado por inmunocitofluorescencia con el anticuerpo secundario adecuado conjugado con Alexa-555 (barra, 10 μ m).

integrinas pueden ser internalizadas por muchas de las principales rutas endocíticas, incluyendo vías dependientes e independientes de clatrina^{60,293,342,343}. Con el fin de averiguar si la integrina puede ser internalizada a través de los túbulos inducidos por el incremento de PI(4,5)P₂, producido por la inhibición de CaM, se realizó un experimento de inmunocitofluorescencia. Se transfectaron células COS1 con el marcador GFP-Mem y después de 24 horas de expresión, se incubaron con un anticuerpo de rata anti-β1integrina (ectodominio) para la unión a la integrina localizada en la membrana plasmática durante 30 minutos a 4°C, con el fin de evitar la internalización durante la unión del anticuerpo. Posteriormente, las células fueron lavadas e incubadas durante 20 minutos a 37°C en presencia de W13 para estimular la internalización de integrina y la formación de túbulos. Seguidamente, las células fueron fijadas y permeabilizadas, y más tarde incubadas con un anticuerpo secundario anti-rata marcado fluorescentemente (figura 9). Se tomaron imágenes de células que presentaban túbulos tras el tratamiento. En las imágenes puede apreciarse claramente la presencia de β1integrina en los túbulos, lo que indica que podrían formar parte de alguna de las rutas de internalización de esta proteína.

2.2. La entrada a través de los túbulos altera el tráfico intracelular de β1-integrina

Una vez internalizadas, las integrinas llegan rápidamente a los endosomas tempranos (EE, *early endosome*). En presencia de fibronectina siguen la ruta a los endosomas tardíos para su degradación²⁹¹, pero la mayoría de integrinas internalizadas son recicladas de vuelta a la membrana plasmática desde los EE³⁷⁰. Es interesante analizar por tanto si, tras su internalización a través de los túbulos, el tráfico intracelular de β1-integrina se ve alterado respecto a la ruta seguida en células que no presentan tubulaciones. Para ello se llevó a cabo un experimento de inmunocitofluorescencia en células COS1 que expresaban transitoriamente el marcador GFP-Mem. Se incubaron las células con un anticuerpo de rata anti-β1-integrina durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se dejó internalizar la integrina a 37°C durante 20 minutos en presencia o ausencia de W13. Después de fijar y permeabilizar las células, fueron incubadas con un anticuerpo anti-EEA1, marcador típico de los EE, y más tarde con los anticuerpos secundarios correspondientes

para la detección fluorescente de β 1-integrina y EEA1 (figura 10). Según lo esperado, las células sin tratar mostraron un alto nivel de co-localización entre vesículas EEA1 positivas y β 1-integrina tras 20 minutos de internalización (figura 10A). Lo mismo ocurría en las células tratadas con W13 que no presentaban tubulaciones. Por el contrario, en células con túbulos tratadas con W13, la β 1-integrina se localizaba en las tubulaciones y disminuía notablemente su localización en vesículas positivas para EEA1 (figura 10B). Este resultado sugiere que la inducción de túbulos provoca una rápida internalización de β 1-integrina, excluyéndola del tráfico convencional hacia los EEs, al menos en los primeros estadios desde su internalización, lo cual podría impedir un inmediato reciclaje de vuelta a la membrana plasmática.

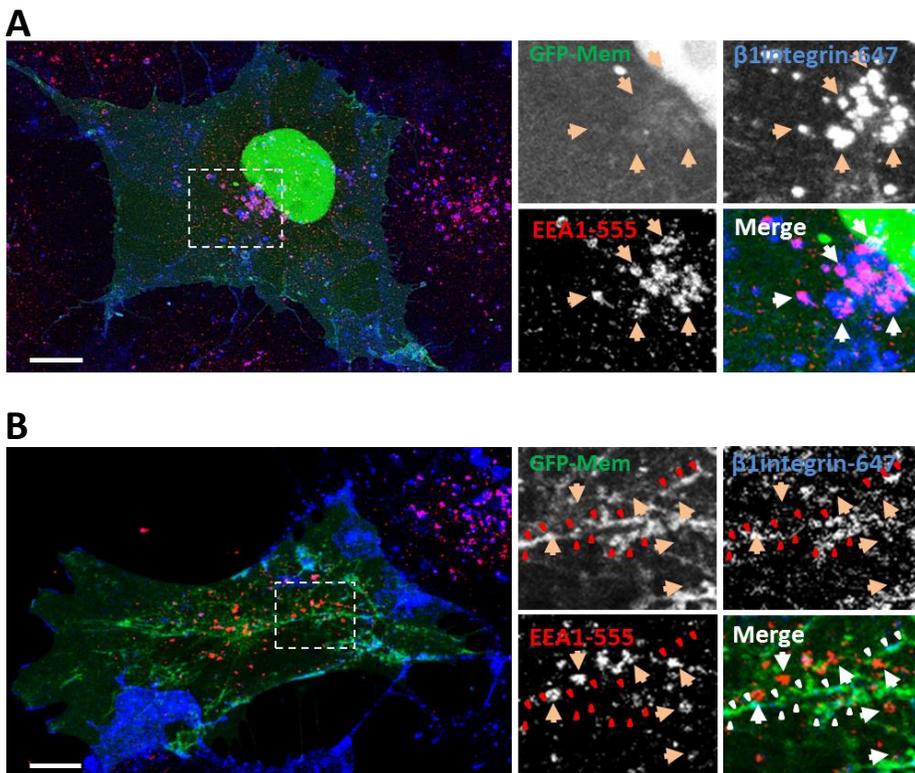


Figura 10. La formación de túbulos altera el tráfico intracelular temprano de β 1-integrina. Células COS-1 fueron transfectadas con el marcador de membrana GFP-Mem. Tras 24 horas de expresión, las células fueron incubadas con anticuerpo anti- β 1-integrina y tratadas con W13 durante 20 min. La β 1-integrina y el EEA1 de células con (B) y sin túbulos (A) fueron detectados por inmunofluorescencia (barras, 10 μ m).

2.3. La formación de túbulos incrementa la entrada neta de β 1integrina

Se ha descrito que los túbulos inducidos por la inhibición de la CaM son una vía de entrada de β 1integrina y que afectan su tráfico intracelular tras la internalización. Para determinar si esta ruta de entrada de β 1-integrina se traduce en un incremento en su internalización se llevó a cabo un ensayo de internalización para cuantificar la tasa de entrada y compararla con la de células sin túbulos. Para ello se transfectaron células COS1 con el marcador GFP-Mem. Tras 24 horas de expresión las células fueron incubadas con anticuerpo anti- β 1-integrina durante 30 minutos a 4°C, y tras lavar el anticuerpo no unido, se dejó internalizar la integrina durante 20 minutos a 37°C, en presencia o ausencia de W13. Después de la internalización, las células fueron sometidas a un lavado ácido a 4°C durante 2,5 minutos para eliminar el anticuerpo no internalizado, y más tarde fueron fijadas y permeabilizadas, y el anticuerpo internalizado fue detectado mediante un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. La cantidad de β 1-integrina internalizada fue determinada mediante la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de las células en imágenes de microscopia confocal. El tratamiento con W13 aumentó ligeramente la cantidad de β 1integrina internalizada en células que no presentaban tubulaciones respecto a células sin tratar. Sin embargo, las células tratadas con W13 que presentaban túbulos, mostraron un aumento espectacular en la tasa de entrada de β 1-integrina, con una internalización 2.5 veces mayor que las células sin túbulos sin tratar, y unas 2 veces mayor que las células sin túbulos incubadas con W13 (figura 11A). Esto parece indicar que la formación de túbulos acelera la entrada neta de β 1-integrina.

2.4. Efecto de la expresión de Rac1G12V sobre la internalización de β 1-integrina

Sirviéndonos como herramienta del ensayo de internalización descrito en el apartado anterior, quisimos determinar si la inhibición de las tubulaciones por parte de Rac1 activo, descrita en el capítulo I, se debía a un impedimento en su formación o si, por el contrario, la expresión de Rac1G12V induce una escisión más

eficiente de las invaginaciones, impidiendo que puedan ser detectadas. Para ello, realizamos un ensayo de internalización de las mismas características y paralelo al experimento anterior, en células que expresaban GFP-Mem o GFP-Rac1G12V (figura 11B y C). Tras totalizar la internalización media de $\beta 1$ -integrina, incluyendo en el cálculo los valores correspondientes a células con y sin túbulos (ver Materiales y Métodos), se compararon las tasas de internalización de células sin tratar con las de células incubadas con W13. Las células que expresaban GFP-Mem (figura 11B) exhibieron una mayor internalización bajo el tratamiento con W13, incluyendo células con y sin túbulos, respecto al control (sin túbulos). Sin embargo, las células GFP-Rac1G12V (sin túbulos, figura 11C) mostraron una significativa aunque poco importante disminución en la internalización después de la inhibición de la CaM. Este resultado sugiere que la ausencia de las tubulaciones tras la expresión del Rac1 constitutivamente activo no es consecuencia de su escisión, sino de la inhibición de su formación y elongación.

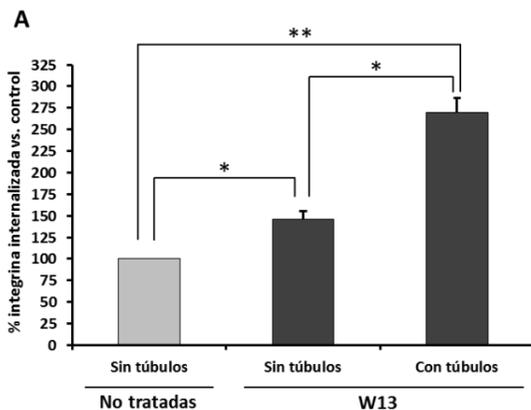
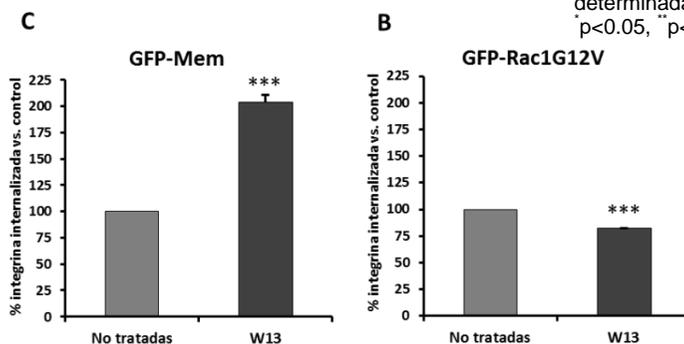


Figura 11. La formación de túbulos acelera la entrada de $\beta 1$ -integrina. (A) Cuantificación del porcentaje de $\beta 1$ -integrina internalizada durante 20 minutos en células COS-1 que expresan GFP-Mem tratadas con W13 (sin túbulos y con túbulos) respecto al control (sin tratamiento y sin túbulos). (B) Porcentaje de integrina internalizada en células que expresan GFP-Mem tratadas con W13 respecto al control. (C) Porcentaje de integrina internalizada en células que expresan GFP-Rac1-G12V tratadas con W13 respecto al control. Los valores en (B) y (C) incluyen células con y sin túbulos, corrigiéndose el valor relativo en base al porcentaje predicho de células con y sin túbulos en cada condición (ver sección Materiales y Métodos). Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (n=20-30 células). La significancia estadística entre las condiciones fue determinada mediante el test *t*-Student $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



CAPÍTULO III

*Regulación de las tubulaciones por rac1: maquinaria
molecular implicada*

CAPÍTULO III

3. Regulación de las tubulaciones por Rac1: maquinaria molecular implicada

En los apartados anteriores hemos demostrado la importancia del aumento y mantenimiento de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática, y más concretamente en las balsas lipídicas, en la inducción de una red tubular de membrana después del tratamiento con W13 así como tras el aumento inducido de PI(4,5)P₂ mediante la sobreexpresión de PIP5K o la incubación con PI(4,5)P₂ añadido exógenamente. También se ha observado como la activación constitutiva de Rac1 es suficiente para inhibir por completo la formación de dicha red tubular, que es una vía de entrada de β1-integrina. En este apartado analizaremos el papel que ejerce la regulación de los niveles de PI(4,5)P₂ en dicha inhibición, estudiando la importancia de los efectores de Rac1 implicados en su metabolismo. También analizaremos el papel del citoesqueleto en la inducción y/o inhibición de los túbulos y cómo Rac1 controla y regula la dinámica del mismo para permitir o impedir su formación.

3.1. Regulación de los niveles de PI(4,5)P₂

Existen diversos efectores de Rac1 implicados directamente en el metabolismo de PI(4,5)P₂ (figura 12). Entre ellos se encuentra la propia PIP5K, ya comentada en el capítulo I. Esta quinasa puede ser reclutada y activada en la membrana plasmática tanto por la forma activa como la inactiva de Rac1, por lo que puede inducir un aumento de PI(4,5)P₂ en ambos casos allá donde Rac1 esté presente. Por el contrario, existen dos efectores de Rac1 activo, unido a GTP, que disminuyen los niveles de PI(4,5)P₂, relacionados con su fosforilación o hidrólisis. Estos efectores son la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza el PI(4,5)P₂, transformándolo en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), y la fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K), que añade un grupo fosfato al PI(4,5)P₂, dando lugar al PI(3,4,5)P₃. Ambas proteínas, por tanto, reducen los niveles de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática, y por ello, son posibles candidatos para la reducción de dicho fosfolípido inducida por la activación de Rac1.

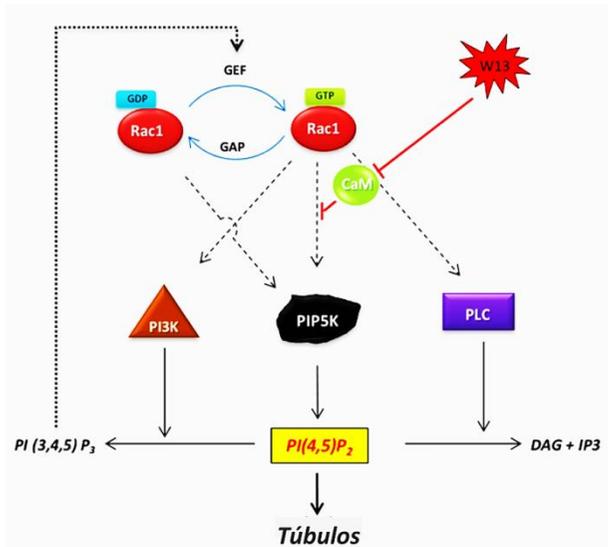


Figura 12. Metabolismo de PI(4,5)P₂ controlado por Rac1. Rac1 es capaz de reclutar PIP5K a la membrana tanto en su forma activa como inactiva, incrementando los niveles de PI(4,5)P₂. La CaM inhibe la interacción entre Rac1 y PIP5K, por lo que su inhibición con W13 aumenta PI(4,5)P₂. Los enzimas PLC y PI3K solo pueden ser activados por Rac1-GTP, disminuyendo el PI(4,5)P₂ allá donde Rac1 es activo. El producto de la PI3K (PI(3,4,5)P₃) puede a su vez activar algunas GEF de Rac1, lo que genera un bucle de retroalimentación positiva. El equilibrio entre estos enzimas controla el nivel de PI(4,5)P₂ y puede determinar la aparición de túbulos.

3.1.1. Papel de la PI3K

Para determinar si la activación de PI3K es responsable de la inhibición de las tubulaciones por parte del Rac1 constitutivamente activo, se expresó en células COS1 el marcador de membrana GFP-Mem (ctrl) o el GFP-Rac1G12V de manera transitoria. Después de 24 horas de expresión y una hora de ayuno, las células fueron tratadas con wortmanina (WTM), un inhibidor químico de la PI3K (figura 13). El tratamiento con WTM indujo tubulaciones en células que expresaban GFP-Mem en un grado similar al tratamiento con W13, debido posiblemente a un aumento de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática. Sin embargo, este efecto fue de nuevo inhibido por la expresión del Rac1 activo, lo que sugiere que esta forma de Rac1 inhibe las tubulaciones de una manera independiente de PI3K.

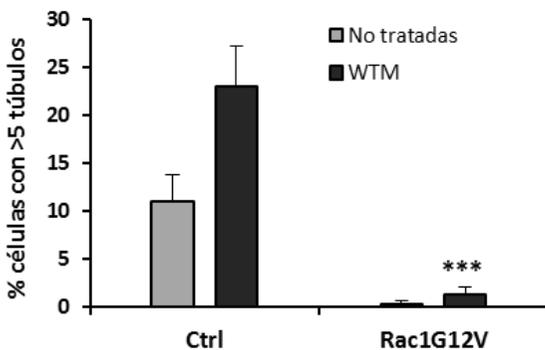


Figura 13. La inhibición de las tubulaciones por parte de Rac1G12V es independiente de PI3K. Células COS1 que expresaban el marcador GFP-Mem (ctrl) o GFP-Rac1G12V fueron tratadas o no con WTM (20 min, 1 μM) a 37°C. Se muestra la media ± SEM del porcentaje de células con túbulos de 4 experimentos independientes (n = 100 células). La significancia estadística de las diferencias entre células que expresaban GFP-Mem y GFP-Rac1G12V fue determinada mediante el test t-Student ***p<0.001.

3.1.2. Papel de la PLC

El análisis del papel de la PLC en la inhibición de las tubulaciones por parte de Rac1G12V fue abordado mediante dos estrategias diferentes. Por un lado se utilizó el compuesto U73122, un inhibidor específico de PLC, y por otro, se diseñaron y expresaron los mutantes F37A (A37) y W56A (A56) del Rac1G12V, que habían sido descritos anteriormente como deficientes en la activación de la PLC¹⁹⁷. Conviene recordar en este punto que la expresión de la forma activa de Rac1 reducía el número de células con túbulos de un 10% a un 1% aproximadamente a nivel basal (en ausencia de drogas como el W13) (figura 14A, ctrl GFP-Mem). El tratamiento con U73122 de células COS1 que expresaban GFP-Rac1G12V indujo un aumento significativo de células con túbulos respecto a las mismas células sin tratar, alcanzando alrededor de un 10%. Asimismo, las células que expresaban los mutantes del Rac1G12V deficientes en la activación de PLC, el GFP-Rac1G12V-A37 y el GFP-Rac1G12V-A56, mostraron un número similar de células con túbulos. Estos resultados sugieren que la activación de la PLC por parte de Rac1 juega un papel en la inhibición de los túbulos a nivel control, posiblemente debido a una reducción en los niveles de PI(4,5)P₂.

Sería interesante conocer el efecto del inhibidor de PLC combinado con el W13, sobre células que expresan el Rac1 activo, pero desgraciadamente dicho tratamiento produjo invariablemente una muerte celular inmediata, por lo que fue imposible evaluar su efecto sobre las tubulaciones.

En cambio, sí pudimos llevar a cabo la inhibición de la CaM en células que expresaban los mutantes deficientes en la activación de PLC, así como la sobreexpresión de la PIP5K (figura 14B). En el caso de las células que expresaban el mutante A37 del Rac1 activo, tanto el tratamiento con W13 como la sobreexpresión de la PIP5K indujeron tubulaciones hasta un nivel similar al de células que no expresan el Rac1 activo. Este resultado sugería un papel clave de la PLC en la inhibición del efecto del W13, además de su importancia a nivel control comentada anteriormente. Sin embargo, sorprendentemente, no ocurrió lo mismo en células que expresaban el mutante A56, sobre las que ambos tratamientos no produjeron efecto alguno respecto a la situación control (figura 14B). Esta aparente contradicción descarta que la PLC sea el único efector de Rac1 involucrado en el

efecto inhibitor sobre los túbulos inducidos por el aumento de PI(4,5)P₂, y nos condujo a la búsqueda de algún elemento diferencial entre los mutantes A37 y A56 del Rac1 activo. Estas posibles diferencias se analizarán en los siguientes apartados.

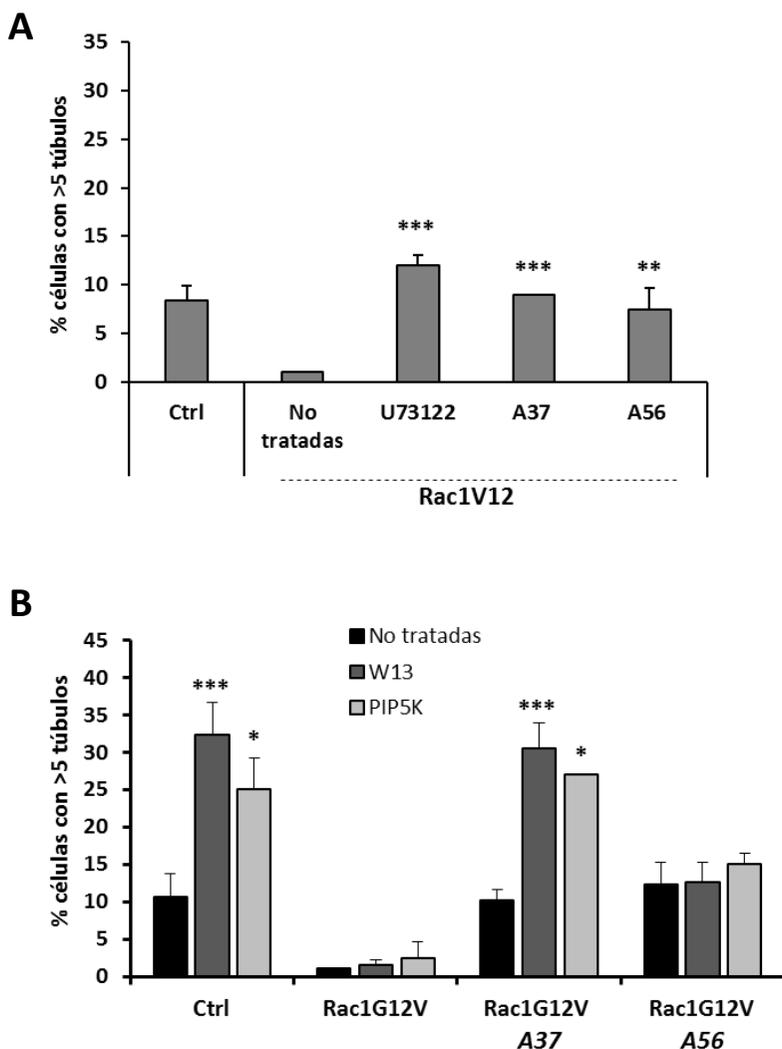


Figura 14. La activación de la PLC por parte de Rac1 es importante, pero no suficiente, para la inhibición de los túbulos. (A) Células COS1 fueron transfectadas con GFP-Mem (ctrl), GFP-Rac1G12V o con los mutantes GFP-Rac1G12V-A37 y -A56. Las células GFP-Rac1G12V fueron tratadas con U73122 (20 min, 5 μ M) a 37°C, y se cuantificó su efecto sobre las tubulaciones, comparado con el control o con las células GFP-Rac1G12V-A37 y -A56 sin tratamiento. **(B)** Células COS1 que expresaban GFP-Mem (ctrl), GFP-Rac1G12V o los mutantes -A37 y -A56, fueron tratadas con W13 (20 min, 5 μ g/ml) o co-transfectadas con Cherry-PIP5K, y se determinó el número de células con túbulos en cada condición. Se muestra la media \pm SEM de 4 experimentos independientes (n=100 células). La significancia estadística entre los tratamientos y sus respectivos controles fue determinada mediante el test t-Student *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

3.2. Regulación del citoesqueleto y su importancia en la formación o inhibición de las tubulaciones

Hasta ahora hemos mostrado como la inhibición de la CaM puede estar modulando los niveles de PI(4,5)P₂, y como esto induce la formación de una red tubular. Además hemos comprobado como la activación constitutiva de Rac1 inhibe dicha red y hemos analizado la implicación, en esta inhibición, de los efectores de Rac1 relacionados con el metabolismo de PI(4,5)P₂, concluyendo que la activación de la PLC contribuye de manera importante a la reducción de las tubulaciones. No obstante, encontramos en este último punto argumentos a favor de la existencia de otros efectores que están participando en la acción del Rac1 activo, y que son independientes de la PLC. Como hemos descrito en la última parte del apartado anterior, mientras el mutante A56 del Rac1 activo impide la formación de túbulos tras el incremento de PI(4,5)P₂, el mutante A37 no es capaz de hacerlo. Es por tanto probable que existan efectores que puedan ser activados por el primero y no por el segundo, y que estén directamente implicados en la inhibición de los túbulos (figura 15). Como mostrarán los resultados en los siguientes apartados, algunos defectos del mutante A37 hallados en la literatura están directamente relacionados con su incapacidad de regular el citoesqueleto, y relacionan estrechamente a éste con la inhibición de las tubulaciones por el Rac1 activo.

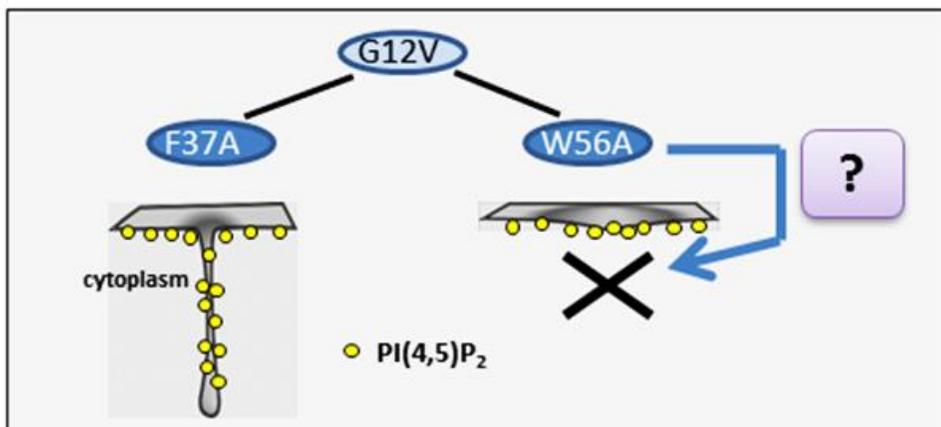


Figura 15. Los mutantes Rac1G12V deficientes en la activación de PLC responden de manera diferente ante el incremento de PI(4,5)P₂. Tras un aumento de PI(4,5)P₂, el mutante A56 inhibe la formación de túbulos de manera independiente de PLC, sugiriendo la existencia de otros factores, que pueden estar impidiendo las tubulaciones, y cuya activación no puede ser llevada a cabo por el mutante A37, que es sensible al incremento de PI(4,5)P₂.

3.2.1. Rac1G12V-A37 y Rac1G12V-A56 actúan diferencialmente sobre el citoesqueleto de actina

Rac1 constitutivamente activo tiene un gran impacto sobre el citoesqueleto de actina, inhibiendo la formación de fibras de estrés³⁷¹ y regulando su dinámica para formar ondulaciones de membrana o lamelipodios³⁷². Las diferencias observadas en la respuesta de los mutantes A37 y A56 de Rac1 activo frente al aumento de PI(4,5)P₂ durante la formación de túbulos, puede estar relacionada con la regulación del citoesqueleto, ya que se han descrito deficiencias en la unión de ROCK1 y POR1 (también conocida como arfaptina2) por parte del mutante Rac1G12V-A37. Debido a que estos dos efectores están directamente relacionados con la reordenación de la actina y la miosina, es probable que exista una implicación directa de la dinámica del citoesqueleto en el proceso de tubulación. Para evaluar en primer lugar si existen diferencias generales en el grado de afectación sufrido por el citoesqueleto de actina bajo la expresión de cada mutante de Rac1, se transfectó GFP-Rac1G12V, GFP-Rac1G12V-A37 o GFP-Rac1G12V-A56 en células Vero, que, a diferencia de las células COS1, presentan una robusta red de actina filamentososa (F-actina) fácilmente observable mediante técnicas de inmunofluorescencia. Tras 24 horas de expresión, las células fueron fijadas y permeabilizadas, y la F-actina fue detectada mediante la incubación con faloidina marcada con rodamina (figura 16). Mientras los mutantes GFP-Rac1G12V y GFP-Rac1G12V-A56 modificaron notablemente el citoesqueleto de actina, anulando las fibras de estrés e incrementando la actina cortical, el GFP-Rac1G12V-A37 no produjo efectos apreciables. Este impacto diferencial de los mutantes sobre la actina nos llevó a estudiar con mayor detalle la posible implicación de la F-actina en la regulación de los túbulos de membrana.

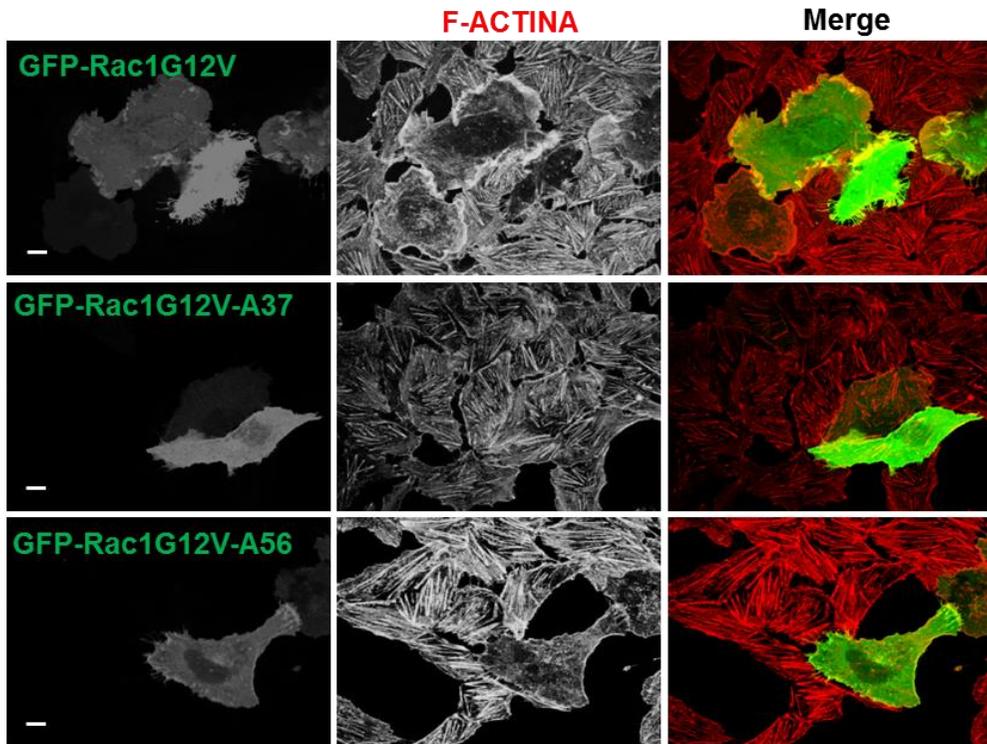


Figura 16. Los mutantes A37 y A56 del Rac1 activo actúan diferencialmente sobre el citoesqueleto de actina. Se muestran imágenes de microscopía confocal de células COS-1 transfectadas con GFP-Rac1G12V, GFP-Rac1G12V-A37 o GFP-Rac1G12V-A56. La F-actina fue detectada mediante la incubación con faloidina marcada fluorescentemente (Barras, 10 μ m).

3.2.2. La despolimerización de actina permite la formación de túbulos en presencia de Rac1 activo

Para evaluar la importancia de la actina en este proceso, utilizamos la latrunculina A, compuesto que provoca la disrupción de la F-actina previniendo el ensamblaje de los monómeros de actina. Células COS1 que expresaban GFP-Rac1G12V o GFP-Rac1G12V-A56 fueron tratadas con esta droga en presencia o ausencia de W13 (figura 17). La inhibición de la F-actina permitió la formación de túbulos en presencia de W13, atenuando la acción del Rac1G12V y anulando por completo el efecto del Rac1G12V-A56. Por tanto, podemos concluir que, además de la PLC, el Rac1 activo requiere de la polimerización de actina para impedir la formación de los túbulos.

Por otro lado, estos resultados también indican que la polimerización de actina no es necesaria para la elongación de las invaginaciones de membrana y la formación

de los túbulos. Para dicha elongación es posible que la célula utilice los microtúbulos (MTs). El requerimiento de este elemento del citoesqueleto ya fue demostrada en trabajos previos de nuestro grupo, por lo que durante esta tesis se analizó la implicación de los MTs en el transporte de las estructuras tubulares hacia el interior de la célula.

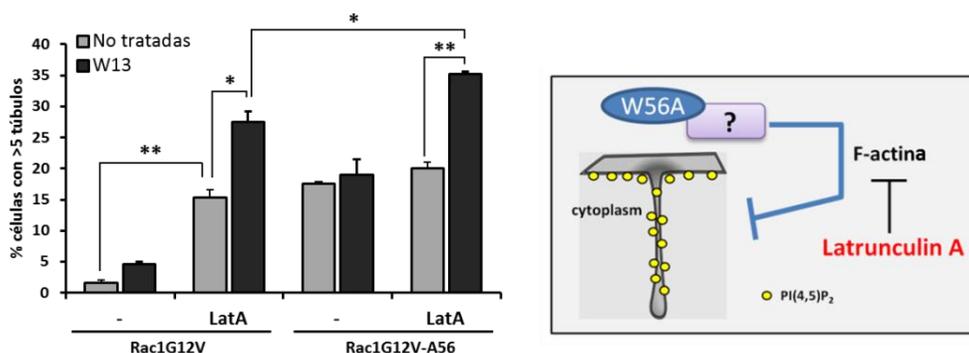


Figura 17. El citoesqueleto de F-actina es clave en la regulación de los túbulos por Rac1. Cuantificación de células con túbulos en presencia o ausencia de W13, tras el tratamiento con latrunculina A (200 nM, 20 min). La significancia estadística entre los tratamientos fue determinada mediante el test *t*-Student $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.2.2.1. Papel del citoesqueleto de tubulina en la formación de los túbulos

Resultados publicados por nuestro grupo describían otro factor clave en la aparición de los túbulos inducidos por PI(4,5)P₂: los MTs. Este elemento del citoesqueleto es necesario para la elongación y/o mantenimiento de los túbulos de membrana inducidos por W13, ya que el tratamiento con nocodazol, un agente despolimerizador de microtúbulos, abolía las tubulaciones¹³⁵. Esto podría indicar que los túbulos utilizan la red de MTs como andamiaje para moverse desde la membrana plasmática hacia la zona perinuclear. Tal como se ha comentado en la introducción, el transporte de vesículas y estructuras tubulares de membrana a lo largo del citoesqueleto se produce mediante proteínas motoras. En el caso de los MTs, estas proteínas pueden ser dineínas, que recorren los MTs desde el extremo “+” hacia el extremo “-”, lo que frecuentemente se traduce en un transporte desde la periferia hacia el centro de la célula, y las quinesinas, que recorren los MTs en sentido opuesto.

Con el objetivo de caracterizar mejor el papel de los MTs y confirmar que los túbulos inducidos por PI(4,5)P₂ son dirigidos hacia el centro de la célula a través de ellos, valiéndose por tanto de las dineínas, células COS1 que expresaban el marcador GFP-Mem fueron tratadas con EHNA, un inhibidor específico de estas proteínas motoras (figura 18). Al igual que ocurría con el tratamiento con nocodazol, la inhibición de las dineínas abolió la aparición de los túbulos desde la membrana plasmática. Estos resultados sugieren que tras la invaginación inicial, el túbulo podría servirse directamente de los MTs, interaccionando con ellos a través de la dineína, para elongarse y dirigirse hacia el interior de la célula.

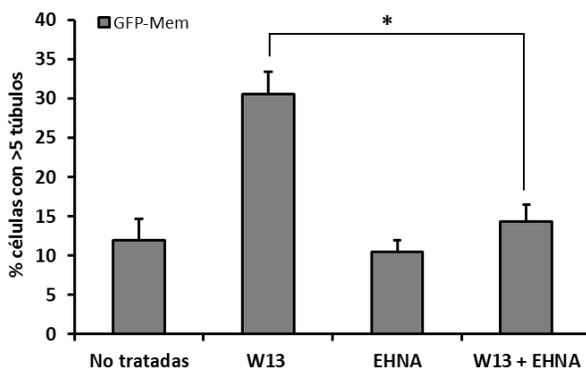


Figura 18. El transporte retrógrado a lo largo de los microtúbulos es esencial para la elongación de los túbulos de membrana. Cuantificación del número de células con túbulos. Células COS1 fueron transfectadas con el marcador de membrana GFP-Mem y tratadas con W13 (20 min, 5 µg/ml), con EHNA (6 horas, 1 mM) o con ambos. Se muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes (n=100). La significancia estadística entre los tratamientos y sus respectivos controles fue determinada mediante el test t-Student p<0.05.

3.2.3. Participación de cortactina

Un posible candidato para la inhibición de las tubulaciones por Rac1 a través de la polimerización de actina es la cortactina, una proteína monomérica que se encuentra en el citoplasma y que puede ser activada por estímulos externos para promover la polimerización y el reordenamiento del citoesqueleto de actina, especialmente de la actina cortical³³⁷. Anteriormente mencionamos algunos trabajos referentes al mutante A37 del Rac1G12V y a su incapacidad para interaccionar con ROCK1 y POR1^{373,374}. En otro estudio, se describe la incapacidad de este mismo mutante para translocar la cortactina a la membrana plasmática³³⁸. Se ha descrito una importante implicación de la cortactina en la endocitosis y la dinámica de la membrana^{72,339,375}. Además, existe una interrelación entre la dinamina y la propia cortactina durante diversos procesos endocíticos, y como

hemos descrito en el capítulo I, la dinamina está implicada en la formación de la red tubular inducida por PI(4,5)P₂. Todo ello convierte a la cortactina en otro probable elemento diferencial entre el mutante A37 y el A56 del Rac1 activo, que podría estar implicado en la inhibición de los túbulos por parte del Rac1 activo, a través de la regulación del citoesqueleto.

3.2.3.1. Translocación de la cortactina a la periferia celular inducida por Rac1

Tal como se ha comentado, se ha descrito que, a diferencia de células que expresan el Rac1 activo, la cortactina no es translocada al córtex celular en células que expresan el mutante A37 del Rac1 activo. Para averiguar si el mutante G12V-A56 era capaz de inducir la translocación de la cortactina, se llevó a cabo un experimento de inmunocitofluorescencia. Células COS1 fueron transfectadas con cada uno de los tres mutantes unidos a GFP. Después de 24 horas de expresión y

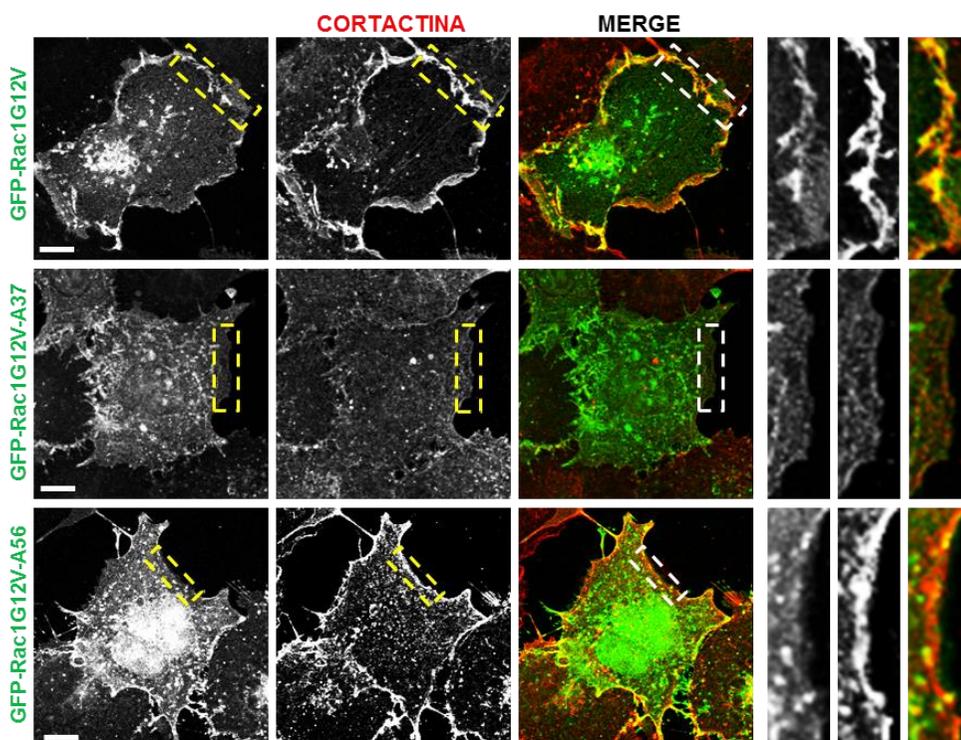


Figura 19. La expresión del mutante GFP-Rac1G12V-A56 provoca la translocación de la cortactina a la membrana plasmática. Células COS1 que expresaban GFP-Rac1G12V, GFP-Rac1G12V-A37 o GFP-Rac1G12V-A56, fueron fijadas y la cortactina endógena fue detectada por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa-555. (Barras, 10 μ m).

una hora de ayuno, las células fueron fijadas y permeabilizadas y la cortactina fue detectada con un anticuerpo específico (figura 19). La cortactina se localizó claramente en la zona periférica de las células que expresaban los mutantes GFP-Rac1G12V y GFP-Rac1G12V-A56, pero no así en las que expresaban GFP-Rac1G12V-A37. Este resultado confirma la observación descrita en el estudio antes comentado ³³⁸, e indica que el mutante G12V-A56 es capaz de translocar la cortactina de la misma manera que el G12V, lo que convierte la capacidad de translocación de la cortactina en otro elemento diferencial entre ambos mutantes del Rac1 activo deficientes en la activación de la PLC.

3.2.3.2. La cortactina es necesaria en la inhibición de los túbulos por parte del Rac1 activo

Con el fin de dilucidar si la cortactina, y su translocación a la membrana plasmática, estaban relacionados en última instancia con la capacidad para impedir la formación de túbulos por parte del Rac1 activo, se transfectaron células COS1 con GFP-Rac1G12V-A56, en presencia o ausencia de expresión transitoria de cortactina salvaje o de cortactina- Δ HPSH3, que actúa como dominante negativo de la cortactina endógena al poder interactuar con la actina pero no con otros elementos necesarios para su correcto funcionamiento, tales como la dinamina, o con proteínas implicadas en la reordenación del citoesqueleto de actina, como Arp2/3. Después de 24 horas de expresión, las células fueron tratadas con W13, y se cuantificó el número de células que presentaban túbulos (figura 20). La sobreexpresión de la cortactina salvaje no tuvo efectos sobre la capacidad del GFP-Rac1G12V-A56 para inhibir los túbulos inducidos por W13, pero la expresión del dominante negativo de cortactina si disminuyó significativamente su capacidad para impedir la formación de redes tubulares.

Estos resultados sugieren que la cortactina está participando, probablemente a través de la polimerización de actina, en la inhibición de las estructuras tubulares inducidas por el incremento de PI(4,5)P₂.

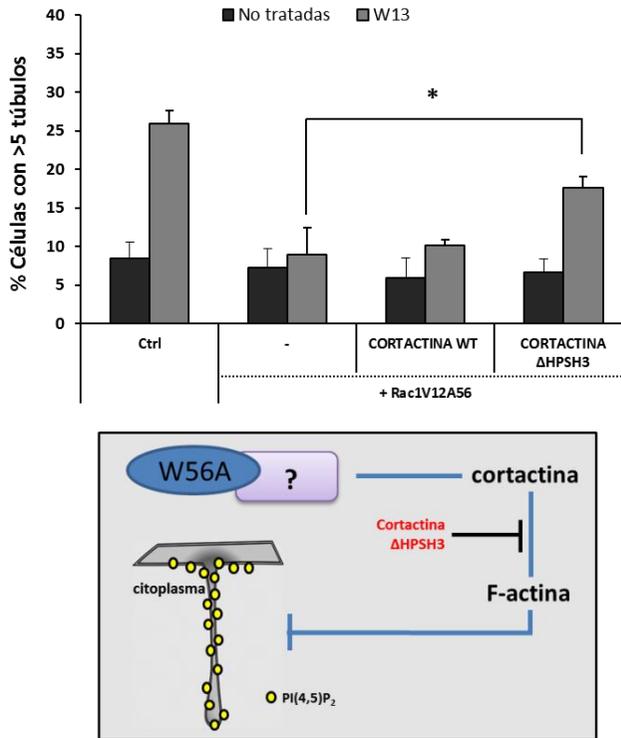


Figura 20. Rac1 inhibe las tubulaciones a través de la cortactina. Cuantificación de tubulaciones en presencia o ausencia de W13 en células transfectadas con el marcador Cherry-Mem (Ctrl), o co-transfectadas con GFP-Rac1G12V-A56 y cortactina-WT o cortactina-ΔHPSH3. Se muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes (n=100). La significancia estadística entre los tratamientos y sus respectivos controles fue determinada mediante el test *t*-Student $p < 0.05$.

3.2.3.3. La translocación de cortactina a la periferia celular inducida por Rac1 requiere POR1

Para averiguar que factor está implicado, corriente abajo de Rac1, en la translocación de cortactina al córtex celular, nos basamos en primer lugar en observaciones y especulaciones ya comentadas, realizadas por Lamarche *et al*, Weed *et al* y Joneson *et al*^{338,373,374}, en las cuales se describe la incapacidad del mutante A37 del Rac1 activo para interactuar con ROCK1 y POR1 *in vitro*, aunque la capacidad para unir PAK, el mejor estudiado de los efectores de Rac1, permanecía intacta.

ROCK1 es una quinasa asociada a la GTPasa RhoA³⁷⁴, y está implicado en la regulación de la actomiosina corriente abajo de la vía de señalización de RhoA y hasta el momento no existe ningún estudio que demuestre una activación directa de

ROCK1 por parte de Rac1. Por su parte, POR1 es una proteína de unión a Rac1 necesaria para la formación de ondulaciones de membrana ¹⁷⁹ y para el reordenamiento del citoesqueleto de actina dependiente de Rac1 ¹⁸². Weed *et al* hipotetizan un posible papel de ROCK1 y/o POR1 en la translocación de cortactina a la membrana plasmática, lo que explicaría la incapacidad del mutante A37 para inducir dicha translocación.

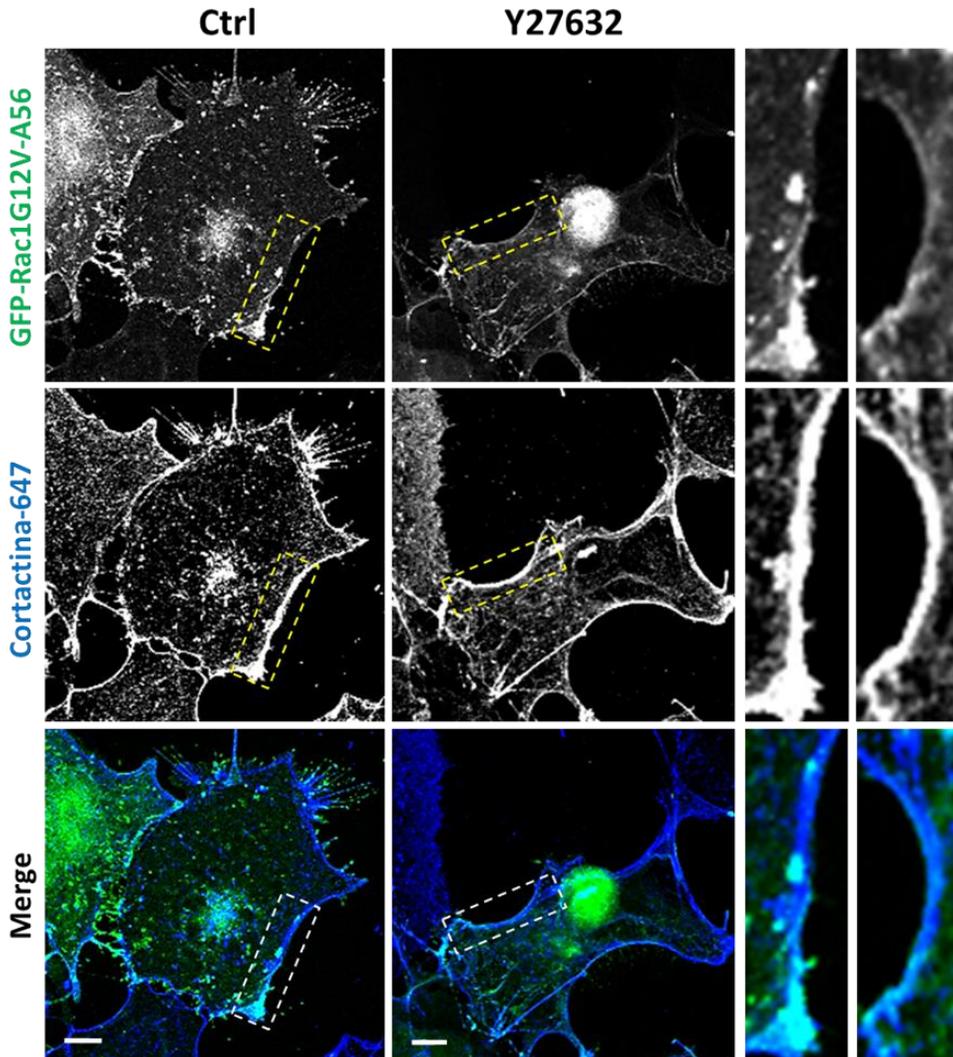


Figura 21. ROCK1 no es necesario para la translocación de cortactina a la membrana plasmática inducida por Rac1 activo. Células COS1 que expresaban GFP-Rac1G12V-A56 fueron tratadas con el inhibidor de ROCK1 Y27632 (20 min, 50 μ M), y la cortactina endógena fue detectada por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico. (Barras, 10 μ m).

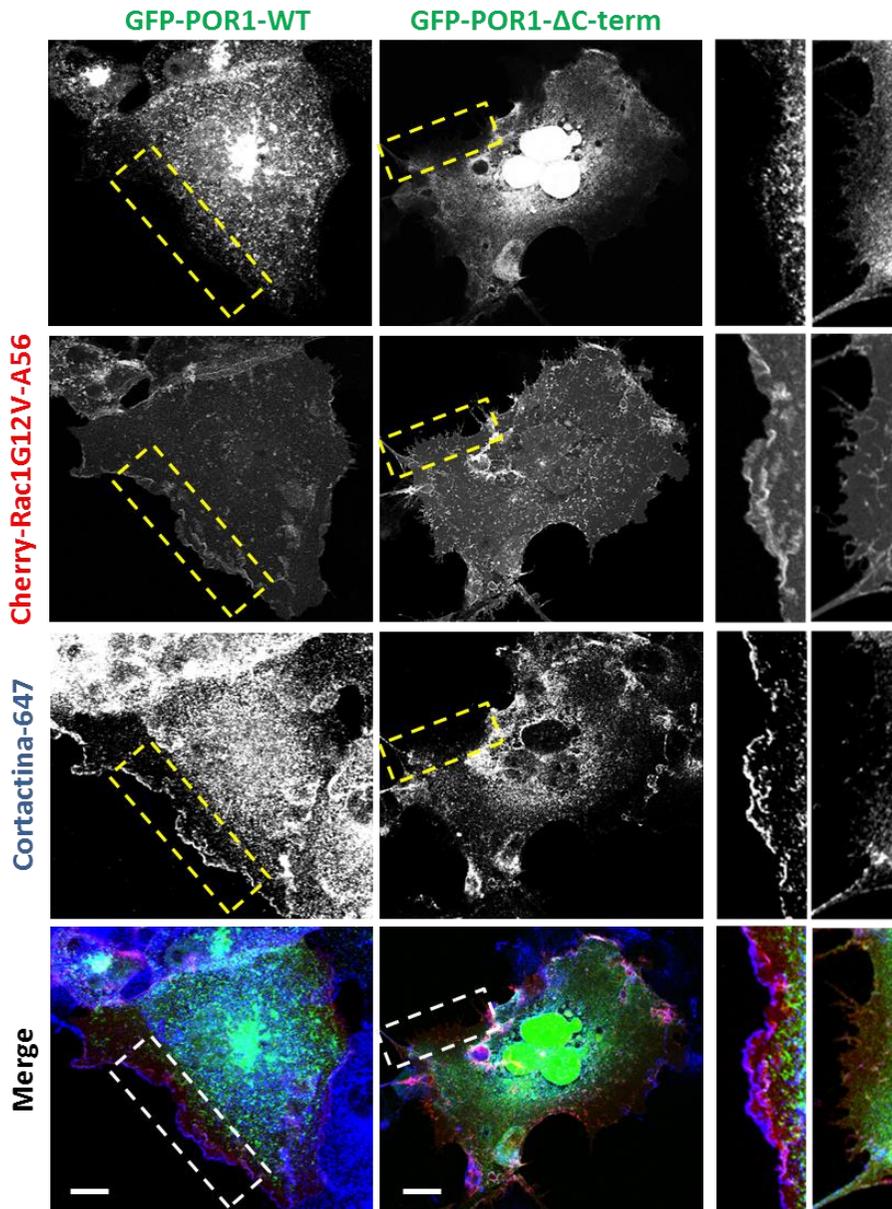


Figura 22. POR1 es necesaria para la translocación de cortactina a la membrana plasmática inducida por Rac1 activo. Células COS1 que co-expresaban Cherry-Rac1G12V-A56 y GFP-POR1-WT o GFP-POR- Δ C-term, fueron fijadas y la cortactina endógena fue detectada por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico, y un anticuerpo secundario Alexa-647. (Barras, 10 μ m).

En primer lugar, evaluamos la importancia de ROCK1 en la translocación de cortactina a la periferia celular por parte de Rac1. Para ello se detectó la cortactina mediante inmunofluorescencia en células que expresaban GFP-Rac1G12V-A56, en presencia o ausencia de Y27632, un inhibidor químico de ROCK1 (figura 21). Como

se aprecia en las imágenes, la inhibición de ROCK1 no afectó de forma apreciable a la translocación de cortactina por parte del Rac1G12V-A56, indicando que ROCK no está participando en la translocación de cortactina al córtex celular mediada por Rac1.

Para averiguar si Rac1 induce la translocación de cortactina a través de POR1, se llevó a cabo la detección de cortactina en células que co-expresaban Cherry-Rac1G12V-A56 y GFP-POR1-WT, la forma salvaje, o GFP-POR1- Δ C-term, con la delección del extremo C-terminal, que lo convierte presumiblemente en un dominante negativo de POR1 (figura 22). Las células que expresaban el GFP-POR1- Δ C-term mostraron una notable reducción de cortactina en la periferia, en comparación con células que expresaban la forma salvaje. Este resultado indica que POR1 está implicado en la translocación de cortactina dependiente de Rac1.

3.2.3.4. Rac1 impide las tubulaciones a través de POR1 y ROCK1

Como se mostró anteriormente, Rac1 induce la translocación de cortactina a la periferia celular, y esta proteína es necesaria para la inhibición de los túbulos tras el incremento de PI(4,5)P₂. Debido a que la translocación de cortactina depende de la acción de POR1, se procedió a testar el impacto de la inhibición de POR1 sobre las tubulaciones. Para ello se llevó a cabo un experimento con células COS1 que co-expresaban Cherry-Rac1G12V-A56 y GFP-POR1-WT o GFP-POR1- Δ C-term. Las células fueron tratadas o no con W13 (figura 23A). Los resultados muestran que la expresión de GFP-POR1- Δ C-term indujo un incremento significativo de las tubulaciones en presencia de W13, probablemente debido a la incapacidad de Rac1 para reclutar cortactina a la membrana plasmática.

Aunque ROCK1 no parece necesario para la translocación de cortactina a la periferia, y no se ha descrito hasta el momento su activación directa por Rac1, la incapacidad del mutante A37 del Rac1 activo para interaccionar con esta quinasa *in vitro*³⁷⁴ nos llevó a evaluar su importancia durante el proceso de tubulación inducido por W13. Para ello se expresó el mutante GFP-Rac1G12V-A56 en células COS1 durante 24 horas. Tras una hora de ayuno, las células fueron tratadas con W13 en presencia o ausencia del inhibidor químico de ROCK1, Y27632 (figura 23B). El tratamiento indujo la formación de tubulaciones en presencia de W13 hasta un nivel similar al observado en células que expresan el mutante G12V-A37 de

Rac1 tratadas con W13. La implicación directa de ROCK1 también fue evaluada por silenciamiento génico mediante la transfección de un RNA pequeño de interferencia (siRNA) específico para ROCK1. Se co-transfectaron células COS1 con GFP-

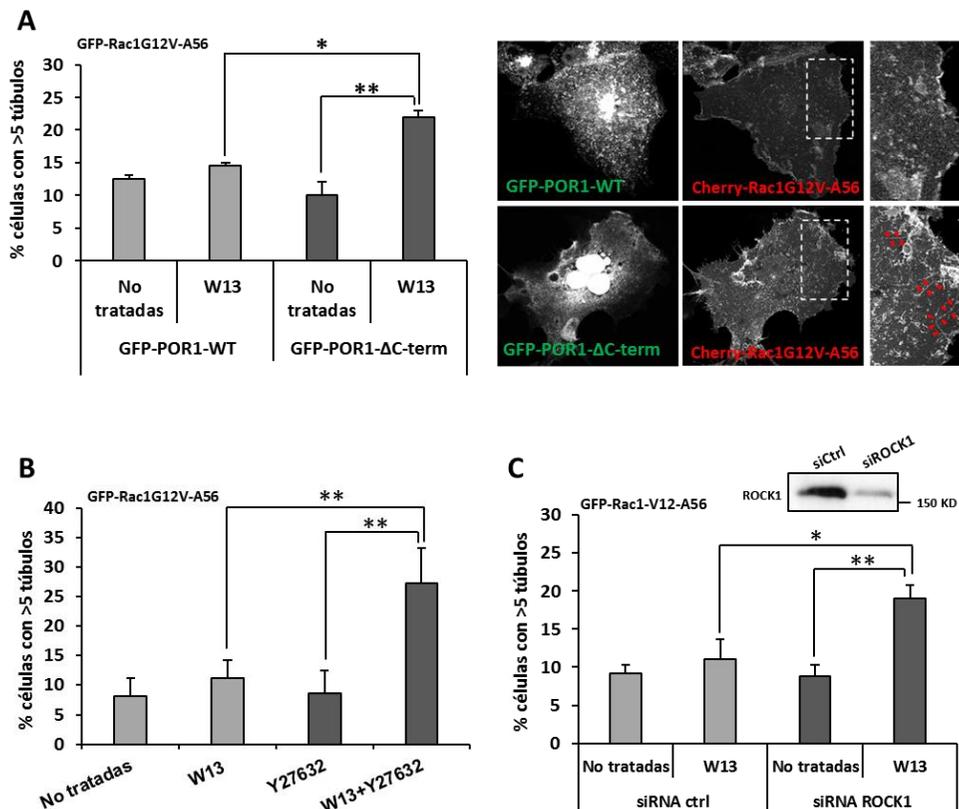


Figura 23. POR1 y ROCK1 son necesarios para la inhibición de los túbulos por parte de Rac1 activo. (A) Cuantificación del número de células COS1 transfectadas con GFP-Rac1G12V-A56 que presentaban túbulos antes y después del tratamiento con W13 (20 min, 5 µg/ml), en presencia de sobreexpresión de GFP-POR1-WT o GFP-POR1-ΔC-term. En el panel derecho se muestran imágenes de microscopía confocal representativas de los tratamientos con W13. Las puntas de flecha rojas indican la presencia de túbulos. **(B)** y **(C)** Células COS1 que expresaban GFP-Rac1G12V-A56 fueron tratadas, o no, con W13 (20 min, 5 µg/ml), en presencia o ausencia de Y27632 **(B)** o de siRNA de ROCK1 **(C)**. Se muestra la media ± SEM de 4 **(B)** o de 3 **(C)** experimentos independientes (n=100 células). La significancia estadística entre los tratamientos fue determinada mediante el test t-Student, $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Rac1G12V-A56 y con el siRNA de ROCK1 o un siRNA no específico como control negativo. Después de 48 horas, el silenciamiento de la expresión de ROCK1 fue verificado por *western blot* (figura 23C). Las células transfectadas fueron tratadas con W13 y se determinó el número de células con túbulos en cada condición (figura 23C). Las células con la expresión de ROCK1 inhibida, eran sensibles al

tratamiento con W13 y mostraban un nivel de tubulación similar a las células GFP-Rac1G12V-A56 tratadas con el inhibidor de ROCK1.

Con el fin de descartar que la acción de ROCK1 sobre los túbulos pudiera estar produciéndose a través de la vía de RhoA, su activador mejor conocido, se transfectaron células COS1 con el marcador Cherry-Mem en ausencia (células control) o presencia de los mutantes GFP-RhoAG14V o GFP-RhoAT19N, constitutivamente activo y dominante negativo de RhoA, respectivamente. Después de 24 horas de expresión, las células fueron incubadas en presencia o ausencia de W13, y se cuantificó el porcentaje de células con túbulos en cada condición (figura 24). La activación constitutiva de RhoA, y presumiblemente de ROCK1 corriente abajo de RhoA, no solo no inhibió las tubulaciones, sino que, por el contrario, produjo un aumento significativo del número de células con túbulos en presencia de W13, probablemente debido a la inhibición del Rac1 endógeno. Las células que expresaban el dominante negativo de RhoA no mostraron diferencias significativas respecto a las células control.

Estos resultados sugieren un papel clave de ROCK1, independiente de RhoA, en la inhibición de los túbulos por parte del Rac1 activo.

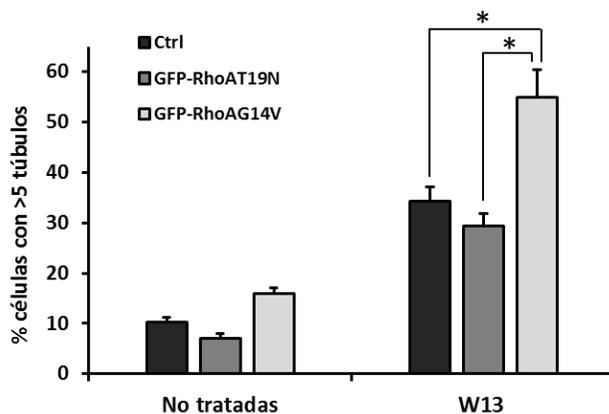


Figura 24. La inhibición de los túbulos por parte de ROCK1 es independiente de RhoA. Células COS1 que expresaban Cherry-Mem (ctrl), fueron tratadas, o no, con W13 (20 min, 5 μ g/ml) en presencia o ausencia de GFP-RhoAG14V o GFP-RhoAT19N. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (n=100 células). La significancia estadística fue determinada mediante el test *t*-Student $p < 0.05$.

3.2.4. Papel de ROCK1

Aunque nunca se ha descrito la activación directa de ROCK1 por parte de Rac1, y no parece que esta quinasa participe en la translocación de cortactina a la periferia celular inducida por la actividad de Rac1, ROCK1 tiene un papel importante durante

la inhibición de las tubulaciones inducidas por PI(4,5)P₂, actuando de una manera independiente de RhoA. Como ya se ha comentado, sí está descrita la interacción directa con Rac1, y la incapacidad del mutante Rac1G12V-A37 para unirse a ROCK1. En este apartado se analiza también la interacción de ROCK1 con el mutante Rac1G12V-A56, y la activación directa de ROCK1 por parte de cada mutante de Rac1 utilizados en este estudio. También se estudia la posible implicación de los factores del citoesqueleto corriente abajo de ROCK1 en la regulación de los túbulos.

3.2.4.1. Análisis de la interacción entre Rac1 y ROCK1 *in vivo* e *in vitro*

Con el objetivo de comprobar si existen diferencias en la interacción con ROCK1 entre los mutantes G12V, G12V-A37 y G12V-A56 de Rac1 *in vivo*, se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación (CoIP). Se expresaron en células COS1 los diferentes mutantes unidos a GFP, así como el vector GFP vacío como control negativo, durante 24 horas. Después de una hora de ayuno, las células fueron lisadas, y estos lisados incubados e inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-GFP. Más tarde se analizó mediante *western blot* la cantidad de ROCK1 endógeno co-inmunoprecipitado (figura 25A). De acuerdo con lo esperado, el GFP-Rac1G12V fue capaz de interactuar con ROCK1, y ocurría lo mismo con el mutante GFP-Rac1G12V-A56. En cambio, el mutante GFP-Rac1G12V-A37, así como el GFP vacío, no mostraron interacción con ROCK1. Debido a problemas técnicos, este experimento pudo llevarse a cabo una única vez, por lo que tuvo que ser confirmado mediante técnicas *in vitro*.

Se efectuaron ensayos de interacción *in vitro* mediante cromatografía de afinidad con glutatona-S transferasa (GST) conjugada con un fragmento de ROCK1 que incluye desde el aminoácido 725 al 1024 (GST-ROCK1 725-1024), en el que se encuentra el dominio de unión a la GTPasa RhoA (RBD). Debido al gran tamaño de la proteína, y por tanto a la dificultad para su clonaje y expresión, se excluyó gran parte del extremo N-terminal, que incluye la mayor parte del dominio quinasa de ROCK1, así como el extremo C-terminal que contiene el dominio *pleckstrin homology* (PH). Posteriormente, se expresaron los tres mutantes de Rac1-G12V unidos a GFP, además del GFP vacío como control negativo, en células COS1, que

tras 24 horas fueron lisadas, y estos lisados incubados con el fragmento de GST-ROCK1 purificado. El GFP-Rac1 unido a GST-ROCK1 725-1024 en cada caso fue detectado por *western blot* (figura 25B). Los resultados confirman la interacción de los mutantes G12V y G12V-A56 de Rac1 con ROCK1, y la incapacidad del G12V-A37 para unir dicha proteína. Esto convierte a ROCK1 en un buen candidato como elemento diferencial clave entre los mutantes A37 y A56, que podría también tener un papel clave en la diferencia durante la inhibición de los túbulos.

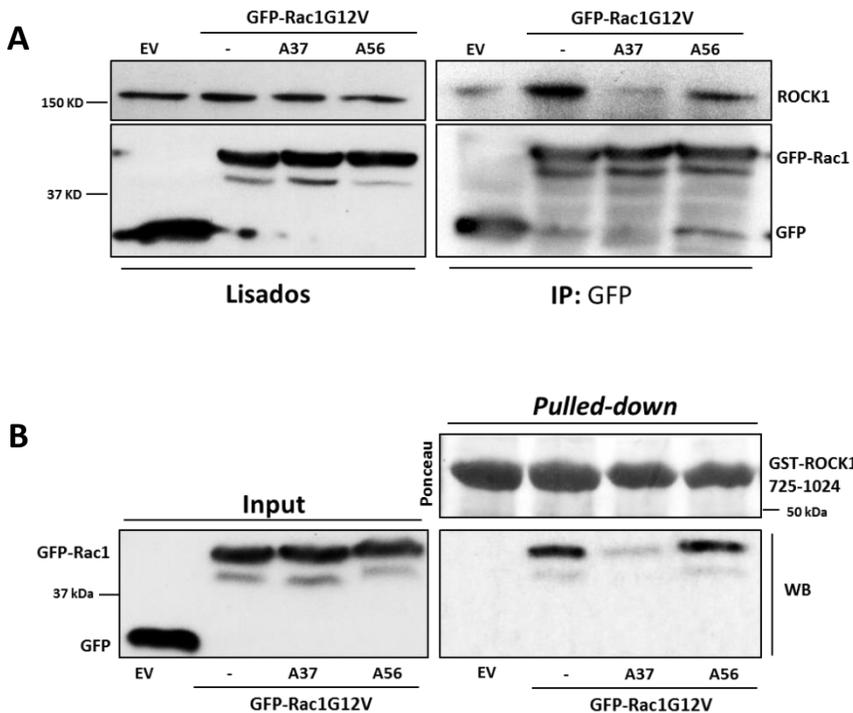


Figura 25. ROCK1 interacciona con Rac1G12V y Rac1G12V-A56, pero no con Rac1G12V-A37. Lisados de células COS1 que expresaban las proteínas recombinantes indicadas, fueron incubados con anticuerpo de conejo anti-GFP y más tarde con bolas magnéticas de proteína A para llevar a cabo una inmunoprecipitación (A), o incubados con GST-ROCK1 725-1024 purificado para llevar a cabo un *pull down* (B), tal como se describe en la sección Materiales y Métodos. La detección de ROCK1 endógeno y de los diferentes mutantes de GFP-Rac1 expresados se realizó mediante *western blot*, y la detección de GST-ROCK1 725-1024 mediante tinción de *Ponceau*. Se muestran experimentos representativos. (A, n=1; B, n=3; EV, *Empty Vector*; IP, inmunoprecipitación; WB, *western blot*).

3.2.4.2. ROCK1 es activado por Rac1, estimulando la vía de activación de la actomiosina

Uno de los principales sustratos fosforilables de ROCK1 es MYPT1 (residuos Thr696 y Thr853)³⁷⁶, que es la subunidad reguladora de la fosfatasa de la cadena

ligera de la miosina (MLCP)²²⁰. MYPT1 potencia la actividad de la subunidad fosfatasa de la MLCP, la PP1 cδ²²¹, y ello conlleva la defosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC), inhibiendo en última instancia la asociación entre la miosina y la actina. La fosforilación de los residuos Thr696 y Thr853 de MYPT1 induce la desactivación de la PP1 cδ, permitiendo de nuevo la asociación entre la miosina y la actina³⁷⁶.

Para confirmar que ROCK1 es activado directamente por Rac1, y que esta activación induce un efecto apreciable sobre MYPT1, y en consecuencia, sobre la miosina, se evaluó el nivel de fosforilación de la Thr696 de MYPT1. En primer lugar, se verificó que dicha fosforilación dependiese exclusivamente de ROCK1, mediante la transfección del siRNA de ROCK1 y la detección de la fosfo-Thr696-MYPT1 (p-MYPT1) por *western blot* con un anticuerpo específico (figura 26A). Los resultados muestran que la presencia de ROCK1 es necesaria para que se produzca la fosforilación de MYPT1. Posteriormente se transfectaron células COS1 con GFP-Rac1G12V, G12V-A37 o G12V-A56, así como con el GFP vacío como control negativo. Tras 24 horas de expresión, las células fueron lisadas, y los lisados analizados por *western blot*. De nuevo se detectaron los niveles de p-MYPT1 en cada caso (figura 26B). Las células que expresaban los mutantes G12V o G12V-A56 de Rac1 presentaban niveles significativamente más altos de p-MYPT1 que las que expresaban el mutante G12V-A37 o el GFP vacío. Estos niveles de fosforilación correlacionaban perfectamente con la capacidad de cada mutante de Rac1 para unir ROCK1 descrita anteriormente. Existen numerosos estudios que describen un antagonismo espacio-temporal entre Rac1 y RhoA, que como hemos dicho, es el principal activador de ROCK1, y se ha demostrado que Rac1 regula negativamente la actividad de RhoA³⁷⁷, lo cual descarta una posible implicación de la vía de RhoA en el aumento del nivel de fosforilación de MYPT1, describiéndose por primera vez una activación de ROCK1 dependiente de Rac1.

3.2.4.3. La miosina está implicada en la inhibición de los túbulos por el Rac1 activo

Debido a que la actividad de ROCK1 permite a la miosina asociarse al citoesqueleto de actina, y la actomiosina ha sido descrita como un elemento clave en algunos procesos de endocitosis y remodelación de la membrana plasmática³⁷⁸,

procedimos a evaluar el papel de la miosina en la inhibición de los túbulos por parte del Rac1 activo. Para ello, expresamos el GFP-Rac1G12V-A56 en células COS1, y

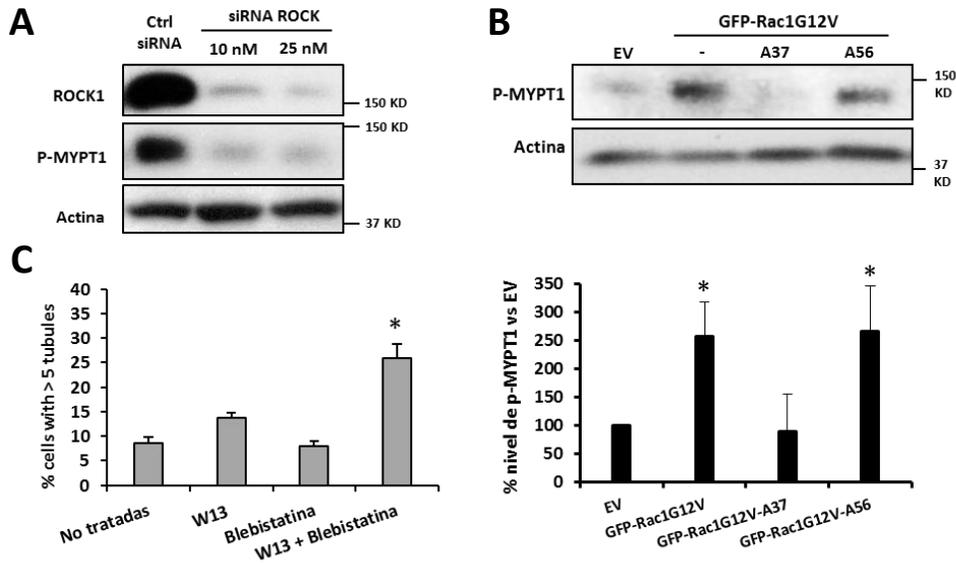


Figura 26. ROCK1 es activado por Rac1 y estimula la vía de activación de la miosina, necesaria para la inhibición de los túbulos. (A) Células COS1 fueron transfecadas con un siRNA contra ROCK1 a las concentraciones indicadas, o con un siRNA inespecífico como control negativo. Los lisados fueron analizados y los niveles de MYPT1 fosforilado fueron detectados por *western blot*. (B) En el panel superior se muestran los niveles de MYPT1 fosforilado detectados por *western blot* en células COS1 que expresaban GFP-Rac1G12V, GFP-Rac1G12V-A37, GFP-Rac1G12V-A56, o GFP como control negativo (EV). La cuantificación de estos niveles expresados en porcentaje respecto al control se muestra en el panel inferior (n=3). (C) Cuantificación del número de células COS1 transfecadas con GFP-Rac1G12V-A56 que presentaban túbulos después del tratamiento con W13 (20 min, 5 µg/ml), blebistatina (30 min, 50 µM) o W13+blebistatina. Se muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes (n=100 células). La significancia estadística entre los tratamientos y sus respectivos controles fue determinada mediante el test *t*-Student *p<0.05.

tras 24 horas de expresión, tratamos las células con blebistatina, inhibidor general de miosinas, en presencia o ausencia de W13 (figura 26C). De nuevo se repitió el patrón y en presencia de W13, las células cuya miosina estaba inhibida presentaron un nivel de tubulaciones similar a las células que expresan Rac1G12V-A37 tratadas con W13. Este resultado sugiere una implicación directa de la miosina en la inhibición de los túbulos.

El citoesqueleto de actomiosina puede estar inhibiendo las tubulaciones mediante al menos dos posibles mecanismos. Uno de ellos puede ser la formación de una

barrera de actomiosina subyacente a la membrana plasmática, que podría incrementar la tensión de la misma o bien impedir físicamente su invaginación inhibiendo la aparición de túbulos. Otra posibilidad es que la actividad de Rac1 estimule la reordenación del citoesqueleto, dando lugar a una escisión más eficiente de las invaginaciones, impidiendo igualmente la aparición y observación de los túbulos. Los resultados obtenidos en el capítulo II respecto a la internalización de la β 1-integrina sugieren que la actividad constitutiva de Rac1 podría estar impidiendo la invaginación de la membrana, reforzando la hipótesis del aumento de tensión de membrana o impedimento estérico para la formación de las invaginaciones.



DISCUSIÓN



1. Estudio de la implicación de Rac1 y PI(4,5)P₂ en la formación de los túbulos de membrana: regulación por CaM

Se sabe que la PIP5K puede ser direccionada hacia la membrana plasmática tanto por Rac1 activo como inactivo, incrementando los niveles de PI(4,5)P₂ en sitios específicos. De acuerdo con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio ¹³⁵, nuestros datos confirman que la CaM puede modular la interacción entre Rac1 y PIP5K, pues su inhibición aumenta esta interacción y puede estar aumentando la producción de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática. En trabajos previos, nuestro grupo ya había observado la formación de una red tubular procedente de la membrana plasmática, que parece formar parte de un proceso endocítico independiente de clatrina (CIE), observándose la presencia de PI(4,5)P₂ en estos túbulos. Los resultados obtenidos en esta tesis confirman que el aumento de este fosfolípido es la causa directa de la formación de las tubulaciones, pues la sobreexpresión de la PIP5K o la adición de PI(4,5)P₂ exógeno generan el mismo efecto que la inhibición de la CaM. Además del efecto sobre la PIP5K, la inhibición de CaM también permite la acción de las PKCs sobre algunos de sus sustratos ³³¹, incrementando la fosforilación de proteínas de unión a PI(4,5)P₂, como MARCKS, y su disociación de la membrana. Ello provocaría finalmente un aumento del PI(4,5)P₂ disponible en la membrana plasmática ^{117,379}. La fuerte reducción del porcentaje de células con túbulos tras la inhibición de PKC podría ser causada por esta razón, y son convenientes nuevos estudios que confirmen el papel de MARCKS u otras proteínas similares en el proceso.

Por tanto, los efectos observados tras la inhibición de la CaM, pero también los debidos a la expresión de PIP5K o la incubación con PI(4,5)P₂ exógeno, podrían ser explicados por una combinación de ambos factores: un incremento en la síntesis de PI(4,5)P₂ y a la vez un aumento de su accesibilidad para proteínas involucradas en la deformación y elongación de la membrana plasmática.

En trabajos previos del grupo, se demostró que la inhibición de Rac1, mediante la expresión de un mutante dominante negativo (Rac1T17N), era suficiente para generar la misma red tubular inducida por la inhibición de CaM, mientras que la

expresión de la forma activa de Rac1 (Rac1G12V), inhibía completamente las tubulaciones en presencia de W13. Ahora hemos comprobado que Rac1 activo también inhibe los túbulos inducidos por la adición de PI(4,5)P₂ exógeno o por la sobreexpresión de PIP5K.

En una situación fisiológica, la activación de la fosfolipasa C (PLC) por parte de Rac1 induciría la hidrólisis de PI(4,5)P₂, generando diacil-glicerol (DAG) e inositol-3-fosfato (IP₃). Este último actúa como segundo mensajero, y puede aumentar la concentración de Ca²⁺ citosólico, lo que a su vez activa la CaM, la cual puede activar Rac1 además de regular su interacción con PIP5K. La CaM puede incrementar la actividad de Rac1 por diversos mecanismos, como la activación de la CaM quinasa II (CaMKII), que puede activar a su vez GEFs de Rac1³⁸⁰, o la activación de la PI3K, que genera PI(3,4,5)P₃, fosfolípido capaz de inducir la activación de Rac1 a través de algunos de sus GEFs³⁸¹. Esto genera un bucle de retroalimentación positiva entre Rac1 y CaM, que puede ser interrumpido mediante el tratamiento con W13.

La importancia de PI(4,5)P₂ en la formación de los túbulos podría estar relacionada con el reclutamiento de proteínas capaces de remodelar la membrana plasmática. Por ejemplo, la GTPasa dinamina es reclutada por los PI(4,5)P₂, y como hemos visto en esta tesis, su presencia es necesaria para la formación de los túbulos. El incremento de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática induce la oligomerización de dímeros de dinamina, y a su vez, la oligomerización provoca un aumento en la afinidad de la dinamina por los PI(4,5)P₂. Aunque la función mejor descrita de la dinamina es la fisión de las invaginaciones de membrana para formar vesículas, algunos autores proponen que la dinamina podría provocar también la tubulación de la membrana plasmática dependiendo de la velocidad en la hidrólisis de GTP¹⁰¹. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la dinamina podría ser la responsable de la iniciación de la invaginación de la membrana después del incremento de PI(4,5)P₂ durante el proceso de tubulación, aunque su importancia en un posible proceso de escisión no puede ser descartada.

Algunas proteínas BAR contienen dominios PH de unión a PI(4,5)P₂, y son capaces de detectar, inducir y/o estabilizar la curvatura de la membrana. Los túbulos producidos por el tratamiento con W13 contienen PACSIN2, una proteína BAR que

es capaz de unirse a PI(4,5)P₂. También se aprecia la ausencia de túbulos PACSIN2-positivos en células que expresan el Rac1G12V. Algunos estudios indican que Rac1 regula la localización subcelular de PACSIN2, y que esta proteína participa en la vía de inactivación de Rac1³⁶⁵. Además, se han relacionado a las proteínas BAR con la acción de la dinamina durante la endocitosis, pues se ha descrito que el reclutamiento de las proteínas BAR depende de su unión a la dinamina localizada en los sitios de endocitosis¹⁰². Esta interacción puede modular la actividad GTPasa de la dinamina, lo cual vincula directamente dicha actividad con el grado de curvatura detectado o estabilizado por las proteínas BAR. Es posible que la dinamina colabore con PACSIN2 para iniciar, elongar y estabilizar los túbulos inducidos por el incremento de PI(4,5)P₂ (figura 28), aunque la contribución exacta de cada una de ellas, así como de otras proteínas BAR, debe ser determinada en futuros estudios.

Se sabe que Rac1 ejerce su acción en la membrana plasmática, y cuando es activo se encuentra localizado específicamente en las balsas lipídicas^{158,359,360}. Además, en nuestro laboratorio se describieron anteriormente diversos cargos que eran internalizados a través de las estructuras tubulares inducidas por la inhibición de la CaM, como el MHC-I, y se observó que la transferrina, un marcador típico de la endocitosis dependiente de clatrina (CDE), quedaba excluida de los túbulos¹³⁵. Se detectó también la presencia de Arf6 en estos túbulos, una GTPasa que regula algunos tipos de CIE⁶⁵. Al contrario que la CDE, las vías de CIE tienen lugar en las balsas lipídicas. En línea con estas observaciones, hemos confirmado que, tras la inhibición de la CaM, la aparición de los túbulos se produce por el aumento de PI(4,5)P₂ específicamente localizado en las balsas lipídicas. Todo ello sugiere un importante papel de la CaM en la modulación de los niveles de PI(4,5)P₂ en los dominios ordenados de membrana durante la CIE, a través de la regulación de Rac1, y quizás también de PKC. Este aumento de PI(4,5)P₂ permitiría la formación de invaginaciones con morfología tubular a través de proteínas de unión a PI(4,5)P₂, como dinamina o proteínas BAR, quizás como parte de un proceso rápido de internalización tanto de membrana plasmática como de proteínas de las balsas lipídicas.

2. Relevancia fisiológica de las tubulaciones de membrana

Como ya hemos comentado, PACSIN2 está presente en los túbulos, y se ha descrito que esta proteína puede asociarse con Rac1 para regular la migración y la adhesión celular³⁶⁵. La inhibición de la expresión de PACSIN2 aumenta la cantidad de Rac1-GTP, y promueve la migración dependiente de Rac1. La migración celular está finamente regulada por las RhoGTPasas y depende en gran medida de la formación y reciclaje de las adhesiones focales (FAs) (figura 27), de las que forman parte las integrinas. Existen numerosos estudios que demuestran una regulación recíproca entre Rac1 y las integrinas, siendo la relación con la β 1-integrina una de las más estudiadas. La β 1-integrina se asocia principalmente con la α 5-integrina, y se sabe que regula la polaridad epitelial a través de Rac1³⁶⁶. Además, se sabe que la actividad de Rac1 aumenta tras la sobreexpresión de β 1-integrina en células CHO²⁷⁹, y disminuye si se inhibe su expresión en células de Schwann³⁶⁷. Igualmente, la β 1-integrina es regulada positivamente mediante la formación de especies reactivas de oxígeno dependientes de Rac1 en cardiomiocitos³⁶⁸. La relación entre Rac1 y la β 1-integrina nos llevó a estudiar la influencia de las tubulaciones en la internalización de esta integrina.

Nuestros estudios indican que las tubulaciones inducidas por el aumento de PI(4,5)P₂ son una vía de internalización de la β 1-integrina. El tratamiento con W13 incrementa la tasa media de entrada de β 1-integrina respecto a las células no tratadas. Esto es debido fundamentalmente al incremento de células con túbulos en presencia de W13. Además, las células tratadas con W13 que no presentan tubulaciones también muestran un aumento significativo en la tasa de internalización respecto a las células control sin túbulos, aunque dicho aumento es poco importante en comparación al que exhiben las células con túbulos. No hemos obtenido datos sobre el tráfico de β 1-integrina en células con túbulos a tiempos largos de internalización, en los que el reciclaje de vuelta a la membrana plasmática dificultaría el estudio de su tasa de entrada. Sin embargo, nuestros datos demuestran una tasa de internalización de β 1-integrina unas 2.5 veces mayor en células con túbulos, respecto a células sin túbulos, tras 20 minutos. Hemos observado además la exclusión de parte de la β 1-integrina internalizada de la red

de endosomas tempranos en células que presentan túbulos, en comparación con células sin túbulos, después de 20 minutos de internalización, lo que indica una perturbación respecto al tráfico convencional de β 1-integrina. Todo esto sugiere que la red de túbulos inducida por el aumento de $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ puede ser una vía de entrada rápida, y que utiliza mecanismos distintos para el tráfico intracelular, al menos en los primeros estadios. W13 tampoco induce una mayor tasa de internalización de β 1-integrina en células que expresan Rac1G12V. Este dato confirma que Rac1 reduce las tubulaciones impidiendo su formación, y no escindiéndolas de manera más eficiente, y como comentaremos más adelante, refuerza la hipótesis de la sobre-activación local de actomiosina como mecanismo de inhibición de las tubulaciones por el Rac1 activo, impidiendo la invaginación de la membrana plasmática. De hecho, diversos estudios muestran que Rac1 regula algunos tipos de CIE, controlando la macropinocitosis, la vía de CLIC/GEEC, la entrada del IL-2R (*Interleukine-2 Receptor*) o del AMF (*Autocrine motility factor*)^{30,175,382,383}. La reordenación del citoesqueleto de actina mediada por Rac1 y posiblemente por RhoA se ha demostrado esencial para que la internalización pueda llevarse a cabo^{385,386}. Por otro lado, se ha observado que la sobreexpresión del mutante constitutivamente activo de Rac1 puede inhibir la CDE, posiblemente al disminuir los niveles de $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ necesarios para esta vía de entrada³⁸⁴⁻³⁸⁶.

Las integrinas, presentes en las adhesiones focales, actúan de puente entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (MEC). Algunos estudios indican que la integrina es internalizada constantemente y que la función de dicha internalización es la de reciclar las integrinas más que la de degradarlas. Para que el reciclaje tenga lugar, las integrinas deben llegar a los compartimentos endocíticos tempranos, desde los cuales son dirigidos directamente a la membrana plasmática, generando un ciclo de reciclaje corto, o bien son llevados a los compartimentos de reciclaje, para volver a la membrana plasmática en un ciclo largo de reciclaje. La internalización de la β 1-integrina a través de los túbulos inducidos por $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, y la consecuente reducción de su presencia en los EEs, implica la exclusión de la integrina, al menos temporalmente, de los ciclos de reciclaje a la membrana plasmática, reduciendo por tanto la cantidad de integrina disponible para la unión a la MEC (figura 27). Durante la migración, la formación de túbulos inducidos por

PI(4,5)P₂ permitiría a la célula liberarse temporal y localmente de la MEC en zonas en retracción, como el borde posterior (figura 27).

La internalización y reciclaje de la integrina es crítica durante la migración o la regulación de la morfología celular, donde los anclajes de la célula a su entorno son claves. Una célula en migración necesita desensamblar las adhesiones focales en su parte posterior a la vez que genera nuevos anclajes en el borde anterior de avance. Rac1 y RhoA actúan antagónicamente en este aspecto. Rac1 promueve la formación y el recambio de adhesiones incipientes y facilita la asociación de estas adhesiones a las protrusiones generadas por la polimerización de actina dependiente de Rac1. Por el contrario, RhoA induce la maduración de las adhesiones focales y su asociación con fibras de estrés^{223,287}.

Como ya hemos comentado anteriormente, las propias integrinas pueden a su vez activar de forma diferencial a las diferentes RhoGTPasas. Por ejemplo, la sobreexpresión de β3-integrina aumenta la actividad de Rho y la formación de fibras de estrés, mientras que la sobreexpresión de β1-integrina incrementa la actividad de Rac1 y la formación de lamelipodios²⁷⁹. Se sabe que Rac1 se activa mayoritariamente en la región anterior de la célula en migración, mientras que RhoA presenta más actividad en el borde posterior. En la figura 27 se expone un modelo hipotético en el que la activación de Rac1 en el borde anterior de una célula migrante, y la consecuente inhibición de los túbulos, podría impedir la entrada rápida de proteínas como la β1-integrina, así como de la propia membrana plasmática. De hecho, como se ha comentado en el capítulo III de resultados, la activación de RhoA facilita la formación de túbulos inducidos por PI(4,5)P₂, lo que podría provocar una mayor entrada en el borde posterior, donde RhoA es más activo, y en el que las adhesiones deben disociarse de la MEC y la membrana debe ser retraída y reciclada hacia otras localizaciones. Ezratty *et al* describen que el desensamble de las adhesiones focales precisa de altos niveles de actividad Rho, además de la acción de la dinamina y los MTs²⁹⁵. La dinamina podría contribuir a la eliminación de las integrinas y otros elementos de las adhesiones focales de la membrana plasmática, y los MTs podrían ser necesarios para el transporte de las estructuras endocíticas hacia el interior de la célula, además de contribuir directamente al aumento de la actividad GTPasa de la dinamina³⁸⁷. El estudio de Ezratty *et al* sugiere también que la función de la dinamina es necesaria para la

migración celular direccionada. Todo ello está en consonancia con los resultados obtenidos durante esta tesis, ya que, como hemos descrito en los capítulos I y III, los MTs y la dineína, que transporta material hacia el centro de la célula a lo largo de los MTs, así como la acción de dinamina, son esenciales para la aparición de las estructuras tubulares (figura 27).

Por tanto, es posible que la polarización de una célula en migración, y la consecuente regulación espacio-temporal de Rac1 y RhoA, determine la inducción local de tubulaciones en el borde posterior y su inhibición en el borde anterior, en coordinación con la regulación de los niveles de PI(4,5)P₂ por parte de la CaM. Dichos niveles podrían modular la acción de la dinamina y de las proteínas BAR. Todo ello daría como resultado un reciclaje rápido de FAs en el borde de avance, y una exclusión local y temporal de las integrinas de la superficie celular en el borde posterior en retracción (figura 27). Futuros experimentos deben confirmar que la polarización de la actividad de las RhoGTPasas durante la migración determina realmente la distribución de las tubulaciones, y que éstas regulan la migración celular. A continuación, se discutirá sobre los posibles mecanismos a través de los cuales Rac1 inhibe la formación de túbulos, y por tanto, la entrada de β1-integrina a través de esta vía de internalización.

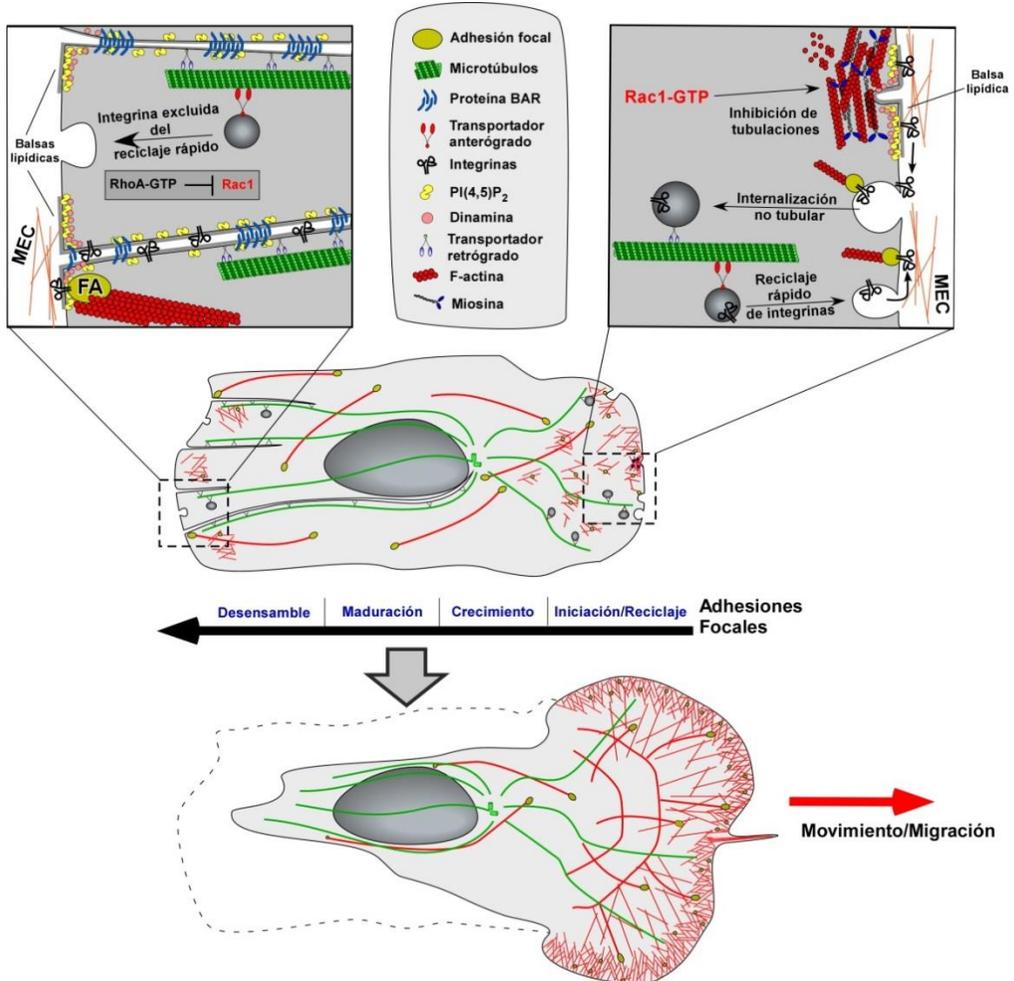


Figura 27. Modelo hipotético del posible papel de las tubulaciones en el reciclaje de integrinas y la migración celular direccional. Durante la migración, la célula debe extenderse hacia delante, reciclando y produciendo nuevas adhesiones a la MEC, y retraer a su vez la parte posterior, desensamblando las adhesiones. Durante el proceso, las AFs atraviesan diferentes fases de maduración, desde su formación y reciclaje rápido en el borde de avance, pasando por un crecimiento y maduración, hasta su desensamblado en el borde posterior. Esto permite el direccionamiento en el desplazamiento de la célula. El proceso viene determinado en gran medida por la polarización en el estado de activación de las RhoGTPasas RhoA y Rac1, lo que permite una regulación polarizada de la dinámica del citoesqueleto de actina. RhoA es activo principalmente en la parte posterior, favoreciendo la formación de fibras de estrés, que pueden actuar como soporte mecánico para la retracción de la célula. Por su parte, Rac1 se activa principalmente en el borde anterior, permitiendo la polimerización de actina y la formación de estructuras específicas como los lamelipodios, que favorecen la extensión de la membrana. La baja actividad de Rac1 en el borde posterior, junto con una alta actividad de RhoA, podría permitir la formación de túbulos de membrana, y la internalización rápida de las integrinas, favoreciendo el desensamblado de las AFs e impidiendo el reciclaje rápido de las integrinas para formar nuevas adhesiones (cuadro ampliado de la izquierda). Por otro lado, el aumento de la actividad de Rac1 en el extremo anterior puede inhibir la internalización tubular, favoreciendo el endocitosis de integrinas a través de otras vías, permitiendo así la renovación rápida de las adhesiones focales (cuadro ampliado de la derecha). La regulación espacio-temporal de los niveles de PI(4,5)P₂ durante la migración, y su relación con la regulación de las RhoGTPasas y el reclutamiento de integrinas en el borde anterior, ha sido ampliamente descrita (revisado por Thapa & Anderson, 2012³⁸⁸). La regulación local de los niveles de PI(4,5)P₂ en las balsas lipídicas, además de la acción de MTs y proteínas con dominios BAR como PACSIN2, podrían favorecer la inducción o inhibición de los túbulos endocíticos en diferentes momentos y lugares de la célula.

3. Regulación de las tubulaciones por parte de Rac1: maquinaria molecular implicada

Nuestros resultados demuestran una clara participación de la PLC en la inhibición de los túbulos por parte de Rac1, probablemente al reducir los niveles de PI(4,5)P₂. Sin embargo, experimentos con mutantes de Rac1 deficientes en la activación de PLC (Rac1G12V-A37 y Rac1G12V-A56), indican la presencia de otros mecanismos, pues el mutante Rac1G12V-A56 puede inhibir los túbulos aún después del aumento de PI(4,5)P₂. Esto nos ha permitido encontrar elementos del citoesqueleto involucrados en la regulación de las tubulaciones corriente abajo de Rac1. Para ello, nos hemos servido del mutante A56 del Rac1 activo como herramienta, ya que carece de la actividad PLC, que impediría el incremento local de PI(4,5)P₂ en las zonas donde Rac1G12V está presente. Al mismo tiempo, a diferencia del mutante A37, el mutante A56 es capaz de activar otros efectores que impiden la formación de túbulos, aun después del incremento de PI(4,5)P₂. Por tanto, este mutante nos permite diseccionar los factores corriente abajo de Rac1, e independientes de PLC, involucrados en la inhibición de los túbulos y estudiar su relevancia en el proceso.

El citoesqueleto juega un papel primordial en todas las vías de internalización y las RhoGTPasas dirigen su reordenación, en especial de la F-actina. La expresión de los mutantes de Rac1 analizados en esta tesis afecta de manera distinta a la organización del citoesqueleto de actina. Mientras los mutantes G12V y G12V-A56 inhiben por completo las fibras de estrés, el G12V-A37 no induce ningún cambio apreciable sobre el citoesqueleto de actina. Los resultados obtenidos con los tratamientos con latrunculina A (LatA) indican que el Rac1 activo impide la aparición de tubulaciones no solo a través de la disminución de los niveles de PI(4,5)P₂ sino también mediante la polimerización de actina. Aunque el nivel de tubulaciones inducidas por W13 aumenta fuertemente en células que expresan Rac1G12V en presencia de LatA, dicho aumento es significativamente mayor en células que expresan Rac1G12V-A56. Esto otorga un papel relevante tanto a la polimerización de actina como a la activación de PLC durante la regulación de los túbulos; el balance entre ambos elementos determinaría la dinámica de las tubulaciones. Asimismo, no se puede descartar que la disrupción masiva de la F-actina (LatA) modifique la tensión de la membrana plasmática, facilitando la tubulación o

modificando el umbral a partir del cual los niveles de PI(4,5)P₂ desencadenan la invaginación.

Los resultados de los experimentos con LatA sugieren además que la polimerización de actina no representa la fuerza motriz necesaria para la elongación y direccionamiento de los túbulos. Como se ha comentado en el apartado anterior, es probable que dicha fuerza sea proporcionada por los MTs y sus proteínas asociadas. En trabajos previos del grupo se determinó que la despolimerización de los MTs inhibía las tubulaciones de membrana. En este trabajo se ha descrito que la dineína, que transporta elementos desde la periferia de la célula a lo largo de los MTs es necesaria para su aparición, lo que sugiere que esta proteína motora es la responsable de la fuerza motriz necesaria para la elongación y direccionamiento de los túbulos hacia el centro de la célula. Un trabajo reciente describe como las dineínas y el complejo dinactina proporcionan la fuerza mecánica necesaria para la tubulación de la membrana plasmática durante la CIE¹³⁸. Además, el citoesqueleto de actina podría actuar como una barrera entre la membrana y los microtúbulos. De hecho, se ha descrito que la despolimerización de de actina permite la formación de túbulos de membrana dependientes de MTs³⁸⁹.

Uno de los principales factores que inducen la polimerización de actina dependiente de Rac1 es la cortactina, que es además uno de los elementos moduladores de la dinámica de actina más importantes durante la endocitosis^{72,174}. Se ha descrito ampliamente el papel de la cortactina tanto en la CDE como en la CIE, y su asociación con la dinamina para llevar a cabo los procesos de endocitosis. La dinamina puede interactuar, a través de su dominio PRD, con el dominio SH3 de la cortactina, haciendo de puente entre los procesos de membrana y el citoesqueleto de actina. Esta asociación, junto con la importancia de la dinamina en la generación de las tubulaciones inducidas por PI(4,5)P₂, y la implicación de la polimerización de actina en su inhibición, convierten a la cortactina en uno de los posibles factores regulados por Rac1 responsables de la inhibición de las tubulaciones. La translocación de la cortactina a la membrana plasmática dependiente de la actividad Rac1 fue descrita por Weed *et al*³³⁸. Los autores demostraron además la ausencia de dicha translocación en células que expresaban el mutante G12V-A37 de Rac1. Nuestros resultados confirman estos datos, y demuestran que la expresión del mutante Rac1G12V-A56, al igual que el

Rac1G12V, induce la translocación de cortactina a la periferia celular. Los experimentos con el dominante negativo de cortactina sugieren además que la acción de esta proteína es necesaria para la inhibición de los túbulos. Es probable por tanto que la importancia de la F-actina en dicha inhibición venga determinada por la translocación de la cortactina a la periferia celular dependiente de Rac1. La dinamina, que podría ser reclutada a las balsas lipídicas tras el incremento de PI(4,5)P₂, podría asociarse a la cortactina cuando Rac1 está activo, y facilitar la polimerización de actina durante el inicio de la tubulación.

Weed *et al* y otros autores proponen dos posibles efectores de Rac1 (POR1, también conocida como arfaptina2, y ROCK1), como responsables de la translocación de cortactina, basándose en la incapacidad del mutante A37 del Rac1 activo para interactuar con estas proteínas^{338,373,374}. Nuestros resultados sugieren que tanto POR1 como ROCK1 son necesarios para la inhibición de las tubulaciones por el rac1 activo. Sin embargo, únicamente POR1 es requerido para la translocación de cortactina. POR1 es una proteína con dominio BAR, y por tanto es capaz de detectar, generar y estabilizar curvatura en las membranas celulares. Se ha descrito que POR1 se asocia a membranas con alto grado de curvatura, y puede inducir la tubulación solo si se encuentra en altas concentraciones³⁹⁰. Desde su descubrimiento como proteína de unión a Rac1, POR1 ha sido también relacionado con Arf1, 3 y 5, y se cree que podría ser un factor de regulación entre las vías de señalización de Rac1 y Arf¹⁸¹⁻¹⁸³. Se ha demostrado que la cara cóncava de un dímero de POR1 constituye un sitio de unión para Rac1, y que POR1 es necesario para la formación de estructuras relacionadas con la F-actina dependientes de Rac1, como las ondulaciones de membrana^{179,183}. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales POR1 regula la translocación de cortactina a la periferia celular están todavía por determinar, y pueden ser objeto de estudio en próximas investigaciones.

Como ya hemos comentado, nuestros resultados indican que ROCK1 también es necesario para que Rac1G12V puede impedir la formación de tubulaciones inducidas por PI(4,5)P₂. Ya se había descrito que el mutante Rac1G12V-A37 no interacciona con ROCK1 *in vitro*³⁷⁴. En esta tesis hemos confirmado este dato tanto *in vitro* como *in vivo*, y hemos demostrado que el mutante Rac1G12V-A56, al igual que el Rac1G12V, si puede interactuar con ROCK1. Además, los resultados

obtenidos *in vitro* sugieren que la interacción podría producirse a través del dominio de unión a RhoA (RBD), ya que la proteína de fusión diseñada carece del dominio quinasa y de los dominios en el extremo C-terminal, por lo que no serían necesarios para la unión.

ROCK1 está relacionado sobre todo con la inducción de la actomiosina en la vía de RhoA. No obstante, nuestros estudios sugieren por primera vez una activación directa de ROCK1 por parte de Rac1, de manera independiente de RhoA. Aunque la acción de Rac1 y RhoA es a menudo antagónica, ya se han descrito diversos efectores compartidos por ambas GTPasas, activados en momentos y/o lugares diferentes para producir efectos antagónicos en varios procesos celulares, como es el caso de PRK1 y PRK2^{240,241}. Es probable que Rac1 y RhoA compitan por la unión a ROCK1. De esta forma, los diferentes estados de activación de ambas RhoGTPasas en distintos lugares de la célula, podrían determinar localmente la activación de ROCK1 por una u otra. De hecho, pese a que, como ya hemos comentado, ROCK1 es necesario para la inhibición de las tubulaciones por parte de Rac1 activo, la expresión del RhoA constitutivamente activo (RhoAG14V) induce un incremento de las tubulaciones, lo que descarta una activación de ROCK1 por parte de RhoA en el proceso de inhibición. La activación de ROCK1 por Rac1 incrementa la fosforilación de MYPT1, y esto podría estar aumentando localmente la asociación de la miosina con el citoesqueleto de actina. Hemos visto además que la inhibición de miosina mediante blebistatina, un inhibidor general de las miosinas, permite la aparición de tubulaciones tras el incremento de PI(4,5)P₂ en células que expresan Rac1G12V-A56. Existen diversos estudios sobre el papel de la miosina en la endocitosis, en especial durante la CDE. La miosina II no muscular (MII) induce el reclutamiento de clatrina a las uniones adherentes, potenciando la endocitosis de cadherinas. La MII también contribuye a la curvatura de los CCVs en los primeros pasos de la CDE³⁹¹.

Todos nuestros datos permiten plantear la hipótesis de que Rac1 puede estar regulando la internalización de los túbulos mediante la coordinación de la miosina y

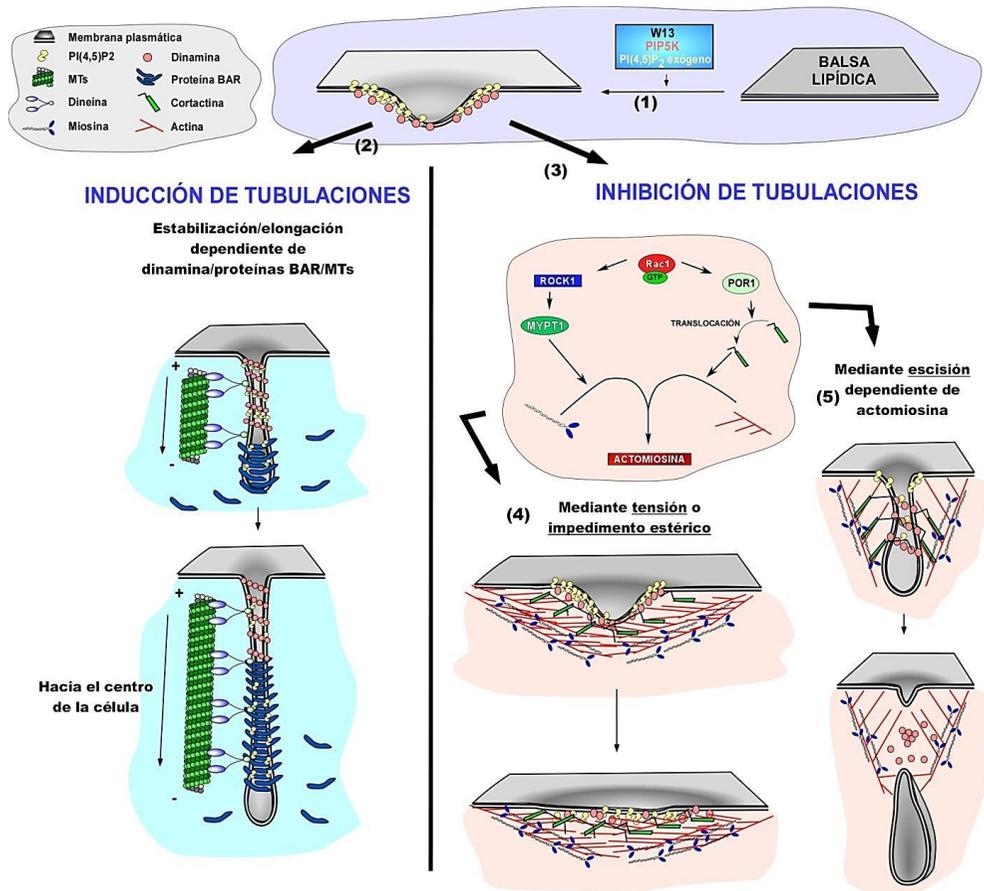


Figura 28. Maquinaria molecular implicada en la formación e inhibición de los túbulos. El incremento de PI(4,5)P₂ en las balsas lipídicas, debido a la sobreexpresión de la PIP5K, la adición de PI(4,5)P₂ exógeno o la inhibición de CaM (1), podría inducir el reclutamiento de dinamina y la curvatura e invaginación incipiente de la membrana plasmática. En ausencia de Rac1 activo (2), la invaginación es elongada mediante la acción de la dineína, que conduciría en sentido retrógrado el túbulo resultante a lo largo de los MTs. El PI(4,5)P₂ acumulado, así como el alto grado de curvatura, podría reclutar proteínas BAR como PACSIN2, permitiendo la estabilización de la estructura tubular. Cuando Rac1 está activo (3), éste puede activar POR1 y ROCK1, que a través de la translocación de cortactina y la fosforilación de MYPT1 pueden inducir el ensamblaje de la actomiosina. La cortactina podría asociarse con la dinamina tras el incremento de PI(4,5)P₂, e iniciar la polimerización de actina localmente. La sobreactivación de la actomiosina podría impedir la formación de túbulos mediante dos posibles mecanismos: la formación de una barrera que aumentaría la tensión de membrana y/o impediría estéricamente el reclutamiento de proteínas como PACSIN2 y otras proteínas BAR (4), o la generación de la fuerza mecánica para escindir la invaginación (5).

la actina (figura 28). Posiblemente mediante la acción de Rac1, POR1 podría direccionar la cortactina a las balsas lipídicas, donde los túbulos son inducidos. Ello permitiría la polimerización local de la actina. Al mismo tiempo, la activación de

ROCK1 y la consiguiente inactivación de MYPT1, potenciarían la asociación de la miosina con la F-actina. La sobreactivación local de las redes de actomiosina modificaría la tensión local de la membrana plasmática. De hecho, se ha descrito recientemente que una elevada actividad local de las redes de actomiosina puede inhibir la endocitosis durante el desarrollo de *Drosophila*³⁹². El citoesqueleto subyacente puede generar una elevada tensión en la membrana plasmática, o bloquear estéricamente el acceso de la maquinaria endocítica, inhibiendo de ambas formas la endocitosis^{393,394}. Sin embargo, además de este mecanismo, la reordenación del citoesqueleto mediada por Rac1 podría estar inhibiendo las tubulaciones mediante una escisión más eficiente de las invaginaciones, impidiendo igualmente la aparición y observación de los túbulos (figura 28). Los resultados obtenidos sobre la internalización de integrina, discutidos anteriormente, sugieren la validez de la hipótesis de la tensión de membrana y/o el impedimento estérico.

CONCLUSIONES



- La inhibición de CaM induce un aumento de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática al incrementar la interacción entre Rac1 y PIP5K.
- El aumento de PI(4,5)P₂ específicamente en las balsas lipídicas induce la formación de una red de túbulos endocíticos.
- La activación de PLC por Rac1 puede atenuar la formación de túbulos.
- Los túbulos inducidos por PI(4,5)P₂ son una vía de entrada de β1-integrina y aceleran su internalización.
- Rac1 y POR1 inducen la translocación de cortactina a la membrana plasmática.
- Rac1 puede activar ROCK1 de manera independiente de RhoA.
- Rac1 regula la formación de los túbulos modulando la red de actomiosina, mediante la acción de la cortactina y la activación directa de ROCK1.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Sigismund, S. *et al.* Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiological reviews* **92**, 273-366, doi:10.1152/physrev.00005.2011 (2012).
- 2 Roth, T. F. & Porter, K. R. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. *The Journal of cell biology* **20**, 313-332 (1964).
- 3 Pearse, B. M. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 1255-1259 (1976).
- 4 Goldstein, J. L., Anderson, R. G. & Brown, M. S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* **279**, 679-685 (1979).
- 5 Xing, Y. *et al.* Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *The EMBO journal* **29**, 655-665, doi:10.1038/emboj.2009.383 (2010).
- 6 Honing, S. *et al.* Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Molecular cell* **18**, 519-531, doi:10.1016/j.molcel.2005.04.019 (2005).
- 7 Henne, W. M. *et al.* FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* **328**, 1281-1284, doi:10.1126/science.1188462 (2010).
- 8 Kosaka, T. & Ikeda, K. Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *The Journal of cell biology* **97**, 499-507 (1983).
- 9 Taylor, M. J., Perrais, D. & Merrifield, C. J. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS biology* **9**, e1000604, doi:10.1371/journal.pbio.1000604 (2011).
- 10 Fujimoto, L. M., Roth, R., Heuser, J. E. & Schmid, S. L. Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic* **1**, 161-171 (2000).
- 11 Girao, H., Geli, M. I. & Idrissi, F. Z. Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals. *FEBS letters* **582**, 2112-2119, doi:10.1016/j.febslet.2008.04.011 (2008).
- 12 Massol, R. H., Boll, W., Griffin, A. M. & Kirchhausen, T. A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10265-10270, doi:10.1073/pnas.0603369103 (2006).

- 13 Cremona, O. *et al.* Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**, 179-188 (1999).
- 14 Milosevic, I. *et al.* Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron* **72**, 587-601, doi:10.1016/j.neuron.2011.08.029 (2011).
- 15 Sorkin, A. & von Zastrow, M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 609-622, doi:10.1038/nrm2748 (2009).
- 16 Morris, R. E., Gerstein, A. S., Bonventre, P. F. & Saelinger, C. B. Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation. *Infection and immunity* **50**, 721-727 (1985).
- 17 Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H. & van der Goot, F. G. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *The Journal of cell biology* **160**, 321-328, doi:10.1083/jcb.200211018 (2003).
- 18 Rust, M. J., Lakadamyali, M., Zhang, F. & Zhuang, X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nature structural & molecular biology* **11**, 567-573, doi:10.1038/nsmb769 (2004).
- 19 Veiga, E. *et al.* Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. *Cell host & microbe* **2**, 340-351, doi:10.1016/j.chom.2007.10.001 (2007).
- 20 Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. & Robinson, M. S. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *The Journal of cell biology* **162**, 909-918, doi:10.1083/jcb.200305145 (2003).
- 21 Anderson, R. G., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* **10**, 351-364 (1977).
- 22 Huang, F., Khvorova, A., Marshall, W. & Sorkin, A. Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *The Journal of biological chemistry* **279**, 16657-16661, doi:10.1074/jbc.C400046200 (2004).
- 23 Ferguson, S. S. *et al.* Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**, 363-366 (1996).
- 24 Scott, C. C. *et al.* Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *The Journal of cell biology* **169**, 139-149, doi:10.1083/jcb.200412162 (2005).
- 25 Ninomiya, N. *et al.* Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* **269**, 22732-22737 (1994).

- 26 Marshall, J. G. *et al.* Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *The Journal of cell biology* **153**, 1369-1380 (2001).
- 27 Tsuboi, S. & Meerloo, J. Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages. *The Journal of biological chemistry* **282**, 34194-34203, doi:10.1074/jbc.M705999200 (2007).
- 28 Fratti, R. A., Backer, J. M., Gruenberg, J., Corvera, S. & Deretic, V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *The Journal of cell biology* **154**, 631-644, doi:10.1083/jcb.200106049 (2001).
- 29 Lim, J. P. & Gleeson, P. A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and cell biology* **89**, 836-843, doi:10.1038/icb.2011.20 (2011).
- 30 Dharmawardhane, S. *et al.* Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Molecular biology of the cell* **11**, 3341-3352 (2000).
- 31 Kerr, M. C. & Teasdale, R. D. Defining macropinocytosis. *Traffic* **10**, 364-371, doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00878.x (2009).
- 32 Sandvig, K. & van Deurs, B. Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis. *The Journal of biological chemistry* **265**, 6382-6388 (1990).
- 33 Damke, H., Baba, T., van der Blik, A. M. & Schmid, S. L. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *The Journal of cell biology* **131**, 69-80 (1995).
- 34 Rothberg, K. G. *et al.* Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682 (1992).
- 35 Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J. & McNiven, M. A. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology* **141**, 85-99 (1998).
- 36 Sandvig, K., Pust, S., Skotland, T. & van Deurs, B. Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Current opinion in cell biology* **23**, 413-420, doi:10.1016/j.ceb.2011.03.007 (2011).
- 37 Singer, S. J. A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure. *Annals of the New York Academy of Sciences* **195**, 16-23 (1972).
- 38 van Meer, G. Lipid traffic in animal cells. *Annual review of cell biology* **5**, 247-275, doi:10.1146/annurev.cb.05.110189.001335 (1989).

- 39 Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K. & Parton, R. G. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 8655-8659 (1995).
- 40 Hansen, C. G., Bright, N. A., Howard, G. & Nichols, B. J. SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nature cell biology* **11**, 807-814, doi:10.1038/ncb1887 (2009).
- 41 Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M. & Helenius, A. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* **118**, 767-780, doi:10.1016/j.cell.2004.09.003 (2004).
- 42 Pelkmans, L. & Zerial, M. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* **436**, 128-133, doi:10.1038/nature03866 (2005).
- 43 Shaul, P. W. & Anderson, R. G. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *The American journal of physiology* **275**, L843-851 (1998).
- 44 Cheng, Z. J., Singh, R. D., Marks, D. L. & Pagano, R. E. Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids. *Molecular membrane biology* **23**, 101-110, doi:10.1080/09687860500460041 (2006).
- 45 Sharma, D. K. *et al.* The glycosphingolipid, lactosylceramide, regulates beta1-integrin clustering and endocytosis. *Cancer research* **65**, 8233-8241, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0803 (2005).
- 46 Schubert, W. *et al.* Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *The Journal of biological chemistry* **276**, 48619-48622, doi:10.1074/jbc.C100613200 (2001).
- 47 Kirkham, M. & Parton, R. G. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochimica et biophysica acta* **1745**, 273-286, doi:10.1016/j.bbamcr.2005.06.002 (2005).
- 48 Pelkmans, L., Puntener, D. & Helenius, A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**, 535-539, doi:10.1126/science.1069784 (2002).
- 49 Patel, H. H., Murray, F. & Insel, P. A. Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annual review of pharmacology and toxicology* **48**, 359-391, doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.121506.124841 (2008).
- 50 Pilch, P. F. *et al.* Cellular spelunking: exploring adipocyte caveolae. *Journal of lipid research* **48**, 2103-2111, doi:10.1194/jlr.R700009-JLR200 (2007).

- 51 Ritter, T. E., Fajardo, O., Matsue, H., Anderson, R. G. & Lacey, S. W. Folate receptors targeted to clathrin-coated pits cannot regulate vitamin uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3824-3828 (1995).
- 52 Borchelt, D. R., Taraboulos, A. & Prusiner, S. B. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *The Journal of biological chemistry* **267**, 16188-16199 (1992).
- 53 Diep, D. B., Nelson, K. L., Raja, S. M., Pleshak, E. N. & Buckley, J. T. Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *The Journal of biological chemistry* **273**, 2355-2360 (1998).
- 54 Ricci, V. *et al.* High cell sensitivity to *Helicobacter pylori* VacA toxin depends on a GPI-anchored protein and is not blocked by inhibition of the clathrin-mediated pathway of endocytosis. *Molecular biology of the cell* **11**, 3897-3909 (2000).
- 55 Kirkham, M. *et al.* Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *The Journal of cell biology* **168**, 465-476, doi:10.1083/jcb.200407078 (2005).
- 56 Chadda, R. *et al.* Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. *Traffic* **8**, 702-717, doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00565.x (2007).
- 57 Bhagatji, P., Leventis, R., Comeau, J., Refaei, M. & Silvius, J. R. Steric and not structure-specific factors dictate the endocytic mechanism of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *The Journal of cell biology* **186**, 615-628, doi:10.1083/jcb.200903102 (2009).
- 58 Lundmark, R. *et al.* The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Current biology : CB* **18**, 1802-1808, doi:10.1016/j.cub.2008.10.044 (2008).
- 59 Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R. G. & Mayor, S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Developmental cell* **2**, 411-423 (2002).
- 60 Howes, M. T. *et al.* Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *The Journal of cell biology* **190**, 675-691, doi:10.1083/jcb.201002119 (2010).
- 61 D'Souza-Schorey, C. & Chavrier, P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 347-358, doi:10.1038/nrm1910 (2006).
- 62 Paleotti, O. *et al.* The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 21661-21666, doi:10.1074/jbc.M503099200 (2005).

- 63 Nishiya, N., Kiosses, W. B., Han, J. & Ginsberg, M. H. An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nature cell biology* **7**, 343-352, doi:10.1038/ncb1234 (2005).
- 64 Radhakrishna, H. & Donaldson, J. G. ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *The Journal of cell biology* **139**, 49-61 (1997).
- 65 Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T. & Donaldson, J. G. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *The Journal of cell biology* **154**, 1007-1017, doi:10.1083/jcb.200103107 (2001).
- 66 Altschuler, Y. *et al.* ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of cell biology* **147**, 7-12 (1999).
- 67 Powelka, A. M. *et al.* Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic* **5**, 20-36 (2004).
- 68 Li, J. *et al.* Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation-dependent recycling of integrin beta1 to control cell migration. *Developmental cell* **9**, 663-673, doi:10.1016/j.devcel.2005.09.012 (2005).
- 69 Tushir, J. S. & D'Souza-Schorey, C. ARF6-dependent activation of ERK and Rac1 modulates epithelial tubule development. *The EMBO journal* **26**, 1806-1819, doi:10.1038/sj.emboj.7601644 (2007).
- 70 Verhey, K. J. & Hammond, J. W. Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 765-777, doi:10.1038/nrm2782 (2009).
- 71 Hartman, M. A., Finan, D., Sivaramakrishnan, S. & Spudich, J. A. Principles of unconventional myosin function and targeting. *Annual review of cell and developmental biology* **27**, 133-155, doi:10.1146/annurev-cellbio-100809-151502 (2011).
- 72 Sauvonnnet, N., Dujancourt, A. & Dautry-Varsat, A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. *The Journal of cell biology* **168**, 155-163, doi:10.1083/jcb.200406174 (2005).
- 73 Cao, H. *et al.* Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Molecular and cellular biology* **23**, 2162-2170 (2003).
- 74 Smythe, E. & Ayscough, K. R. Actin regulation in endocytosis. *Journal of cell science* **119**, 4589-4598, doi:10.1242/jcs.03247 (2006).
- 75 Cox, D. *et al.* Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nature cell biology* **4**, 469-477, doi:10.1038/ncb805 (2002).

- 76 Olazabal, I. M. *et al.* Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR, phagocytosis. *Current biology : CB* **12**, 1413-1418 (2002).
- 77 Hasson, T. Molecular motors: sensing a function for myosin-VIIa. *Current biology : CB* **9**, R838-841 (1999).
- 78 Komaba, S. & Coluccio, L. M. Localization of myosin 1b to actin protrusions requires phosphoinositide binding. *The Journal of biological chemistry* **285**, 27686-27693, doi:10.1074/jbc.M109.087270 (2010).
- 79 Collaco, A., Jakab, R., Hegan, P., Mooseker, M. & Ameen, N. Alpha-AP-2 directs myosin VI-dependent endocytosis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in the intestine. *The Journal of biological chemistry* **285**, 17177-17187, doi:10.1074/jbc.M110.127613 (2010).
- 80 Vale, R. D. Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annual review of cell biology* **3**, 347-378, doi:10.1146/annurev.cb.03.110187.002023 (1987).
- 81 Stephens, D. J. Functional coupling of microtubules to membranes - implications for membrane structure and dynamics. *Journal of cell science* **125**, 2795-2804, doi:10.1242/jcs.097675 (2012).
- 82 Gomez, T. S. & Billadeau, D. D. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Developmental cell* **17**, 699-711, doi:10.1016/j.devcel.2009.09.009 (2009).
- 83 Campellone, K. G., Webb, N. J., Znameroski, E. A. & Welch, M. D. WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* **134**, 148-161, doi:10.1016/j.cell.2008.05.032 (2008).
- 84 Ishizaki, T. *et al.* Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nature cell biology* **3**, 8-14, doi:10.1038/35050598 (2001).
- 85 Frost, A., Unger, V. M. & De Camilli, P. The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* **137**, 191-196, doi:10.1016/j.cell.2009.04.010 (2009).
- 86 Miaczynska, M. *et al.* APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* **116**, 445-456 (2004).
- 87 Lee, E. *et al.* Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* **297**, 1193-1196, doi:10.1126/science.1071362 (2002).
- 88 Ochoa, G. C. *et al.* A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *The Journal of cell biology* **150**, 377-389 (2000).

- 89 Takenawa, T. & Suetsugu, S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 37-48, doi:10.1038/nrm2069 (2007).
- 90 Karbowski, M., Jeong, S. Y. & Youle, R. J. Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *The Journal of cell biology* **166**, 1027-1039, doi:10.1083/jcb.200407046 (2004).
- 91 Wu, J. Q. *et al.* Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *The Journal of cell biology* **174**, 391-402, doi:10.1083/jcb.200602032 (2006).
- 92 Padrick, S. B. *et al.* Hierarchical regulation of WASP/WAVE proteins. *Molecular cell* **32**, 426-438, doi:10.1016/j.molcel.2008.10.012 (2008).
- 93 Itoh, T. & De Camilli, P. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochimica et biophysica acta* **1761**, 897-912, doi:10.1016/j.bbailp.2006.06.015 (2006).
- 94 Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A. & van der Bliek, A. M. C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Molecular cell* **4**, 815-826 (1999).
- 95 Thompson, H. M., Skop, A. R., Euteneuer, U., Meyer, B. J. & McNiven, M. A. The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis. *Current biology : CB* **12**, 2111-2117 (2002).
- 96 Haller, O. & Kochs, G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* **3**, 710-717 (2002).
- 97 Llorente, A., Rapak, A., Schmid, S. L., van Deurs, B. & Sandvig, K. Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus. *The Journal of cell biology* **140**, 553-563 (1998).
- 98 Ferguson, S. M. & De Camilli, P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 75-88, doi:10.1038/nrm3266 (2012).
- 99 Sweitzer, S. M. & Hinshaw, J. E. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* **93**, 1021-1029 (1998).
- 100 Stowell, M. H., Marks, B., Wigge, P. & McMahon, H. T. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nature cell biology* **1**, 27-32, doi:10.1038/8997 (1999).
- 101 Praefcke, G. J. & McMahon, H. T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 133-147, doi:10.1038/nrm1313 (2004).
- 102 Meinecke, M. *et al.* Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to

- GTP-dependent membrane scission. *The Journal of biological chemistry* **288**, 6651-6661, doi:10.1074/jbc.M112.444869 (2013).
- 103 Yoshida, Y. *et al.* The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *The EMBO journal* **23**, 3483-3491, doi:10.1038/sj.emboj.7600355 (2004).
- 104 Taylor, M. J., Lampe, M. & Merrifield, C. J. A feedback loop between dynamin and actin recruitment during clathrin-mediated endocytosis. *PLoS biology* **10**, e1001302, doi:10.1371/journal.pbio.1001302 (2012).
- 105 Palmer, S. E. *et al.* A dynamin-actin interaction is required for vesicle scission during endocytosis in yeast. *Current biology : CB* **25**, 868-878, doi:10.1016/j.cub.2015.01.061 (2015).
- 106 Schlunck, G. *et al.* Modulation of Rac localization and function by dynamin. *Molecular biology of the cell* **15**, 256-267, doi:10.1091/mbc.E03-01-0019 (2004).
- 107 Krueger, E. W., Orth, J. D., Cao, H. & McNiven, M. A. A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Molecular biology of the cell* **14**, 1085-1096, doi:10.1091/mbc.E02-08-0466 (2003).
- 108 Baldassarre, M. *et al.* Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Molecular biology of the cell* **14**, 1074-1084, doi:10.1091/mbc.E02-05-0308 (2003).
- 109 Weaver, A. M. *et al.* Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex. *Current biology : CB* **12**, 1270-1278 (2002).
- 110 Logothetis, D. E. *et al.* Phosphoinositide control of membrane protein function: a frontier led by studies on ion channels. *Annual review of physiology* **77**, 81-104, doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170358 (2015).
- 111 Shewan, A., Eastburn, D. J. & Mostov, K. Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, a004796, doi:10.1101/cshperspect.a004796 (2011).
- 112 Le Roy, C. & Wrana, J. L. Signaling and endocytosis: a team effort for cell migration. *Developmental cell* **9**, 167-168, doi:10.1016/j.devcel.2005.07.007 (2005).
- 113 Insall, R. H. & Weiner, O. D. PIP3, PIP2, and cell movement--similar messages, different meanings? *Developmental cell* **1**, 743-747 (2001).
- 114 Suh, B. C. & Hille, B. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Current opinion in neurobiology* **15**, 370-378, doi:10.1016/j.conb.2005.05.005 (2005).
- 115 Martin, T. F. PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Current opinion in cell biology* **13**, 493-499 (2001).

- 116 Naslavsky, N., Weigert, R. & Donaldson, J. G. Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Molecular biology of the cell* **14**, 417-431, doi:10.1091/mbc.02-04-0053 (2003).
- 117 Seykora, J. T., Myat, M. M., Allen, L. A., Ravetch, J. V. & Aderem, A. Molecular determinants of the myristoyl-electrostatic switch of MARCKS. *The Journal of biological chemistry* **271**, 18797-18802 (1996).
- 118 Swierczynski, S. L. & Blackshear, P. J. Myristoylation-dependent and electrostatic interactions exert independent effects on the membrane association of the myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate protein in intact cells. *The Journal of biological chemistry* **271**, 23424-23430 (1996).
- 119 Lippincott-Schwartz, J. Dynamics of secretory membrane trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1038**, 115-124, doi:10.1196/annals.1315.019 (2004).
- 120 Maxfield, F. R. & McGraw, T. E. Endocytic recycling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 121-132, doi:10.1038/nrm1315 (2004).
- 121 Bonifacino, J. S. & Rojas, R. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 568-579, doi:10.1038/nrm1985 (2006).
- 122 Luini, A., Ragnini-Wilson, A., Polishchuk, R. S. & De Matteis, M. A. Large pleiomorphic traffic intermediates in the secretory pathway. *Current opinion in cell biology* **17**, 353-361, doi:10.1016/j.ceb.2005.06.012 (2005).
- 123 Polishchuk, E. V., Di Pentima, A., Luini, A. & Polishchuk, R. S. Mechanism of constitutive export from the golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains. *Molecular biology of the cell* **14**, 4470-4485, doi:10.1091/mbc.E03-01-0033 (2003).
- 124 Massol, R. H., Larsen, J. E. & Kirchhausen, T. Possible role of deep tubular invaginations of the plasma membrane in MHC-I trafficking. *Experimental cell research* **306**, 142-149, doi:10.1016/j.yexcr.2005.01.021 (2005).
- 125 Marsh, B. J., Volkman, N., McIntosh, J. R. & Howell, K. E. Direct continuities between cisternae at different levels of the Golgi complex in glucose-stimulated mouse islet beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5565-5570, doi:10.1073/pnas.0401242101 (2004).
- 126 Polishchuk, R. S., Capestrano, M. & Polishchuk, E. V. Shaping tubular carriers for intracellular membrane transport. *FEBS letters* **583**, 3847-3856, doi:10.1016/j.febslet.2009.10.031 (2009).

- 127 Lee, M. C. *et al.* Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* **122**, 605-617, doi:10.1016/j.cell.2005.07.025 (2005).
- 128 Takei, K., Yoshida, Y. & Yamada, H. Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. *Journal of biochemistry* **137**, 243-247, doi:10.1093/jb/mvi052 (2005).
- 129 Lundmark, R., Doherty, G. J., Vallis, Y., Peter, B. J. & McMahon, H. T. Arf family GTP loading is activated by, and generates, positive membrane curvature. *The Biochemical journal* **414**, 189-194, doi:10.1042/BJ20081237 (2008).
- 130 Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R. & Rodriguez-Boulan, E. Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nature cell biology* **2**, 125-127, doi:10.1038/35000081 (2000).
- 131 Puertollano, R. *et al.* Morphology and dynamics of clathrin/GGA1-coated carriers budding from the trans-Golgi network. *Molecular biology of the cell* **14**, 1545-1557, doi:10.1091/mbc.02-07-0109 (2003).
- 132 Lundmark, R. & Carlsson, S. R. SNX9 - a prelude to vesicle release. *Journal of cell science* **122**, 5-11, doi:10.1242/jcs.037135 (2009).
- 133 Sens, P., Johannes, L. & Bassereau, P. Biophysical approaches to protein-induced membrane deformations in trafficking. *Current opinion in cell biology* **20**, 476-482, doi:10.1016/j.ceb.2008.04.004 (2008).
- 134 Donaldson, J. G., Porat-Shliom, N. & Cohen, L. A. Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cellular signalling* **21**, 1-6, doi:10.1016/j.cellsig.2008.06.020 (2009).
- 135 Vidal-Quadras, M. *et al.* Rac1 and calmodulin interactions modulate dynamics of ARF6-dependent endocytosis. *Traffic* **12**, 1879-1896, doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01274.x (2011).
- 136 Romer, W. *et al.* Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* **450**, 670-675, doi:10.1038/nature05996 (2007).
- 137 Boucrot, E., Saffarian, S., Zhang, R. & Kirchhausen, T. Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PloS one* **5**, e10597, doi:10.1371/journal.pone.0010597 (2010).
- 138 Day, C. A. *et al.* Microtubule motors power plasma membrane tubulation in clathrin-independent endocytosis. *Traffic* **16**, 572-590, doi:10.1111/tra.12269 (2015).
- 139 Tooze, J. & Hollinshead, M. Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells. *The Journal of cell biology* **115**, 635-653 (1991).

- 140 van Meel, E. & Klumperman, J. Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochemistry and cell biology* **129**, 253-266, doi:10.1007/s00418-008-0384-0 (2008).
- 141 Heasman, S. J. & Ridley, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 690-701, doi:10.1038/nrm2476 (2008).
- 142 Wennerberg, K., Rossman, K. L. & Der, C. J. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* **118**, 843-846, doi:10.1242/jcs.01660 (2005).
- 143 Kjoller, L. & Hall, A. Signaling to Rho GTPases. *Experimental cell research* **253**, 166-179, doi:10.1006/excr.1999.4674 (1999).
- 144 Sahai, E. & Marshall, C. J. RHO-GTPases and cancer. *Nature reviews. Cancer* **2**, 133-142, doi:10.1038/nrc725 (2002).
- 145 Rossman, K. L., Der, C. J. & Sondek, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 167-180, doi:10.1038/nrm1587 (2005).
- 146 Zheng, Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends in biochemical sciences* **26**, 724-732 (2001).
- 147 Bos, J. L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-877, doi:10.1016/j.cell.2007.05.018 (2007).
- 148 Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304, doi:10.1126/science.1062023 (2001).
- 149 Olofsson, B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cellular signalling* **11**, 545-554 (1999).
- 150 Dransart, E., Olofsson, B. & Cherfils, J. RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic* **6**, 957-966, doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00335.x (2005).
- 151 Forget, M. A., Desrosiers, R. R., Gingras, D. & Beliveau, R. Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *The Biochemical journal* **361**, 243-254 (2002).
- 152 Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews* **93**, 269-309, doi:10.1152/physrev.00003.2012 (2013).
- 153 Sugihara, K. *et al.* Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* **17**, 3427-3433, doi:10.1038/sj.onc.1202595 (1998).
- 154 Bustelo, X. R., Sauzeau, V. & Berenjeno, I. M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **29**, 356-370, doi:10.1002/bies.20558 (2007).

- 155 Filippi, M. D. *et al.* Localization of Rac2 via the C terminus and aspartic acid 150 specifies superoxide generation, actin polarity and chemotaxis in neutrophils. *Nature immunology* **5**, 744-751, doi:10.1038/ni1081 (2004).
- 156 Prieto-Sanchez, R. M. & Bustelo, X. R. Structural basis for the signaling specificity of RhoG and Rac1 GTPases. *The Journal of biological chemistry* **278**, 37916-37925, doi:10.1074/jbc.M301437200 (2003).
- 157 ten Klooster, J. P., Jaffer, Z. M., Chernoff, J. & Hordijk, P. L. Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *The Journal of cell biology* **172**, 759-769, doi:10.1083/jcb.200509096 (2006).
- 158 del Pozo, M. A. *et al.* Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **303**, 839-842, doi:10.1126/science.1092571 (2004).
- 159 del Pozo, M. A., Price, L. S., Alderson, N. B., Ren, X. D. & Schwartz, M. A. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *The EMBO journal* **19**, 2008-2014, doi:10.1093/emboj/19.9.2008 (2000).
- 160 Price, L. S. *et al.* Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *The Journal of biological chemistry* **278**, 39413-39421, doi:10.1074/jbc.M302083200 (2003).
- 161 Parrini, M. C., Lei, M., Harrison, S. C. & Mayer, B. J. Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Molecular cell* **9**, 73-83 (2002).
- 162 Lei, M. *et al.* Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* **102**, 387-397 (2000).
- 163 Gatti, A., Huang, Z., Tuazon, P. T. & Traugh, J. A. Multisite autophosphorylation of p21-activated protein kinase gamma-PAK as a function of activation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 8022-8028 (1999).
- 164 Frost, J. A., Khokhlatchev, A., Stippec, S., White, M. A. & Cobb, M. H. Differential effects of PAK1-activating mutations reveal activity-dependent and -independent effects on cytoskeletal regulation. *The Journal of biological chemistry* **273**, 28191-28198 (1998).
- 165 Sells, M. A. *et al.* Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Current biology : CB* **7**, 202-210 (1997).
- 166 Dharmawardhane, S., Sanders, L. C., Martin, S. S., Daniels, R. H. & Bokoch, G. M. Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pinocytotic vesicles and cortical actin structures in stimulated cells. *The Journal of cell biology* **138**, 1265-1278 (1997).

- 167 Sells, M. A., Pfaff, A. & Chernoff, J. Temporal and spatial distribution of activated Pak1 in fibroblasts. *The Journal of cell biology* **151**, 1449-1458 (2000).
- 168 Wang, D. *et al.* PAK1 kinase is required for CXCL1-induced chemotaxis. *Biochemistry* **41**, 7100-7107 (2002).
- 169 Yang, N. *et al.* Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**, 809-812, doi:10.1038/31735 (1998).
- 170 Burridge, K. Crosstalk between Rac and Rho. *Science* **283**, 2028-2029 (1999).
- 171 Vidal, C., Geny, B., Melle, J., Jandrot-Perrus, M. & Fontenay-Roupie, M. Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood* **100**, 4462-4469, doi:10.1182/blood.V100.13.4462 (2002).
- 172 Webb, B. A. *et al.* Phosphorylation of cortactin by p21-activated kinase. *Archives of biochemistry and biophysics* **456**, 183-193, doi:10.1016/j.abb.2006.06.011 (2006).
- 173 Schafer, D. A. *et al.* Dynamin2 and cortactin regulate actin assembly and filament organization. *Current biology : CB* **12**, 1852-1857 (2002).
- 174 Grassart, A. *et al.* Pak1 phosphorylation enhances cortactin-N-WASP interaction in clathrin-caveolin-independent endocytosis. *Traffic* **11**, 1079-1091, doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01075.x (2010).
- 175 Grassart, A., Dujancourt, A., Lazarow, P. B., Dautry-Varsat, A. & Sauvonnnet, N. Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *EMBO reports* **9**, 356-362, doi:10.1038/embor.2008.28 (2008).
- 176 Rudolph, J., Crawford, J. J., Hoeflich, K. P. & Wang, W. Inhibitors of p21-activated kinases (PAKs). *Journal of medicinal chemistry* **58**, 111-129, doi:10.1021/jm501613q (2015).
- 177 Vadlamudi, R. K. *et al.* Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nature cell biology* **4**, 681-690, doi:10.1038/ncb838 (2002).
- 178 Qyang, Y. *et al.* The p21-activated kinase, Shk1, is required for proper regulation of microtubule dynamics in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology* **44**, 325-334 (2002).
- 179 Van Aelst, L., Joneson, T. & Bar-Sagi, D. Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *The EMBO journal* **15**, 3778-3786 (1996).
- 180 Gauthier-Rouviere, C. *et al.* RhoG GTPase controls a pathway that independently activates Rac1 and Cdc42Hs. *Molecular biology of the cell* **9**, 1379-1394 (1998).

- 181 Shin, O. H. & Exton, J. H. Differential binding of arfaptin 2/POR1 to ADP-ribosylation factors and Rac1. *Biochemical and biophysical research communications* **285**, 1267-1273, doi:10.1006/bbrc.2001.5330 (2001).
- 182 D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D. & Van Aelst, L. A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *The EMBO journal* **16**, 5445-5454, doi:10.1093/emboj/16.17.5445 (1997).
- 183 Tarricone, C. *et al.* The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* **411**, 215-219, doi:10.1038/35075620 (2001).
- 184 Higgins, A. M., Banik, B. L. & Brown, J. L. Geometry sensing through POR1 regulates Rac1 activity controlling early osteoblast differentiation in response to nanofiber diameter. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* **7**, 229-236, doi:10.1039/c4ib00225c (2015).
- 185 Peters, P. J. *et al.* Arfaptin 2 regulates the aggregation of mutant huntingtin protein. *Nature cell biology* **4**, 240-245, doi:10.1038/ncb761 (2002).
- 186 Rangone, H. *et al.* Phosphorylation of arfaptin 2 at Ser260 by Akt Inhibits PolyQ-huntingtin-induced toxicity by rescuing proteasome impairment. *The Journal of biological chemistry* **280**, 22021-22028, doi:10.1074/jbc.M407528200 (2005).
- 187 Man, Z. *et al.* Arfaptins are localized to the trans-Golgi by interaction with Arl1, but not Arfs. *The Journal of biological chemistry* **286**, 11569-11578, doi:10.1074/jbc.M110.201442 (2011).
- 188 Gehart, H. *et al.* The BAR domain protein Arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network. *Developmental cell* **23**, 756-768, doi:10.1016/j.devcel.2012.07.019 (2012).
- 189 Weernink, P. A. *et al.* Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42. *The Journal of biological chemistry* **279**, 7840-7849, doi:10.1074/jbc.M312737200 (2004).
- 190 Doughman, R. L., Firestone, A. J., Wojtasiak, M. L., Bunce, M. W. & Anderson, R. A. Membrane ruffling requires coordination between type I alpha phosphatidylinositol phosphate kinase and Rac signaling. *The Journal of biological chemistry* **278**, 23036-23045, doi:10.1074/jbc.M211397200 (2003).
- 191 Del Pozo, M. A. *et al.* Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nature cell biology* **4**, 232-239, doi:10.1038/ncb759 (2002).

- 192 Tolias, K. & Carpenter, C. L. In vitro interaction of phosphoinositide-4-phosphate 5-kinases with Rac. *Methods in enzymology* **325**, 190-200 (2000).
- 193 Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-657, doi:10.1038/nature05185 (2006).
- 194 Irvine, R. F. Nuclear lipid signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 349-360, doi:10.1038/nrm1100 (2003).
- 195 Rebecchi, M. J. & Pentylala, S. N. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological reviews* **80**, 1291-1335 (2000).
- 196 Illenberger, D. *et al.* Stimulation of phospholipase C-beta2 by the Rho GTPases Cdc42Hs and Rac1. *The EMBO journal* **17**, 6241-6249, doi:10.1093/emboj/17.21.6241 (1998).
- 197 Jezyk, M. R. *et al.* Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C-beta2. *Nature structural & molecular biology* **13**, 1135-1140, doi:10.1038/nsmb1175 (2006).
- 198 Li, S., Wang, Q., Wang, Y., Chen, X. & Wang, Z. PLC-gamma1 and Rac1 coregulate EGF-induced cytoskeleton remodeling and cell migration. *Molecular endocrinology* **23**, 901-913, doi:10.1210/me.2008-0368 (2009).
- 199 Polivka, J., Jr. & Janku, F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & therapeutics* **142**, 164-175, doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.004 (2014).
- 200 Yang, Y. *et al.* Activation of Rac1-PI3K/Akt is required for epidermal growth factor-induced PAK1 activation and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Journal of biomedical research* **25**, 237-245, doi:10.1016/S1674-8301(11)60032-8 (2011).
- 201 Murga, C., Zohar, M., Teramoto, H. & Gutkind, J. S. Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB. *Oncogene* **21**, 207-216, doi:10.1038/sj.onc.1205036 (2002).
- 202 Zhu, G. *et al.* An EGFR/PI3K/AKT axis promotes accumulation of the Rac1-GEF Tiam1 that is critical in EGFR-driven tumorigenesis. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2015.45 (2015).
- 203 Ebi, H. *et al.* PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 21124-21129, doi:10.1073/pnas.1314124110 (2013).
- 204 Adamson, P., Paterson, H. F. & Hall, A. Intracellular localization of the P21rho proteins. *The Journal of cell biology* **119**, 617-627 (1992).

- 205 Schmidt, A. & Hall, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & development* **16**, 1587-1609, doi:10.1101/gad.1003302 (2002).
- 206 Arthur, W. T., Ellerbroek, S. M., Der, C. J., Burrridge, K. & Wennerberg, K. XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *The Journal of biological chemistry* **277**, 42964-42972, doi:10.1074/jbc.M207401200 (2002).
- 207 Chikumi, H. *et al.* Homo- and hetero-oligomerization of PDZ-RhoGEF, LARG and p115RhoGEF by their C-terminal region regulates their in vivo Rho GEF activity and transforming potential. *Oncogene* **23**, 233-240, doi:10.1038/sj.onc.1207012 (2004).
- 208 Wheeler, A. P. & Ridley, A. J. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Experimental cell research* **301**, 43-49, doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.012 (2004).
- 209 Leung, T., Chen, X. Q., Manser, E. & Lim, L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Molecular and cellular biology* **16**, 5313-5327 (1996).
- 210 Ishizaki, T. *et al.* The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *The EMBO journal* **15**, 1885-1893 (1996).
- 211 Leung, T., Manser, E., Tan, L. & Lim, L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *The Journal of biological chemistry* **270**, 29051-29054 (1995).
- 212 Feng, J. *et al.* Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *The Journal of biological chemistry* **274**, 3744-3752 (1999).
- 213 Sebbagh, M. *et al.* Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature cell biology* **3**, 346-352, doi:10.1038/35070019 (2001).
- 214 Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y. & Nakamura, T. Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *The Journal of cell biology* **147**, 1519-1532 (1999).
- 215 Sumi, T., Matsumoto, K. & Nakamura, T. Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **276**, 670-676, doi:10.1074/jbc.M007074200 (2001).
- 216 Riento, K. & Ridley, A. J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 446-456, doi:10.1038/nrm1128 (2003).

- 217 Hartshorne, D. J. Myosin phosphatase: subunits and interactions. *Acta physiologica Scandinavica* **164**, 483-493, doi:10.1046/j.1365-201X.1998.00447.x (1998).
- 218 Kimura, K. *et al.* Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-248 (1996).
- 219 Kawano, Y. *et al.* Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *The Journal of cell biology* **147**, 1023-1038 (1999).
- 220 Matsumura, F. & Hartshorne, D. J. Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochemical and biophysical research communications* **369**, 149-156, doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.090 (2008).
- 221 Velasco, G., Armstrong, C., Morrice, N., Frame, S. & Cohen, P. Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS letters* **527**, 101-104 (2002).
- 222 Amano, M. *et al.* Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **3**, 177-188 (1998).
- 223 Chrzanowska-Wodnicka, M. & Burridge, K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *The Journal of cell biology* **133**, 1403-1415 (1996).
- 224 Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T. & Narumiya, S. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nature cell biology* **1**, 136-143, doi:10.1038/11056 (1999).
- 225 Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S. & Gundersen, G. G. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nature cell biology* **3**, 723-729, doi:10.1038/35087035 (2001).
- 226 Kosako, H. *et al.* Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene* **19**, 6059-6064, doi:10.1038/sj.onc.1203987 (2000).
- 227 Kimura, K. *et al.* Regulation of the association of adducin with actin filaments by Rho-associated kinase (Rho-kinase) and myosin phosphatase. *The Journal of biological chemistry* **273**, 5542-5548 (1998).
- 228 Goto, H. *et al.* Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. *The Journal of biological chemistry* **273**, 11728-11736 (1998).

- 229 Matsui, T. *et al.* Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *The Journal of cell biology* **140**, 647-657 (1998).
- 230 Denker, S. P., Huang, D. C., Orlowski, J., Furthmayr, H. & Barber, D. L. Direct binding of the Na⁺-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation. *Molecular cell* **6**, 1425-1436 (2000).
- 231 Amano, M. *et al.* Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* **271**, 648-650 (1996).
- 232 Shibata, H. *et al.* Characterization of the interaction between RhoA and the amino-terminal region of PKN. *FEBS letters* **385**, 221-224 (1996).
- 233 Lim, W. G. *et al.* The very C-terminus of PRK1/PKN is essential for its activation by RhoA and downstream signaling. *Cellular signalling* **18**, 1473-1481, doi:10.1016/j.cellsig.2005.11.009 (2006).
- 234 Kitagawa, M., Shibata, H., Toshimori, M., Mukai, H. & Ono, Y. The role of the unique motifs in the amino-terminal region of PKN on its enzymatic activity. *Biochemical and biophysical research communications* **220**, 963-968, doi:10.1006/bbrc.1996.0515 (1996).
- 235 Takahashi, M., Mukai, H., Toshimori, M., Miyamoto, M. & Ono, Y. Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 11566-11571 (1998).
- 236 Palmer, R. H. & Parker, P. J. Expression, purification and characterization of the ubiquitous protein kinase C-related kinase 1. *The Biochemical journal* **309 (Pt 1)**, 315-320 (1995).
- 237 Flynn, P., Mellor, H., Palmer, R., Panayotou, G. & Parker, P. J. Multiple interactions of PRK1 with RhoA. Functional assignment of the Hr1 repeat motif. *The Journal of biological chemistry* **273**, 2698-2705 (1998).
- 238 Mellor, H., Flynn, P., Nobes, C. D., Hall, A. & Parker, P. J. PRK1 is targeted to endosomes by the small GTPase, RhoB. *The Journal of biological chemistry* **273**, 4811-4814 (1998).
- 239 Flynn, P., Mellor, H., Casamassima, A. & Parker, P. J. Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **275**, 11064-11070 (2000).
- 240 Vincent, S. & Settleman, J. The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Molecular and cellular biology* **17**, 2247-2256 (1997).

- 241 Owen, D. *et al.* Molecular dissection of the interaction between the small G proteins Rac1 and RhoA and protein kinase C-related kinase 1 (PRK1). *The Journal of biological chemistry* **278**, 50578-50587, doi:10.1074/jbc.M304313200 (2003).
- 242 Modha, R. *et al.* The Rac1 polybasic region is required for interaction with its effector PRK1. *The Journal of biological chemistry* **283**, 1492-1500, doi:10.1074/jbc.M706760200 (2008).
- 243 Gampel, A., Parker, P. J. & Mellor, H. Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Current biology : CB* **9**, 955-958 (1999).
- 244 Marinissen, M. J., Chiariello, M. & Gutkind, J. S. Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway. *Genes & development* **15**, 535-553, doi:10.1101/gad.855801 (2001).
- 245 Lim, M. A. *et al.* Roles of PDK-1 and PKN in regulating cell migration and cortical actin formation of PTEN-knockout cells. *Oncogene* **23**, 9348-9358, doi:10.1038/sj.onc.1208147 (2004).
- 246 Matsuzawa, K. *et al.* Domain-specific phosphorylation of vimentin and glial fibrillary acidic protein by PKN. *Biochemical and biophysical research communications* **234**, 621-625, doi:10.1006/bbrc.1997.6669 (1997).
- 247 Mukai, H. The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. *Journal of biochemistry* **133**, 17-27 (2003).
- 248 Kawamata, T. *et al.* A protein kinase, PKN, accumulates in Alzheimer neurofibrillary tangles and associated endoplasmic reticulum-derived vesicles and phosphorylates tau protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 7402-7410 (1998).
- 249 Metzger, E., Muller, J. M., Ferrari, S., Buettner, R. & Schule, R. A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor: implications for PRK in prostate cancer. *The EMBO journal* **22**, 270-280, doi:10.1093/emboj/cdg023 (2003).
- 250 Gao, Q. *et al.* PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein. *The Journal of biological chemistry* **275**, 14824-14830 (2000).
- 251 Watanabe, N. *et al.* p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *The EMBO journal* **16**, 3044-3056, doi:10.1093/emboj/16.11.3044 (1997).
- 252 Vicente-Manzanares, M. *et al.* The RhoA effector mDia is induced during T cell activation and regulates actin polymerization and cell

- migration in T lymphocytes. *Journal of immunology* **171**, 1023-1034 (2003).
- 253 Rivelino, D. *et al.* Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *The Journal of cell biology* **153**, 1175-1186 (2001).
- 254 Tsuji, T. *et al.* ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *The Journal of cell biology* **157**, 819-830, doi:10.1083/jcb.200112107 (2002).
- 255 Adames, N. R. & Cooper, J. A. Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **149**, 863-874 (2000).
- 256 Bustos, R. I., Forget, M. A., Settleman, J. E. & Hansen, S. H. Coordination of Rho and Rac GTPase function via p190B RhoGAP. *Current biology : CB* **18**, 1606-1611, doi:10.1016/j.cub.2008.09.019 (2008).
- 257 Nimnual, A. S., Taylor, L. J. & Bar-Sagi, D. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nature cell biology* **5**, 236-241, doi:10.1038/ncb938 (2003).
- 258 Barac, A. *et al.* Direct interaction of p21-activated kinase 4 with PDZ-RhoGEF, a G protein-linked Rho guanine exchange factor. *The Journal of biological chemistry* **279**, 6182-6189, doi:10.1074/jbc.M309579200 (2004).
- 259 Rosenfeldt, H., Castellone, M. D., Randazzo, P. A. & Gutkind, J. S. Rac inhibits thrombin-induced Rho activation: evidence of a Pak-dependent GTPase crosstalk. *Journal of molecular signaling* **1**, 8, doi:10.1186/1750-2187-1-8 (2006).
- 260 Alberts, A. S., Qin, H., Carr, H. S. & Frost, J. A. PAK1 negatively regulates the activity of the Rho exchange factor NET1. *The Journal of biological chemistry* **280**, 12152-12161, doi:10.1074/jbc.M405073200 (2005).
- 261 Wildenberg, G. A. *et al.* p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* **127**, 1027-1039, doi:10.1016/j.cell.2006.09.046 (2006).
- 262 Worthylake, R. A. & Burridge, K. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *The Journal of biological chemistry* **278**, 13578-13584, doi:10.1074/jbc.M211584200 (2003).
- 263 Ohta, Y., Hartwig, J. H. & Stossel, T. P. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nature cell biology* **8**, 803-814, doi:10.1038/ncb1437 (2006).
- 264 Sanz-Moreno, V. *et al.* Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* **135**, 510-523, doi:10.1016/j.cell.2008.09.043 (2008).

- 265 Kuo, J. C., Han, X., Hsiao, C. T., Yates, J. R., 3rd & Waterman, C. M. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for beta-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nature cell biology* **13**, 383-393, doi:10.1038/ncb2216 (2011).
- 266 Guilluy, C., Garcia-Mata, R. & Burridge, K. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends in cell biology* **21**, 718-726, doi:10.1016/j.tcb.2011.08.002 (2011).
- 267 Machacek, M. *et al.* Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461**, 99-103, doi:10.1038/nature08242 (2009).
- 268 Keren, K. *et al.* Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature* **453**, 475-480, doi:10.1038/nature06952 (2008).
- 269 Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-1709, doi:10.1126/science.1092053 (2003).
- 270 Sanders, L. C., Matsumura, F., Bokoch, G. M. & de Lanerolle, P. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**, 2083-2085 (1999).
- 271 Kiosses, W. B., Daniels, R. H., Otey, C., Bokoch, G. M. & Schwartz, M. A. A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *The Journal of cell biology* **147**, 831-844 (1999).
- 272 Gardiner, E. M. *et al.* Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis. *Current biology : CB* **12**, 2029-2034 (2002).
- 273 Worthylake, R. A., Lemoine, S., Watson, J. M. & Burridge, K. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *The Journal of cell biology* **154**, 147-160 (2001).
- 274 Houk, A. R. *et al.* Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrophil migration. *Cell* **148**, 175-188, doi:10.1016/j.cell.2011.10.050 (2012).
- 275 Inoue, T. & Meyer, T. Synthetic activation of endogenous PI3K and Rac identifies an AND-gate switch for cell polarization and migration. *PLoS one* **3**, e3068, doi:10.1371/journal.pone.0003068 (2008).
- 276 Legate, K. R., Wickstrom, S. A. & Fassler, R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes & development* **23**, 397-418, doi:10.1101/gad.1758709 (2009).
- 277 Gotoh, A., Takahira, H., Geahlen, R. L. & Broxmeyer, H. E. Cross-linking of integrins induces tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product Vav and the protein tyrosine kinase Syk in human factor-dependent myeloid cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **8**, 721-729 (1997).

- 278 Yron, I. *et al.* Integrin-dependent tyrosine phosphorylation and growth regulation by Vav. *Cell adhesion and communication* **7**, 1-11 (1999).
- 279 Miao, H. *et al.* Differential regulation of Rho GTPases by beta1 and beta3 integrins: the role of an extracellular domain of integrin in intracellular signaling. *Journal of cell science* **115**, 2199-2206 (2002).
- 280 Ren, X. D., Kiosses, W. B. & Schwartz, M. A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *The EMBO journal* **18**, 578-585, doi:10.1093/emboj/18.3.578 (1999).
- 281 Morii, N. *et al.* A rho gene product in human blood platelets. II. Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation. *The Journal of biological chemistry* **267**, 20921-20926 (1992).
- 282 Laudanna, C., Campbell, J. J. & Butcher, E. C. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* **271**, 981-983 (1996).
- 283 Zhong, C. *et al.* Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *The Journal of cell biology* **141**, 539-551 (1998).
- 284 Nobes, C. D. & Hall, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62 (1995).
- 285 Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514 (1998).
- 286 Mackay, D. J., Esch, F., Furthmayr, H. & Hall, A. Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *The Journal of cell biology* **138**, 927-938 (1997).
- 287 Choi, C. K. *et al.* Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature cell biology* **10**, 1039-1050, doi:10.1038/ncb1763 (2008).
- 288 Pellinen, T. *et al.* Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. *Developmental cell* **15**, 371-385, doi:10.1016/j.devcel.2008.08.001 (2008).
- 289 Shi, F. & Sottile, J. Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *Journal of cell science* **121**, 2360-2371, doi:10.1242/jcs.014977 (2008).
- 290 Pellinen, T. & Ivaska, J. Integrin traffic. *Journal of cell science* **119**, 3723-3731, doi:10.1242/jcs.03216 (2006).

- 291 Caswell, P. T. & Norman, J. C. Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic* **7**, 14-21, doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00362.x (2006).
- 292 Nishimura, T. & Kaibuchi, K. Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Developmental cell* **13**, 15-28, doi:10.1016/j.devcel.2007.05.003 (2007).
- 293 Chao, W. T. & Kunz, J. Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *FEBS letters* **583**, 1337-1343, doi:10.1016/j.febslet.2009.03.037 (2009).
- 294 Galvez, B. G. *et al.* Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Molecular biology of the cell* **15**, 678-687, doi:10.1091/mbc.E03-07-0516 (2004).
- 295 Ezratty, E. J., Partridge, M. A. & Gundersen, G. G. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nature cell biology* **7**, 581-590, doi:10.1038/ncb1262 (2005).
- 296 Friedberg, F. & Rhoads, A. R. Evolutionary aspects of calmodulin. *IUBMB life* **51**, 215-221, doi:10.1080/152165401753311753 (2001).
- 297 Deisseroth, K., Heist, E. K. & Tsien, R. W. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* **392**, 198-202, doi:10.1038/32448 (1998).
- 298 Luby-Phelps, K., Hori, M., Phelps, J. M. & Won, D. Ca(2+)-regulated dynamic compartmentalization of calmodulin in living smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **270**, 21532-21538 (1995).
- 299 Craske, M. *et al.* Hormone-induced secretory and nuclear translocation of calmodulin: oscillations of calmodulin concentration with the nucleus as an integrator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 4426-4431 (1999).
- 300 Hidaka, H. & Tanaka, T. Naphthalenesulfonamides as calmodulin antagonists. *Methods in enzymology* **102**, 185-194 (1983).
- 301 Jurado, L. A., Chockalingam, P. S. & Jarrett, H. W. Apocalmodulin. *Physiological reviews* **79**, 661-682 (1999).
- 302 Kincaid, R. L. & Vaughan, M. Direct comparison of Ca²⁺ requirements for calmodulin interaction with and activation of protein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 1193-1197 (1986).
- 303 Mamar-Bachi, A. & Cox, J. A. Quantitative analysis of the free energy coupling in the system calmodulin, calcium, smooth muscle myosin light chain kinase. *Cell calcium* **8**, 473-482 (1987).

- 304 Means, A. R. Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Molecular endocrinology* **14**, 4-13, doi:10.1210/mend.14.1.0414 (2000).
- 305 Hoeflich, K. P. & Ikura, M. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* **108**, 739-742 (2002).
- 306 Drum, C. L. *et al.* Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* **415**, 396-402, doi:10.1038/415396a (2002).
- 307 Schumacher, M. A., Rivard, A. F., Bachinger, H. P. & Adelman, J. P. Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature* **410**, 1120-1124, doi:10.1038/35074145 (2001).
- 308 Lopez-Alcala, C. *et al.* Identification of essential interacting elements in K-Ras/calmodulin binding and its role in K-Ras localization. *The Journal of biological chemistry* **283**, 10621-10631, doi:10.1074/jbc.M706238200 (2008).
- 309 Wang, K. L. & Roufogalis, B. D. Ca²⁺/calmodulin stimulates GTP binding to the ras-related protein ral-A. *The Journal of biological chemistry* **274**, 14525-14528 (1999).
- 310 Coppola, T. *et al.* Disruption of Rab3-calmodulin interaction, but not other effector interactions, prevents Rab3 inhibition of exocytosis. *The EMBO journal* **18**, 5885-5891, doi:10.1093/emboj/18.21.5885 (1999).
- 311 Elsaraj, S. M. & Bhullar, R. P. Regulation of platelet Rac1 and Cdc42 activation through interaction with calmodulin. *Biochimica et biophysica acta* **1783**, 770-778, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.022 (2008).
- 312 Burgoyne, R. D. & Morgan, A. Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics. *Trends in neurosciences* **18**, 191-196 (1995).
- 313 Burgoyne, R. D. & Morgan, A. Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell calcium* **24**, 367-376 (1998).
- 314 Hilfiker, S. *et al.* Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **354**, 269-279, doi:10.1098/rstb.1999.0378 (1999).
- 315 Colombo, M. I., Beron, W. & Stahl, P. D. Calmodulin regulates endosome fusion. *The Journal of biological chemistry* **272**, 7707-7712 (1997).
- 316 Mills, I. G., Urbe, S. & Clague, M. J. Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. *Journal of cell science* **114**, 1959-1965 (2001).
- 317 Apodaca, G., Enrich, C. & Mostov, K. E. The calmodulin antagonist, W-13, alters transcytosis, recycling, and the morphology of the

- endocytic pathway in Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of biological chemistry* **269**, 19005-19013 (1994).
- 318 Enrich, C., Apodaca, G. & Mostov, K. E. Calmodulin regulates the intracellular trafficking in epithelial cells. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* **34 Suppl 3**, 83-85 (1996).
- 319 Tebar, F. *et al.* Calmodulin regulates intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor and the MAPK signaling pathway. *Molecular biology of the cell* **13**, 2057-2068, doi:01-12-0571 (2002).
- 320 Llado, A. *et al.* Protein kinaseCdelta-calmodulin crosstalk regulates epidermal growth factor receptor exit from early endosomes. *Molecular biology of the cell* **15**, 4877-4891, doi:10.1091/mbc.E04-02-0127 (2004).
- 321 Llado, A. *et al.* Protein kinase Cdelta and calmodulin regulate epidermal growth factor receptor recycling from early endosomes through Arp2/3 complex and cortactin. *Molecular biology of the cell* **19**, 17-29, doi:10.1091/mbc.E07-05-0411 (2008).
- 322 Jaken, S. & Parker, P. J. Protein kinase C binding partners. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **22**, 245-254, doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200003)22:3<245::AID-BIES6>3.0.CO;2-X (2000).
- 323 Parker, P. J. & Murray-Rust, J. PKC at a glance. *Journal of cell science* **117**, 131-132, doi:10.1242/jcs.00982 (2004).
- 324 Mochly-Rosen, D. & Gordon, A. S. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12**, 35-42 (1998).
- 325 Parton, R. G. & Simons, K. The multiple faces of caveolae. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 185-194, doi:10.1038/nrm2122 (2007).
- 326 Hartwig, J. H. *et al.* MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* **356**, 618-622, doi:10.1038/356618a0 (1992).
- 327 Arbusova, A., Schmitz, A. A. & Vergeres, G. Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *The Biochemical journal* **362**, 1-12 (2002).
- 328 Murray, D., Ben-Tal, N., Honig, B. & McLaughlin, S. Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure* **5**, 985-989 (1997).
- 329 Blackshear, P. J. The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *The Journal of biological chemistry* **268**, 1501-1504 (1993).
- 330 Kalwa, H. & Michel, T. The MARCKS protein plays a critical role in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism and directed cell

- movement in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **286**, 2320-2330, doi:10.1074/jbc.M110.196022 (2011).
- 331 Nairn, A. C. & Aderem, A. Calmodulin and protein kinase C cross-talk: the MARCKS protein is an actin filament and plasma membrane cross-linking protein regulated by protein kinase C phosphorylation and by calmodulin. *Ciba Foundation symposium* **164**, 145-154; discussion 154-161 (1992).
- 332 Suh, B. C., Inoue, T., Meyer, T. & Hille, B. Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P₂ gate KCNQ ion channels. *Science* **314**, 1454-1457, doi:10.1126/science.1131163 (2006).
- 333 Shea, K. F., Wells, C. M., Garner, A. P. & Jones, G. E. ROCK1 and LIMK2 interact in spread but not blebbing cancer cells. *PloS one* **3**, e3398, doi:10.1371/journal.pone.0003398 (2008).
- 334 Weed, S. A. *et al.* Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *The Journal of cell biology* **151**, 29-40 (2000).
- 335 van der Blik, A. M. *et al.* Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *The Journal of cell biology* **122**, 553-563 (1993).
- 336 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
- 337 Cosen-Binker, L. I. & Kapus, A. Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology* **21**, 352-361, doi:10.1152/physiol.00012.2006 (2006).
- 338 Weed, S. A., Du, Y. & Parsons, J. T. Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *Journal of cell science* **111 (Pt 16)**, 2433-2443 (1998).
- 339 Weed, S. A. & Parsons, J. T. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* **20**, 6418-6434, doi:10.1038/sj.onc.1204783 (2001).
- 340 Dai, J. & Sheetz, M. P. Regulation of endocytosis, exocytosis, and shape by membrane tension. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **60**, 567-571 (1995).
- 341 Gauthier, N. C., Rossier, O. M., Mathur, A., Hone, J. C. & Sheetz, M. P. Plasma membrane area increases with spread area by exocytosis of a GPI-anchored protein compartment. *Molecular biology of the cell* **20**, 3261-3272, doi:10.1091/mbc.E09-01-0071 (2009).
- 342 Fabbri, M. *et al.* Dynamic partitioning into lipid rafts controls the endo-exocytic cycle of the alphaL/beta2 integrin, LFA-1, during leukocyte chemotaxis. *Molecular biology of the cell* **16**, 5793-5803, doi:10.1091/mbc.E05-05-0413 (2005).

- 343 Gu, Z., Noss, E. H., Hsu, V. W. & Brenner, M. B. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *The Journal of cell biology* **193**, 61-70, doi:10.1083/jcb.201007003 (2011).
- 344 Jacquemet, G. *et al.* Rac1 is deactivated at integrin activation sites through an IQGAP1-filamin-A-RacGAP1 pathway. *Journal of cell science* **126**, 4121-4135, doi:10.1242/jcs.121988 (2013).
- 345 Chen, X. *et al.* Integrin alpha1beta1 controls reactive oxygen species synthesis by negatively regulating epidermal growth factor receptor-mediated Rac activation. *Molecular and cellular biology* **27**, 3313-3326, doi:10.1128/MCB.01476-06 (2007).
- 346 Costa, P., Scales, T. M., Ivaska, J. & Parsons, M. Integrin-specific control of focal adhesion kinase and RhoA regulates membrane protrusion and invasion. *PLoS one* **8**, e74659, doi:10.1371/journal.pone.0074659 (2013).
- 347 Arthur, W. T., Petch, L. A. & Burridge, K. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Current biology : CB* **10**, 719-722 (2000).
- 348 Quast, T. *et al.* Cytohesin-1 controls the activation of RhoA and modulates integrin-dependent adhesion and migration of dendritic cells. *Blood* **113**, 5801-5810, doi:10.1182/blood-2008-08-176123 (2009).
- 349 Sengupta, P. *et al.* Membrane-permeable calmodulin inhibitors (e.g. W-7/W-13) bind to membranes, changing the electrostatic surface potential: dual effect of W-13 on epidermal growth factor receptor activation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 8474-8486, doi:10.1074/jbc.M607211200 (2007).
- 350 Marks, B. *et al.* GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* **410**, 231-235, doi:10.1038/35065645 (2001).
- 351 Sever, S., Damke, H. & Schmid, S. L. Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of cell biology* **150**, 1137-1148 (2000).
- 352 Hoppins, S., Lackner, L. & Nunnari, J. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annual review of biochemistry* **76**, 751-780, doi:10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048 (2007).
- 353 Detmer, S. A. & Chan, D. C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 870-879, doi:10.1038/nrm2275 (2007).
- 354 Chircop, M. *et al.* Inhibition of dynamin by dynole 34-2 induces cell death following cytokinesis failure in cancer cells. *Molecular cancer*

- therapeutics* **10**, 1553-1562, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0067 (2011).
- 355 Orth, J. D. & McNiven, M. A. Dynamin at the actin-membrane interface. *Current opinion in cell biology* **15**, 31-39 (2003).
- 356 Accola, M. A., Huang, B., Al Masri, A. & McNiven, M. A. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **277**, 21829-21835, doi:10.1074/jbc.M201641200 (2002).
- 357 Bethoney, K. A., King, M. C., Hinshaw, J. E., Ostap, E. M. & Lemmon, M. A. A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13359-13364, doi:10.1073/pnas.0906945106 (2009).
- 358 Glaser, M. *et al.* Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) produces reversible inhibition of phospholipase C by sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in lateral domains. *The Journal of biological chemistry* **271**, 26187-26193 (1996).
- 359 Michaely, P. A., Mineo, C., Ying, Y. S. & Anderson, R. G. Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. *The Journal of biological chemistry* **274**, 21430-21436 (1999).
- 360 Moissoglu, K. *et al.* Regulation of Rac1 translocation and activation by membrane domains and their boundaries. *Journal of cell science* **127**, 2565-2576, doi:10.1242/jcs.149088 (2014).
- 361 Dharmalingam, E. *et al.* F-BAR proteins of the syndapin family shape the plasma membrane and are crucial for neuromorphogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 13315-13327, doi:10.1523/JNEUROSCI.3973-09.2009 (2009).
- 362 Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S. & Suetsugu, S. Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *Journal of cell science* **124**, 2032-2040, doi:10.1242/jcs.086264 (2011).
- 363 de Kreuk, B. J., Anthony, E. C., Geerts, D. & Hordijk, P. L. The F-BAR protein PACSIN2 regulates epidermal growth factor receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* **287**, 43438-43453, doi:10.1074/jbc.M112.391078 (2012).
- 364 Hansen, C. G., Howard, G. & Nichols, B. J. Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *Journal of cell science* **124**, 2777-2785, doi:10.1242/jcs.084319 (2011).
- 365 de Kreuk, B. J. *et al.* The F-BAR domain protein PACSIN2 associates with Rac1 and regulates cell spreading and migration. *Journal of cell science* **124**, 2375-2388, doi:10.1242/jcs.080630 (2011).

- 366 Yu, W. *et al.* Beta1-integrin orients epithelial polarity via Rac1 and laminin. *Molecular biology of the cell* **16**, 433-445, doi:10.1091/mbc.E04-05-0435 (2005).
- 367 Nodari, A. *et al.* Beta1 integrin activates Rac1 in Schwann cells to generate radial lamellae during axonal sorting and myelination. *The Journal of cell biology* **177**, 1063-1075, doi:10.1083/jcb.200610014 (2007).
- 368 Hauselmann, S. P. *et al.* beta1-Integrin is up-regulated via Rac1-dependent reactive oxygen species as part of the hypertrophic cardiomyocyte response. *Free radical biology & medicine* **51**, 609-618, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.007 (2011).
- 369 Humphries, J. D., Byron, A. & Humphries, M. J. Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science* **119**, 3901-3903, doi:10.1242/jcs.03098 (2006).
- 370 Bretscher, M. S. Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor in CHO cells. *The EMBO journal* **8**, 1341-1348 (1989).
- 371 Albertinazzi, C., Cattelino, A. & de Curtis, I. Rac GTPases localize at sites of actin reorganization during dynamic remodeling of the cytoskeleton of normal embryonic fibroblasts. *Journal of cell science* **112 (Pt 21)**, 3821-3831 (1999).
- 372 Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. & Hall, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410 (1992).
- 373 Joneson, T., McDonough, M., Bar-Sagi, D. & Van Aelst, L. RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. *Science* **274**, 1374-1376 (1996).
- 374 Lamarche, N. *et al.* Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* **87**, 519-529 (1996).
- 375 Samaj, J. *et al.* Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant physiology* **135**, 1150-1161, doi:10.1104/pp.104.040683 (2004).
- 376 Khromov, A., Choudhury, N., Stevenson, A. S., Somlyo, A. V. & Eto, M. Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca²⁺ sensitization force of smooth muscle contraction. *The Journal of biological chemistry* **284**, 21569-21579, doi:10.1074/jbc.M109.019729 (2009).
- 377 Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A. & Collard, J. G. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *The Journal of cell biology* **147**, 1009-1022 (1999).

- 378 Missirlis, D. The effect of substrate elasticity and actomyosin contractility on different forms of endocytosis. *PLoS one* **9**, e96548, doi:10.1371/journal.pone.0096548 (2014).
- 379 Gambhir, A. *et al.* Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophysical journal* **86**, 2188-2207, doi:10.1016/S0006-3495(04)74278-2 (2004).
- 380 Fleming, I. N., Elliott, C. M., Buchanan, F. G., Downes, C. P. & Exton, J. H. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 12753-12758 (1999).
- 381 Han, J. *et al.* Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* **279**, 558-560 (1998).
- 382 Nonnenmacher, M. & Weber, T. Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell host & microbe* **10**, 563-576, doi:10.1016/j.chom.2011.10.014 (2011).
- 383 Shankar, J. *et al.* Raft endocytosis of AMF regulates mitochondrial dynamics through Rac1 signaling and the Gp78 ubiquitin ligase. *Journal of cell science* **126**, 3295-3304, doi:10.1242/jcs.120162 (2013).
- 384 Akhtar, N. & Hotchin, N. A. RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. *Molecular biology of the cell* **12**, 847-862 (2001).
- 385 Ellis, S. & Mellor, H. Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends in cell biology* **10**, 85-88 (2000).
- 386 Lamaze, C., Chuang, T. H., Terlecky, L. J., Bokoch, G. M. & Schmid, S. L. Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* **382**, 177-179, doi:10.1038/382177a0 (1996).
- 387 Shpetner, H. S. & Vallee, R. B. Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature* **355**, 733-735, doi:10.1038/355733a0 (1992).
- 388 Thapa, N. & Anderson, R. A. PIP2 signaling, an integrator of cell polarity and vesicle trafficking in directionally migrating cells. *Cell adhesion & migration* **6**, 409-412, doi:10.4161/cam.21192 (2012).
- 389 van Deurs, B., von Bulow, F., Vilhardt, F., Holm, P. K. & Sandvig, K. Destabilization of plasma membrane structure by prevention of actin polymerization. Microtubule-dependent tubulation of the plasma membrane. *Journal of cell science* **109 (Pt 7)**, 1655-1665 (1996).
- 390 Ambroggio, E. E., Sillibourne, J., Antonny, B., Manneville, J. B. & Goud, B. Arf1 and membrane curvature cooperate to recruit Arfaptin2 to liposomes. *PLoS one* **8**, e62963, doi:10.1371/journal.pone.0062963 (2013).

- 391 Chandrasekar, I. *et al.* Nonmuscle myosin II is a critical regulator of clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* **15**, 418-432, doi:10.1111/tra.12152 (2014).
- 392 Lee, D. M. & Harris, T. J. An Arf-GEF regulates antagonism between endocytosis and the cytoskeleton for *Drosophila* blastoderm development. *Current biology : CB* **23**, 2110-2120, doi:10.1016/j.cub.2013.08.058 (2013).
- 393 Gauthier, N. C., Masters, T. A. & Sheetz, M. P. Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends in cell biology* **22**, 527-535, doi:10.1016/j.tcb.2012.07.005 (2012).
- 394 Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J. C., Ubelmann, F. & Kirchhausen, T. Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nature cell biology* **13**, 1124-1131, doi:10.1038/ncb2307 (2011).

