

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA
FACULTAT DE MEDICINA



**DINÁMICA DE LA ACTINA Y TRÁFICO DE MEMBRANAS ASOCIADO AL
COMPLEJO DE GOLGI: PAPEL REGULADOR DE RHOA, RAC1 Y CDC42**

**Tesis presentada por Olga B. Matas Guadix y
dirigida por el Dr. Gustavo Egea Guri
para optar al grado de Doctora en Bioquímica**

Barcelona, Mayo del 2005

IV. RESULTADOS

1.- SÓLO CDC42 SE LOCALIZA EN EL COMPLEJO DE GOLGI

Tal como hemos mencionado en el apartado de objetivos, nuestro grupo había demostrado la presencia de Cdc42 en el CG (Luna et al., 2002), queríamos investigar si ocurría lo mismo con las otras Rho GTPasas mejor conocidas: Rac1 y RhoA.

La primera aproximación experimental que llevamos a cabo fue estudiar la distribución subcelular de las Rho GTPasas a nivel de microscopía de inmunofluorescencia en células que sobreexpresaban los cDNAs que codifican para las formas activas (dominante positivo) o inactivas (dominante negativo), de las GTPasas fusionadas con la proteína GFP (del inglés *green fluorescent protein*; ver el siguiente cuadro:

	Dominante positivo	Dominante negativo
RhoA	V14	N19
Rac1	V12/Q61L	N17
Cdc42	V12	N17

Las GTPasas codificadas presentan mutaciones puntuales que alteran la tasa de intercambio GDP/GTP dando lugar a la proteína permanentemente activada (unida a GTP), o bien a la proteína permanentemente inactiva (unida a GDP).

Microinyectamos los vectores de expresión de cada Rho GTPasa en el núcleo de células NRK. Tal y como habíamos descrito anteriormente (Luna et al., 2002), los dominantes positivo y negativo de Cdc42 co-localizaban con la enzima residente del CG manosidasa II (ManII) (fig 1 A-D). Por lo que respecta a Rac1, tanto la forma activa como la inactiva se localizaban mayoritariamente en el núcleo, en las ondulaciones de membrana y en el citoplasma (fig 1 E-H; Kraynov et al., 2000) no habiendo co-localización con Man II. Algo similar ocurre con RhoA pero en este caso tanto el dominante positivo como el negativo se distribuyen uniformemente por todo el citoplasma (fig 1 I-L). Estos resultados indican que ni Rac1 ni RhoA se localizan en el CG.

Para descartar la posibilidad de que la acumulación citoplasmática de RhoA y Rac1 enmascarase la distribución minoritaria de ambas proteínas en otros compartimentos intracelulares, decidimos permeabilizar las células con estreptolisina-O (SL-O) y extraer el citoplasma eliminando de este modo el exceso de proteína citoplasmática no unida a

membranas. Tras el tratamiento con SL-O, las células se fijan y se procesan para microscopía de inmunofluorescencia (IF). Como muestra la figura 2, cuando se emplea un anticuerpo frente a Cdc42 se obtiene un marcaje que se caracteriza por una acumulación en la zona perinuclear que se corresponde con la región del CG (fig 2 A-C) ya que co-localiza con la proteína residente del CG giantina (Linstedt y Hauri, 1993). Cuando se utiliza un anticuerpo frente a la proteína endógena Rac1, algunas células muestran un marcaje que se caracteriza por una acumulación perinuclear (fig. 2 D) pero sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con Cdc42, dicha acumulación no se corresponde con el CG ya que no se observa co-localización con giantina (fig. 2 D-F). Lo mismo ocurre cuando se utiliza un anticuerpo monoclonal frente a la proteína

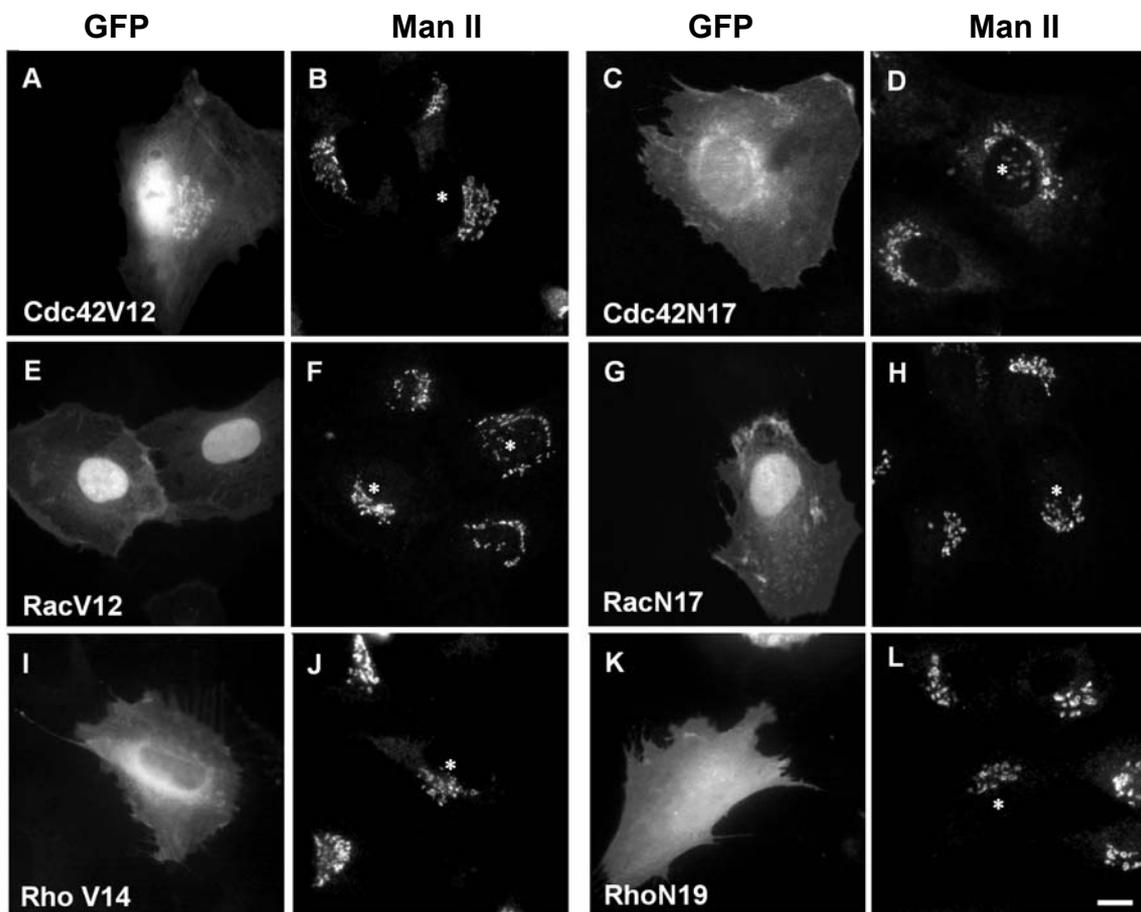


Figura 1. Estudios inmunohistoquímicos muestran a Cdc42 como la única Rho GTPasa que se localiza en el CG. Se microinyectó en el núcleo de células NRK los dominantes positivos o negativos de GFP-Cdc42 (Cdc42V12 o Cdc42N17, respectivamente A-D), GFP-Rac1 (RacV12 o RacN17, respectivamente E-H) o GFP-Rho (RhoV14 y RhoN19, respectivamente I-L). Se dejaron expresar los plásmidos durante 3-4 horas y posteriormente las células fueron fijadas y procesadas para IF. Para visualizar el CG se utilizó un anticuerpo frente a Manosidasa II (ManII). (*) Indica las células transfectadas. Imágenes de microscopía confocal. Barra 10 μ m.

RhoA. En este caso, los estudios de co-localización se llevaron a cabo empleando como marcador del complejo de Golgi la proteína de matriz GMAP-210 (Infante et al., 1999). Tampoco se observa co-localización alguna entre Rho y el marcador de Golgi empleado (fig. 2 G-I).

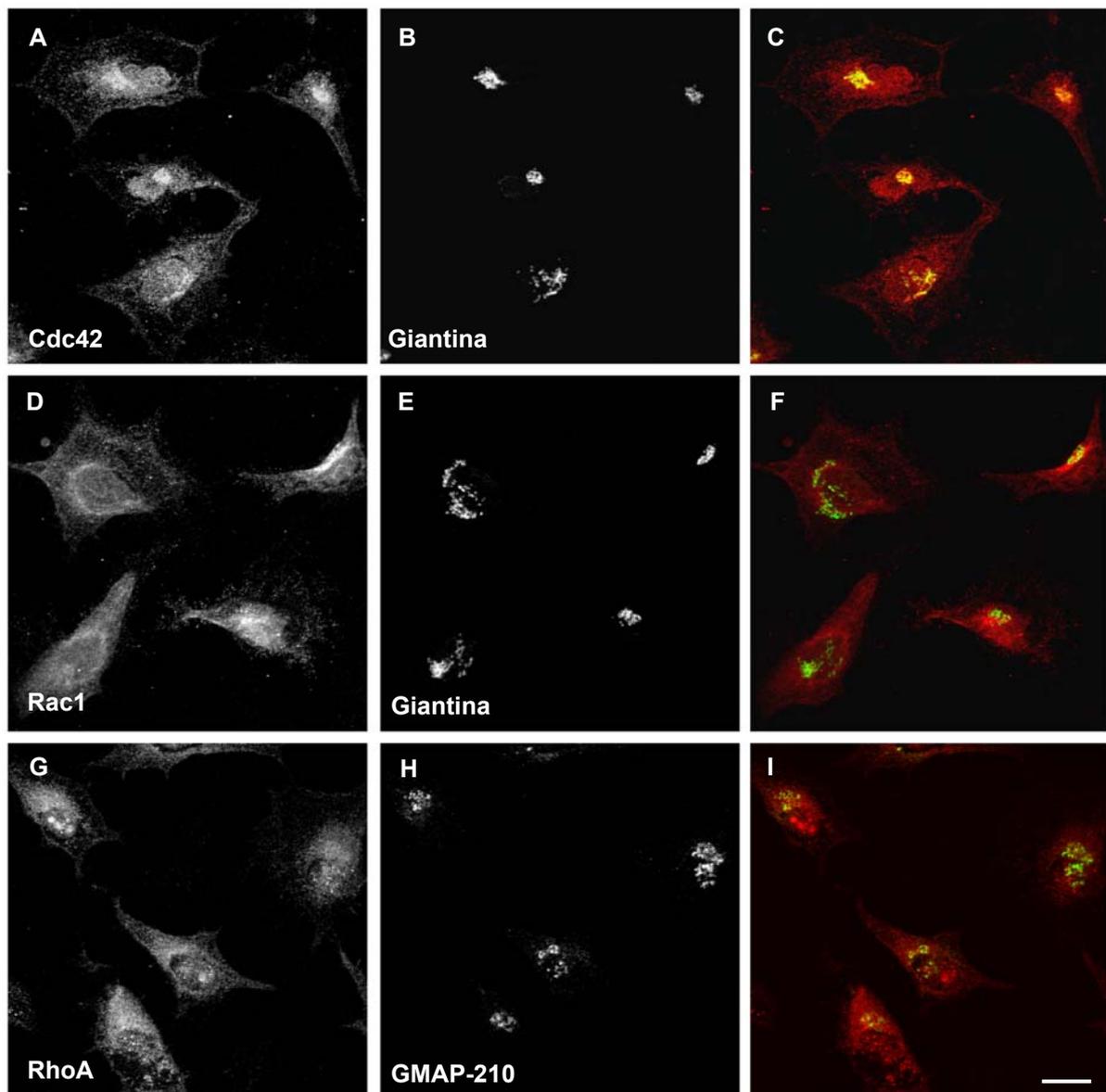


Figura 2. La permeabilización y extracción del citoplasma en células HeLa no revela la presencia de Rac1 y RhoA asociadas con el CG. Células Hela confluentes fueron permeabilizadas con SL-O y posteriormente se sometieron a varios lavados con tampones de alta concentración salina para extraer el citoplasma. Finalmente se fijaron y se hizo un doble marcaje con anticuerpos frente a Cdc42 y giantina (A-C), Rac1 y giantina (D-F) o RhoA y GMAP-210 (G-I). Sólo se observa co-localización entre Cdc42 y la proteína de matriz giantina. Imágenes de microscopía confocal. Barra 10 μ m.

Finalmente, para corroborar bioquímicamente la ausencia de Rac1 y RhoA en el complejo de Golgi, aislamos membranas de Golgi a partir de hígado de rata y posteriormente fueron sometidas a un gradiente de sacarosa (*floating-up*) para aumentar su pureza (ver materiales y métodos pág 118). LLevamos a cabo un western blot empleando anticuerpos frente a Cdc42, Rac1 y RhoA (fig. 3). Las membranas de Golgi sólo fueron reactivas frente al anticuerpo contra Cdc42 mostrando una banda de 22 KD que se corresponde con el peso molecular característico de esta Rho GTPasa. Los anticuerpos frente a Rac1 o Rho no detectaron banda alguna. Como control de que los anticuerpos frente a estas Rho GTPasas eran inmunoreactivos, empleamos paralelamente a las membranas de Golgi los lisados totales de células NRK. En este caso, tanto Cdc42, como Rac1 y Rho detectaron una serie de bandas características para cada una de las Rho GTPasas.

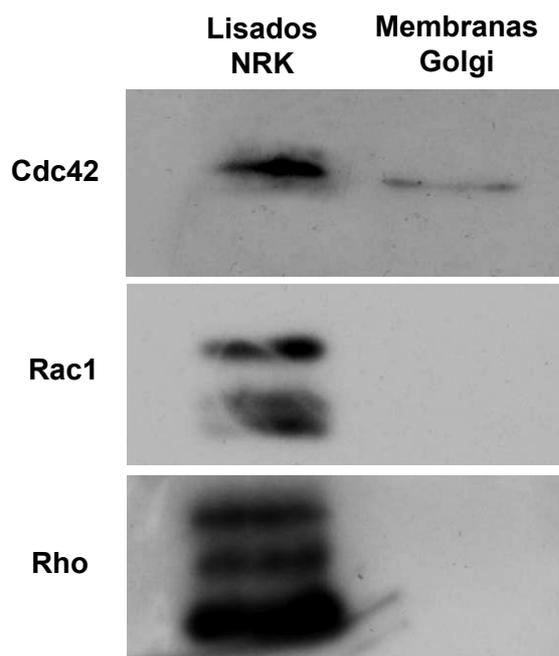


Fig 3. Ni Rac1 ni Rho se asocian a las membranas de Golgi. *Western blot* de lisados de células NRK o membranas de Golgi aisladas de hígado de rata y purificadas según el método de *floating-up* para detectar la presencia de Cdc42, Rac1 o Rho. Mientras en los lisados celulares se observan las bandas correspondientes a las tres GTPasas, sólo Cdc42 aparece en las membranas de Golgi.

Por lo tanto, el conjunto de resultados bioquímicos e inmunohistoquímicos indican claramente que la única Rho GTPasa asociada a las membranas del complejo de Golgi es Cdc42. No obstante, estos datos son insuficientes para descartar definitivamente a RhoA y Rac1 como reguladoras del tráfico de membranas en la zona RE/CG ya que, el no encontrarse en el complejo de Golgi, no implica necesariamente que no puedan actuar de forma indirecta a través de algún efector sobre la regulación de la dinámica de membranas a este nivel.

2.-RAC1 Y RHOA NO ALTERAN EL DESENSAMBLAJE Y EL REENSAMBLAJE DEL COMPLEJO DE GOLGI

Para determinar si RhoA y/o Rac1 pudieran estar implicadas indirectamente en la regulación del transporte de proteínas en la zona RE/CG, estudiamos la cinética del desensamblaje del CG inducida por la droga brefeldina A (BFA) en células que sobreexpresaban los mutantes activos o inactivos de ambas Rho GTPasas. Para ello, transfectamos células HeLa con los dominantes positivos o negativos de Rac1 o RhoA fusionados con GFP, se incubaron con BFA y se fijaron a diferentes intervalos de tiempo para monitorizar la fusión del CG con el RE inducida por esta droga. Para visualizar el CG se empleó un anticuerpo frente a la proteína giantina. Tal y como se muestra en la figura 4, la cinética de fusión del CG con el RE es la misma en células no transfectadas como en células transfectadas con GFP-RacV12 (fig. 4 A-F) o con GFP-RhoV14 (fig. 4 G-L). Así, tras 60 minutos en presencia de BFA el marcador del CG giantina da un patrón difuso característico de RE (fig. 4 F y L) que se observa por igual en todas las células transfectadas y no transfectadas. Cuando transfectamos las células con los vectores de expresión que contenían las formas inactivas de Rac1 (GFP-RacN17) o RhoA (GFP-RhoN19) el resultado fue el mismo, no observándose tampoco cambio alguno en la cinética del desensamblaje del CG en las células transfectadas en comparación con las células no transfectadas (no se muestra). Estos resultados sugieren que ni Rac1 ni RhoA regulan el flujo de membranas desde el CG al RE.

Nuestro siguiente paso fue determinar si el flujo de membranas en el sentido inverso, o sea desde el RE al CG (flujo anterógrado), se alteraba por la sobreexpresión de los mutantes de Rac1 o RhoA. Aprovechando la aproximación experimental anterior, estudiamos el reensamblaje del CG tras retirar la BFA del medio. Para ello, transfectamos células HeLa con los mutantes activos o inactivos de Rac1 o RhoA. Tras dejar un tiempo de expresión de 16-18 horas, las células se incubaron con BFA durante 60 minutos (tiempo suficiente para que ocurra la fusión del CG con el RE). A continuación, se retiró la droga del medio y se siguió la cinética de reconstitución del CG mediante inmunohistoquímica. El resultado se muestra en la figura 5. Tampoco encontramos diferencias entre las células transfectadas ya sea con GFP-RacV12 o con GFP-RhoV14 y las células vecinas no transfectadas. Llevamos a cabo el mismo experimento pero transfectando con los dominantes negativos de ambas GTPasas.

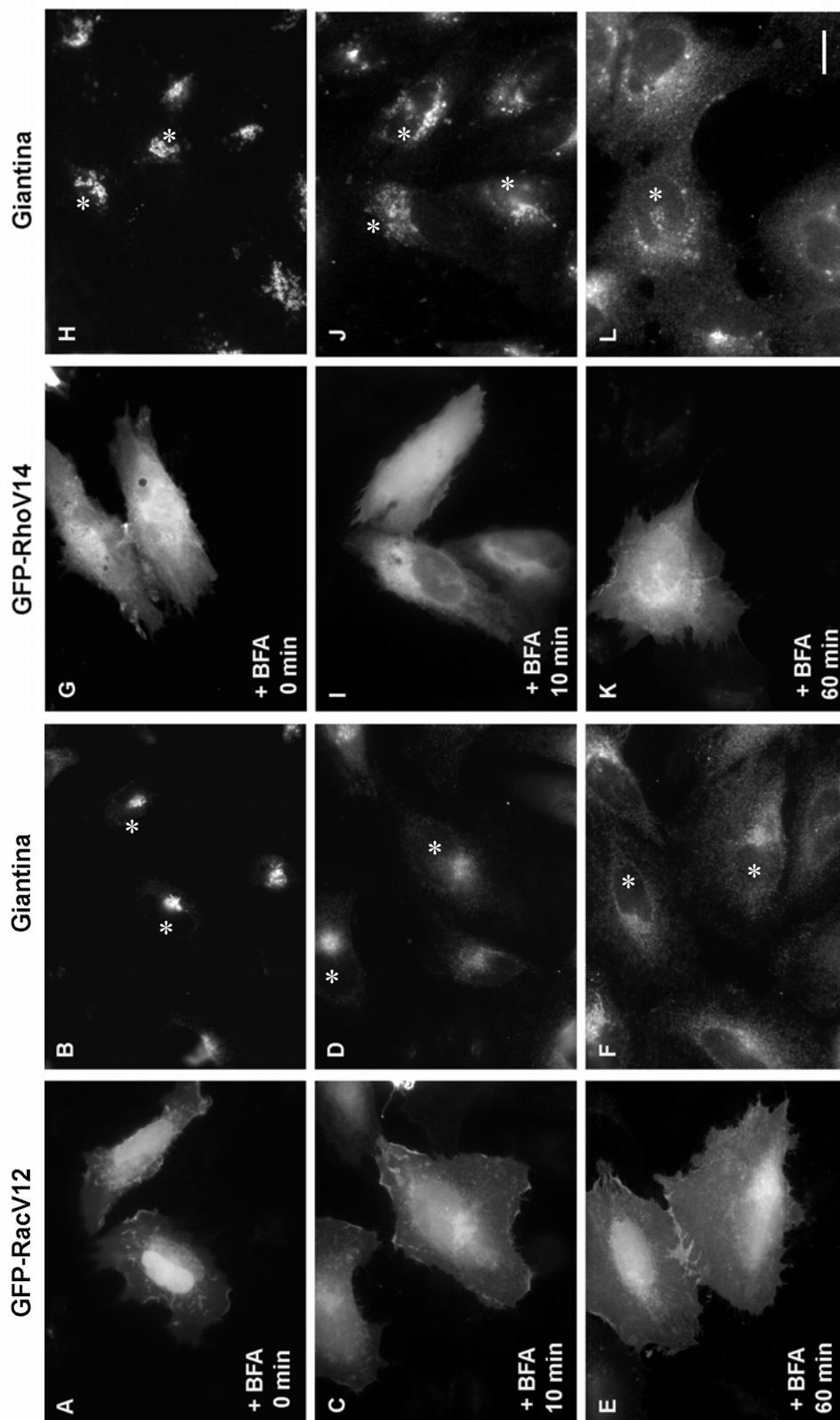


Figura 4. Rac1 y RhoA no inducen alteraciones en el desensamblaje del CG inducido con BFA. Células HeLa transfectadas con GFP-RacV12 (A-F) o GFP-RhoV14 (G-L) fueron tratadas con BFA (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 60 minutos. Seguidamente las células fueron procesadas para IF a distintos intervalos de tiempo. Las células transfectadas se identificaron gracias a la proteína fluorescente GFP y para visualizar el CG se utilizó el anticuerpo frente a giantina. (*) Indica las células transfectadas. Imágenes tomadas con una cámara Olympus. Barra 10 μm .

En este caso tampoco observamos ninguna diferencia en la reconstitución del CG entre las células transfectadas y las control (no se muestra).

3.- NI RAC1 NI RHOA REGULAN EL TRANSPORTE DE LA PROTEÍNA VSV-G DESDE EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO AL COMPLEJO DE GOLGI

A pesar de que los resultados del reensamblaje del CG tras el tratamiento y retirada del medio de la BFA indicaban la no implicación de Rac1 o RhoA en el transporte anterógrado, estudiamos la cinética de transporte desde el RE al CG de una proteína de carga. Se trata de un mutante de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) sensible a la temperatura. A 40°C (temperatura no permisiva) esta proteína sufre daños en su estructura terciaria y queda retenida en el RE. Sólo a 32°C (temperatura permisiva) se pliega de forma correcta y se transporta al CG. Inicialmente, el abordaje experimental lo realizamos infectando con el virus a las células HeLa previamente transfectadas con los dominantes de Rac1 o RhoA. En estos ensayos observamos que las células que sobreexpresaban la forma activa de Rac1 eran mucho menos susceptibles de ser infectadas por el virus. Por ello decidimos transfectar las células con un cDNA que codifica para el mutante termo-sensible de la proteína G del virus unido a GFP. Para ver el efecto de la expresión de las formas activas e inactivas de Rac1 o RhoA sobre la cinética de la proteína G del virus se realizaron co-transfecciones con los vectores de expresión GFP-VSV-G y myc-RacV12 o myc-RhoV14 así como con los dominantes negativos respectivos. En primer lugar, transfectamos células únicamente con GFP-VSV-G. Estas células se procesaron en paralelo con las células co-transfectadas y se utilizaron como control del ensayo. Todas las células, las transfectadas con GFP-VSV-G y las co-transfectadas con GFP-VSV-G y los mutantes activos o inactivos de Rac1 y RhoA se incubaron a la temperatura de 40 °C durante 24 horas. Esta temperatura no afecta a la expresión de los dominantes de Rac1 y RhoA y permite la acumulación de la proteína G en el RE. Seguidamente, las células se incubaron a de 32°C y se siguió el transporte de la proteína G hacia el CG mediante IF.

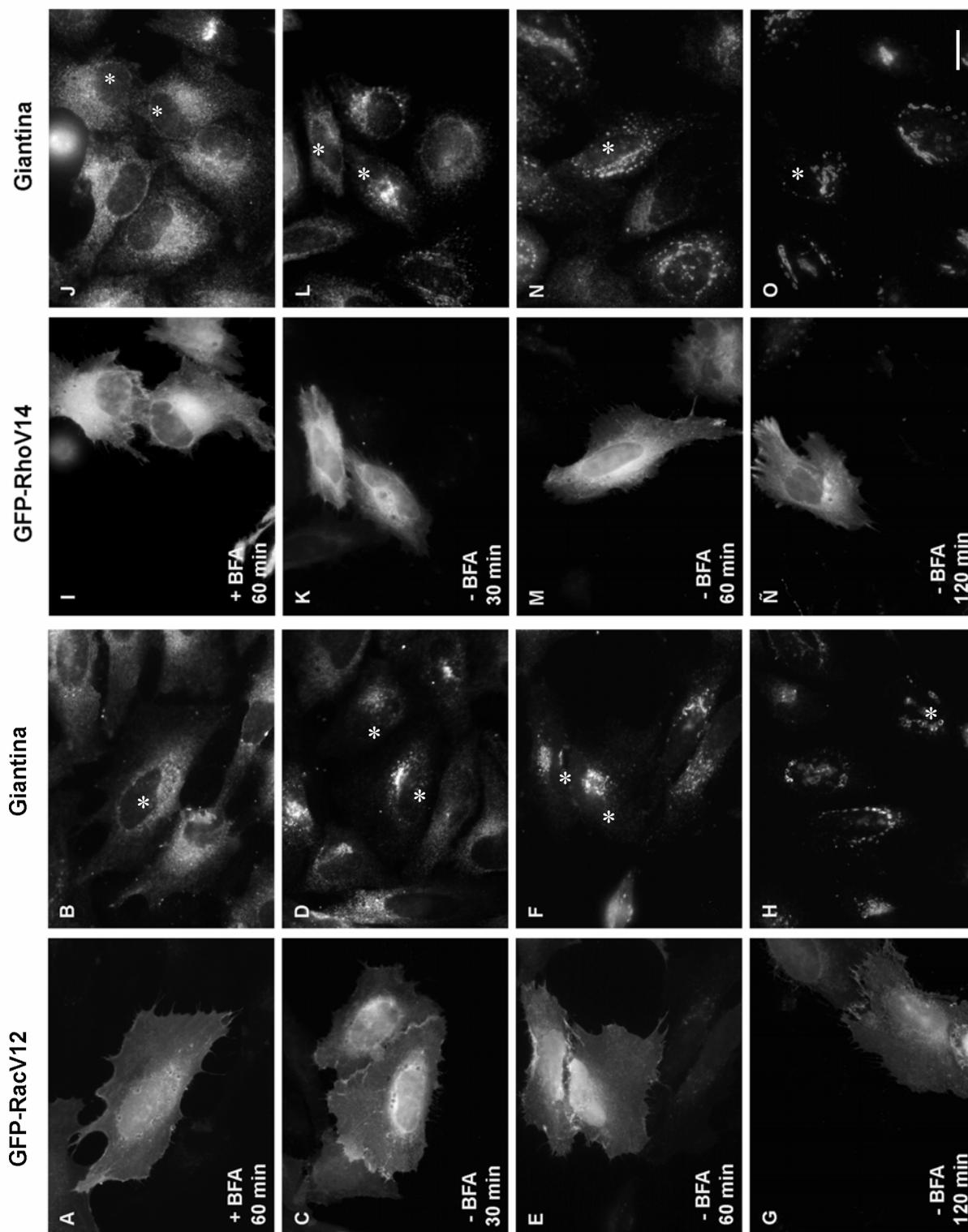


Figura 5. Rac1 y RhoA no inducen alteraciones en el reensamblaje del CG tras retirar la BFA. Células HeLa transfectadas con GFP-RacV12 (A-H) o GFP-RhoV14 (I-O) fueron tratadas con BFA (1 μ g/ml) durante 60 minutos. A continuación retiramos la droga del medio y fijamos las células a distintos intervalos de tiempo. Las células transfectadas se identificaron gracias a la proteína fluorescente GFP y para visualizar el CG se utilizó el anticuerpo frente a giantina. Imágenes tomadas con una cámara Olympus. Barra 10 μ m.

Las células transfectadas con los vectores de expresión de Rac1 y RhoA se identificaron mediante un anticuerpo frente a myc. A la vista de la figura 6 donde se muestra el resultado de un experimento típico, observamos que la cinética de llegada al CG de la proteína G del virus es idéntica tanto en las células control como en las células co-transfectadas. Tras 15 minutos a 32 °C, la proteína G comienza a llegar al GC (fig. 6 B y F) y a los 30 minutos prácticamente la totalidad de esta proteína se encuentra ya en este orgánulo (fig. 6 C y H). En este caso también se realizó el ensayo con los dominantes negativos de Rac1 y RhoA no habiendo tampoco diferencias con respecto a los datos obtenidos con los dominantes positivos o las células control (no se muestra).

Por lo tanto, los resultados del reensamblaje del CG al retirar la BFA y los del transporte de la proteína G del VSV indican que ni Rac1 ni RhoA regulan el transporte anterógrado. La ausencia de efecto no es debida a una falta de actividad biológica de los mutantes de Rac1 y RhoA porque la expresión de los mismos provoca el efecto esperado sobre el citoesqueleto de actina. Así podemos observar que RacV12 promueve la formación de ondulaciones de membrana (*ruffling*) y la clarificación de fibras de estrés del citoplasma (ver recuadros en figura 6) mientras que RhoV14 provoca un incremento de las fibras de estrés (no se muestra).

4.-LA ACUMULACIÓN EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO DE PROTEÍNAS RESIDENTES DEL COMPLEJO DE GOLGI INDUCIDA POR LA EXPRESIÓN DE SAR1^{dn} NO SE VE ALTERADA NI POR RAC1 NI RHOA.

Los resultados obtenidos en los experimentos de desensamblaje del CG en células tratadas con BFA sugieren que las Rho GTPasas Rac1 y RhoA, a diferencia de Cdc42, no regulan el transporte retrógrado. Para corroborar este dato decidimos emplear un abordaje experimental más fisiológico que no requiriese del empleo de la droga BFA.

La GTPasa Sar1 es crucial para la formación de ITs de tipo COPII en el RE. El empleo de un mutante de Sar1 defectivo en la actividad GTPasa (H79G; Sar1^{dn}), impide el reciclaje de proteínas a través del RE al bloquear su salida provocando así su

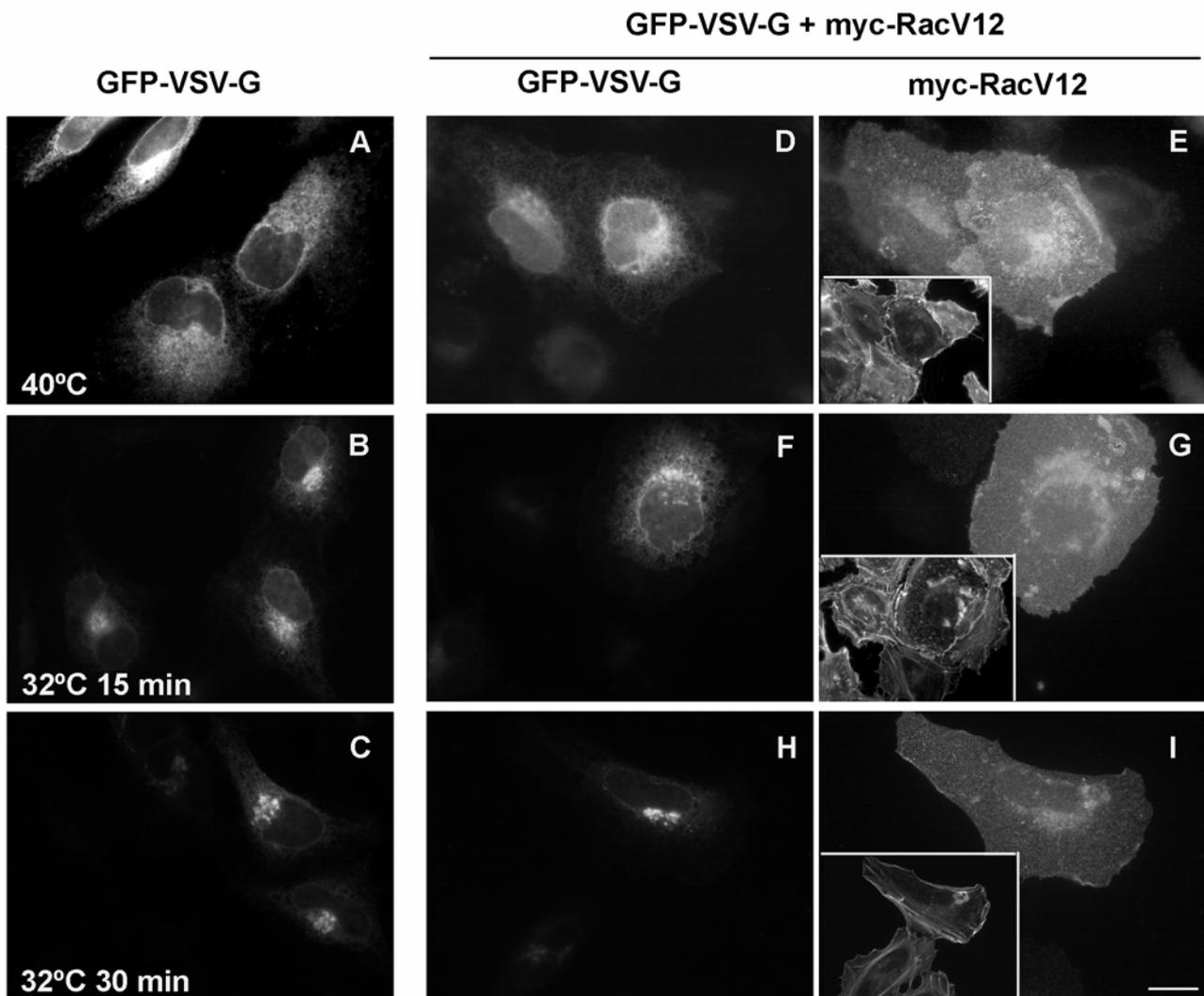


Figura 6. La cinética de la proteína G del VSV-G es idéntica en células que expresan RacV12 y en células control. Células HeLa transfectadas con GFP-VSV-G (A-C) o bien co-transfectadas con los vectores de expresión GFP-VSV-G y Myc-GFP-RacV12 (D-I) se incubaron durante 24 horas a 40°C para que la proteína G quedase acumulada en RE. Seguidamente se siguió el transporte de la proteína G desde el RE hacia el CG incubando a las células a 32 °C. Finalmente se procesaron las células para IF. Las células transfectadas con RacV12 se visualizaron con anticuerpos frente a myc (E, G, I). La proteína G se pone de manifiesto gracias a que se encuentra fusionada con GFP. Los recuadros muestran el efecto de la expresión de RacV12 sobre el citoesqueleto de actina puesto de manifiesto con faloidina. Imágenes tomadas con una cámara Olympus. Barra 10 μ m.

acumulación en los sitios de salida del RE. Por lo tanto, la expresión de Sar1^{dn} inhibe el transporte anterógrado poniendo de manifiesto el transporte retrógrado que continúa normalmente hasta la desaparición del CG en el RE (Aridor et al., 1995; Kuge et al., 1994; Storrie et al., 1998). Co-microinyectamos células HeLa con un vector que expresaba la proteína mutada Sar1^{dn} y los vectores de expresión para los dominantes positivos de RhoA, Rac1 o Cdc42. Asimismo, como control del efecto esperado de

Sar1^{dn}, microinyectamos células únicamente con Sar1^{dn}. Incubamos las células durante 4 horas a 37 °C y seguidamente fueron procesadas para IF utilizando giantina como marcador del CG. En las células microinyectadas sólo con Sar1^{dn} observamos que la proteína giantina da un marcaje difuso típico de RE (fig. 7 recuadro en B). En el caso de las células que sobreexpresaban el dominante positivo de Rac1 (fig. 7 A, B y C) o RhoA (no se muestra) obtuvimos el mismo resultado que en las células control y por tanto la giantina presenta un marcaje típico de RE (fig. 7 B y C). En cambio, tal y como ya habíamos descrito anteriormente (Luna et al., 2002), la forma activa de Cdc42 provoca un retraso en desensamblaje del CG inducido por Sar1^{dn} con lo que el marcaje con giantina presentaba todavía el típico patrón de CG (fig. 7 D, E, F). Este resultado corrobora los datos obtenidos con BFA y confirma que, a diferencia de Cdc42, ni Rac1 ni RhoA están implicados en la regulación del transporte retrógrado.

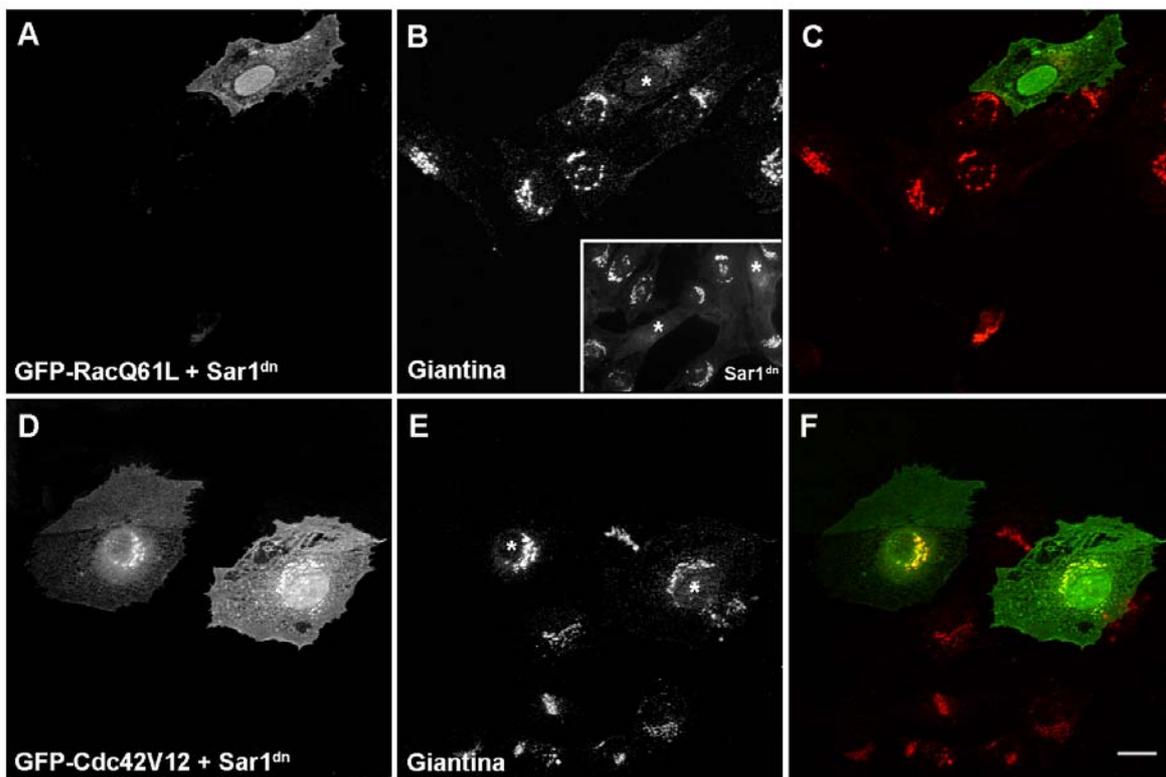


Figura 7. Rac1 no altera la acumulación en RE de giantina inducida por Sar1^{dn} (ver recuadro en B). Células HeLa fueron co-microinyectadas en el núcleo con Sar1^{dn} y GFP-RacV12 (A) o con GFP-Cdc42V12 (D). Tras 4 horas de expresión, las células fueron fijadas y procesadas para IF empleando anticuerpos frente a giantina (B y E). Las figuras C y F muestran la superposición del marcaje con GFP y giantina. Imágenes tomadas con un microscopio confocal. Los asteriscos en D y E indican las células transfectadas. Barra 10 μ m.

5.-RAC1 Y RHOA NO ALTERAN LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS CICLANTES.

Hasta este momento, en los ensayos experimentales para estudiar el transporte retrógrado siempre habíamos empleado giantina como marcador del CG, una proteína de matriz localizada en la parte *cis*-media de este orgánulo (Linstedt y Hauri, 1993). Pensamos que si Rac1 o RhoA ejercieran alguna alteración en alguna vía de reciclaje esta proteína no sería el marcador más idóneo para detectarla ya que existe controversia sobre si las proteínas de matriz ciclan o no a través del RE (Miles et al., 2001; Seemann et al., 2000; Ward et al., 2001). Por este motivo decidimos estudiar el efecto de estas GTPasas sobre el patrón de distribución de proteínas ciclantes como TGN46 que cicla entre la red *trans* del Golgi (TGN) y la membrana plasmática (Prescott et al., 1997) y el receptor de KDEL (KDELr; ERD2) que cicla entre el CG y el RE (Girod et al., 1999). Células HeLa transitoriamente transfectadas con los dominantes positivos o negativos de Rac1 y RhoA fueron fijadas y procesadas para IF empleando anticuerpos frente al receptor de KDEL o TGN46. En el caso de TGN46, esta proteína presentaba un patrón de distribución idéntico tanto en las células transfectadas con GFP-RacV12 como en las células control no transfectadas (fig. 8 A y B). Tampoco observamos cambios cuando expresamos la forma inactiva de Rac1 (RacN17; no se muestra).

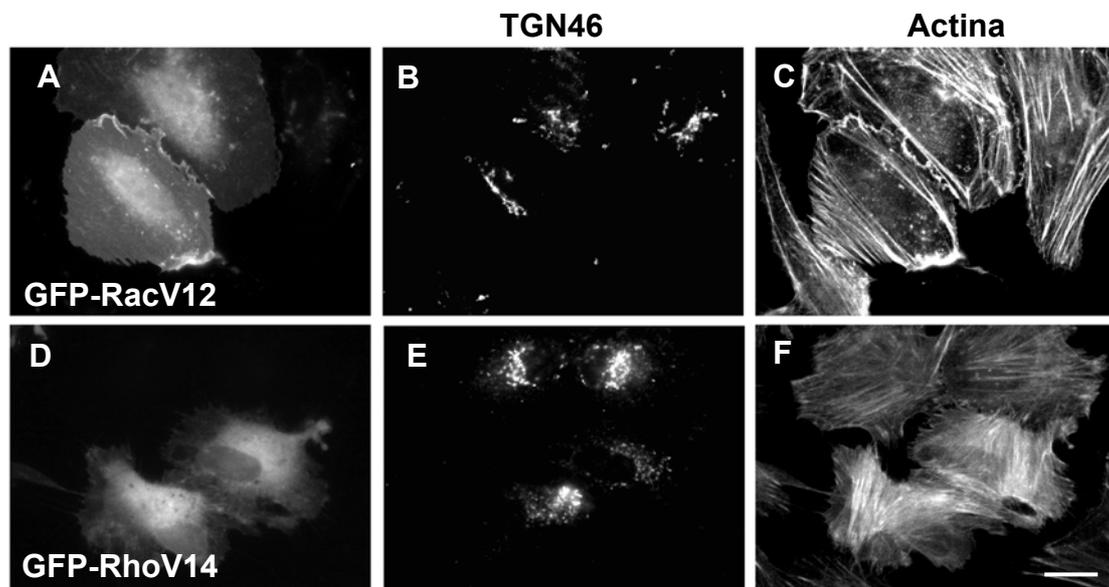


Figura 8. Rac1 y RhoA no alteran el patrón de distribución de la proteína ciclante TGN46. Células HeLa previamente transfectadas con GFP-RacV12 (A) o GFP-RhoV14 (D) fueron fijadas y procesadas para IF. Se utilizó un anticuerpo frente a la proteína TGN46 (B y E) y se marcaron las fibrás de estrés con faloidina-CPITC (C y F). Imágenes tomadas con una cámara Olympus. Barra 10 μ m.

La sobreexpresión de la forma activa de RhoA tampoco provocó cambios en la distribución de TGN46 (fig. 8 D y E). Lo mismo ocurre en células transfectadas con la forma inactiva de Rho (RhoN19; no se muestra).

La expresión de los dominantes positivos de Rac1 y RhoA da lugar a la aparición de ondulaciones de membrana (fig. 8 C) o a un aumento de fibras de estrés (fig. 8 F), respectivamente. Con ello descartamos que la ausencia de efecto sobre el transporte o el ciclaje de proteínas se deba a que los mutantes expresados no eran funcionales.

El receptor de KDEL (ERD2; Lewis y Pelham, 1990) se encarga de retornar las proteínas solubles residentes en el RE que se han escapado hasta el compartimento intermedio (CI, ERGIC) y el CG, es por tanto una proteína que cicla continuamente entre RE y CG pasando por el ERGIC empleando siempre intermediarios de transporte de tipo COPI (Orci et al., 1997; Girod et al., 1999). A 37 °C esta proteína se localiza mayoritariamente en el complejo de Golgi (fig. 9 B y J) pero cuando las células se incuban a 15° C, el receptor de KDEL queda retenido en el ERGIC y se observa entonces un patrón puntiforme distribuido por todo el citoplasma (fig. 9 H y O). Para determinar si Rac1 y/o RhoA inducían cambios en la distribución típica de KDELr a 37 °C o en su redistribución a 15 °C, transfectamos células HeLa con las formas activas (fig. 9 A-O) e inactivas (no se muestra) de ambas GTPasas y posteriormente se incubaron a 15°C para observar si había cambios en la cinética de adquisición del patrón puntiforme por acumulación de KDELr en el CI. Tanto las células transfectadas con GFP-RacV12 (fig. 9 A-H) como las que lo están con RhoV14 (fig. 9 I-O) siguen la misma cinética de distribución de KDELr a 15 °C. A los 15 minutos se comienza a observar un progresivo incremento de estructuras puntiformes (fig. 9 D y L) tanto en células control como en las células transfectadas. En los recuadros de la figura 9 podemos observar las reorganizaciones del citoesqueleto de actina que experimentan las células que sobreexpresan las formas mutadas de Rac1 y RhoA. Los resultados muestran que la distribución subcelular del KDELr tanto a 37 °C como a 15 °C no se ve alterada por efecto de la expresión de las formas mutadas de Rac1 o RhoA. Así pues, el conjunto de estos resultados confirma que ni Rac1 ni RhoA regulan el transporte de proteínas que ciclan ya sea entre el CG y la membrana plasmática (TGN46) como aquellas que lo hacen entre el CG y el RE (KDELr).

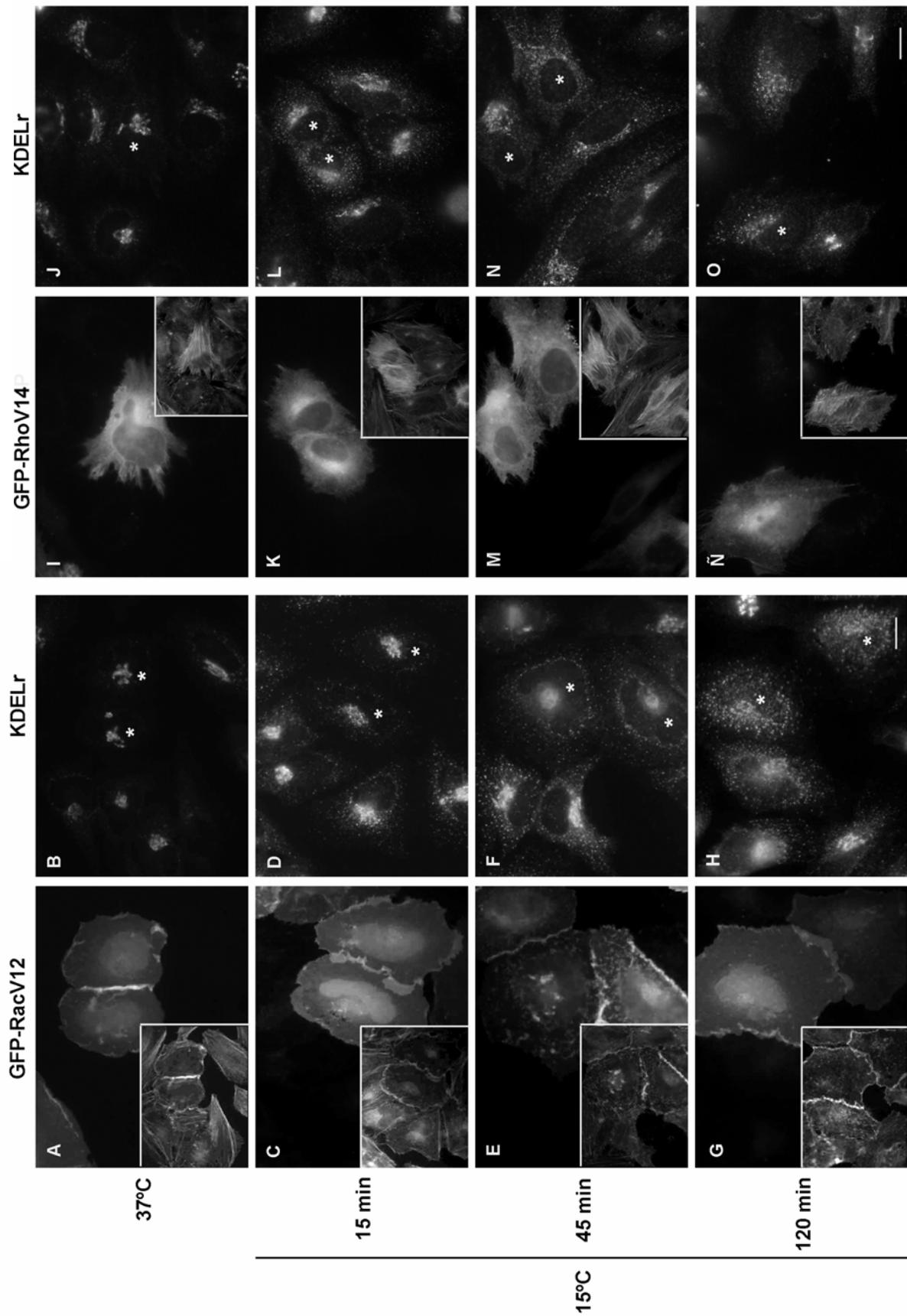


Figura 9. Rac1 y RhoA no alteran la redistribución de KDELr en células incubadas a 15 °C. Células HeLa transfectadas con GFP-RacV12 (A-H) o con GFP- RhoV14 (I-O) se incubaron a 15 °C durante 120 minutos y fueron fijadas a diferentes intervalos de tiempo para monitorizar la redistribución de la proteína KDELr al CI. A continuación fueron procesadas para IF empleando un anticuerpo frente a KDELr y CPITC-faloidina para así visualizar el efecto de la sobreexpresión de Rac1 y RhoA sobre el citoesqueleto de actina (recuadros). Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital Olympus. Barra 10 µm.

6.-SÓLO LA FORMA ACTIVADA DE CDC42 PROVOCA CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DEL COMPLEJO DE GOLGI

El conjunto de todos los resultados expuestos hasta el momento indican que ni Rac1 ni RhoA regulan el transporte de proteínas en la zona RE/CG. Sin embargo, a pesar de su no implicación en las fases tempranas de la vía secretora, su actividad podría estar relacionada con el mantenimiento de la citoarquitectura del CG. Así, trabajos previos del laboratorio han demostrado que existe una correlación entre el citoesqueleto de actina y la morfología del complejo de Golgi (Valderrama et al., 1998) y por ello, nuestro siguiente paso fue examinar si las Rho GTPasas regulaban de alguna manera dicha correlación.

El grupo del Dr. J. C. Lacal (CSIC, Madrid) nos cedió unas líneas celulares de fibroblastos NIH3T3 que expresaban de forma constitutiva los dominantes positivos de RhoA, Rac1 y Cdc42 (ver el siguiente cuadro).

Nombre de la línea	Mutante expresado
NE3	RhoV14
NC5.2	RacQ61L
PQL29	Cdc42V12
NC1.2	Vector vacío (moc)

Para ver más claramente los efectos de la expresión constitutiva de las formas activadas de las GTPasas sobre la organización del citoesqueleto de actina, cultivamos las células en ausencia de suero durante 48 horas y pusimos de manifiesto la organización del citoesqueleto de actina con TRITC-faloidina. Observamos las reorganizaciones del citoesqueleto de actina mas o menos esperadas en función de la GTPasas expresada, es decir, incremento de fibras de estrés en el caso de RhoA (fig. 10 E), ondulaciones de membrana en el caso de Rac1 (fig. 10 G) y en el caso de Cdc42 aumento de fibras de estrés y aparición de algunos filopodia (fig. 10 C). Observamos también que las células

que expresaban la forma activa de Cdc42 presentaban además un CG mucho más extenso, casi circular alrededor del núcleo (fig. 10 D), a diferencia de las células control (NC1.2, fig. 10 B) o las que expresaban las formas activas de RhoA (fig. 10 F) o de Rac 1 (fig. 10 H) que en cambio mostraban un CG compactado.

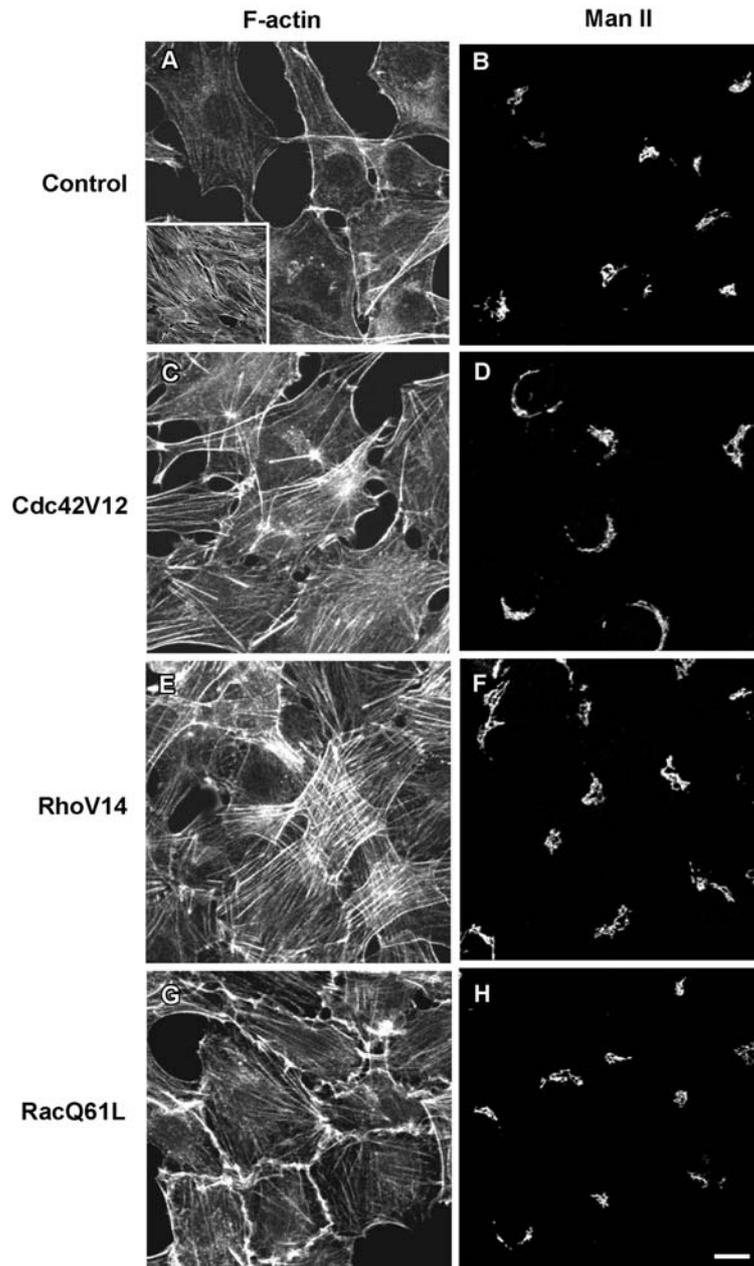


Figura 10. Cambios en la morfología del CG en células NIH3T3 que expresan constitutivamente los dominantes positivos de Cdc42 (C y D), RhoA (E y F) y Rac1 (G y H) en comparación con células control que expresan el vector vacío (A y B). Las células fueron cultivadas en ausencia de suero durante 48 horas y a continuación procesadas para IF empleando TRITC-faloidina para marcar el citoesqueleto de actina (A, C, E y G), y anti-Man II para visualizar el CG (B, D, F y H). El recuadro en A muestra la apariencia de las fibras de estrés en células cultivadas con suero. Imágenes captadas con microscopio confocal. Barra 10 μ m.

Un resultado parecido al anterior se obtuvo con una aproximación experimental diferente. Microinyectamos en el citoplasma de células humanas A375p las formas constitutivamente activadas de las proteínas Cdc42 o Rac1 (Cdc42Q61L-GST o Rac1Q61L-GST, respectivamente). Las células A375p se caracterizan por presentar un complejo de Golgi altamente compactado por lo que cualquier cambio en su morfología es fácilmente observable (Ayala et al., 1999). Empleando anticuerpos frente a la enzima manosidasa II, observamos que si bien el CG permanece compactado en las células microinyectadas con la proteína Rac1-GTP (fig. 11 B), aquellas microinyectadas con Cdc42-GTP mostraban un CG más extendido (fig. 11 D). Estos resultados indican que, a diferencia de Rac1 y RhoA, Cdc42 no sólo se localiza en el complejo de Golgi y regula el transporte retrógrado de proteínas (Luna et al., 2002) sino que también parece estar implicada en regular su morfología.

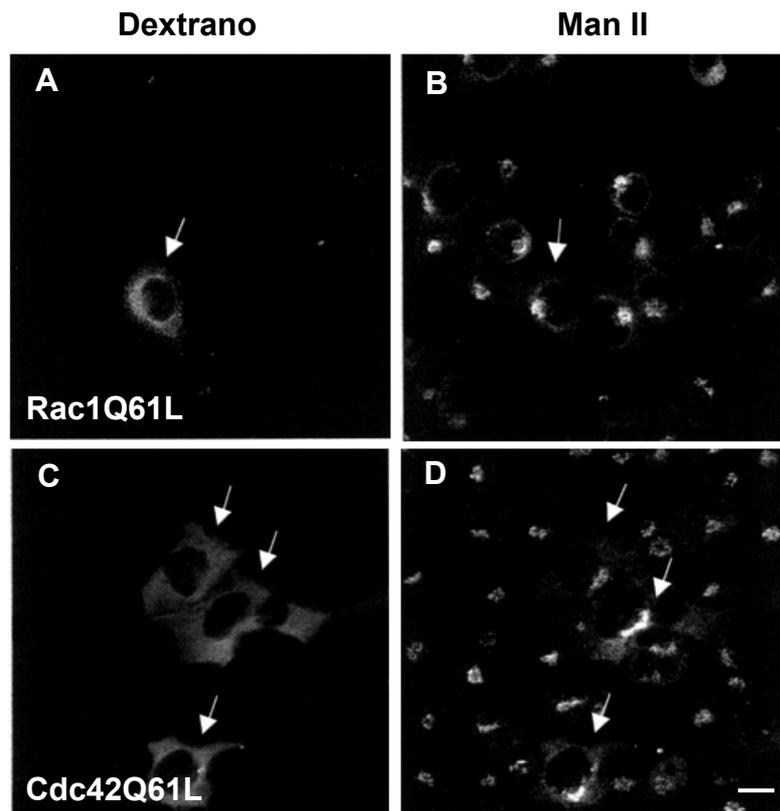


Figura 11. Solamente la forma activa de Cdc42 (Cdc42Q61L) provoca cambios en la morfología del CG. Células A375p fueron co-microinyectadas en el citoplasma con dextrano y con las proteínas mutadas fusionadas a GST, RacQ61L (A-B) o Cdc42Q61L (C-D). Tras 30 minutos a 37 °C, las células fueron fijadas y procesadas para IF empleando anticuerpos frente a manosidasa II (Man II, B y D). Las flechas indican las células microinyectadas. Imágenes tomadas con una cámara Olympus. Barra 10 µm.

7.-N-WASP Y ARP2/3, EFECTORES DE CDC42, SE LOCALIZAN EN EL COMPLEJO DE GOLGI

En el trabajo de Luna et al., (2002) empleando técnicas de crioinmunomicroscopía electrónica mostramos que la forma activa de Cdc42 está enriquecida en las porciones laterales de las cisternas del CG (fig. 12; tabla 1). En este mismo trabajo, mediante diversas aproximaciones experimentales mostramos también que Cdc42 regula el transporte retrógrado de proteínas utilizando como efectores a N-WASP y el complejo multiproteico Arp2/3.

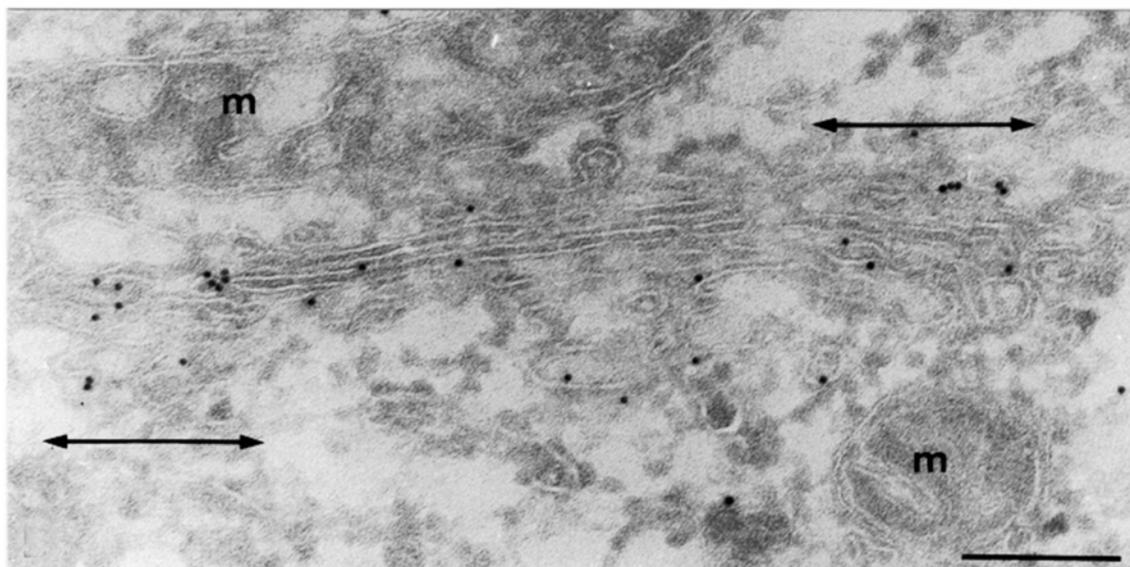


Figura 12. La forma activa de Cdc42 está enriquecida en los extremos de las cisternas del CG y en ITs cercanos al CG (peri-Golgi). Células HeLa transfectadas con GFP-Cdc42V12 fueron procesadas para ensayos de crioultramicrotomía. Mediante inmunomarcaje empleando anti-GFP fueron detectadas sólo aquellas células transfectadas. Las flechas marcan las porciones laterales de las cisternas. Barra 200 nm; m, mitocondria.

	Cisternas del CG		Elementos túbulo-vesiculares peri-Golgi	No unido a membranas
	P. Laterales	P. Central		
Cdc42V12	36.6 ± 3.2*	23.8 ± 3.5*	33.4 ± 3.2	6.3 ± 1.8
Cdc42N17	16.2 ± 4.0*	13.5 ± 4.0	16.6 ± 4.1	53.7 ± 5.3

Tabla 1. Análisis cuantitativo de la localización subcelular del marcaje con oro coloidal en la zona del Golgi de las células HeLa transfectadas con GFP-Cdc42V12 o GFP-Cdc42N17 y procesadas en las condiciones antes referidas. Los números representan el porcentaje (media ± SEM) del marcaje total de oro en las diferentes áreas establecidas en la zona del Golgi. (*)Estudio estadístico con el test de la *t* de student ($p \leq 0.01$). P. Laterales, porciones laterales de las cisternas del CG; P. Central, porción central de las cisternas del CG.

Por otro lado, la cascada de señalización Cdc42/N-WASP/Arp2/3 ha sido ampliamente estudiada a nivel de membrana plasmática donde actúa a gran escala en el proceso de polimerización de actina (ver introducción pág. 18, fig. 5). Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo era conocer si N-WASP y Arp2/3, al igual que Cdc42, se localizaban también en el complejo de Golgi donde podrían actuar en los procesos de nucleación y polimerización de actina involucrados en el transporte retrógrado.

Con este propósito llevamos a cabo estudios de crioinmunomicroscopía electrónica. Para estudiar la distribución de N-WASP inicialmente empleamos un anticuerpo cedido por el laboratorio del Dr. M. Way (ICRF, Londres) que reconoce la proteína endógena. Las células HeLa fueron procesadas para crioultramicrotomía (ver materiales y métodos pág 115) y se realizó un inmunomarcaje empleando el anticuerpo frente a N-WASP. Los resultados iniciales obtenidos indicaban que dicho anticuerpo no era apto para estudios de microscopía electrónica. Por este motivo decidimos emplear células HeLa transfectadas de forma transitoria con el cDNA que codifica para GFP-N-WASP y utilizar a continuación un anticuerpo frente a GFP. De esta forma observamos que en las células que sobreexpresaban N-WASP, la membrana plasmática aparece completamente decorada con partículas de oro (fig 13 recuadro). A nivel del CG, N-WASP se distribuye en intermediarios de transporte algunos de los cuales muestran la típica cubierta electrodensa COPI (fig 13 flechas), así como en las cisternas donde el marcaje

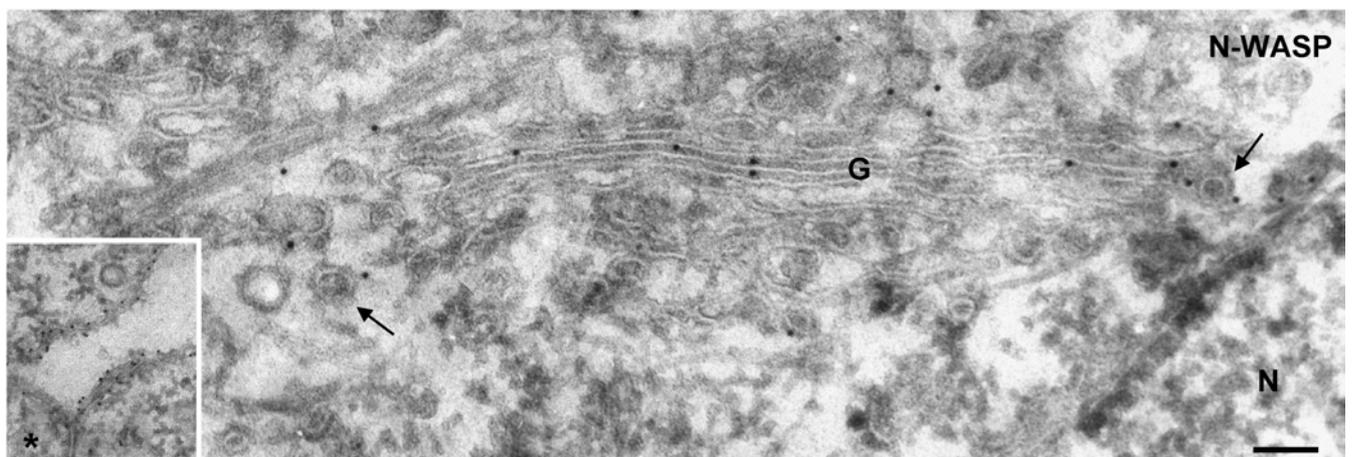


Figura 13. GFP-N-WASP se localiza en las cisternas del CG y en ITs cercanos. Células HeLa fueron transfectadas con el cDNA que codifica para GFP-N-WASP, fijadas y procesadas para crioinmunomicroscopía electrónica. Se empleó un anticuerpo policlonal frente a GFP seguido de proteína A unida a oro coloidal de 10 nm. Las células transfectadas muestran la membrana plasmática decorada con partículas de oro (recuadro) a diferencia de las no transfectadas (asterisco en recuadro). En estas células, se observa marcaje en las cisternas del CG así como en los ITs, algunos de los cuales presentan la típica cubierta COPI (flechas). G, Golgi; N, núcleo. Barra 100 nm.

con oro coloidal se distribuía homogéneamente en las porciones laterales y centrales.

Por lo que respecta a Arp2/3, estudios previos de IF empleando un anticuerpo frente a la subunidad Arp3 mostraban un marcaje citoplasmático con una cierta acumulación en la zona perinuclear. Estudios de co-localización con GM130 confirmaron que dicha acumulación se correspondía con el CG (fig. 14 A). Este marcaje, no es específico de la línea celular empleada ya que se reproduce en otros modelos celulares como los fibroblastos NIH3T3 (fig. 14 B). Para estudiar la localización de Arp2/3 mediante crioinmunomicroscopía electrónica se empleó el anticuerpo frente Arp3, lo que nos permitió estudiar su localización endógena. Observamos que Arp3 se distribuía mayoritariamente en ITs próximos al CG (fig 14 C flechas) y en menor medida en las cisternas del CG.

8.-CDC42, N-WASP Y ARP2/3 PRESENTAN UNA DISTRIBUCIÓN POLARIZADA (*CIS-TRANS*) EN LAS CISTERNAS DEL COMPLEJO DE GOLGI.

Nuestro siguiente propósito fue determinar si Cdc42, N-WASP y Arp2/3 se distribuían por igual en las cisternas del CG o tenían una localización restringida dentro del mismo (*cis*, *media* o *trans*) tal como ocurre con las enzimas de glicosilación. Para ello, llevamos a cabo estudios de co-localización a nivel de crioinmunomicroscopía electrónica entre Cdc42, N-WASP o Arp3 y proteínas residentes del CG tanto de la cara *cis* (GM130, Nakamura et al., 1995) como de la red *trans*-Golgi (TGN46, Prescott et al., 1997). El CG en las células HeLa contiene habitualmente cinco cisternas (C1-C5). En las células transfectadas con GFP-Cdc42, esta GTPasa se encuentra enriquecida en las cisternas *cis-media* (C1-C3) pero también aparece en las cisternas *trans* (C4 y C5) (tabla 2 y fig 15 A). Con respecto a GFP-N-WASP, se encuentra distribuido sólo en las tres primeras cisternas estando ausente en las cisternas *trans* (C4, C5; tabla 2). La proteína Arp3 es de todas las estudiadas la que presenta una polaridad más marcada con el casi 70% del oro coloidal acumulado en la primera cisterna (tabla 2 y fig 15 B). Los experimentos empleando TGN46 confirman que N-WASP y Arp3 (fig 15 C) no se encuentran en las cisternas *trans* aunque Arp3 muestra cierta co-localización en estructuras tubulo-vesiculares del TGN inmunoreactivas para TGN46 (ver pág 97).

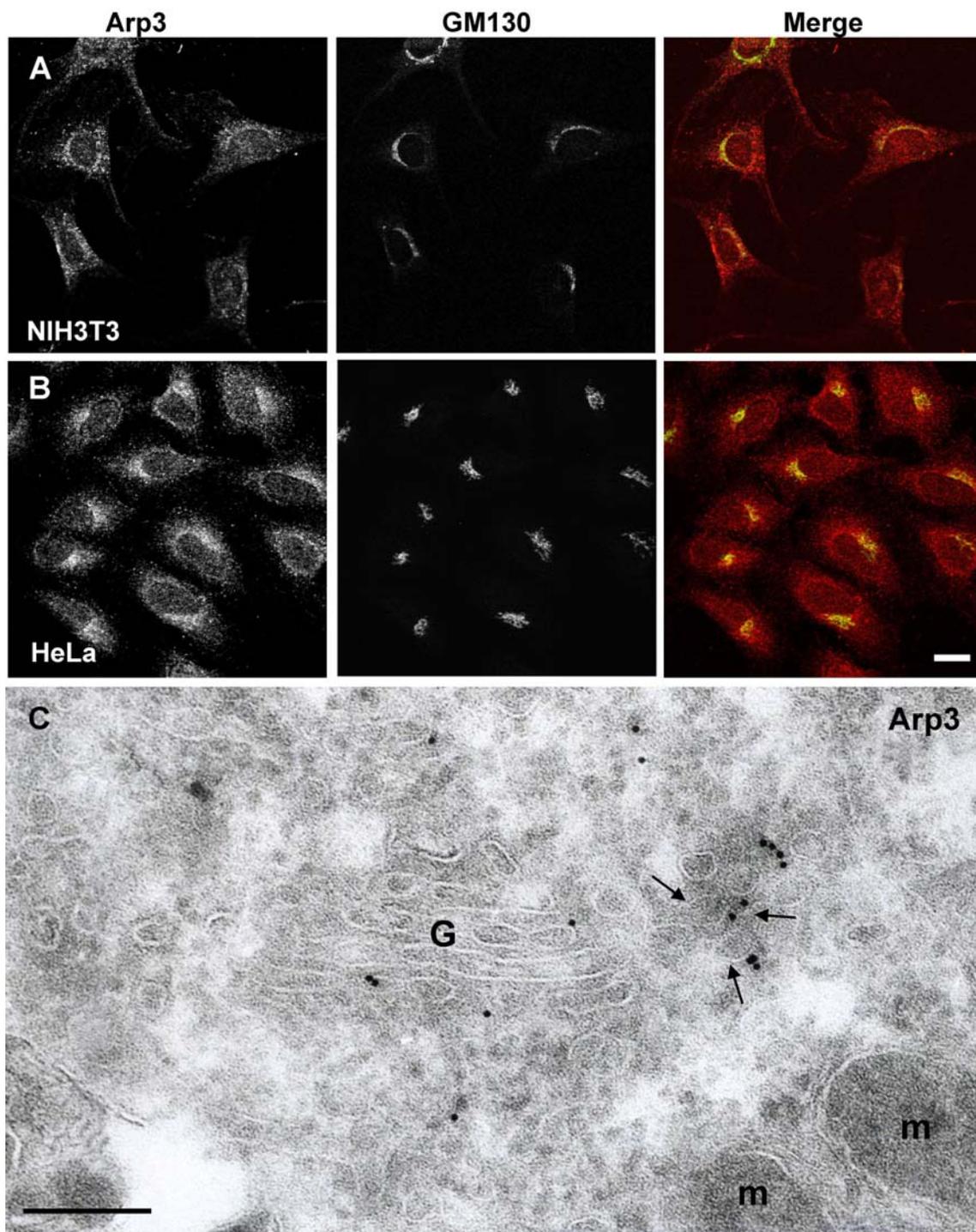


Figura 14. Arp2/3 se localiza en cisternas e ITs del CG. (A y B) estudios de IF en células HeLa y NIH-3T3. Se llevaron a cabo dobles marcajes empleando anticuerpos frente al marcador de Golgi GM130 (verde) y la subunidad Arp3 (rojo). El color amarillo en el tercer panel indica el grado de colocalización de ambas proteínas. (C) células HeLa fueron procesadas para estudios de crioinmunomicroscopía electrónica. Se empleó un anticuerpo policlonal frente a la subunidad Arp3 seguido de proteína A ligada a oro de 10 nm. Se observa marcaje en las cisternas del CG y en ITs (flechas). Barra en (A y B) 10 μ m. Barra en (C) 100 nm.

	C1	C2	C3	C4	C5
Cdc42	23.4 ± 4.0	33.6 ± 5.4	23.8 ± 3.6	11.1 ± 3.1	8.4 ± 3.9
N-WASP	50.4 ± 6.2	33.8 ± 4.9	13.8 ± 5.0	0.7 ± 0.7	1.3 ± 2.2
Arp3	68.1 ± 7.2	18.0 ± 5.8	8.3 ± 4.3	4.7 ± 2.4	1.3 ± 2.2

Tabla 2. Distribución *cis-trans* (C1-C5, respectivamente) de GFP-Cdc42, N-WASP y Arp3 en células Hela. Los números representan el porcentaje (media ± SEM) del total de las partículas de oro cuantificadas.

9.-LA ACTIVACIÓN DE CDC42 INDUCE LA REDISTRIBUCIÓN DE N-WASP Y ARP3 A LOS LATERALES DE LAS CISTERNAS DEL GOLGI.

Previamente habíamos observado el enriquecimiento de la forma activa de Cdc42 (Cdc42V12) en las porciones laterales del CG (fig. 12; tabla 1). Por lo tanto, ya que sus efectores N-WASP y Arp3 se localizan también en este orgánulo, examinamos si ambos se redistribuían hacia las porciones laterales de las cisternas del CG acompañando a Cdc42 activado. Co-transfectamos células Hela con los vectores de expresión GFP-N-WASP y myc-Cdc42V12 o bien GFP-N-WASP y myc-Cdc42N17 y las procesamos para crioinmunomicroscopía electrónica. Como se muestra en la tabla 3, la mayor parte de partículas de oro aparecen asociadas a estructuras túbulo-vesiculares en la zona del CG. Ya que nuestro objetivo era examinar posibles cambios en la distribución dentro de las cisternas nos centramos en las porciones centrales y laterales de las mismas. Así, en las células transfectadas únicamente con GFP-N-WASP el inmunomarcaje frente a GFP mostraba una distribución homogénea de esta proteína entre las porciones centrales y

Cisternas del CG

	P. Laterales	P. Centrales	Elementos tubulo-vesiculares peri-Golgi
Control	14.1 ± 5.4	23.5 ± 5.0	62.4 ± 6.7
Cdc42V12	35.2 ± 3.2*	15.3 ± 4.1	49.4 ± 3.8
Cdc42N17	21.7 ± 3.8	21.2 ± 3.3	57.1 ± 4.9

Tabla 3. Se llevaron a cabo estudios estadísticos para examinar cambios en la distribución de N-WASP dentro de las cisternas del CG en células HeLa transfectadas con GFP-N-WASP (control), co-transfectadas con GFP-N-WASP/myc-Cdc42V12 (Cdc42V12) o con GFP-N-WASP/myc-Cdc42N17 (Cdc42N17). Se emplearon anticuerpos frente a GFP y anticuerpos frente a myc seguidos de proteína A-oro coloidal de 15 y 10 nm, respectivamente. La tabla indica los porcentajes (media ± SEM) del total del marcaje de oro. (*) Diferencias significativas con respecto a las porciones centrales empleando el test de la *t* de Student ($p \leq 0.001$).

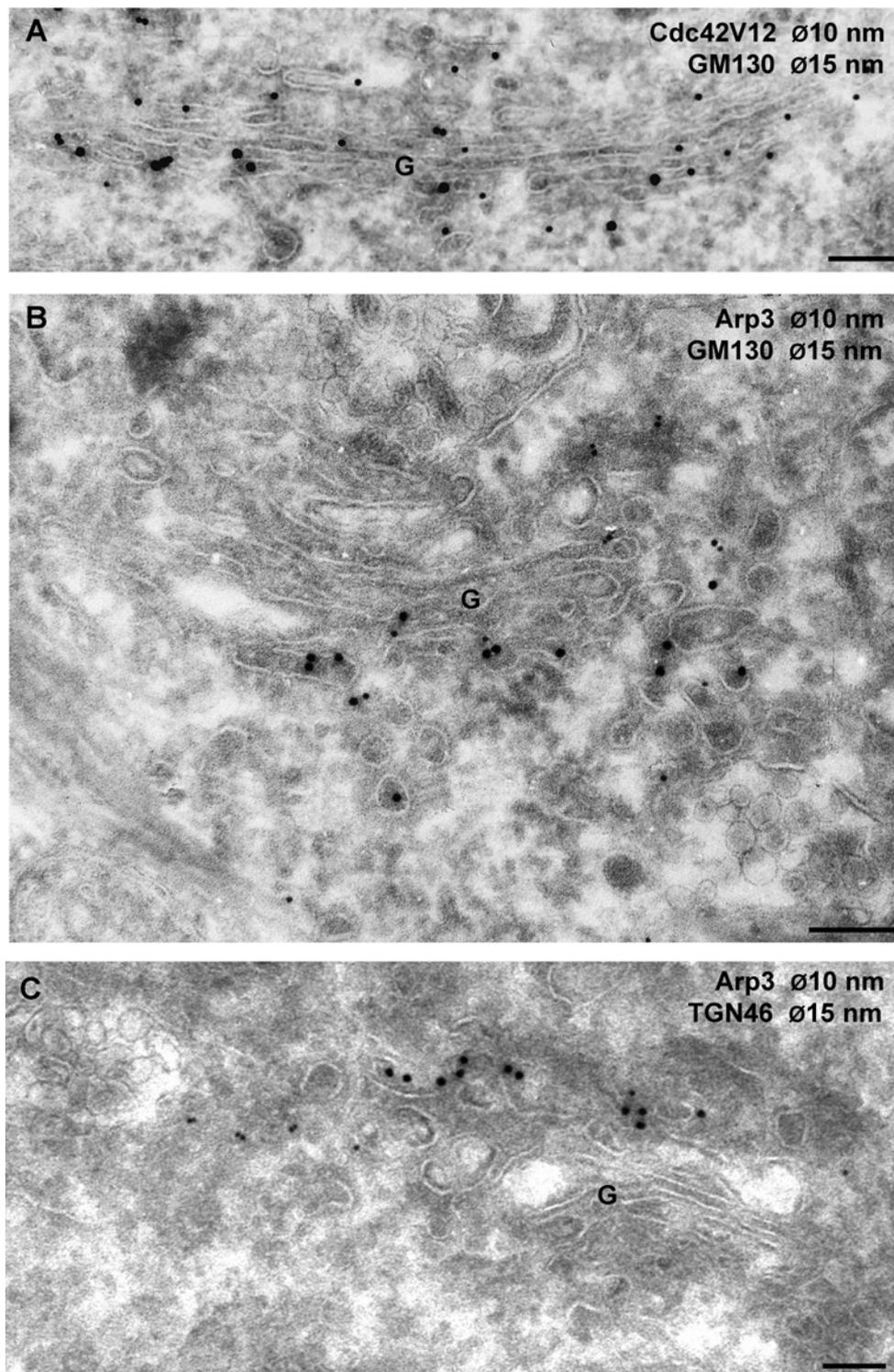


Figura 15. Cdc42, N-WASP y Arp3 presentan una distribución polarizada dentro de las cisternas del CG. Células HeLa transfectadas transitoriamente con GFP-Cdc42 (A) o no transfectadas (B y C) fueron fijadas y procesadas para doble inmunomarcaje con anticuerpos frente a GFP (A) o frente a Arp3 (B y C) y anticuerpos frente GM130 (A y B) o TGN46 (C) seguidos de proteína A-oro coloidal. Cdc42 presenta una distribución mas amplia que la de GM130 extendiéndose hasta cisternas de la porción *media* y (en menor medida) *trans* del Golgi, mientras que Arp3 sigue una distribución muy semejante a la de GM130, en cambio las proteínas TGN46 y Arp3 aparecen segregadas en las cisternas del CG. Barras, 100 nm.

laterales (tabla 3 condición control). En células co-transfectadas con GFP-N-WASP y myc-Cdc42V12 observamos que N-WASP se redistribuía significativamente hacia las porciones laterales en detrimento de las porciones centrales (tabla 3 condición Cdc42V12). La co-transfección de GFP-N-WASP y el dominante negativo de Cdc42 (myc-Cdc42N17) no induce cambio alguno en la distribución de N-WASP en las cisternas (tabla 3 condición Cdc42N17).

A continuación, estudiamos la distribución de Arp3 en presencia de las diferentes formas mutadas de Cdc42 siguiendo el mismo diseño experimental empleado para N-WASP con la única diferencia de que no se llevaron a cabo co-transfecciones, ya que se estudió la distribución relativa de la proteína endógena Arp3. Como muestra la tabla 4, tanto en células control no transfectadas (tabla 4 condición control) como en células transfectadas con GFP-Cdc42N17 (tabla 4; fig 16 B), Arp3 se distribuye de forma uniforme a lo largo de las cisternas. Sólo en las células que sobreexpresaban GFP-Cdc42V12 (tabla 4; fig 16 A) Arp3 se redistribuía significativamente hacia las porciones laterales.

	Cisternas del CG		
	P. Laterales	P. Centrale	Elementos túbulo-vesiculares peri-golgi
Control	13.5 ± 5.8	16.9 ± 5.6	69.2 ± 7.1
Cdc42V12	23.5 ± 5.7*	11.5 ± 4.9	65.0 ± 7.7
Cdc42N17	14.4 ± 3.5	18.8 ± 3.9	67.2 ± 5.1

Tabla 4. Estudio estadístico para examinar cambios en la distribución de Arp3. Células HeLa no transfectadas (control), transfectadas con GFP-Cdc42V12 (Cdc42V12) o GFP-Cdc42N17 (Cdc42N17) se inmunomarcaron empleando anticuerpos frente a GFP y anticuerpos frente a Arp3 seguidos de proteína A-oro coloidal de 15 y 10 nm, respectivamente. La tabla indica los porcentajes (media ± SEM) del total del marcaje de oro. (*) Diferencias significativas con respecto a las porciones centrales empleando el test de la *t* de Student ($p \leq 0.001$).

10.-CDC42, N-WASP Y ARP3 CO-LOCALIZAN EN ELEMENTOS TÚBULO-VESICULARES DE LA ZONA RE/COMPLEJO DE GOLGI.

En los estudios de distribución de Cdc42, N-WASP y Arp2/3 (tablas 1, 3 y 4, respectivamente) observamos que un alto porcentaje de estas moléculas se encuentran en estructuras túbulo-vesiculares localizadas alrededor del CG que podrían corresponder a intermediarios de transporte. Consecuentemente, decidimos examinar si Cdc42 y sus efectores N-WASP y Arp2/3 co-localizaban entre sí en esos posibles ITs

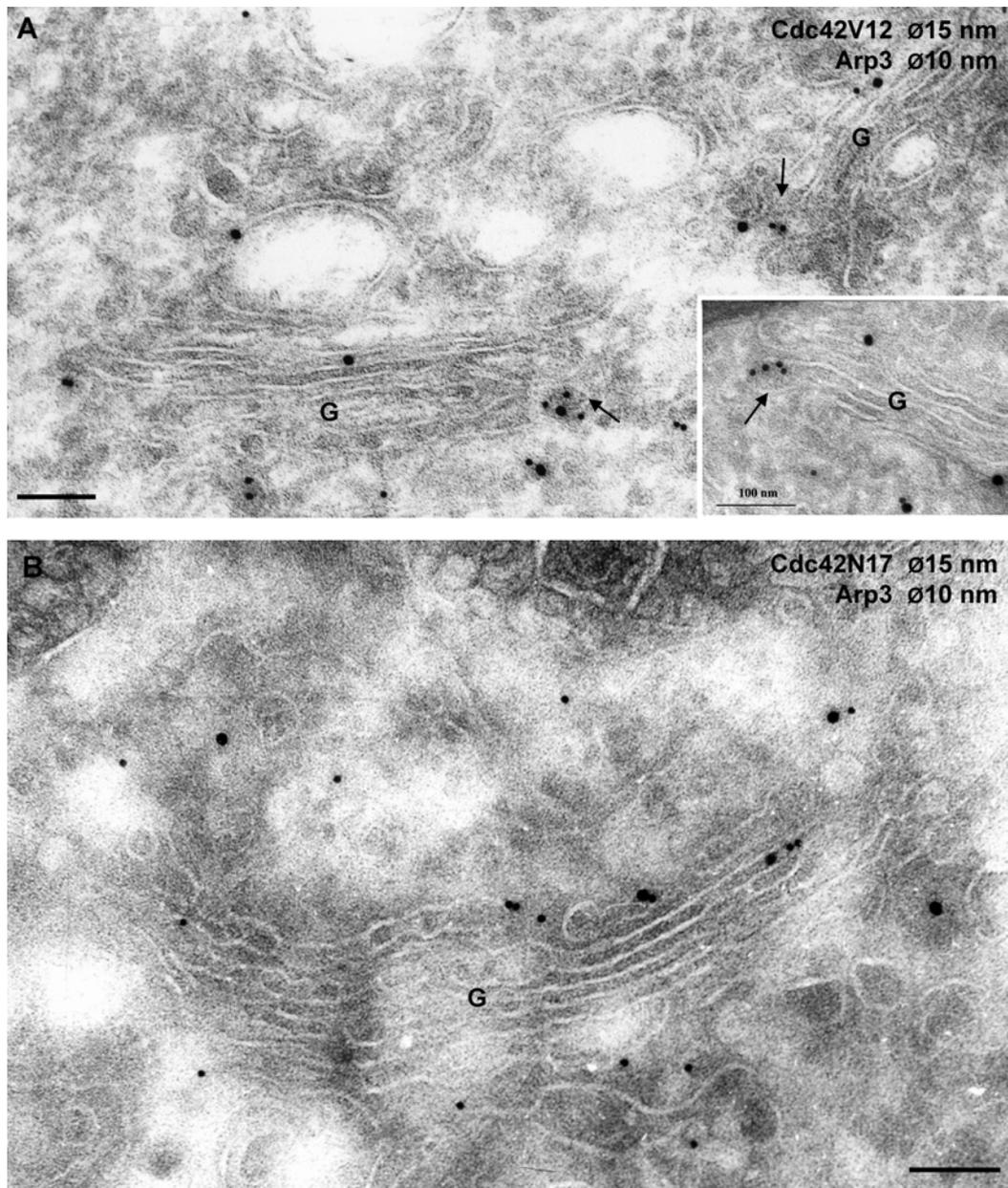


Figura 16. Localización de Arp3 en las membranas del CG en células HeLa transfectadas transitoriamente con myc-Cdc42V12 (A) o myc-Cdc42N17 (B). Las células fueron fijadas y doblemente marcadas empleando un anticuerpo monoclonal frente a myc y un anticuerpo policlonal frente a Arp3. Como anticuerpo secundario se empleó proteína A ligada a oro coloidal de 10 y 15 nm, respectivamente. En células que sobreexpresan Cdc42V12 (A), Arp3 se localiza mayoritariamente en porciones laterales de las cisternas del CG (recuadro en A, flecha), donde también se localiza Cdc42V12 (flecha en A). Sin embargo, en las células que expresan Cdc42N17 (B), Arp3 y Cdc42 se encuentran distribuidos uniformemente a lo largo de las cisternas. G, cisternas del complejo de Golgi. Barras, 100 nm.

y si esas estructuras túbulo-vesiculares que contenían Cdc42, N-WASP y/o Arp2/3 eran realmente ITs y, por tanto, co-localizaban con proteínas ciclantes y de secreción anterógrada en esta zona temprana de la vía secretora. Transfectamos células HeLa con la combinación de cDNAs que nos permitiera estudiar la co-localización de Cdc42 y N-WASP, Cdc42 y Arp3 o N-WASP y Arp3. Para la cuantificación se tuvieron en cuenta aquellas estructuras túbulo-vesiculares localizadas a una distancia inferior a 200 nm de los laterales del dictiosoma más cercano. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5 e indican altos porcentajes de co-localización para cualquiera de las combinaciones citadas. Así, un 30% de los elementos túbulo-vesiculares positivos para Cdc42 contenían también N-WASP. Este dato se mantiene casi invariable cuando contabilizamos el porcentaje de posibles ITs positivos para N-WASP que contenían también Cdc42 (32%). Curiosamente cuando analizamos la co-distribución de Cdc42 y Arp3 obteníamos porcentajes algo más elevados (50%) (fig 17 A y B). En los estudios de co-localización entre N-WASP y Arp3 (fig 17 C) se obtiene una cierta variación en los datos obtenidos en función de cómo se realice el análisis estadístico. Así, el porcentaje de elementos túbulo-vesiculares Arp3 positivos que contienen N-WASP es del 17%, pero si el estudio se lleva a cabo a la inversa, es decir cuantificando el porcentaje de posibles ITs positivos para N-WASP que contienen también Arp3 el porcentaje se dispara al 38%. Este dato sugería que la interacción entre N-WASP y Arp3 es transitoria y una vez N-WASP ha reclutado y activado a Arp2/3 tiene lugar una rápida disociación de N-WASP quedando Arp2/3 asociado al IT. Consistente con esta interpretación, es la rápida tasa de disociación de N-WASP y Arp2/3 observada en estudios *in vitro* (Marchan et al., 2001). A nivel de la membrana plasmática se

II

I	Cdc42V12	N-WASP	Arp3
Cdc42V12		32.5 ± 6.5	47.5 ± 3.4
N-WASP	29.7 ± 6.4		38.6 ± 7.5
Arp3	47.8 ± 3.2	17.5 ± 3.2	

Tabla 5. Análisis cuantitativo de la co-localización de Cdc42 activado (Cdc42V12), N-WASP y Arp3 en posibles IT próximos al CG. Para cada doble marcaje se cuantificaron al menos 100 estructuras túbulo-vesiculares marcadas y cercanas al dictiosoma. Los números indican el porcentaje (media ± SEM) de posibles ITs positivos para la proteína (I) que también contienen la proteína (II).

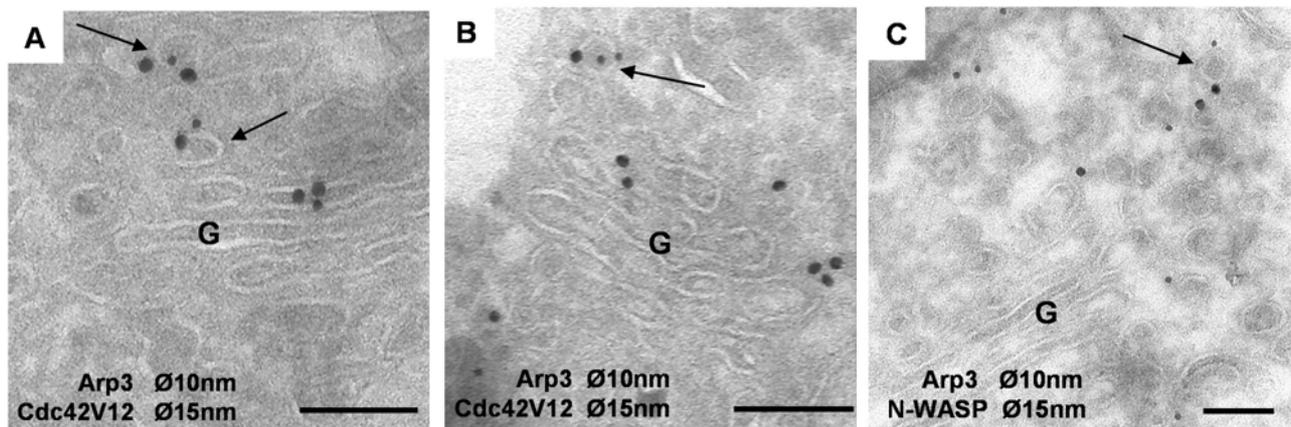


Figura 17. Co-localización en ITs (flechas) de Arp3 con Cdc42V12 (A y B) o con N-WASP (C) Células HeLa fueron transfectadas con GFP-Cdc42V12 (A y B) o con GFP-N-WASP (C). Se llevaron a cabo dobles marcajes utilizando anticuerpos frente Arp3 y frente GFP seguidos de proteína A oro de 10 nm y 15 nm, respectivamente. G, cisternas del complejo de Golgi. Barras 100 nm.

especula que tras la disociación de N-WASP y Arp2/3, cortactina se une al complejo proteico y mantiene estable el filamento de actina iniciado por la actividad nucleadora de Arp2/3. Ya que la mayoría de los estudios sobre cortactina están en relación con su actividad a nivel de la membrana plasmática, decidimos examinar, al igual que hicimos con Arp2/3, la posible localización de cortactina en el complejo de Golgi (ver apartado 12 de resultados pág. 98).

11.-LOS ELEMENTOS TUBULO-VESICULARES ARP3 POSITIVOS CONTIENEN PROTEÍNAS DE LA VÍA SECRETORA TEMPRANA

Dado el alto porcentaje de colocalización de Cdc42, N-WASP y Arp3 en elementos túbulo-vesiculares próximos al CG, nuestro interés se centró en caracterizarlos molecularmente para saber si se correspondían con ITs de tipo retrógrado, anterógrado o post-Golgi. Determinada ya la preferencia de los miembros de esta cascada de señalización, especialmente Arp3, por la cara *cis* del CG era de esperar que los ITs contuvieran marcadores moleculares típicos de la zona RE/CG. Realizamos dobles marcajes empleando anticuerpos frente a la subunidad Arp3 y anticuerpos frente GM130 (marcador *cis*-Golgi), el receptor de KDEL (KDELr; proteína que cicla continuamente entre el RE y el CG vía ITs tipo COPI) y TGN46 (marcador de TGN que cicla entre el TGN y la membrana plasmática) (fig. 18 A, B, C, respectivamente). Los

datos cuantitativos mostrados en la tabla 6 indican que casi el 30% de los ITs positivos para Arp3 contienen también GM130 o KDELR y sólo el 15% contienen TGN46. Se deduce pues que Arp3 está presente mayoritariamente en ITs que ciclan continuamente entre el RE y el CG. Es de destacar también que, a pesar de que Arp3 está prácticamente ausente en las cisternas *trans* del CG (ver fig. 15 C), sí que co-localiza parcialmente con ITs procedentes del TGN.

	GM130	KDELR	TGN46
Arp3	29.8 ± 5.9	27.4 ± 7.0	15.7 ± 5.7

Tabla 6. Análisis de la co-distribución de Arp3 con las proteínas indicadas en ITs próximos al CG. Un mínimo de 100 ITs positivos fueron tenidos en cuenta para llevar a cabo el análisis estadístico. En la tabla se indican los porcentajes (media ± SEM) de ITs positivos para Arp3 que también contienen las proteínas señaladas en la tabla.

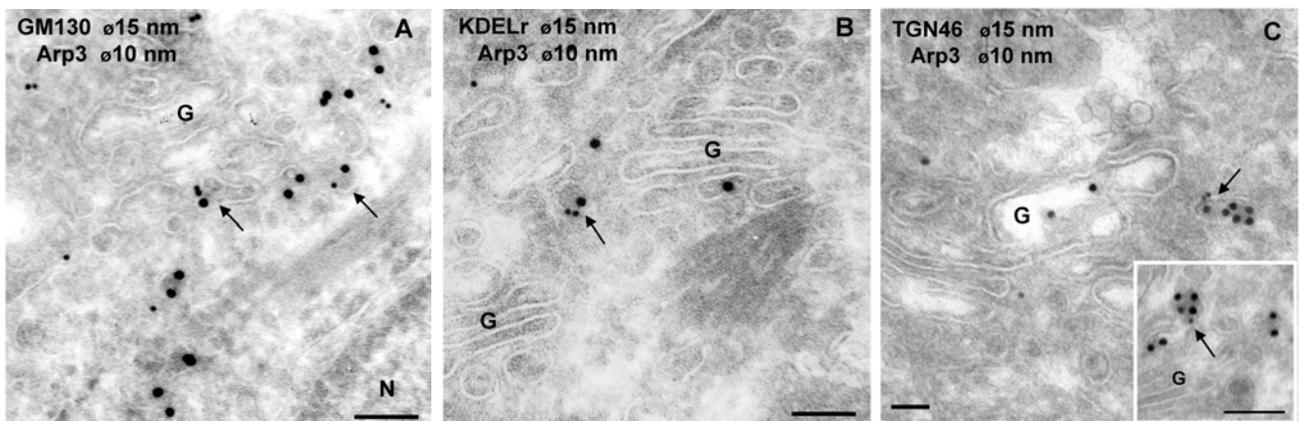


Figura 18. Células HeLa doblemente marcadas para Arp3 y GM130 (A) o Arp3 y KDELR (B) o Arp3 y TGN46 (C). Algunos ITs próximos al CG contienen Arp3 así como marcadores característicos de la zona RE/CG como GM130 o KDELR (flechas en A y B, respectivamente). Arp3 también co-localiza con TGN-46 en algunos de estos ITs (C). G, Complejo de Golgi; N, núcleo. Barras, 100 nm.

12.-CORTACTINA SE LOCALIZA EN EL COMPLEJO DE GOLGI

Para estudiar la distribución subcelular de cortactina en el complejo de Golgi, comprobamos en primer lugar la especificidad de nuestro anticuerpo frente a cortactina. Previamente, Krueger y colaboradores (2003) habían demostrado que cortactina se

localiza preferentemente en las ondulaciones dorsales (*dorsal waves*) de la zona cortical. Se trata de reorganizaciones del citoesqueleto de actina que se producen cuando las células son estimuladas con el factor de crecimiento PDGF (del inglés *platelet-derived growth factor*). A este nivel, cortactina co-localiza también con Arp3 (Krueguer et al., 2003). Decidimos examinar si nuestro anticuerpo era capaz de poner de manifiesto esa distribución de cortactina y para ello estimulamos células NIH3T3 con PDGF y estudiamos mediante IF la localización de cortactina, Arp3 y actina (fig. 19)

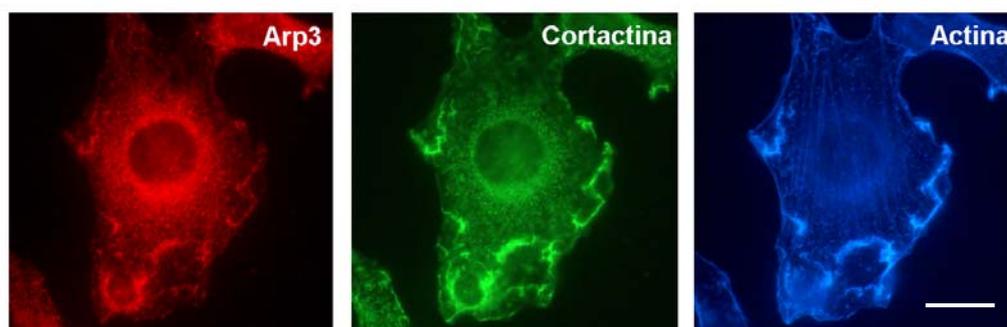


Figura 19. Cortactina co-localiza con Arp3 en las ondulaciones dorsales de la membrana plasmática inducidas por PDGF. Células NIH3T3 previamente cultivadas sin suero durante 16-18 h, fueron tratadas con PDGF (100 ng/ml, 10 min). A continuación fueron fijadas y procesadas para IF utilizando anticuerpos frente a Arp3 y frente a cortactina. Para poner de manifiesto el citoesqueleto de actina se empleó faloidina-CPITC. Imágenes tomadas con una cámara digital Olympus. Barra 10 μ m.

Como era de esperar, la actina de la zona cortical se reorganiza dando lugar a las ondulaciones dorsales (fig. 19, azul). A nivel de estas estructuras encontramos también a cortactina (fig. 19, verde) y Arp3 (fig. 19, rojo). También observamos una acumulación perinuclear de cortactina aunque es más evidente en el caso de Arp3. Una vez confirmada la capacidad de nuestro anticuerpo frente a cortactina para reconocer la proteína endógena, examinamos su posible localización en el complejo de Golgi en células NIH3T3 no estimuladas con PDFG. Para ello, llevamos a cabo dobles marcajes entre cortactina (fig. 20 A) y manosidasa II (fig. 20 B). Mediante microscopía confocal observamos una acumulación perinuclear de cortactina que co-localizaba con Man II (fig. 20 C). Para confirmar este resultado morfológico realizamos también estudios bioquímicos con fracciones subcelulares enriquecidas en membranas de Golgi aisladas a partir de hígado de rata y sometidas posteriormente a otro sistema de purificación en gradientes de sacarosa (*floating-up*; ver materiales y métodos pág. 118). Con este sistema obtuvimos dos fracciones, una ligera (fracción ligera) y otra más

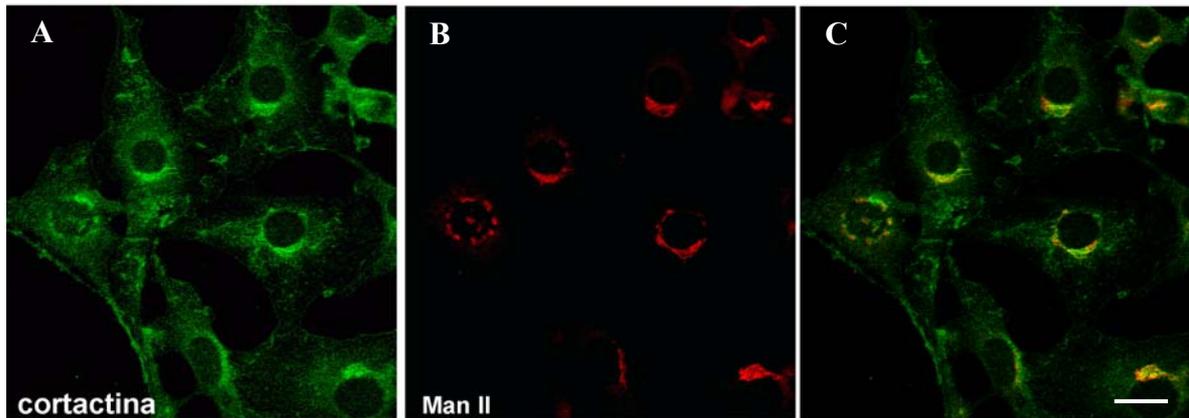


Figura 20. Cortactina se localiza también en el complejo de Golgi. Células NIH3T3 fueron fijadas y procesadas para IF empleando anticuerpos frente a cortactina (B) y frente a la enzima residente del complejo de Golgi manosidasa II (C). La última imagen muestra la superposición del marcaje con cortactina y Man II (D). Imágenes de microscopía confocal. Barra 10 μ m.

densa (fracción pesada) cuya caracterización bioquímica por *western blotting* confirmó la presencia de solamente membranas de Golgi en la primera, y de membrana plasmática y RE en la segunda (datos no mostrados). Observamos que cortactina no sólo aparecía en los lisados totales de células NRK que analizamos en paralelo sino que también aparecía en ambas fracciones (fig. 21).

Estos resultados bioquímicos confirman la presencia de cortactina en el CG y sugieren que esta proteína podría colaborar en la actividad polimerizadora de actina junto con Cdc42/N-WASP/Arp2/3 en el CG. También muestran un nuevo paralelismo entre la maquinaria polimerizadora de actina en la membrana plasmática y el CG.

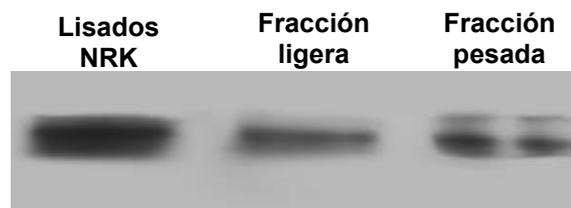


Fig. 21. Cortactina aparece en la fracción enriquecida en membranas de Golgi. *Western blot* de lisados totales de células NRK, de la fracción ligera y de la fracción pesada obtenidas a partir de membranas de Golgi aisladas de hígado de rata y sometidas posteriormente a un gradiente de sacarosa (*floating-up*). Empleando un anticuerpo frente a cortactina detectamos la presencia de esta proteína en todas las fracciones analizadas.