

**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

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1.-MATERIALES

A continuación se detallan los distintos **vectores de expresión** utilizados así como la procedencia de los mismos.

Vector de expresión	Procedencia
GFP-N-WASP	M. Way . Imperial Cancer Research Fund (ICRF). London.
GFP-Rho(wt,V14,N19)	
GFP-Cdc42(wt,V12,N17)	F. Sanchez-Madrid. Hospital La Princesa. Madrid.
GFP-Rac(wt,V12,N17)	
myc-Cdc42(wt,V12,N17)	A. Hall. University College. London.
myc-Rac(wt,V12,N17)	
myc-Rho(wt,V14,N19)	
Sar1(H79G) o Sar1 ^{dn}	Rainer Pepperkok. EMBL. Heidelberg.
GFP-VSV-G	J. Lippincott-Schwartz. NIH, Bethesda.

La siguiente tabla muestra los **anticuerpos** empleados para inmunohistoquímica (IF), inmunomicroscopía electrónica (ME) o western blotting (WB), indicando si son monoclonales o policlonales y la dilución de trabajo utilizada para cada aplicación.

Anticuerpo	Fuente	Procedencia	IF	ME	WB
Anti-GFP	Conejo	D. Shima. ICRF. London		1:50	
Anti-Myc	Ratón	BABCO-Covance Inc.	1:1000	1:10	
Anti-Cdc42	Conejo	Santa Cruz	1:5		
Anti-Cdc42	Ratón	BD Transduction laboratories			1:250

Anticuerpo	Fuente	Procedencia	IF	ME	WB
Anti-Rac1	Conejo	Santa Cruz	1:5		
Anti-Rac1	Ratón	BD Transduction laboratories			1:250
Anti-RhoA	Ratón	Santa Cruz	1:5		
Anti-RhoA	Ratón	BD Transduction laboratories			1:250
Anti-Arp3	Conejo	M. D. Welch. University of California	1:100	1:75	
Anti-Arp3	Conejo	Upstate biotech	1:100		
Anti-KDELr	Ratón	Stressgen	1:1200		
Anti-KDELr	Conejo	H. D. Soling. Gottingen. Alemania	1:1000	1:150	
Anti-GM130	Ratón	BD Transduction Laboratories	1:10000	1:50	
Anti-TGN46	Oveja	SeroTec	1:700	1:150	
Anti-GMAP-210	Conejo	Rosa M ^a Ríos. Universidad de Sevilla	1:2000		
Anti-giantina	Ratón	H.P. Sauri. Biozentrum. Suiza.	1:1000		
Anti-manosidasalII	Conejo	K.W. Moremen. Universidad de Georgia.	1:500		
Anti-cortactina	Ratón	BD Transduction laboratories	1:100		

Las **drogas** que se han utilizado en los diferentes tratamientos son:

Brefeldina A (BFA). Provoca la fusión del CG con el RE. Para estudiar el desensamblaje del CG se utilizó a una concentración de 1µg/ml durante 60 minutos a

37°C. En el estudio del reensamblaje del CG tras 60 minutos en presencia de la droga, se sustituyo el medio con BFA por medio fresco atemperado a 37°C y se dejó reconstituir nuevamente el CG durante 120 minutos.

Estreptolisina-O (SL-O). Es una toxina bacteriana que se une al colesterol de la bicapa lipídica, se agrega y da lugar a la formación de poros que atraviesan la membrana plasmática y cuyo diámetro puede alcanzar los 35 nm (Walev et al., 2001). Se usó a una concentración de 5 µg/ml durante 10 minutos a 4 °C (para un protocolo detallado ver apartado 2.6 de materiales y métodos pág. 117).

PDGF (del inglés *platelet-derived growth factor*). Se usó a una concentración de 100 ng/ml durante 10 minutos a 37 °C en células previamente cultivadas en ausencia de suero durante 16 horas.

Otros productos empleados.

Los anticuerpos secundarios empleados Alexa-488 y Alexa-546 (fragmentos F(ab')₂) son de la casa comercial Molecular Probes, al igual que el dextrano (*cascade blue dextran*) empleado en los experimento de co-microinyección.

La faloidina conjugada con TRITC, FITC o CPITC es de la casa comercial Sigma.

2.-MÉTODOS

2.1.-CULTIVO CELULAR

Las células HeLa y NRK crecen en medio Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado al 10% (volumen/volumen), ambos proceden de la casa comercial Invitrogen. Las células NIH3T3 crecen en medio DMEM pero en este caso suplementado con suero bovino de recién nacido al 10% en vez de suero fetal. Las células NIH3T3 transfectadas de forma estable con los dominantes positivos y negativos de Cdc42, Rac1 y RhoA se han de seleccionar con medio conteniendo geneticina (G418) a una concentración de 750 µg/ml. Las células A375p crecen en medio esencial Dulbeco/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10%. Todos los medios llevan los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycin

(100 µg/ml), piruvato (100 mM) y L-glutamina (200 mM). Las células crecen a 37 °C en atmósfera saturada de agua y 5% de CO₂.

2.2.-MICROINYECCIÓN

Las células a microinyectar son cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio estériles hasta que alcanzan una confluencia del 70-80%. Se transfieren a una placa con medio tamponado con 25 mM de Hepes. Si lo que se va a microinyectar es una proteína, ésta se diluye en tampón de microinyección en el citoplasma (ver anexo composición de soluciones) a una concentración de 200 µg/ml. Si se trata de un cDNA, se diluye en tampón de microinyección en el núcleo a concentraciones de 50 ng/ml. Una vez preparada la solución de proteína o cDNA se centrifuga a 14000 r.p.m durante 5 minutos. Las proteínas y cDNAs que no llevan ningún tag se microinyectan conjuntamente con dextrano azul diluido al 1% para poder reconocer las células microinyectadas. La microinyección se realiza con un sistema automático (Carl Zeiss, Jena, Germany). Una vez microinyectadas, las células se transfieren a una nueva placa de Petri estéril con medio fresco atemperado a 37 °C y se incuban durante el tiempo necesario.

2.3.- TRANSFECCIÓN TRANSITORIA.

Para las transfecciones se utilizaron muestras de cDNA plasmídico aisladas con columnas comerciales de Sigma y cuya concentración y pureza habían sido previamente analizadas en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 260 nm y el cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm respectivamente.

El método de transfección usado fue el reactivo comercial *Effectene* (Quiagen). Se trata de un lípido sintético de carácter catiónico que a través de una reacción en dos pasos condensa el DNA y lo rodea de cargas positivas gracias a las cuales se facilita su paso a través de las membranas celulares. Las células son sembradas el día anterior a una confluencia entre el 40 y 80 % en cubreobjetos estériles o en placas de Petri estériles. La transfección se realiza tal y como indica el protocolo adjunto con el producto. Consiste en dos pasos, en el primer paso el *enhancer* se mezcla con el DNA en las proporciones adecuadas durante 2-5 minutos a temperatura ambiente y en el segundo paso se añade el reactivo *effectene* y la mezcla se incuba durante 5-10 minutos para que se formen los

complejos entre el lípido catiónico y el cDNA. Mientras, las células son lavadas con PBS y se les añade el volumen de medio fresco indicado. A continuación se añade medio de cultivo a los complejos de cDNA y *effectene* y la mezcla se añade directamente a las células. El tiempo habitual de expresión del cDNA transfectando con este sistema es de 16-18 horas.

2.4.-INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se lleva a cabo sobre células en monocapa que crecen en cubreobjetos de vidrio estériles. Las células se fijan con paraformaldeído al 4% disuelto en PBS durante 15 minutos. Seguidamente, se hacen tres lavados consecutivos con PBS y se bloquean los grupos aldeído con una solución 50 mM de NH₄Cl en PBS durante 30 minutos. El detergente empleado para permeabilizar las células es saponina (0.1%) disuelto en PBS conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1%. El tiempo de permeabilización es de 10 minutos. El marcaje simple o doble se realiza diluyendo los anticuerpos en PBS con 1% de BSA. El anticuerpo primario se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4 °C. A continuación se realizan tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS y se procede a la incubación con el anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios se diluyen a sus respectivas concentraciones en la misma solución que los anticuerpos primarios y se incuban durante 30 o 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se vuelven a realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS y se montan los cubres. El medio de montaje empleado es Mowiol (Calbiochen). Las preparaciones se visualizan en un microscopio de epifluorescencia Olimpos BX60 y las imágenes son captadas con una cámara digital Olympus CCD. Para los estudios de co-localización empleamos un microscopio confocal Leica TCS-NT o un microscopio confocal espectral Leica TCS-SL.

2.5.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

2.5.a.-Obtención de criosecciones ultrafinas

Se fijan células HeLa control (no transfectadas) y transitoriamente transfectadas durante 2 horas en una solución de paraformaldeído al 2% y glutaraldeído al 0.2% en tampón fosfato 0.1 M y pH 7. Se lavan con tampón fosfato y se centrifugan para obtener un

pellet el cual se incluye en una solución acuosa de gelatina al 10%. La mezcla se enfría a 4 °C durante dos horas para que la gelatina solidifique. Con ayuda de una lupa y en un ambiente frío se manipula la gelatina conteniendo las células hasta obtener bloques de 1 mm² aproximadamente. Los bloques se crioprotegen sumergiéndolos en una solución de sacarosa 2.3 M durante dos horas a 4° C. Finalmente se congelan en nitrógeno líquido donde quedan almacenados hasta la sesión de crioultramicrotomía. Las criosecciones tienen un grosor de unos 50 nm y se realizan utilizando un crioultramicrotomo (Ultracut T/FCS, Leica) que lleva acoplada una cámara que permite bajar la temperatura hasta -120 °C y empleando un cuchilla de diamante (Druker). Las secciones ultrafinas obtenidas se recogen en una mezcla de metilcelulosa (1.8%) y sacarosa (2.3M) en proporción 1:1 según el método de Liou et al., 1996 y son depositadas en rejillas de cobre previamente recubiertas con una capa de formvar.

2.5.b.-Inmunocitoquímica

Las rejillas de cobre que contienen las criosecciones obtenidas se incuban con anticuerpos policlonales seguidos de proteína A conjugada con oro coloidal. Cuando el anticuerpo es monoclonal se emplea un anticuerpo puente policlonal que lo reconoce y a continuación la proteína A-oro coloidal. Los dobles marcajes se llevan a cabo empleando las combinaciones óptimas de tamaño de partículas de oro y secuencia de anticuerpos. Así, en primer lugar se incuban las rejillas con el anticuerpo que va a unirse con la proteína A-oro de 10 nm, y a continuación con el anticuerpo que se une a proteína A-oro de 15 nm. Tras cada marcaje, las secciones se fijan con glutaraldeído al 1% y se contrastan con acetato de uranilo. Finalmente se protegen con una capa de metilcelulosa y acetato de uranilo (Slot et al., 1991).

2.5.c.-Análisis cuantitativo

Distribución de proteínas en las cisternas del complejo de Golgi

Para establecer la distribución relativa de Cdc42, GFP-N-WASP o Arp3 en el área del CG las partículas de oro son cuantificadas y adscritas a una de las siguientes categorías: i) porciones laterales (definidas como las zonas laterales de las cisternas del CG que muestran la típica dilatación terminal), ii) porciones centrales (definidas como las

regiones más delgadas de las cisternas apiladas), iii) intermediarios de transporte peri-Golgi (definidos como membranas tubulo-vesiculares localizadas en las proximidades del complejo de Golgi). El número de partículas de oro asignado a cada categoría se expresa como el porcentaje obtenido respecto al total de partículas de oro cuantificadas en el área del CG. Para cada estudio estadístico se tienen en cuenta un total de 25 áreas de Golgi seleccionadas al azar. La significación de los datos se analiza mediante el test de la *t* de Student.

Distribución polarizada *cis-trans* de Cdc42, N-WASP y Arp3

Para cada caso se emplean 25 áreas de Golgi seleccionadas al azar. Para identificar la porción *cis* del CG se llevan a cabo dobles marcajes empleando anticuerpos frente a la proteína de matriz GM130 (Nakamura et al., 1995) y anticuerpos frente a GFP (para identificar N-WASP o Cdc42) o Arp3. Las cisternas se numeran desde la cisterna 1 (C1) que se corresponde con la cara *cis* hasta la cisterna 5 (C5) que se correspondería con la cara *trans*. El número de partículas contadas se expresa como porcentaje respecto al total de partículas de oro en el área del CG.

Estudio de la composición molecular de los ITs positivos para Arp3

Se llevaron a cabo una serie de dobles marcajes en los que se visualizaba Arp3 conjuntamente con GM130, KDELR o TGN46. Para cada combinación se tuvieron en cuenta un mínimo de 100 elementos tubulo-vesiculares peri-Golgi. La significación de los datos se analizó mediante el test de la *t* de Student.

Para estudiar la co-localización en intermediarios de transporte de Cdc42, N-WASP y Arp3, se llevaron a cabo dobles marcajes con todas las combinaciones y se cuantificaron un mínimo de 100 vesículas marcadas para cada estudio estadístico.

2.6.-PERMEABILIZACIÓN CELULAR

Se siembran células HeLa sobre cubreobjetos de vidrio estériles tratados con poli-D-lisina. Para ello se prepara una solución acuosa de poli-D-lisina (1 mg/ml) en condiciones de esterilidad y se añade a los cubreobjetos dispuestos sobre una placa de Petri. Se mantienen sumergidos durante 60 minutos y se procedió a lavarlos con abundante agua estéril. Se dejan secar completamente a 37 °C.

A partir de una solución de SL-O de 250 µg/ml en KAc con BSA y DTT (ver anexo de composición de soluciones) se prepara una alícuota de 5 µg/ml en ICT/DTT. Con objeto de activar la SL-O se incuba durante 30 minutos a 37 °C. Se deja enfriar a temperatura ambiente. A continuación se lavan las células con PBS, seguido de un lavado con la solución ICT/DTT y finalmente se permeabilizan añadiéndole la SL-O durante 10 minutos. La permeabilización así como los lavados previos se realizan a 4 °C. Seguidamente, a temperatura ambiente, se llevan a cabo lavados con una serie de soluciones para extraer el citoplasma, tal como se indica a continuación:

ICT/DTT durante 1 minuto

KCl-KHM durante 5 minutos

KAc durante 1 minuto

Finalmente se fijan las células con paraformaldehído al 4 % y se procesan para IF.

2.7.-OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE GOLGI PURAS Y ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN BLOT

Para obtener los lisados totales se cultivan 10 placas de Petri (p100). Las células se lisan en tampón de lisis (ver anexo composición de soluciones) durante 2 h a 4 °C. Posteriormente, se centrifugan a 16.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento se descarta y el contenido de proteínas del sobrenadante se cuantifica mediante el método *Bradford*.

Las fracciones enriquecidas en membranas de Golgi se aislaron a partir de membranas de CG aisladas de hígado según el método de Hui et al., (1998) que fueron posteriormente sometidas a un segundo gradiente de sacarosa según el método de *floating-up* (Beckers y Rothman, 1992; Chen et al., 2004). Explicamos a continuación el protocolo detallado.

Obtención de membranas de Golgi

En tubos de centrifuga SW-28, preparamos gradientes discontinuos de sacarosa (13 ml solución B y 7.5 ml solución E; ver anexo composición de soluciones) y preservamos en hielo.

Partimos de 6 hígados de rata que son rápidamente extraídos y depositados en 200 ml de solución C. Se presionan y agitan para extraer el exceso de sangre, trabajando siempre a

4 °C.

Pesamos 40 gr de hígado y añadimos 100 ml de solución C. Cortamos en bloques pequeños para seguir eliminando el exceso de sangre. Retiramos el exceso de solución hasta dejar menos de 80 ml. Con unas tijeras limpias seguimos cortando hasta obtener bloques de 4-5 mm de diámetro.

Homogenizamos con una malla de aluminio de 150 μm de diámetro.

Enrasamos el homogenado obtenido hasta 80 ml con solución C y mezclamos.

Cargamos 13 ml de este homogenado en la parte superior de los gradientes previamente preparados. Equilibramos los diferentes tubos con la solución B. Centrifugamos a 28000 r.p.m. durante 1 h a 4 °C.

Mediante una pipeta Pasteur retiramos la capa más superficial (lípidos) y recogemos la fracción de CG (2-3 ml por gradiente) alojada en la interfase de la solución C y D.

Diluimos dicha fracción hasta obtener una concentración de sacarosa (0.25 M) con solución A. Para ello empleamos un refractómetro (0.25 M se corresponde con una lectura de 9%).

Alicuotamos las muestras en dos nuevos tubos de centrifuga SW-28. Llenamos los tubos con solución B y lentamente y resbalando por las paredes, añadimos 100 μl de solución E. Centrifugamos a 7000 r.p.m. durante 30 min a 4 °C.

Descartamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en 2 ml de solución B, mezclamos bien y añadimos 38 ml más de solución B. Vertemos la muestra en un nuevo tubo de centrifuga. Añadimos 100 μl de solución E y equilibramos con solución A. Centrifugamos en las mismas condiciones que en el paso anterior.

Retiramos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en 4.5 ml de solución B. Alicuotamos, congelamos en nitrógeno líquido y almacenamos a -80 °C.

Floating-up

Mezclamos 200 μg de las membranas de Golgi previamente obtenidas con tampón Tris pH 7.4 hasta obtener un volumen final de 1ml. Seguidamente centrifugamos a 15000 r.p.m durante 20 min a 4 °C. Descartamos el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 200 μl de tampón Tris. Añadimos 400 μl de sacarosa 2 M. A continuación preparamos un gradiente de sacarosa (1,1 M, 1,0 M, 0,5 M) en solución Tris. Añadimos la mezcla anterior y centrifugamos a 32.0000 r.p.m. durante 2 h a 4 °C. Las membranas

de Golgi, más ligeras, aparecen flotando en la interfase 0,5/1 M mientras que el resto de membranas como la membrana plasmática, mas densas, aparecen en la interfase 1,2/1,1 M. Habitualmente se puede recoger hasta 1 ml de cada fracción. A continuación se centrifugan las fracciones por separado a 45.0000 r.p.m durante 1 h a 4 °C y el sedimento se resuspende en tampón Tris conteniendo 0.2 M de sacarosa y 50 mM de KCl y se congela a -80 °C hasta que vaya a ser empleado.

La cuantificación proteica de cada muestra se realiza mediante el método *Bradford*.

A todas las muestras a analizar se les añade tampón de muestra (ver anexo de composición de soluciones) y se hierven durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Las muestras se cargan en un gel de acrilamida. Una vez separadas las proteínas se transfieren electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con TBST-5% leche liofilizada desnatada (ver anexo de composición de soluciones) durante 2 h a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4 °C. Se incuba con los anticuerpos primarios en la solución de bloqueo durante 1 h. Tras los lavados se incuba con los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Pierce) diluidos a 1:20000 en la solución de bloqueo durante 1 h. Finalmente las bandas se revelaron empleando ECL.

2.8.-ANEXO: COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES

MICROINYECCIÓN

Tampón de microinyección en citoplasma

KCl 100 mM

Hepes 5 mM

pH 7.25

Tampón de microinyección en núcleo

Tris-HCl 10 mM pH 7.4

EDTA 0.25 mM

PERMEABILIZACIÓN

Solución KAc

KAc 115 mM

Hepes 25 mM pH 7.4

MgCl₂ 2.5 mM

Solución KAc/BSA/DTT

KAc

BSA 1 mg/ml

DTT 20 mM

Solución ICT

KCl 78 mM

MgCl₂ 4 mM

CaCl₂ 8.37 mM

EGTA 10 mM

Hepes 50 mM pH 7.24

Solución ICT/DTT

ICT + 1 mM DTT

Tampón KHM

Hepes-KOH 25 mM pH 7.2

KAc 125 mM

MgAc 2.5 mM

Tampón KCl-KHM

KHM + 1 M KCl

OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE GOLGI

Solución	A	B	C	D	E
Concentración de sacarosa	0	0.25	0.5	0.86	1.3
KPO ₄ 0.5 M pH 6.7 (ml)	20	40	80	20	12
Sacarosa 2 M (ml)	—	25	100	43	39
MgCl ₂ (ml)	0.25	0.5	1	0.25	0.15
Agua (ml)	79.8	134.5	219	36.8	8.9
Volumen total	100	200	400	100	60

WESTERN BLOT

Tampón de lisis

PBS

TX-100 1%

PMSF 1 mM

Solución de bloqueo (TBST)

TBS

Tween-20 0.1% (vol/vol)

Leche liofilizada desnatada 5%

Tampón de muestra (pH 6.8)

Tris 125 mM

SDS 4%

Glicerol 20%

2-β mercaptoetanol 10%

Bromofenacil azul 0.01%