

3. MATERIALES Y MÉTODOS

«Give us the tools and we will finish the job.»

Winston Churchill (1874-1965)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

La brefeldina A (BFA, usada a 5µg/ml) y el N-acetil-leucil-leucil-norleucinal (LLnL, usado a 50µM) se adquirieron de Sigma, del mismo modo que los fosfolípidos dioctanoil-PI3P, dioctanoil-PI4P, dioctanoil-PI(4,5)P₂, azolectina (una mezcla de lípidos de soja rica en fosfatidilcolina) y dipalmitoil-PI(4,5)P₂ (usados estos dos últimos para fabricar liposomas), así como el EGF, la saponina, la digitonina i la polietilenimina (PEI). El fluoruro de aluminio se preparó como una mezcla de 50µM AlCl₃ y 30mM NaF, ambos de Sigma. El kit BCA (basado en el método del ácido bicinconínico de medida de concentración de proteínas) se obtuvo de Pierce. Los fluoróforos EGF-TRITC, Dextrano-Texas Red (fijable, 10 kDa), Transferrina-Alexa Fluor 546, TO-PRO3, faloidina-FITC y faloidina-TRITC fueron comprados a Molecular Probes (Invitrogen Corp.). Los compuestos radiactivos [³⁵S]-metionina, [³H]-GDP y [³⁵S]-GTPγS procedieron de GE Healthcare, de donde también se obtuvieron las matrices de filtración en gel (Sephadex G-200) y afinidad (Proteína A-Sepharosa, Proteína G-Sepharosa y Glutación Sepharosa). Sin embargo, la matriz de afinidad Ni-NTA Agarosa fue adquirida de Qiagen, al igual que el oligo HERC1-siRNA. El X-gal, la L-lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (LDH), el fosfoenolpiruvato (PEP), el ADP y el NADH fueron de Roche Applied Science, lo mismo que los oligos para PCR. Las *PIP strips* y las *PIP arrays* fueron de Echelon Biosciences, el mowiol de Calbiochem, la Ecotaq polimerasa termosensible de Ecogen y la lipofectina y la lipofectamina-2000 de Invitrogen. El resto de reactivos fueron mayoritariamente de Sigma.

3.2. Plásmidos

A continuación se muestra una tabla con todos los plásmidos usados a lo largo de este trabajo y las características de cada uno de ellos:

<i>Tabla de Plásmidos</i>			
<i>Nombre</i>	<i>Proteína expresada y organismo</i>	<i>Figuras</i>	<i>Origen</i>
pSNF1	GAL4BD-SNF1 (<i>S.cerevisiae</i>) en <i>S.cerevisiae</i>	14	Fields y Song (1989)
pSNF4	GAL4AD-SNF4 (<i>S.cerevisiae</i>) en <i>S.cerevisiae</i>	14	Fields y Song (1989)
pJLR82	GAL4BD-HECT(HERC1) en <i>S.cerevisiae</i>	14	-
pFG5	GAL4BD-HECT(HERC1)-C4811A en <i>S.cerevisiae</i>	14,17	-
pCC40	GAL4BD-HERC3 en <i>S.cerevisiae</i>	14	-
pFG19	GAL4BD-HECT(HERC1)-C4811A, E4616A, D4617A en <i>S.cerevisiae</i>	17	-
pFG20	GAL4BD-HECT(HERC1)-C4811A, E4616A, D4617A, L4613R en <i>S.cerevisiae</i>	17	-
pClon25	GAL4AD-M2PK(406-531)	14,17	-
pFG32	GST-M2PK(406-531) en <i>E.coli</i>	18	-
pFG26	His-HECT(HERC1) en células Sf9	18,19	-
pGEX-4T-1	GST (<i>Schistosoma japonicum</i>) en <i>E.coli</i>	18,21	GE Healthcare
pM2PK	M2PK (<i>Rattus norvegicus</i>) en células Sf9	19	Ikeda y Noguchi (1998)
pFastBacGST	GST (<i>Schistosoma japonicum</i>) en células Sf9	19	-
pJDD7	GST-HERC1(3684-4861) en células Sf9	19	-
pJDD8	GST-HERC1(1-3716) en células Sf9	19	-
pJDD9	GST-HERC1(1-1413) en células Sf9	19	-
pPM7	GST-HERC1 en células Sf9	19	-
pJLR86	GST-ubiquitina en <i>E.coli</i>	21	-
pLuciferasa	Luciferasa (<i>Photinus pyralis</i>) en células mamífero	21	Promega
pFG36	M2PK en células de mamífero	21	-
pCC36	HERC3 en células de mamífero	21	-
pcDNA3.1His	Vector de expresión de His-proteínas en células mamífero	22,23	Invitrogen
pCC44	His-HECT (HERC1) en células de mamífero	22,23	-
pCC45	His-HECT (HERC1)-C4811A en células de mamífero	23	-
pFG3	His-HERC1 en células de mamífero	22	-
pUbcH5a	His-UbcH5a en <i>E.coli</i>	22	Iwai et al. (1999)
pFG2	His-HERC1 en células Sf9	25,26,28	-
pJLR134	ARF6-His en células Sf9	25,26	-
pGST-ARNO	GST-ARNO en <i>E.coli</i>	25	Frank et al. (1998a)
pJLR73	RLD1-Flag (HERC1) en células Sf9	26	-
pJLR16	RLD2-Flag (HERC1) en células Sf9	26	-
pJLR131	RLD1-Flag (HERC1) en <i>E.coli</i>	26,27,28	-
pJLR130	RLD2-Flag (HERC1) en <i>E.coli</i>	27	-
pEGFP-FYVE	GFP-2x-FYVE (Hrs) en células de mamífero	32	Gillooly et al. (2000)
pVSVG-GFP	VSV-G-GFP-ts045 en células de mamífero	33,44	Hirschberg et al. (1998)
pARF6-HA	ARF6-HA en células de mamífero	36	Radhakrishna et al. (1996)
pT27N-HA	ARF6-HA-T27N en células de mamífero	36	Radhakrishna et al. (1996)
pQ67L-HA	ARF6-HA-Q67L en células de mamífero	36	Radhakrishna et al. (1996)
pARF1-HA	ARF1-HA en células de mamífero	36	Radhakrishna et al. (1996)
pARNO-Myc	ARNO-Myc en células de mamífero	37	Frank et al. (1998a)
pPH-PLC-GFP	PH-PLCdelta1-GFP en células de mamífero	38	Varnai et al. (2002)
pMyc-PIPK	Myc-PI(4)P 5-quinasa-alfa en células de mamífero	38	Honda et al. (1999)
pEGFR-GFP	EGFR-GFP en células de mamífero	44	Carter y Sorkin (1998)
pJLR155	GFP-HERC1 en células de mamífero	37,45,47,48	-
pJLR156	GFP-HERC1(1-1334) en células de mamífero	45,47,48,52	-
pJLR157	GFP-HERC1(1-2958) en células de mamífero	45-50,52	-
pJLR158	GFP-HERC1(1-412) en células de mamífero	45-48,52	-
pJLR159	GFP-HERC1(1-2674) en células de mamífero	45,47,48	-
pJLR160	GFP-HERC1(3151-4861) en células de mamífero	45,46,47,48	-

pJLR163	GFP-HERC1(3684-4861) en células de mamífero	45,47,48,52	-
pECT1	GFP-HERC1(1-4020) en células de mamífero	45-48	-
pEG7	GFP-HERC1(754-1334) en células de mamífero	45,47,48,52	-
pFG38	GFP-RLD2(HERC1) en células de mamífero	45-48,52	-
pFG39	GFP-WD40(HERC1) en células de mamífero	45,47,48	-
pFG40	GFP-HECT(HERC1) en células de mamífero	45,46,48	-
pFG41	GFP-RLD1(HERC1) en células de mamífero	45-48,52,55,56	-
pFG42	GFP-HECT(HERC1)-C4811A en células de mamífero	45,48	-
pFG43	GFP-HERC1(1-4745) en células de mamífero	45,46,48	-
pFG44	GFP-RLD1(G483E) en células de mamífero	45,55,56	-
pEGFP	GFP (<i>Aequoria victoria</i>) en células de mamífero	46,51,52, 55,56	BD Biosciences

Las proteínas indicadas proceden, si no se indica lo contrario, de la especie humana. Los plásmidos cuyo origen no es especificado fueron producidos en nuestro propio laboratorio.

3.3. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en esta tesis y sus características principales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla de Anticuerpos			
Monoclonales (de ratón)			
Antígeno	Clon	Figuras	Origen
Epítipo His (6xHis)	HIS-1	18,19	Sigma
Glutación S-transferasa (GST)	GST-2	18,19	Sigma
Piruvato quinasa tipo M2 (M2PK)	DF4	19,20,21,22	ScheBo Tech
Cadena pesada de la clatrina (CHC)	23	24,39	BD Biosciences
Cadena ligera de la clatrina (CLC)	CON.1	24,40	Sigma
Mono- y poliubiquitina	FK2	49	Biomol
Heat Shock Protein 72/73 (Hsp70)	Ab-1	24	Oncogene
Fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P)	Z-P003	26	Echelon Biosciences Inc.
Fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P)	#915-045	26	Assay Designs Inc.
Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂)	#90541	26	Assay Designs Inc.
Epítipo Flag	M2	26,27,28	Sigma
Early Endosome Autoantigen-1 (EEA1)	14	32,40	BD Biosciences
p58 de rata / ERGIC53 humano	58K-9	34,43	Sigma
Beta-COP	M3A5	34,39,43	Sigma
Golgi matrix protein of 130 kDa (GM130)	35	34,35,43,49	BD Biosciences
Golgi matrix protein-1 (GMPt1) de rata	GMPt1	34	Alcalde et al. (1992)
Epítipo Hemaglutinina (HA)	HA-7	36	Sigma
Epítipo Myc	9E10	37,38	Sigma
Factores de ADP-ribosilación (ARFs 1-6)	1D9	39	Abcam
Catepsina D	BC011	39	Oncogene
Alfa-tubulina	Ab-1	39	Oncogene
Receptor de EGF (EGFR)	Ab-12	39,42	Lab Vision Corp.
Fosfo p42/p44 MAPK (Thr202/Tyr204)	E10	39	Cell Signaling Technology
Fosfo-p70-S6 quinasa-Thr389 (p70-S6K)	1A5	39	Cell Signaling Technology
Receptor de KDEL (KDELr)	KR-10	43	Calbiochem
Receptor de manosa 6-fosfato (CI-M6PR)	2G11	43	Affinity Bioreagents
Proteína fluorescente verde (GFP)	7.1 y 13.1	46,50	Roche Applied Science
Rab5	15	50	BD Biosciences

<i>Policlonales (sueros de conejo)</i>			
<i>Antígeno</i>	<i>Suero</i>	<i>Figuras</i>	<i>Origen</i>
<i>HERC1 (dominio RLD2)</i>	410	19,20,22,24,26,28,29-36,38,39,42	Rosa et al. (1996)
<i>Ubiquitina</i>	#U5379	21	Sigma
<i>Secundarios (Fragmentos F(ab')₂ de cabra)</i>			
<i>Antígeno</i>	<i>Conjugado a</i>	<i>Figuras</i>	<i>Origen</i>
<i>IgG de ratón</i>	Alexa Fluor 488	32,34,36-38,40,43	Invitrogen Corp.
<i>IgG de conejo</i>	Alexa Fluor 546	32-34,36,38	Invitrogen Corp.
<i>IgG de ratón</i>	Alexa Fluor 546	20,35,49	Invitrogen Corp.
<i>IgG de conejo</i>	Alexa Fluor 488	20,29-31,35	Invitrogen Corp.
<i>IgG de ratón</i>	HRP	18,19,21,22,24,26,27,28,39,42,46,50	Invitrogen Corp.
<i>IgG de conejo</i>	HRP	19,21,22,24,26,28,39,42	Invitrogen Corp.

3.4. Líneas celulares, transfecciones y RNAi

En esta tesis se han utilizado tres líneas celulares de mamífero: HEK-293 (*human embryonic kidney-293 cells*), HeLa (células de adenocarcinoma de cérvix de la señora Henrietta Lacks (†1951)) y NRK (*normal rat kidney cells*). Todas ellas han sido cultivadas con medio DMEM (Biological Industries) suplementado con L-glutamina (2mM), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100µg/ml y suero fetal bovino (FBS) al 10%. Mientras que las últimas no han sido transfectadas, las dos primeras lo han sido con polietilenimina (PEI) (HEK-293) o con lipofectina (HeLa), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para el RNAi se usó lipofectamina-2000 tanto para HeLa como para HEK-293. Se ha usado además una línea de células del insecto coleóptero *Spodoptera fugiperda* (células Sf9), las cuales fueron cultivadas con medio SF-900II (Invitrogen Corp.) suplementado con 10% FBS. Para las infecciones con baculovirus, estos fueron incubados con las células en ausencia de suero durante 3 horas, tras lo cual se volvió a añadir suero al medio. Los tiempos de expresión, tanto en células de insecto como de mamífero, oscilaron entre las 40 y las 72 horas (en el caso del RNAi, los experimentos se realizaron 72 horas post-transfección).

La secuencia del oligonucleótido HERC1-siRNA (se muestran ambas cadenas) es:

5'-r(CGGCAUGGAUGAACAAAUU)d(TT)-3'

5'-r(AAUUUGUUCAUCCAUGCCG)d(TT)-3'

3.5. Sistema de los dos híbridos en levadura

Los experimentos de doble híbrido en levadura (Fields y Song (1989)) se efectuaron utilizando el sistema *Matchmaker Gal4 Yeast Two-Hybrid System-3* (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Resumidamente, células de la cepa AH-109 de *Saccharomyces cerevisiae* fueron cotransformadas con (1) el plásmido “cebo” (es decir los plásmidos pJLR82 o pFG5, u otros plásmidos derivados del vector pGBT8/9 (BD Biosciences) que codifican proteínas de fusión entre el dominio de unión al DNA de Gal4 y la proteína “cebo”) y (2) con una genoteca de cDNAs de células HeLa clonada en el vector pGAD-GH (de modo que las proteínas de la genoteca se expresan fusionadas al dominio de activación de la transcripción de Gal4) o con otros plásmidos derivados de pGAD-GH (BD Biosciences), tales como pClon25. Las células transformadas fueron a continuación sembradas en medios selectivos adecuados (dichos medios, conocidos como *dropouts*, se basan en el hecho de que las células AH-109 son incapaces de crecer sin triptófano, leucina, histidina y adenina a menos que hayan sido transformadas previamente con un plásmido “cebo” (que les permite sintetizar triptófano), un plásmido de la genoteca (que les confiere auxotrofia para la leucina) y a menos que las proteínas híbridas codificadas por ambos plásmidos interactúen entre sí (entonces se reconstituye el factor de transcripción Gal4 y se expresan los genes “*reporter*” necesarios para la síntesis de histidina y adenina, además del gen de la beta-galactosidasa, cuya expresión permite identificar los clones positivos mediante un ensayo de actividad basado en la hidrólisis del X-Gal (para detalles sobre este ensayo referirse a Rosa y Barbacid (1997))). El DNA

plasmídico de los clones positivos fue a continuación aislado y electroporado en la cepa MH4 de *Escherichia coli*, cuyas células pueden crecer en medio mínimo sólo si interiorizan un plásmido de la genoteca que les permita complementar su mutación leuB6, la cual les impide sintetizar leucina. Finalmente, los plásmidos se extrajeron de esta cepa de *E.coli* y se pasaron a la cepa XL1-blue, de donde volvieron a ser purificados y analizados por digestión con enzimas de restricción antes de ser secuenciados.

3.6. Expresión y purificación de proteínas

Las proteínas His-HERC1, GST-HERC1, RLD1-Flag, RLD2-Flag, ARF6-His y His-HECT fueron expresadas en células de insecto Sf9 tras haber sido éstas infectadas con los correspondientes baculovirus recombinantes, derivados respectivamente a partir de los plásmidos pFG2, pPM7, pJLR73, pJLR16, pJLR134 y pFG26 (los baculovirus fueron elaborados mediante el sistema *Bac-to-Bac system* (GibcoBRL, Invitrogen Corp.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Por otro lado, las proteínas GST-M2PK(406-531), GST-ARNO, RLD1-Flag y RLD2-Flag fueron expresadas por adición de IPTG a células de la cepa BL21 de *Escherichia coli* transformadas con los plásmidos pFG32, pGST-ARNO, pJLR131 y pJLR130, respectivamente (el IPTG induce la expresión en estas células de la T7 RNA polimerasa, sin la cual no pueden sintetizarse las susodichas proteínas). Según contuviesen, respectivamente, GST, epítopos His o epítopos Flag, las proteínas mencionadas fueron purificadas con matrices de afinidad en las que se hallan fijados el tripéptido glutatión (*Glutathione sepharose beads* (GE Healthcare)), iones níquel (*Ni-NTA agarose beads* (Qiagen)), o anticuerpos anti-Flag (estos últimos fueron conjugados a las matrices Affigel-10 y Affigel-15

(BioRad)). Las purificaciones se realizaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes de las matrices mencionadas.

3.7. SDS-PAGE y Western blot

Para analizar muestras proteicas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), se utilizaron protocolos estándares de preparación de las muestras y de los geles (Ausubel et al. (1987)). Sin embargo, cuando se deseaban estudiar proteínas de muy elevado peso molecular (≥ 300 -400 kDa), en lugar del gel concentrador habitual se prepararon geles al 4% de acrilamida y con una ratio acrilamida versus bisacrilamida de 80:1 en lugar del 37:1 que se usa comúnmente. Para los Western blots se usaron asimismo procedimientos convencionales (Ausubel et al. (2004)). En resumen, las proteínas de los geles fueron transferidas a membranas de PVDF o nitrocelulosa (cuando se transfieren geles del tipo 4% (80:1) debe además ponerse otra membrana por el lado opuesto, respecto al gel, de la membrana a la que se transfieren las proteínas: ello mejora ostensiblemente los resultados posteriores) y estas fueron luego bloqueadas con 5-10% de leche en polvo ó 5% de BSA (disueltas en TBS-T: Tris·HCl 50mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%) e incubadas con los anticuerpos primarios adecuados (3 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C), tras lo cual las membranas fueron lavadas 3-5 veces 5 minutos con TBS-T, incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (HRP: *Horseradish peroxidase*) (1 hora a temperatura ambiente, 1:30,000 en TBS-T) y finalmente lavadas con TBS-T (3 veces, 5 minutos/vez) y TBS (es decir TBS-T sin Tween-20) (2 veces, 1 minuto/vez). Tras todo esto, las proteínas fueron detectadas por electroquimioluminiscencia usando el kit *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare).

3.8. Experimentos de pull-down

Los pull-downs de las Figuras 18 y 19 se realizaron como se describe en Garcia-Gonzalo et al. (2003). Abreviadamente, los pull-downs in vitro (Figura 18) se llevaron a cabo mezclando 0.5µg de GST o GST-M2PK(406-531), ambas unidas a cuentas de glutatión sepharosa, con 1.2 µg de His-HECT soluble en PBS. Después de 3 horas de incubación a 4°C, las cuentas fueron lavadas tres veces en PBS y las proteínas unidas a ellas analizadas por Western blot y SDS-PAGE. En cuanto a los pull-downs en células de insecto (Figura 19), las células fueron lisadas 72 horas después de haber sido infectadas con los correspondientes baculovirus y los extractos celulares fueron incubados a 4°C en agitación con cuentas de Ni-NTA-agarosa (para bajar His-HECT) o de glutatión sepharosa (para bajar las GSTs) durante 2 horas. A continuación las cuentas fueron lavadas tres veces con un tampón con 0.3M NaCl, desaladas y analizadas por SDS-PAGE y Western blot. El pull-down de la Figura 19C fue elaborado mezclando 100ng de GST o GST-HERC1 unidas a las cuentas con un lisado de células Sf9 infectadas con un baculovirus para la expresión de M2PK, siendo todo lo demás igual a los de las Figuras 19A y B. Por otro lado, los pull-downs con liposomas de la Figura 27B fueron realizados tal como se describe en Zheng et al. (1996). En breve, 0.5µg de RLD1-Flag o RLD2-Flag, ambos purificados de *E.coli*, fueron añadidos a 100µl de liposomas, preparados por sonicación con azolectina solamente o con azolectina más 100µM de dipalmitoil-PI(4,5)P₂. Las mezclas fueron incubadas 5 minutos antes de ser ultracentrifugadas a 100,000g durante 30 minutos. Los liposomas del pellet fueron a continuación solubilizados con tampón de carga y analizados por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos anti-Flag.

3.9. Ensayos de ubiquitinación

Los ensayos de ubiquitinación en lisados de reticulocitos de conejo (LRCs) se efectuaron como se describe en Cruz et al. (2001). En breve, las proteínas Luciferasa, M2PK y HERC3 fueron transcritas, traducidas y marcadas radiactivamente a partir de sus cDNAs (plásmidos pLuciferasa, pFG36 y pCC36, respectivamente) mediante el uso del kit *T7 Quick coupled TNT kit* (Promega). Alícuotas de los LRCs con las proteínas radiactivas fueron subsiguientemente incubados con GST o GST-ubiquitina a temperatura ambiente durante media hora, tras lo cual las muestras fueron procesadas para su análisis por SDS-PAGE. Después de la separación de las proteínas, el gel electroforético fue fijado, secado y autoradiografiado. Por lo que respecta al experimento con LLnL (Figura 21B), también se efectuó como en Cruz et al. (2001). Básicamente, las células HEK-293 fueron tratadas durante ~14 horas con 50 μ M LLnL (disuelto en DMSO) o un volumen equivalente de DMSO. Después de la incubación, se obtuvieron lisados celulares cuya proteína total fue determinada (kit BCA) y por último cantidades equivalentes de proteína fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot.

3.10. Actividades enzimáticas

Para medir la actividad piruvato quinasa (PK) en células HEK-293, éstas fueron puestas en hielo, lavadas una vez con PBS frío y despegadas de las placas por rascado en presencia de tampón de extracción (Tris·HCl 10mM, NaF 1mM, EDTA 1mM, β -ME 1mM, pH 7.4). Las células fueron seguidamente lisadas en un homogenizador celular y los lisados resultantes centrifugados 20 minutos a 15,000g a 0°C. Los sobrenadantes fueron utilizados para medir la concentración de proteínas (kit BCA (Pierce)) y la actividad PK. Ésta fue analizada en un tampón con Tris·HCl 50mM, KCl 100mM, MgSO₄ 5mM, ADP 2mM, PEP 0.2 ó 2mM, NADH 0.25 mM y LDH 0.15 mg/ml, pH

7.6. La actividad PK fue calculada a partir del seguimiento de la disminución de la absorbancia a 340nm debida a la oxidación del NADH. El efecto de UbcH5a sobre la actividad fue evaluado por adición de 2ng de His-UbcH5a por microgramo de proteína total a los extractos e incubación de los mismos durante 30 minutos a 4°C antes de la medición de la actividad.

3.11. Cromatografía de filtración en gel

Los experimentos de cromatografía de filtración en gel se efectuaron como se describe en Mazurek et al. (2001a). Básicamente, células HEK-293 transfectadas con pcDNA3.1/His (control), pCC44 (His-HECTwt) o pCC45 (His-HECT-C4811A) fueron extraídas en tampón de lisis (100mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4, 1mM DTT, 1mM NaF, 1mM β-ME, 1mM ácido ε-aminocaproico, 0.2mM PMSF y 10% glicerol), lisadas en un homogenizador celular y los lisados centrifugados 20 minutos a 15,000g. Subsiguientemente, los sobrenadantes fueron cargados en una columna de filtración en gel preparada con Sephadex G-200 y las fracciones eluidas analizadas por Western blot (no se muestra) y por actividad piruvato quinasa (Figura 23).

3.12. Experimentos de inmunoprecipitación

Para realizar las inmunoprecipitaciones de la Figura 24, las placas de HEK-293 fueron en primer lugar puestas en hielo y las células lavadas con PBS antes de ser extraídas con tampón de lisis (50mM Tris·HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 10% glicerol, 0.5% Nonidet P-40, 5μg/ml aprotinina, 5μg/ml leupeptina, 1μg/ml pepstatina A, 100μg/ml benzamidina y 1mM PMSF) y centrifugadas 20 minutos a 15,000g. El sobrenadante, tras tomar una alícuota para SDS-PAGE, fue a continuación incubado con proteína A-sepharosa y suero preimmune durante 45 minutos a 4°C en agitación

(*precleaning*). Tras eliminar la resina por centrifugación, el nuevo sobrenadante fue dividido en dos partes iguales que se agitaron toda la noche a 4°C con proteína A-sepharosa y suero preinmune (control negativo) o suero anti-HERC1. La mañana siguiente las resinas fueron lavadas dos veces con tampón A (10mM Tris·HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.2% Triton X-100 y 2mM EDTA), dos con tampón B (10mM Tris·HCl pH 7.5, 500mM NaCl, 0.2% Triton X-100 y 2mM EDTA) y una con tampón C (10mM Tris·HCl pH 7.5) (5 minutos/lavado), antes de ser resuspendidas en tampón de carga y analizadas por SDS-PAGE y Western blot.

3.13. Experimentos de disociación e intercambio de nucleótidos

Dichos experimentos fueron llevados a cabo como se describe en Frank et al. (1998a). Brevemente, para los ensayos de disociación, en general 1µg de ARF6-His purificado fue incubado a 30°C durante 45 minutos en 100µl de HEPES·NaOH (o Tris·HCl) 50mM, DTT 1mM, [³H]-GDP 2.5µM, MgCl₂ 5mM y 1.5 mg/ml de vesículas de azolectina. A continuación se añadió GTP frío 100µM y His-HERC1 100ng/ml (Figura 25A) ó RLD1-Flag 5ng/µl (Figura 26D) y/o fosfoinosítidos hidrosolubles (PI3P, PI4P ó PI(4,5)P₂) 200µM (Figura 26C) ó 2µM (Figura 26D) y las mezclas fueron incubadas de nuevo a 30°C. A cada uno de los tiempos indicados a partir de este momento, se tomaron alicuotas de 10µl de la muestra y, tras ser filtradas para eliminar el [³H]-GDP libre, se utilizaron para medir la radiactividad asociada a ARF6-His en un contador de centelleo (ver también Rosa et al. (1996)). Los ensayos de intercambio se efectuaron básicamente como los de disociación, con la principal diferencia que ARF6-His fue inicialmente cargada con GDP frío (0.5µM) en lugar de GDP tritiado y, tras los 45 minutos de carga de la GTPasa, se añadió [³⁵S]-GTPγS 1µM y 10ng/µl de GST-ARNO ó 100ng/ml de His-HERC1. En los experimentos de reconstitución de la

actividad del RLD1-Flag bacteriano con PI(4,5)P₂ (Figura 26D) estos dos compuestos fueron incubados por separado 45 minutos a 30°C antes de ser añadidos a la mezcla de reacción.

3.14. Slot blots

Mediante un dispositivo de *Slot blot* (BioRad) conectado a una bomba de vacío, se depositaron 40ng/banda de RLD1-Flag (en el caso de la Figura 26B previamente incubado durante 10 minutos a 100°C), 40ng/banda de RLD2-Flag o 4ng/banda de His-HERC1 (todos ellos purificados de células de insecto) sobre una membrana de PVDF, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las membranas con las bandas (*slots*) de proteína fueron a continuación tratadas para la inmunodetección de las proteínas o fosfoinosítidos que se indican, siguiendo para ello los pasos que se describen en el apartado de Western blots.

3.15. Ensayos de unión a fosfolípidos

Para estos ensayos se utilizaron membranas comerciales que contienen las cantidades indicadas de los fosfolípidos en cuestión. Dichas membranas reciben el nombre de *PIP strips* (Figura 27C) y *PIP arrays* (Figura 28) y son fabricadas por Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT). Dichas membranas fueron inicialmente incubadas 90 minutos con solución de bloqueo (10mM Tris·HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20 y 3% BSA libre de ácidos grasos) y luego toda la noche a 4°C con 0.5µg/ml de RLD1-Flag o RLD2-Flag ó 5ng/ml de His-HERC1 (todas diluidas en solución de bloqueo). Tras ello las proteínas fueron detectadas con anticuerpos anti-Flag o anti-HERC1 siguiendo el método descrito para los Western blots.

3.16. Técnicas inmunocitoquímicas

Para llevar a cabo los marcajes fluorescentes de proteínas celulares endógenas o sobreexpresadas, en primer lugar las células HEK-293, HeLa o NRK crecidas sobre cubreobjetos fueron fijadas con 4% PFA en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron las células tres veces con PBS y se guardaron a 4°C hasta efectuarse los marcajes. Éstos se hicieron sumergiendo los cubreobjetos a temperatura ambiente en solución de permeabilización-bloqueo (PBS con 0.5% BSA y 0.05% saponina (PBS-BS) durante 20 minutos, tras lo cual los cubreobjetos fueron incubados con los correspondientes anticuerpos primarios (diluidos en PBS con 0.5% BSA (PBS-B): 100 veces los anti-HERC1 y lo indicado por el proveedor en los demás casos) durante una hora a 37°C. Tras tres lavados con PBS-BS los cubreobjetos fueron incubados con los anticuerpos secundarios pertinentes diluidos en PBS-B (0.5µg/ml) durante 45 minutos a 37°C, lavados de nuevo tres veces con PBS-BS, dos con PBS y montados en portaobjetos usando mowiol. La F-actina fue detectada con faloidina-TRITC o faloidina-FITC, ambas usadas a una concentración de 100ng/ml. En el caso de algunas proteínas del Golgi como beta-COP y especialmente KDELR, las células deben ser permeabilizadas antes de ser fijadas para que los resultados sean buenos. En estos casos las células se permeabilizaron en hielo durante 5 minutos en presencia de 30µg/ml digitonina, lavadas tres veces aún en hielo y luego fijadas y procesadas como ya se ha descrito.

3.17. Microscopía confocal

Las muestras se analizaron en un microscopio confocal espectral (Leica TCS-SL) equipado con láseres de argón (cuya banda de 488nm se utilizó para excitar los fluorocromos Alexa Fluor 488, FITC y GFP (mostrados en verde)) y helio-neón (cuya

banda de 543nm fue usada para excitar los fluorocromos Texas Red, TRITC y Alexa Fluor 546 (mostrados en rojo), mientras que su banda de 633nm se usó para la excitación del fluoróforo TO-PRO3 (mostrado en azul)). En los casos en que se visualizaron más de un fluorocromo en la misma muestra, ambos fluorocromos fueron excitados secuencialmente (no simultáneamente) para evitar interferencias entre canales. Los intervalos de longitud de onda dentro de los cuales se captó la fluorescencia fueron asimismo seleccionados para evitar al máximo dichas posibles interferencias. Todas las imágenes mostradas son secciones ópticas (excepto la Figura 57, que fue obtenida con un microscopio de fluorescencia no confocal: modelo Leica DM-IRB). Las imágenes de colocalización, denotadas como superposición o fusión en las respectivas figuras, fueron creadas con el programa Adobe Photoshop 7.0 a partir de las imágenes originales.

3.18. Técnicas de DNA recombinante

Las técnicas usadas para manipular moléculas de DNA ya han sido descritas en otros lugares (ver por ejemplo Ausubel et al. (1987)). En resumen, para generar nuevos plásmidos, los fragmentos de DNA que no habían sido previamente clonados fueron amplificados, a partir de un plásmido preexistente o de una genoteca de cDNAs, por PCR con oligos específicos en cuyos extremos se añadieron dianas para las endonucleasas de restricción apropiadas. Los fragmentos así amplificados fueron a continuación digeridos con los enzimas de restricción pertinentes (MBI Fermentas o Roche Applied Science) y purificados a partir de geles de agarosa mediante el kit *DNA isolation kit* de Biological Industries (cuando se trataba de transferir un inserto desde un vector a otro nuevo, el plásmido original se digirió con los enzimas de restricción adecuados y el inserto deseado se purificó, igual que en el caso anterior, a partir de un

gel de agarosa). Seguidamente, la concentración de los fragmentos purificados, junto con la de los correspondientes vectores cortados y purificados de la misma manera (y sus extremos 5' desfosforilados con fosfatasa alcalina si habían sido linearizados con una sola endonucleasa de restricción), fue determinada por comparación con un estándar en un gel de agarosa. Una vez establecidas las concentraciones de los distintos insertos y vectores, éstos fueron puestos a ligar con T4 DNA ligasa (MBI Fermentas), procurando que la ratio molar entre inserto y vector en la mezcla de ligación fuese aproximadamente de 3 a 1 a favor del inserto. Las ligaciones se efectuaron normalmente durante 3 horas a temperatura ambiente (o toda la noche a 15°C) y se prepararon también ligaciones control con sólo vector y con sólo inserto (esto último sólo cuando los insertos eran de gran tamaño, tal como el cDNA de HERC1 (15 kb), y procedían de otros vectores). Una vez terminadas, las ligaciones fueron usadas para transformar células competentes (preparadas por el método del cloruro cálcico) de la cepa XL1blue de *Escherichia coli* por choque térmico (42°C durante 45 segundos), tras lo cual dichas células fueron sembradas en placas de medio rico (LB: *Luria broth*) con el antibiótico apropiado para la selección del plásmido deseado (normalmente ampicilina o kanamicina). Las placas fueron incubadas toda una noche a 37°C y el día siguiente se hicieron cultivos líquidos (en 3-5ml de LB con antibiótico) de algunas de las colonias obtenidas en las placas correspondientes a las ligaciones inserto-vector. Tras 12-16 horas de crecimiento, los cultivos bacterianos se usaron para purificar DNA plasmídico (mediante el kit *Miniprep* de Biotools), el cual fue posteriormente analizado por corte con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa para comprobar si se trataba del plásmido deseado. En caso afirmativo, alícuotas del plásmido y de las bacterias en cuestión fueron almacenadas, las últimas en presencia de un 15% de glicerol, a -20°C o -80°C, respectivamente, para su uso posterior. En el caso de los

plásmidos cuyos insertos fueron generados por PCR, dichos insertos fueron secuenciados automáticamente con el kit *Big Dye 3.1* de Applied Biosystems y oligos específicos del vector o del propio inserto. También fueron secuenciados aquellos plásmidos generados por técnicas de mutagénesis dirigida, la cual se llevó a cabo con el kit *QuickChange XL Site-directed mutagenesis kit* de Stratagene, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.19. Centrifugación en gradiente de sacarosa

Para efectuar los análisis por centrifugación en un gradiente de flotación discontinuo de sacarosa, 4 placas de 10 centímetros de diámetro de células HEK-293 transfectadas tres días antes con pJLR157 fueron lisadas en hielo en un homogenizador celular con 1ml de un tampón conteniendo 250mM sacarosa (8.5%), 3mM imidazole, pH 7.4, 0.5mM EDTA, 5µg/ml aprotinina, 5µg/ml leupeptina, 1µg/ml pepstatina A, 100µg/ml benzamidina, 1mM PMSF y 20mM β-glicerofosfato. Dichos lisados fueron entonces centrifugados 15 minutos a 3,000g y el sobrenadante resultante fue recentrifugado, esta vez durante 30 minutos a 150,000g. El pellet de esta última centrifugación fue entonces resuspendido en 200µl de tampón con un 50% de sacarosa y depositado en el fondo de un tubo de centrifuga de 2.2ml de capacidad (alícuotas del pellet y el sobrenadante fueron asimismo procesadas para análisis por SDS-PAGE y Western blot). Encima del pellet resuspendido se depositaron a continuación, de más densa a más ligera y con sumo cuidado, 200µl de cada una de las soluciones de sacarosa cuyos porcentajes se hallan indicados en la Figura 52 (es decir, desde la solución con un 50% de sacarosa justo encima del sobrenadante hasta la del 8% arriba de todo del tubo). Luego, dicho gradiente discontinuo de sacarosa con el sobrenadante de HEK-293 en el fondo fue centrifugado durante 3 horas a 167,000g. Al término de dicha centrifugación,

las distintas capas correspondientes a los distintos porcentajes de sacarosa fueron sacadas del tubo muy cuidadosamente desde arriba hacia abajo y transferidas a nuevos tubos para su análisis. La concentración de proteínas de las distintas fracciones fue a continuación determinada por el método del ácido bicinónico (BCA) y las muestras procesadas para SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos anti-GFP y anti-Rab5. Las primeras cuatro fracciones (8-25% sacarosa) tenían concentraciones de proteína por debajo del límite de detección y se cargaron 70µl de cada una de ellas en el gel de SDS-PAGE, mientras que de todas las demás fracciones (30-50% sacarosa) se cargaron 14µg. En cuanto al pellet y al sobrenadante de 150,000g, se cargaron 80µg de ambos en el gel.

3.20. Experimentos de internalización de EGF, transferrina y dextrano

Para los experimentos de internalización se utilizaron células HeLa previamente sembradas encima de cubreobjetos (y transfectadas si era preciso) en placas de 24 pocillos (*24-well clusters*). En los experimentos con EGF dichas células fueron además ayunadas toda la noche previa al experimento (estuvieron creciendo en ausencia de FBS). A continuación, el medio de las células fue sustituido por medio sin suero suplementado con 25mM HEPES, pH 7.4, 0.5% BSA y el correspondiente trazador endocítico (Dextrano-Texas Red (1mg/ml) o Transferrina-Alexa Fluor-546 (25µg/ml) o EGF-TRITC (40ng/ml)). Después de 15 minutos, las células fueron lavadas dos veces rápidamente con PBS y fijadas antes de ser tratadas para inmunofluorescencia o ser directamente montadas para su observación en el microscopio. Las cuantificaciones de la internalización de EGF-TRITC se efectuaron contando en el microscopio el número de células transfectadas que presentaban niveles claramente reducidos de EGF-TRITC (en comparación con las células vecinas no transfectadas) respecto al número total de

células transfectadas contabilizadas. Las barras de error, donde se muestran, denotan la desviación estándar de los recuentos efectuados en tres experimentos independientes. En el experimento de degradación de EGFR (Figura 44), las células previamente transfectadas con o sin HERC1-siRNA fueron ayunadas e incubadas con EGF 30ng/ml (5 nM) durante los tiempos indicados (para los tiempos mayores de 30 minutos, el EGF se quitó del medio a los 30 minutos) y a continuación las células fueron lisadas con tampón RIPA (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0.5% Deoxicolato sódico, 0.1% SDS) en presencia de inhibidores de proteasas (5µg/ml aprotinina, 5µg/ml leupeptina, 1µg/ml pepstatina A, 100µg/ml benzamidina y 1mM PMSF) y los sobrenadantes resultantes de la centrifugación de los lisados a 15,000g durante 20 minutos fueron analizados por SDS-PAGE y Western blot. La cuantificación de los niveles de EGFR en el Western blot se realizó con el programa Adobe Photoshop 7.0.

3.21. Genotipaje de ratones

Para determinar el genotipo de los ratones se utilizó el kit *DNeasy Tissue kit* (Qiagen) para aislar DNA genómico a partir de fragmentos de las colas de los ratones, siguiendo los pasos indicados por el fabricante. Con cada muestra de DNA obtenida se efectuaron dos reacciones de PCR, con las siguientes condiciones:

(i) Mezclar en un tubo de PCR estos reactivos:

Tampón de PCR (10X, sin MgCl ₂)	5.0 µl
MgCl ₂ (50mM)	1.5 µl
dNTPs (10mM cada uno)	1.0 µl
Oligo tbl-4 (1µM)	15 µl

Oligo tbl-6 ó tbl-7 (1µM)	15 µl
Ecotaq (5 U/µl)	1.0 µl
DNA genómico (~10µg/ml)	11.5 µl

(ii) Poner los tubos en el termociclador con este programa:

- (I) 8 minutos a 94°C
- (II) 1 minuto a 94°C
- (III) 40 segundos a 62°C
- (IV) 25 segundos a 72°C
- (V) Volver al paso (II) (37 veces)
- (VI) 10 minutos a 72°C

(iii) Comprobar el resultado por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Como se comenta en la Figura 59, el DNA de los ratones *tbl/tbl* debe dar lugar a una banda de 197 bp sólo con los oligos *tbl-4* y *tbl-7*, mientras que en los ratones *+tbl* debe aparecer dicha banda con ambos pares de oligos. Por último, los DNAs de los ratones salvajes (*+/+*) deben dar lugar a la banda de 197 bp con los oligos *tbl-4* y *tbl-6*.

Las secuencias de los oligonucleótidos mencionados son:

tbl-4: 5'-GCTTGTGGTAAAGGCAGCTATGGG-3'

tbl-6: 5'-GTTTCCCATAGTCACCATCTC-3'

tbl-7: 5'-GTTTCCCATAGTCACCATCTT-3'