The background of the cover is a grayscale electron micrograph showing a Golgi apparatus with several cisternae. The Golgi is stained with a yellowish-brown dye. Numerous small, spherical, electron-dense particles are scattered throughout the field, representing actin filaments. The overall texture is granular and detailed, typical of high-magnification electron microscopy.

**IMPLICACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA
EN LA ARQUITECTURA, HOMEOSTASIS Y
TRÁFICO DE SALIDA DEL
APARATO DE GOLGI**

Y

**ESTUDIO DE LA FORMACIÓN Y DEGRADACIÓN
DE UN AGRESOMA DE ACTINA**

Tesis Doctoral

Francisco Lázaro Diéguez

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
FACULTAD DE MEDICINA



**IMPLICACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA EN LA ARQUITECTURA,
HOMEOSTASIS Y TRÁFICO DE SALIDA DEL APARATO DE GOLGI
Y
ESTUDIO DE LA FORMACIÓN Y DEGRADACIÓN DE
UN AGRESOMA DE ACTINA**

El director

El autor

Gustavo Egea

Francisco Lázaro Diéguez

Tesis presentada por Francisco Lázaro Diéguez
dirigida por el Dr. Gustavo Egea
para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Barcelona, Marzo de 2008

A mis padres y hermana,

“Quien utiliza el microscopio aprende a considerar la naturaleza con otros ojos, comprendiendo a la vez el sentido e interconexión de nuestro enorme mundo”

Georg Stehli

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi maestro Gustavo Egea, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por sus enseñanzas, por su confianza y por su apoyo a lo largo de estos años. También recordar a Jaime Renau-Piqueras y miembros de su laboratorio por introducirme en el mundo de la ciencia.

Gracias, tanto a mis compañeros actuales del laboratorio; Inés, Javi, Bet, Susana, Laia, Enric y Sergi, como pasados; Stefan, Juanma, Olga, Isabel, Montse, Yovan, Emma, Miguel y Cecilia, de los que tanto he aprendido. Y sobre todo, gracias a Maite Muñoz por su ayuda y soporte técnico.

Gracias también a Jordi Alberch e integrantes de su grupo, tanto actuales; Pep, Esther, Xavi, Silvia, Begoña, Ana, Raquel, Dani, Noelia, Empar, Laura, Paola, Albert, Ingrid, Cris y Ana, como pasados; Miquel, Nuria, Susana, Juanma, Jesús, Solène, Sonia, Ana María y especialmente a J.R. por los buenos momentos compartidos.

Gracias al resto de los miembros del Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Universidad de Barcelona, especialmente a Nuria Morante y Carmen Tomás por su ayuda con los trámites burocráticos.

Gracias a Koert N. J. Burger, Juan Llopis, José A. Martínez-Menárguez y Piero Crespo así como a los integrantes de sus grupos de investigación, por su acogida en sus respectivos laboratorios y enseñanzas, especialmente a Nuria Jiménez por su ayuda con la tomografía electrónica.

Gracias a los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona, por su ayuda con las técnicas de microscopía confocal y electrónica.

Gracias (спасибо) a mis amig@s por su ayuda en los momentos difíciles y finalmente gracias a mi familia; a mi padre y a mi madre. Gracias por darme la oportunidad de llegar hasta aquí.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

β -APP: precursor de la proteína β -amiloide	FBS: Suero bovino fetal
aa: aminoácido/s	FIs: Filamentos intermedio/s
ABPs: Proteína/s de unión a la G/F-actina	ITs: Intermediario/s de transporte
ADF: Factor despolimerizador de actina	LPA: Ácido lisofosfatídico
ADP: Adenosina difosfato	LtA: Latrunculina A
AG: Aparato de Golgi	LtB: Latrunculina B
APs: Complejo de proteína/s adaptadora/s	MAPs: Proteína/s asociada/s a MTs
ARPs: Proteína/s relacionada/s a la G/F-actina	MFs: Filamento/s de actina, F-actina o microfilamento/s
ATP: Adenosina trifosfato	MTOC: Centro organizador de MTs o centrosoma
ATPasa: Adenosina trifosfatasa	MTs: Microtúbulo/s
Baf: Bafilomicina A	MyB: Mycalolide B
Benz: Benzamil	N-WASP: WASP neural
BfA: Brefeldina A	NaGlu: Gluconato sódico
C2: Toxina C2 de <i>Clostridium botulinum</i>	NZ: Nocodazol
Cc: Concentración crítica	Jpk: Jaspilakinolide
CGN: Red <i>cis</i> del aparato de Golgi	ODC: Ornitina descarboxilasa
CHs: Cuerpo/s de Hirano	Pep: Pespstatina A
CI: Cuerpo/s de inclusión	Pha: Faloidina
ConA: Concanamicina A	pH _C : pH del citoplasma
CyD: Citocalasina D	pH _G : pH del aparato de Golgi
DRFs: Proteína/s relacionada/s con diafanos	PIP ₂ : Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
GAPs: Proteína/s activadora/s de la actividad	PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato
GTPasa	PKC: Proteína quinasa C.
GDI: Inhibidor/s de disociación de nucleótido/s	RACK1: Receptor de la C-quinasa-1 activada
GDP: Guanosina difosfato	RE: Retículo endoplasmático
GEFs: Proteína/s o factor/es intercambiador/es de nucleótidos de guanina	REL: Retículo endoplasmático liso
CFP: Proteína fluorescente cian	SLA: Sistema lisosomal-autofagia
GPI: Glicosilfosfatidilinositol	SUP: Sistema ubiquitina-proteasoma
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium	TEM: Microscopía electrónica de transmisión
GFP: Proteína fluorescente verde	TGN: Red <i>trans</i> del aparato de Golgi
GTP: Guanosina trifosfata	TX: Taxol
GTPasa: Guanosina trifosfatasa	YFP: Proteína fluorescente amarilla
ERGIC: Compartimento intermedio entre RE y AG	WASP: Proteína del síndrome de Wiscott-Aldrich
ERES: Sitio/s de salida del retículo endoplasmático	WAVE: WASP homóloga a verprolina
ERM: Complejo ezrina, radixin y moesina	WB: <i>Western blot</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. El citoesqueleto de actina.....	3
1.1. Generalidades	
1.2. Los filamentos de actina o microfilamentos	
1.2.1. Origen y estructura	
1.2.2. Dinámica y toxinas de actina	
1.2.3. Proteínas asociadas y motores	
1.3. Regulación y organización del citoesqueleto de actina	
1.3.1. Nucleadores de actina	
1.3.2. Las Rho GTPasas	
1.3.3. Asociación actina-espectrina: el córtex del eritrocito	
2. Tráfico intracelular.....	23
2.1. Rutas o vías de tráfico intracelular	
2.1.1. La ruta endocítica y de reciclaje	
2.1.2. La ruta secretora o biosintética	
2.2. El aparato de Golgi: arquitectura y función	
2.3. Transporte anterógrado, retrógrado, intra-Golgi y post-Golgi	
2.4. El citoesqueleto en la arquitectura y función del aparato de Golgi	
2.5. Regulación del pH en las vías de tráfico intracelular	
2.6. Interacción entre elementos reguladores de la homeostasis iónica intracelular y el citoesqueleto de actina.	
3. Citoesqueleto y patología.....	49
3.1. Enfermedades relacionadas con alteraciones del citoesqueleto	
3.2. Cuerpos de inclusión y agresomas	
3.3. Agresomas de actina filamentosa: el cuerpo de Hirano	
4. Proteólisis intracelular.....	54
4.1. Sistema lisosomal y autofagia	
4.2. Sistema ubiquitina-proteasoma	
4.3. Las calpaínas	
4.4. Proteólisis intracelular y patología	

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	63
RESULTADOS.....	67
Trabajo 1.....	69
Estudio comparativo del impacto del citoesqueleto de actina sobre la morfología y superficie celular en las células de mamífero en respuesta a las toxinas de actina	
Trabajo 2.....	78
Los filamentos de actina están implicados en el mantenimiento de la morfología de las cisternas y en el pH del aparato de Golgi	
Resultados adicionales no publicados.....	95
2.1.Análisis de la cinética de acción de la latrunculina B y el jasplakinolide sobre el citoesqueleto de actina y el aparato de Golgi	
2.2.Distribución subcelular de la protón-ATPasa vacuolar y de los intercambiadores iónicos AE2 (aniónico) y NHE7 (catiónico)	
2.3.Análisis del flujo de membrana inducido por la brefeldina A y distribución subcelular del receptor KDEL en la región retículo endoplasmático-aparato de Golgi en células con alteraciones en la homeostasis iónica intracelular.	
2.4.Ultraestructura del aparato de Golgi en células que presentan alteraciones la homeostasis iónica intracelular	
Trabajo 3.....	102
Requerimiento variable de la dinámica de actina para la salida de <i>cargo</i> de la red <i>trans</i> del aparato de Golgi	
Trabajo 4.....	110
Dinámica de la actina en el complejo de Golgi de las células de mamífero	
Trabajo 5.....	122
Dinámica de un agresoma de actina filamentosa generado por el agente estabilizador de actina jasplakinolide	
Resultados adicionales no publicados.....	148
5.1.Alteraciones de la red de filamentos de actina en exposiciones prolongadas a toxinas de actina a la concentración mínima efectiva	

5.2. Análisis del flujo de membrana inducido por brefeldina A y distribución subcelular del receptor KDEL en la región retículo endoplasmático-aparato de Golgi en células que presentan un agregoma de actina filamentosa

RESUMEN DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....151

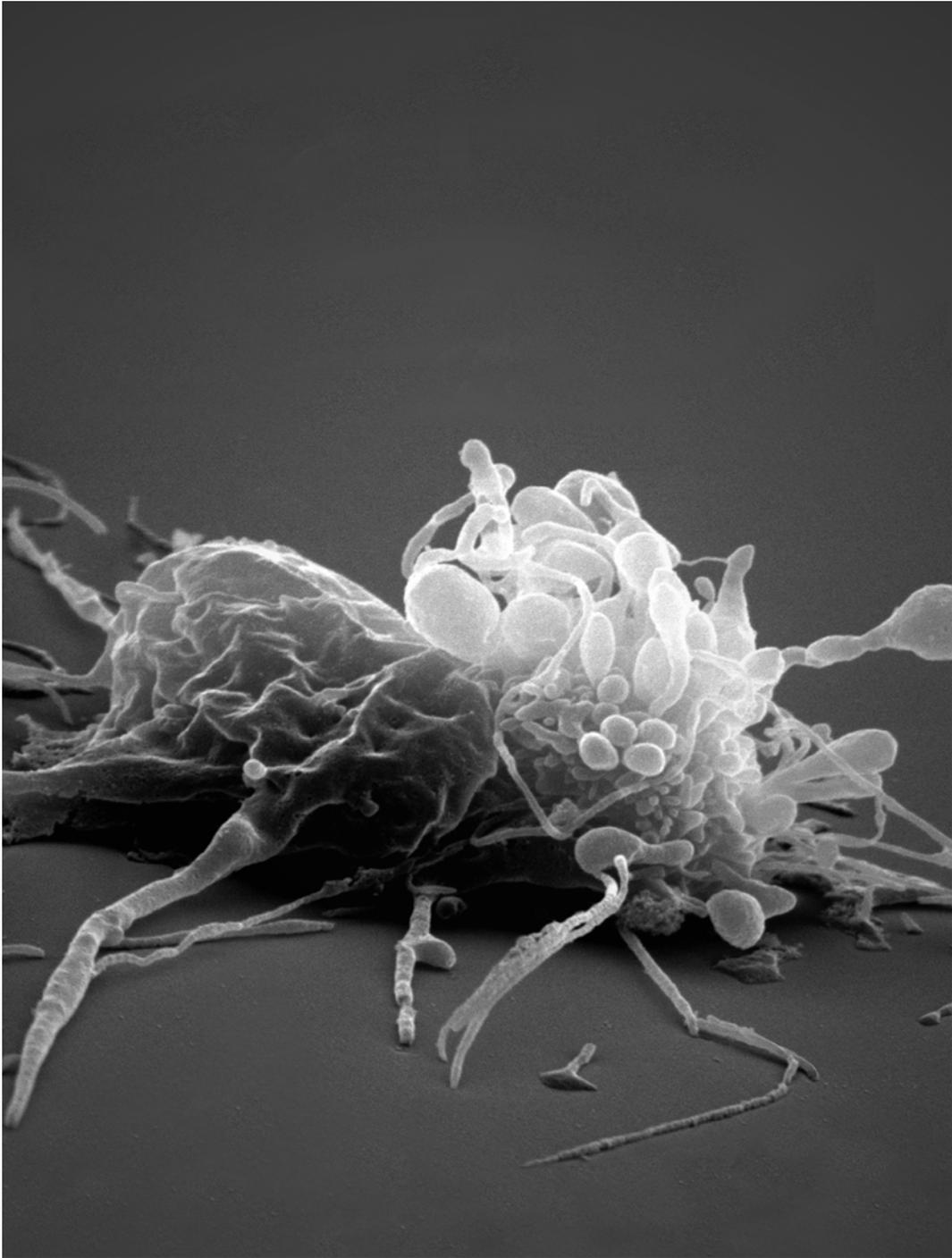
CONCLUSIONES.....167

MATERIAL Y MÉTODOS.....171

1. Cultivos celulares
2. Drogas/toxinas, marcadores, agentes o reactivos y tratamientos
3. Anticuerpos
4. Plásmidos y transfecciones
5. Inmunofluorescencia
6. Microscopía electrónica de transmisión y de barrido
7. Análisis estereológico
8. Tomografía electrónica y reconstrucción 3D
9. Medidas del pH citoplasmático y del aparato de Golgi
10. Análisis FRAP y FRAP inverso
11. Ensayo para la viabilidad celular
12. Fraccionamiento subcelular por gradiente de sacarosa
13. Electroforesis y *western blot*
14. Cuantificación de los niveles de F-actina
15. Medida de la actividad del proteasoma

ANEXO.....183

BIBLIOGRAFÍA.....189



- INTRODUCCIÓN -