

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

A José María y Rafaela, mis abuelos.

A mi familia. A Iñaki

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que he de agradecer su apoyo y ayuda para llegar al final de esta etapa. Sería imposible citarlas a todas por lo que espero la comprensión de aquellas a las que no nombre expresamente.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a Gustavo Egea, director de esta tesis por haber confiado en mí así como por su paciencia y dedicación a lo largo de todo este tiempo. Mi más sincero agradecimiento también a mis compañeros de grupo y de laboratorio tanto los del principio, Teresa, Ferran y especialmente Ana por hacer tan fácil el comienzo, como los del final, Juanma y Montse de los que tanto he aprendido, Inés y Miguel con los que mas de una vez he arreglado el mundo y a Frank y Stefan por su ayuda siempre que la he necesitado. Demasiadas comidas, demasiados cafés, mucho apoyo y muchas risas como para no mencionar a Esther, Sonia, Susana, Nuria y Miquel, gracias por hacer de la convivencia una delicia. A ello ha contribuido también otra mucha gente de la que no me puedo olvidar, Jordi, Pep, J.R., Raquel, Juanma, Silvia, Jesús y Ana. A Maite, porque sin su organización y ayuda el caos hubiera sido mucho más cotidiano. También he conocido a gente con la que no he tenido la oportunidad de compartir tanto tiempo pero con la que siempre he sabido que podía contar, por ello me gustaría expresar mi gratitud a todos los compañeros de Biología Celular. Anna y Lidia me han ayudado y a veces sin ser conscientes, por su incondicional amistad, muchas gracias. Gracias también a Nuria, Carme y M^a José, sin vosotras la burocracia y demás papeles hubieran sido imposibles de controlar. Me gustaría hacer una mención especial a toda la gente de Murcia que hicieron que me sintiera como en casa, a Jose Ángel y Emma gracias por TODO, Manolo, Irene, Tere y M^a Carmen me consideraron siempre un miembro mas del laboratorio, a María le debo su preocupación por encontrarme alojamiento y la suerte de haber conocido a Olga, Raquel, Laura y Cristina que hicieron de Murcia una lugar inolvidable en la memoria. Finalmente, estas últimas líneas se las dedico a mi familia a la que agradezco una vez más, más que nunca, su apoyo incondicional. A Iñaki, por enseñarme tanto, por cuidarme, por exigirme, por aguantarme. A Jorge y Ángeles, por su inestimable ayuda al comienzo, en el intermedio y al final. Espero compensaros en parte con horas extra de canguro.

A todos, muchas gracias.

I.	ABREVIATURAS	5
II.	INTRODUCCIÓN	
1.	El citoesqueleto de actina	7
1.1	La molécula de actina	7
1.2	Proceso de polimerización de actina	8
1.3	Proteínas de unión a actina	10
1.4	Nucleación de actina: Arp2/3 y forminas	11
1.4.a	El complejo Arp2/3 y sus activadores	12
1.4.b	Forminas	24
2.	Las Rho GTPasas	29
2.1	Generalidades	29
2.2	Dominios funcionales	29
2.3	Localización subcelular	30
2.4	Ciclo funcional de las Rho GTPasas	32
2.5	Proteínas reguladoras: GEFs, GAPs, GDIs	34
2.6	Funciones biológicas de Rho, Rac y Cdc42	39
2.6.a	Efecto de las Rho GTPasas sobre la organización del citoesqueleto de actina	39
2.6.b	Rho GTPasas y la polaridad celular	48
2.6.c	Rho GTPasas y el tráfico intracelular	49
3.-	Tráfico de membranas entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi	54
3.1	Generalidades	54
3.2	Formación de intermediarios de transporte a partir del retículo endoplasmático y del complejo de Golgi	54
3.3	Complejos multiproteicos COP	57
3.3.a	COPI	57
3.3.b	COPII	58
3.3.c	Función de los intermediarios de transporte COP	60

3.4	Proteínas implicadas en la fusión de los intermediarios de transporte con sus membranasceptoras	62
3.5	Transporte retrógrado COP I independiente	64
3.6	Papel del citoesqueleto en el transporte en la zona retículo endoplasmático/complejo de Golgi	65
3.6.a	El citoesqueleto de microtúbulos	65
3.6.b	El citoesqueleto de actina	66
III.	OBJETIVOS	69
IV.	RESULTADOS	
1.	Sólo Cdc42 se localiza en el complejo de Golgi	71
2.	Rac1 y RhoA no alteran el desensamblaje ni el reensamblaje del complejo de Golgi	75
3.	Ni Rac1 ni RhoA regulan el transporte de la proteína VSV-G desde el retículo endoplasmático al complejo de Golgi	77
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 por Rac1 ni por RhoA	79
5.	Rac1 y RhoA no alteran la distribución de proteínas ciclantes	82
6.	Sólo la forma activada de Cdc42 provoca cambios en la morfología del complejo de Golgi	85
7.	N-WASP y Arp2/3, efectores de Cdc42, se localizan en el complejo de Golgi	88
8.	Cdc42, N-WASP y Arp2/3 presentan una distribución polarizada (<i>cis-trans</i>) en las cisternas del complejo de Golgi	90
9.	La activación de Cdc42 induce la redistribución de N-WASP y Arp2/3 a los laterales de las cisternas del complejo de Golgi	92
10.	Cdc42, N-WASP y Arp2/3 co-localizan en elementos túbulo-vesiculares de la	

zona RE/complejo de Golgi	94
11. Los elementos túbulo-vesiculares Arp3 positivos contienen proteínas de la vía secretora temprana	97
12. Cortactina se localiza en el complejo de Golgi	98
V. DISCUSIÓN	101
VI. CONCLUSIONES	109
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Materiales	111
2. Métodos	113
2.1 Cultivo Celular	113
2.2 Microinyección	114
2.3 Transfección transitoria	114
2.4 Inmunofluorescencia indirecta	115
2.5 Microscopía electrónica	115
2.5.a Obtención de criosecciones ultrafinas	115
2.5.b Inmunocitoquímica	116
2.6.c Análisis cuantitativo	116
2.6 Permeabilización celular	117
2.7 Obtención de membranas de Golgi y análisis mediante western blot	118
2.8 Anexo: Composición de soluciones	119
VIII. BIBLIOGRAFÍA	123
IX. ANEXO	

- Ana Luna, Olga B. Matas, Jose Ángel Martínez-Menárguez, Eugenia Mato,

- Juan M. Durán, José Ballesta, Michael Way and Gustavo Egea, 2002, Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by Cdc42 and N-WASP: *Molecular Biology of the Cell*, 13, 866-879. 151
- Olga B. Matas, Jose Ángel Martínez-Menárguez and Gustavo Egea, 2004, Association of Cdc42/N-WASP/Arp2/3 signalling pathway with Golgi membranes: *Traffic*, 5, 838-846 165
 - Olga B. Matas, Stefan Fritz, Ana Luna and Gustavo Egea, 2004, Membrane trafficking at the ER/Golgi interface: funcional implications of RhoA and Rac1: *sometido*. 173

I. ABREVIATURAS

Abi	Abl interactor
ABPs	Actin-binding proteins
ADF	Actin depolymerizing factor
ADP	Adenosine diphosphate
ARPC	Arp2/3 complex component
Arps	Actin-related proteins
ATP	Adenosine triphosphate
BFA	Brefeldin A
CG	Complejo de Golgi (Golgi complex)
CI	Compartimento intermedio (intermediate compartment)
CRIB	Cdc42/Rac-interactive binding motif
DAD	Dia-autorregulatory domain
Dbl	Diffuse B-cell lymphoma
DFRs	Diaphanous-related formins
EGF	Epidermal growth factor
ERGIC	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment
ERM	Ezrina, Radixina, Moesina
FH	Formin homology
GAP	GTPase-activating protein
GBD	GTPase binding domain
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Guanosine triphosphatase
IF	Inmunofluorescencia (immunofluorescence)
ITs	Intermediarios de transporte
LIMK	LIM kinase
LPA	Lysophosphatidic acid
mDia	mamalian diaphanous
ME	Microscopía electrónica (electron microscopy)

MLC	Miosin light chain
MLCK	Miosin light chain kinase
MLCP	Miosin light chain phosphatase
MTOC	Microtubule organization center
MT	Microtubule
Nap1	Nck-associated protein
NSF	N-ethylmaleimide sensitive factor
NTA	N-terminal acidic domain
N-WASP	Neural Wiscott-Aldrich syndrome protein
PAK	p21 activated kinase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PH	Pleckstrin homology
Pi	Phosphate inorganic
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI-4P5K	Phosphoinositol-4 phosphate 5-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIR121	p53 inducible messenger RNA
POR1	Partner of Rac1
RBD	Rho-binding domain
RE	Retículo endoplasmático (endoplasmic reticulum)
ROK	Rho-associated kinase
SCAR	Supressor of cAMP receptor
SH3	Src homology 3
SHD	Scar homology domain
SL-O	Streptolysine-O
SNAPs	Soluble NSF attachment proteins
SNAREs	SNAP receptors
TGN	<i>trans</i> -Golgi network
WASP	Wiscott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP family verproline-homologous protein
WB	Western blot
WH	WASP homology