

**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

V. DISCUSIÓN

RAC1 Y RHOA NO REGULAN EL TRANSPORTE EN LA ZONA RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO/COMPLEJO DE GOLGI

Los miembros de la familia de las Rho GTPasas están implicados en la regulación de multitud de eventos celulares. Originalmente se identificaron como proteínas capaces de regular el citoesqueleto de actina (Nobes y Hall 1995; Ridley et al., 1992) pero posteriormente se demostró su participación en la regulación de la transcripción de genes (Hill et al., 1995; Minden et al., 1995), en la transformación dependiente de Ras (Qiu et al., 1995), en procesos de tráfico intracelular (Caron y Hall, 1998; Lamaze et al., 1996; Leung et al., 1999; Jou et al., 2000) así como en la polarización celular (Kroschewsky et al., 1999). Esta amplia variabilidad funcional es en parte fruto de su versátil localización subcelular, lo que a su vez se debe a su capacidad para ciclar entre una forma unida a GDP soluble en el citoplasma y asociada a una Rho-GDI (forma inactiva) y una forma unida GTP asociada a las membranas (forma activada).

De entre todos los miembros de las Rho GTPasas, Cdc42 es el componente cuya localización subcelular está claramente demostrada en el CG (Erickson et al., 1996; Fuccini et al., 2002; Luna et al., 2002). Sin embargo, no hay datos concluyentes sobre la localización subcelular de otros miembros de la familia como Rho y Rac. Por consiguiente, ya que uno de los objetivos de este trabajo era determinar el papel de Rac1 y RhoA en el transporte intracelular en la zona RE/CG, decidimos examinar en primer lugar la localización subcelular de ambas GTPasas en varios tipos celulares. Con objeto de conocer si existían diferencias en cuanto a la distribución de las proteínas en estado activo o inactivo, se estudió la distribución de los dominantes positivos y negativos de ambas GTPasas. También examinamos la posibilidad de que la mayoritaria localización citoplasmática de estas GTPasas impidiese ver su presencia minoritaria en el CG, por lo que permeabilizamos las células para extraer el citoplasma. Finalmente centramos nuestro interés en fracciones enriquecidas en membranas de Golgi en donde estudiamos la presencia de Rac1 y RhoA mediante *western blotting*. Los resultados de todas estas aproximaciones experimentales indican claramente que ni Rac1 ni RhoA se encuentran en el complejo de Golgi y por lo tanto señalan a Cdc42 como la única Rho GTPasa que, de momento, se localiza en este orgánulo. A pesar de las diferencias en cuanto a la localización intracelular de Cdc42, Rac1 y RhoA, estos resultados no eran concluyentes para descartar la participación de Rac1 y RhoA en el tráfico de membranas en la zona

RE/CG. De hecho, numerosos estudios demuestran la participación de Cdc42, Rac1 y/o RhoA en la regulación del transporte intracelular a nivel de la membrana plasmática, en particular destaca su participación en la endocitosis (Qualmann y Mellor, 2003). Así pues, estudiamos también la posibilidad de que Rac1 y/o RhoA, a pesar de no estar localizadas en el complejo de Golgi pudieran, a través de sus efectores, estar implicadas en la regulación del tráfico intracelular de membranas en las fases tempranas de la vía secretora. Siguiendo diseños experimentales similares a los que nos permitieron demostrar el papel de Cdc42 como regulador del transporte retrógrado de proteínas (Luna et al., 2002) empleamos los dominantes positivos y negativos de Rac1 y RhoA. Observamos que ni el desensamblaje ni el reensamblaje del CG se encuentran afectados por la expresión de ninguno de los dominantes de Rac1 o RhoA, lo cual era indicativo de que el flujo de membranas retrógrado y anterógrado no están regulados por ninguna de estas dos GTPasas. De todos modos, para descartar definitivamente su implicación en el transporte anterógrado se estudió la cinética del transporte de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) entre el RE y el CG y tampoco se observó alteración alguna. Para descartar definitivamente su implicación en el transporte retrógrado estudiamos el flujo de proteínas del CG hacia el RE inducida por la expresión del dominante negativo de Sar1 (Sar1^{dn}) y tampoco vimos ninguna alteración a diferencia de lo que ocurre con Cdc42 (Luna et al., 2002). Finalmente estudiamos la posibilidad de que Rac1 y RhoA regulasen alguna vía de reciclaje como la que sigue el receptor de KDEL que cicla entre el CG y el RE o la proteína TGN46 que cicla entre el TGN y la membrana plasmática. La distribución subcelular de ambas proteínas permanecía inalterada en las células que sobreexpresan las formas activas e inactivas de Rac1 y RhoA. Tampoco la redistribución de KDELr desde el CG hacia CI o ERGIC se vió alterada cuando las células transfectadas se incubaron a 15 °C.

Ya por último, investigamos si las Rho GTPasas, en base a su papel regulador básico del citoesqueleto de la actina, promovían cambios en la morfología del CG. Estos estudios llevados a cabo en líneas celulares estables que expresan constitutivamente las formas activas de Cdc42, Rac1 o RhoA, mostraban que sólo Cdc42-GTP induce cambios en la morfología del CG.

El conjunto de todos estos resultados demuestra que a diferencia de Cdc42, ni Rac1 ni RhoA se localizan en el CG ni ejercen efecto alguno sobre su morfología o sobre el

transporte anterógrado y retrógrado de la vía secretora temprana.

En el caso de RhoA, nuestras observaciones son consistentes con trabajos previos que demuestran que esta GTPasa no está implicada en la regulación de la dinámica de la actina asociada al CG (Fuccini et al., 2002; Valderrama et al., 2000) aunque sí contrastan con los resultados obtenidos en neuronas de hipocampo, en donde se ha descrito que la proteína de unión a Rho, Citron-N, se encuentra asociada al CG y su sobreexpresión induce el reclutamiento de RhoA (Camera et al., 2003). Nuestros estudios de localización para RhoA se han llevado a cabo en varias líneas celulares (HeLa, Vero, NRK, A375p, NIH3T3) y se han realizado siguiendo diferentes aproximaciones experimentales. En ninguno de los casos examinados hasta ahora hemos podido observar co-localización de RhoA con marcadores de CG. Trabajos anteriores muestran a RhoA como una proteína citosólica (Adamson et al., 1992; Kranenburg et al., 1997) y en algunos casos asociada a la membrana plasmática (Boivin y Beliveau, 1995; Michaely et al., 1999) por lo que probablemente la localización de RhoA en CG sea una particularidad de las células neuronales.

Por lo que respecta a Rac1, se ha publicado recientemente un trabajo que muestra que la proteína OCRL1 (una fosfoinositósido fosfatasa) se localiza en TGN actuando como una RhoGAP de Rac1 (Faucherre et al., 2004). De momento se desconoce la relevancia fisiológica de la interacción entre OCRL1 y Rac1 en el tráfico de membranas. Por otro lado, empleando la misma línea celular (Cos7), Michaelson y colaboradores encontraron que Rac1 se localiza en la membrana plasmática y en el nucleoplasma pero no encontraron ni rastro de esta GTPasa en el CG (Michaelson et al., 2001). Si bien es conocido el papel de Rac en la endocitosis, nuestros resultados muestran claramente que Rac1 no es necesario para el transporte en la zona RE/CG ni participa en las fases tardías de la vía secretora ya que la distribución subcelular de TGN46 (que cicla entre el TGN y la membrana plasmática) no se ve alterada por la expresión del dominante positivo o negativo de Rac1. Este último resultado está en concordancia con un trabajo recientemente publicado en el que se estudia el transporte post-Golgi en células en migración y en donde se muestra que aunque la migración celular depende tanto de la correcta formación del lamelipodium en el frente de avance como del transporte anterógrado post-Golgi, Rac1 sólo está implicado en el primer proceso pero no en el segundo (Prigozhina y Waterman-Storer, 2004).

LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN CDC42-N-WASP-ARP2/3 ES FUNCIONAL EN EL COMPLEJO DE GOLGI

La cascada de señalización Cdc42, N-WASP, Arp2/3 está involucrada en la regulación de los procesos de polimerización de actina que acontecen en la membrana plasmática y, en particular, en la formación de la red dendrítica que constituye el frente de avance en células en migración. La polimerización de actina inducida por la activación de esta vía de señalización también ha sido implicada en procesos de endocitosis. Los trabajos de Merrifield y colaboradores muestran que N-WASP y Arp2/3 colaboran en la endocitosis mediada por clatrina tanto en la etapa inicial de internalización (Merrifield et al., 2002) como en el posterior alejamiento (por propulsión) de las vesículas ya formadas de la membrana plasmática (Merrifield et al., 2004).

En la zona RE/CG también se ha demostrado la importancia del citoesqueleto de actina en los procesos de transporte (Hirschberg et al., 1998; Valderrama et al., 1998; Valderrama et al., 2001). Estudios recientes muestran a Cdc42 como el nexo de unión entre el tráfico vesicular y la dinámica de actina ya que Cdc42 i) se localiza en el CG (Erickson et al., 1999), ii) regula el transporte de proteínas no sólo en la zona RE/CG (Luna et al., 2002, Fuccini et al., 2002) sino también el transporte post-Golgi (Cohen et al., 2001; Rojas et al., 2001; Müsch et al., 2001) y iii) necesita a N-WASP y Arp2/3 para regular la salida de proteínas desde el CG en dirección al RE (Luna et al., 2002) y promover el reclutamiento de actina a las membranas del CG (Fuccini et al., 2002, Chen et al., 2004). Estos datos sugieren la existencia en el CG de una plataforma de nucleación/polimerización de actina análoga a la que existe en la membrana plasmática. Para examinar esta hipótesis estudiamos en primer lugar la precisa localización subcelular en el CG de los miembros de la cascada de señalización implicada en polimerización de actina, es decir, de Cdc42, N-WASP y Arp2/3. Empleando técnicas de crioinmunomicroscopía electrónica hemos observado que no sólo Cdc42 sino también sus efectores N-WASP y Arp2/3 se localizan en este orgánulo. Los componentes de esta vía de señalización no se distribuyen de forma homogénea en todas las cisternas del dictiosoma sino que lo hacen de manera polarizada. Así, Cdc42 se acumula mayoritariamente en las cisternas *cis*-media y en menor medida en las cisternas *trans*, N-WASP en la zona *cis*-media y Arp2/3 sólo en la cara *cis*. Además, la sobreexpresión de la forma activa de Cdc42 induce cambios en la distribución de N-

WASP y Arp3 dentro de las cisternas, en particular observamos un enriquecimiento de ambos componentes en las porciones laterales de las mismas donde según el modelo de maduración de cisternas tiene lugar la formación de los intermediarios de transporte retrógrados (Polishchuk y Mironov 2004). Observamos también que esta redistribución lateral no ocurre en células que sobreexpresan la forma inactiva de Cdc42. Estos datos concuerdan con los resultados de Luna et al., (2002) en donde la expresión de la forma truncada de N-WASP que carece del dominio de unión y activación de Arp2/3 (N-WASP Δ WA) impide que la forma activa de Cdc42 provoque un retraso en el desensamblaje del CG inducido por la sobreexpresión de Sar1^{dn} y, por lo tanto confirman que N-WASP y Arp2/3 son los intermediarios a través de los que Cdc42 regula el transporte retrógrado.

En la actualidad, nuestro grupo está llevando a cabo ensayos para determinar la capacidad nucleadora/polimerizadora de actina de las membranas del complejo de Golgi. A partir de fracciones de membranas de Golgi aisladas de hígado de rata (Beckers y Rothman, 1992) se ha purificado mediante el sistema de *floating-up* en gradientes de sacarosa (Chen et al., 2004) una fracción ligera cuya caracterización proteica por *western blotting* ha confirmado su pureza en membranas de Golgi ya que contiene proteínas típicas del CG (giantina, manosidasa II, TGN46 y β COP) y carece totalmente de proteínas del RE (calnexina), de la membrana plasmática (SNAP-23) o de los endosomas (EEA1). Mediante ensayos de polimerización de actina *in vitro* empleando actina ligada al grupo fluorescente pireno (Cooper et al., 1983) observamos que la fracción ligera polimeriza actina de forma específica (S. Fritz, S. Romero, M. F. Carlier y G. Egea, manuscrito en preparación). Estos datos demuestran no sólo la asociación a las membranas de CG de una cascada de señalización involucrada en polimerización de actina sino que dicha vía es funcional en este orgánulo ya que es capaz de inducir procesos de polimerización de actina.

DINÁMICA DE LA ACTINA Y LA FORMACIÓN DE INTERMEDIARIOS DE TRANSPORTE EN EL COMPLEJO DE GOLGI

El análisis estadístico de los experimentos de inmunomarcaje revela que un alto porcentaje de Cdc42, N-WASP y Arp2/3 se localiza en los ITs localizados alrededor del

CG (peri-Golgi), de los que aproximadamente el 30% co-localizan con proteínas que ciclan entre el CG y el RE y sólo un 15% de los mismos cicla entre TGN y membrana plasmática. Este hecho junto con la redistribución de N-WASP y Arp2/3 hacia los laterales de las cisternas cuando Cdc42 se activa (GTP-Cdc42) nos llevó a formular la hipótesis de que esta cascada de señalización gobernada por Cdc42 podría activarse concomitantemente con la formación de los ITs que viajan en sentido retrógrado (Golgi-RE). De acuerdo con esta hipótesis se ha demostrado que Cdc42 interacciona con componentes de las cubiertas COPI, en concreto con la subunidad γ COP (Wu et al., 2000). También en este sentido se ha descrito que la unión de N-WASP y Arp3 a las membranas de Golgi es activada por el complejo coatómero/Cdc42 (Chen et al., 2004). Una incógnita todavía por despejar es determinar de qué manera la polimerización de actina inducida por esta vía de señalización participa en la formación de los ITs. En este sentido consideramos varias opciones no excluyentes entre sí. La primera de ellas consiste en que la polimerización de actina generada por la activación de esta cascada de señalización participe en el proceso de separación (fisión) de los ITs de las cisternas, proceso en el que podría cooperar una isoforma de la dinamina (dinamina 2) que se ha localizado en el CG (McNiven et al., 2000). A nivel de la membrana plasmática, Merrifield y colaboradores han demostrado que dinamina 1 y actina cooperan en el proceso de fisión de las vesículas de clatrina (Merrifield et al., 2002). El proceso molecular podría ser como sigue: la dinamina 2 se ensamblaría entorno al cuello del IT en formación y promovería la polimerización de actina a través de proteínas intermediarias como sindapina y N-WASP (Kessels y Qualmann, 2002). La polimerización de actina generaría una fuerza que estiraría el cuello del IT que se va estrechando cada vez más hasta que finalmente tienen lugar la separación completa de la cisterna. Otra posibilidad sería que la polimerización de actina de lugar a la formación de cometas en los ITs recién formados en los laterales de las cisternas, lo que se traduciría en un alejamiento por propulsión de la cisterna. Esta cometa sería de vida muy breve y no serviría como mecanismo de transporte del IT hasta el RE (Durán et al., 2003) sino que su finalidad sería simplemente la de facilitar el alejamiento del IT de la cisterna. Esto explicaría por qué la proporción de Cdc42, N-WASP y Arp2/3 es mayor en los ITs peri-Golgi ya formados que en las propias cisternas. Una tercera posibilidad es que la polimerización de los filamentos de actina desde las membranas del CG en

dirección al citoplasma originaría un sistema de carriles por los que, gracias a las miosinas, se desplazan los ITs ya formados (Durán et al., 2003).

A diferencia de Cdc42, ni N-WASP ni Arp2/3 aparecen en las cisternas *trans* del CG. Sin embargo, sí se puede observar una población de Arp3 que co-localiza con ITs que contienen TGN46. Existen evidencias, sobretodo en células polarizadas MDCK, en donde se muestra que Cdc42 regula el transporte post-Golgi posiblemente gracias a su capacidad para regular el citoesqueleto de actina ya que la despolimerización de la actina provoca alteraciones en la salida de proteínas desde el TGN hacia la membrana plasmática (Müsch et al., 2001; Cohen et al., 2001). Es posible que la actina intervenga de diferente modo en la zona RE/CG y en el transporte post-Golgi. Así podría ocurrir que mientras en la zona RE/CG la actina participa en los procesos de formación de ITs (ayudando en el proceso de fisión y/o formando carriles de corto recorrido por las que se desplazan los ITs gracias a la actividad motora de las miosinas), en el TGN actuaría en los procesos de formación de cometas en los ITs post-Golgi. Esta hipótesis concuerda con los trabajos de Rozelle y colaboradores que muestran que las vesículas capaces de formar cometas de actina provienen mayoritariamente del TGN (Rozelle et al., 2000).

CORTACTINA Y LA DINÁMICA DE LA ACTINA ASOCIADA AL COMPLEJO DE GOLGI

Cortactina es una proteína que está empezando a adquirir protagonismo en el tráfico de membranas. Su actividad se ha relacionado con los procesos polimerización de actina en el frente de avance de células en migración así como en la endocitosis mediada por clatrina. En nuestros estudios preliminares hemos observado su localización en el complejo de Golgi lo que sugiere que cortactina podría colaborar con la vía de señalización Cdc42/N-WASP/Arp2/3 en la dinámica de actina asociada a procesos de transporte en la zona RE/CG. En este sentido, cortactina no sólo puede unirse y activar (aunque mas débilmente que N-WASP) a Arp2/3 sino que también puede unir y activar a N-WASP (Martínez-Quiles et al., 2004; Kempniak et al., 2005; Kowalski et al., 2005). Por tanto existen diversas hipótesis acerca de cómo esta proteína puede colaborar en los procesos de polimerización de actina a nivel del CG. Centrándonos en la zona RE/CG,

si la activación final de Arp2/3 conduce a la formación de una red de actina que actúa como vía de transporte de corto recorrido, cortactina podría contribuir a estabilizar los filamentos de actina que constituyen esa red. Otra de sus posibles funciones en esta zona, sería la de reclutar proteínas implicadas en la dinámica de la actina como dinamina 2 que participaría junto con la actina en el proceso de separación de los ITs en formación de las membranas del CG de forma homóloga a lo descrito en la membrana plasmática. En este sentido se ha demostrado que en la membrana plasmática, cortactina regula conjuntamente con dinamina 1 y actina la fisión de las vesículas de clatrina (Cao et al., 2003; Zhu et al., 2005).

Cortactina también podría estar implicada en los procesos de formación de cometas que en el párrafo anterior señalábamos serían de especial relevancia en el TGN. De hecho, se ha observado que tanto cortactina como las proteínas de la familia WASP se localizan en las cometas de actina asociadas a endomembranas (Taunton et al., 2000; Kaksonen et al., 2000). En un trabajo muy reciente, se muestra que más que la activación del complejo Arp2/3, la actividad principal de cortactina consistiría en la activación de N-WASP restringiendo su localización y su actividad polimerizadora de actina a aquellas zonas que lo requieran (Kempiak et al., 2005) por lo que quizás en el CG, cortactina no sólo colaboraría en los procesos de polimerización de actina, sino que restringiría la actividad de N-WASP. Dado que N-WASP no se localiza en las cisternas C4 y C5, es decir las cisternas *trans* del dictiosoma, no podemos descartar la posibilidad de que la presencia de cortactina en el CG sea complementaria a la de N-WASP. De este modo, la formación de los ITs se daría en todo el dictiosoma pero la maquinaria molecular que la dispara sería diferente y tal vez asociada al transporte diferencial de distintos cargo. En concordancia con esta última interpretación, se ha publicado recientemente un trabajo que demuestra la asociación de cortactina al TGN donde recluta a dinamina 2 y actina y regula el transporte de cargo desde el TGN hacia la membrana plasmática (Cao et al., 2005).