

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

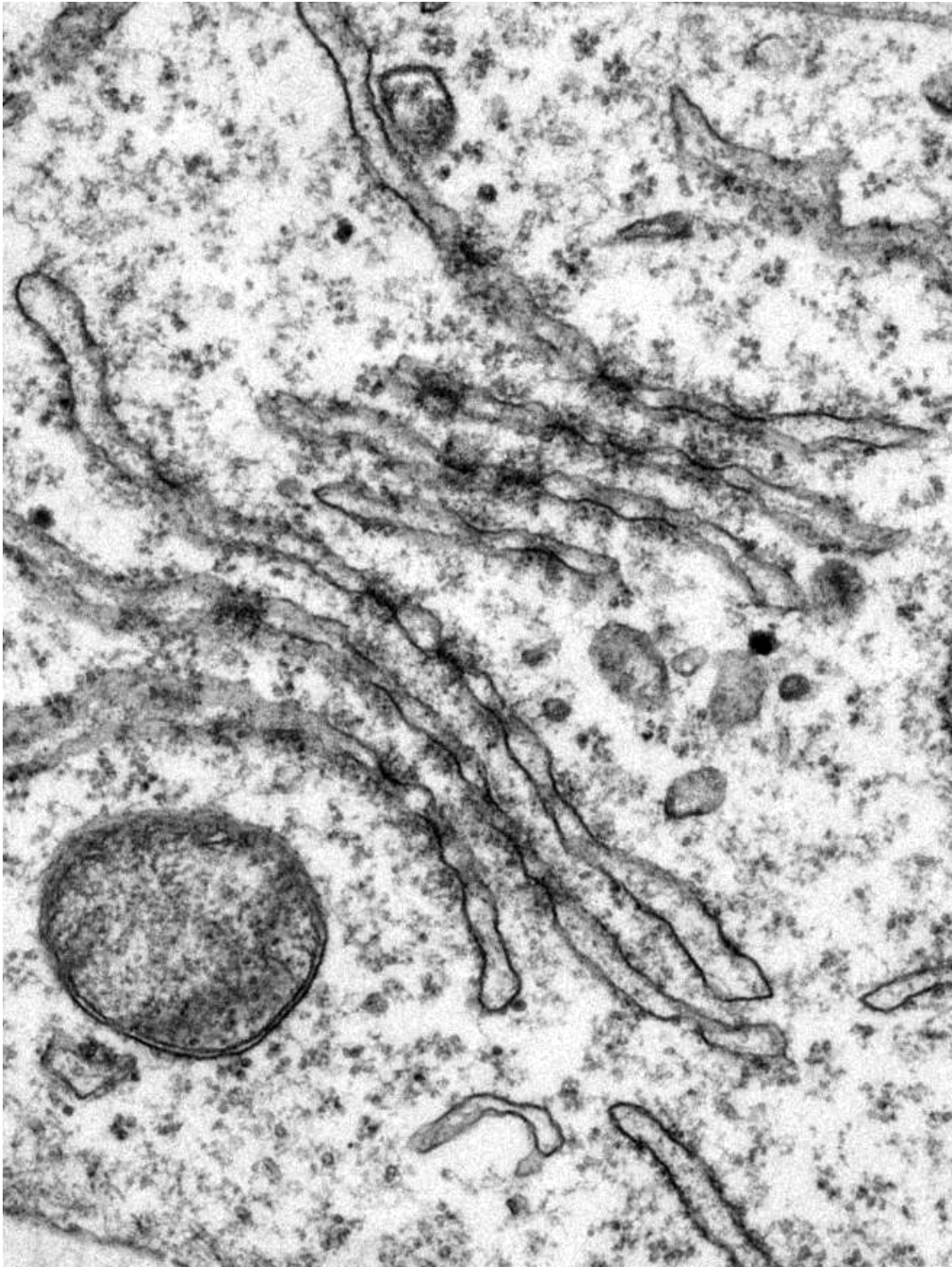
El autor

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



- MATERIAL Y MÉTODOS -

1. Cultivos celulares

Las células HeLa, NRK, Vero, COS-1 y M213 crecen en *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) completo (suplementado con suero bovino fetal (FBS, inactivado a 56°C 45 min) al 10% (vol/vol), penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml), piruvato sódico (1 mM) y L-glutamina (2 mM)). Las células neurales c17.2 crecen en DMEM completo suplementado con 5% suero de caballo y 20 µg/ml gentamicina G-418. Los cultivos primarios de astrocitos de cortex cerebral de rata se obtuvieron según el protocolo descrito en Renau-Piqueras et al., 1989 y los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón según Urena et al., 2005 creciendo sendos cultivos en DMEM completo. Las células crecen a 37°C en atmósfera saturada de agua y 5% de CO₂. Los medios de cultivo y suplementos se obtuvieron de Gibco-Invitrogen (Paisley, Scotland, UK) y Sigma (St. Louis, MO, USA).

2. Drogas/toxinas, marcadores, agentes o reactivos y tratamientos

Las toxinas latrunculina B, mycalolide B, bafilomicina A1, concanamina A, benzamil, nocodazol, lactacistina, pepstatina A, leupeptina, E-64-d, rapamicina y el 17-DMAG se obtuvieron de Calbiochem (EMD Biosciences, Darmstadt, Germany). Las toxinas citocalasina D, monensina, nigericina, taxol, brefeldina A y cicloheximida, los compuestos gluconato sódico, N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr- α -4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (N-Suc-LLVY-MCA), PMA, LPA y los marcadores TRITC-, FITC-faloidina y monodansilcadaverina de Sigma (St. Louis, MO, USA). La toxina jasplakinolide y los marcadores MitoTracker CM-H2XRos, BCECF-AM y DAPI de Invitrogen (Carlsbad, CA). Los componentes C2I y C2IIa de la toxina C2 de *C. botulinum* fueron cedidos por H. Barth (Ulm University, Germany). Los tratamientos con las distintas toxinas se realizaron diluyendo la respectiva toxina a la concentración adecuada en DMEM completo. Como control se incubaron las células diluyendo el vehículo a la misma concentración a la cual se diluye la toxina. En el caso de las incubaciones con la toxina C2 de *C. botulinum* se utilizó DMEM completo pero suplementando con 0.5% de FBS.

3. Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales frente a la β - y γ -tubulina, cofilina, miosina IIA y vimentina se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA), los anticuerpos monoclonales frente a la cortactina, p21-Arc (Arp2/3), RhoA, Rac, y Cdc42 de BD Biosciences (Erembodegem,

Belgium). El anticuerpo frente LC3 (clon 5F10) es de Nanotools (Teningen, Germany), el anticuerpo frente al TGN46 humano de Serotec (Oxford, UK) y el anticuerpo ATP6J frente a la subunidad G de la H⁺-ATPasa vacuolar de Abcam (Cambridge, UK). Los anticuerpos policlonales frente al AE2 y el NHE7 fueron cedidos por S. Kellokumpu (University of Oulu, Finland) y M. Numata (University of British Columbia, Canada) respectivamente. Los anticuerpos monoclonales frente a la giantina, TGN38 y MAP4 fueron proporcionados por H.P. Hauri (Biozentrum, Basel University), George Banting (University Walk, Bristol) y J. Avila (CSIC-UAM, Madrid) respectivamente. Los anticuerpos policlonales frente N-WASP, espectrina y lamp-2 fueron proporcionados por M. Way (MRC, London), J.S. Morrow (University of Yale) y M. Fukuda (La Jolla, CA, USA) respectivamente. Los anticuerpos policlonales frente a la β y γ -actina, manosidasa II, y el KDELr por C. Chaponnier (University of Genova), Kelly Moremen (University of Georgia) y H-D Söling (University of Göttingen) respectivamente. Los anticuerpos monoclonales frente a proteínas poliubicitinadas (clon FK2) son de Affiniti (Exeter, Devon, UK) y aquellos que reconocen la subunidad α -C9 del proteasoma 20S fueron cedidos por E. Knecht (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia). Los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 546 fragmentos F(ab')₂ cabra anti-conejo IgG, Alexa Fluor 546 burro anti-oveja IgG y Alexa Fluor 647 cabra anti-ratón son de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) y los anticuerpos secundarios cabra anti-conejo-Cy2 IgG o anti-pollo-Cy2 IgY de Jackson ImmunoResearch (West Baltimore, PA, USA).

4. Plásmidos y transfecciones

El cDNA que codifica para la actina fusionada a la proteína YFP, YFP-actina se obtuvo de Clontech (Germany). Los cDNAs que codifican la región N-terminal de la β 1,4-Galactosil transferasa (GT) humana fusionada a las proteínas fluorescentes verde (GFP), azul (CFP) y amarilla (YFP), GFP-GT, CFP-GT y YFP-GT respectivamente fueron cedidos por J. Llopis (Universidad Castilla la Mancha, Albacete). Los cDNA de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) salvaje con destino basolateral y el mutante con destino apical fusionados con la proteína fluorescente GFP (GFP-VSV-G) así como el CFP-VSV fueron proporcionados por Kai Simons (Max Planck institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany). El GFP-p75NTR y el YFP-GPI fueron cedidos por Roman Polishchuk (CMNS, Chieti, Italy). El plásmido que codifica para el marcador de autofagosomas LC3 fusionado a GFP, pEGFP-LC3 fue cedido por T. Yoshimori y N.

Mizushima (National Institute of Genetics, Mishima, Japan). El plásmido que codifica para la huntingtina mutada htt^m fusionado al GFP, GFP- htt^m fue proporcionado por J. Alberch (Universidad de Barcelona). Las transfecciones se realizaron utilizando los *kits* de transfección Effectine (Quiagen) y FuGene6 (Roche Diagnostics) en células creciendo sobre cubreobjetos a una densidad de 2×10^6 células/ml con tiempos de expresión de 4-48 h para el GFP- htt^m y de 16-48 h para el resto de los plásmidos.

5. Inmunofluorescencia

Las inmunofluorescencias indirectas se realizaron en células sembradas sobre cubreobjetos al 50-90% de confluencia. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% disuelto en PBS (pH 7.4) durante 15 min o alternativamente en metanol a -20 °C durante 2 s, tras lo cual se lavaron con PBS (3x5 min) y se incubaron con NH_4Cl (50 mM) en PBS durante 30 min para eliminar la autofluorescencia. Seguidamente las células son sometidas a una solución permeabilizante conteniendo PBS, 1% de albúmina sérica bovina (BSA) como agente bloqueante y 0.05% de saponina como agente permeabilizante, durante 10 min. A continuación las células se incubaron con el anticuerpo primario de interés entre 30-60 min a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C, tras ello se lavaron las células con PBS (3x5 min). La detección de los anticuerpo primarios se realizó con anticuerpos secundarios conjugados con distintos fluoróforos diluidos a la concentración adecuada en PBS conteniendo 1% BSA y 0.05% de saponina incubándose durante 30-45 min a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron los cubreobjetos con PBS (3x5 min) y se montaron en Mowiol. Las muestras se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 (Tokyo, Japan) equipado con una cámara digital Orca-ER (Hamamatsu Photonics, Japan) o con un microscopio confocal Leica TCS-SL (Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz). Las imágenes captadas se procesaron con los programas Adobe Photoshop CS. (Adobe Systems, SanJose, CA), Image J 1.33. (NIH, Bethesda, MD) y IMOD 3.5.5. (Colorado, USA).

6. Microscopía electrónica de transmisión y de barrido

Las células HeLa, NRK o Vero sembradas al 80% de confluencia se procesaron para TEM. Tras un lavado rápido con tampón PIPES precalentado a 37 °C (0.1 M, pH 7.4) las células se fijaron con 1.25% glutaraldehído en tampón PIPES conteniendo sacarosa (2%) y Mg_2SO_4 (2

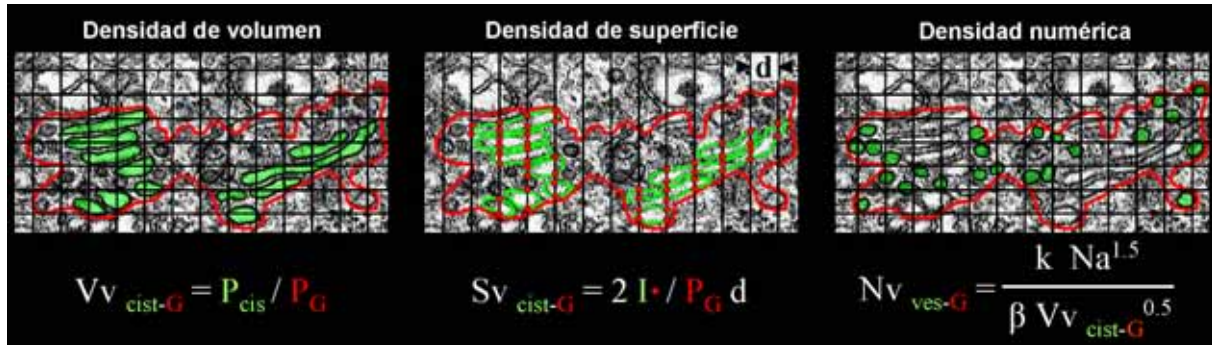
mM) 60 min a 37°C. Seguidamente las células se lavaron con tampón PIPES (3x5 min) y se levantaron suavemente de la placa de cultivo con la ayuda de un raspador o *scraper* para ser centrifugadas a 100 g durante 5 min. A continuación las células fueron post fijadas en 1 % OsO₄, 1 % K₃Fe(CN)₆ con tampón PIPES 1 h a temperatura ambiente en oscuridad tras lo cual se lavaron en PIPES (3x5 min) y se incubaron con 0.1 % ácido tánico en tampón PIPES 5 min para aumentar su contraste. Tras el lavado con PIPES (3x5 min) las células son deshidratadas con soluciones crecientes de etanol (80 %, 90 %, 95 % y 3x100%) y finalmente incluidas en resina Epon EMbed-812 polimerizando a 60°C durante 48 h. Las secciones ultrafinas 40-60 nm se contrastaron con acetato de uranilo durante 30 min y citrato de plomo 10 min. La observación de las secciones ultrafinas se realizó en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 operando a 80-90 kV equipado con una cámara digital modelo Gatan BioScan 792 y el programa DigitalMicrograph 3.11.0 (Gatan, Inc., Pleasanton,. CA, USA) para la captación de imágenes.

Las células HeLa, NRK o Vero procesadas para microscopia electrónica de barrido se lavaron rápidamente en tampón cacodilato a 37°C (0.1 M, pH 7.4) y fijaron con 2.5% glutaraldehído en tampón cacodilato 60 min a 37°C. Tras el lavado de las células con tampón cacodilato se contrastaron con 0.1 % ácido tánico en tampón cacodilato 5 min. A continuación las células se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol (80 %, 90 %, 95 % y 3x100 %) se secaron por punto crítico con el sistema Polaron CPD 7501 y fueron cubiertas con oro con por el sistema Bio-Rad SC510 *sputter coater*. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2300. Los reactivos y utensilios utilizados en los experimentos de microscopía electrónica se obtuvieron de Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA).

7. Análisis estereológico

El estudio estereológico de las alteraciones fenotípicas observadas en los dictiosomas del AG inducidas por las toxinas de actina se realizó manualmente mediante la técnica de conteo de puntos con una plantilla cuadrículada superpuesta aleatoriamente sobre las micrografías obtenidas en el microscopio electrónico a 50 y 60 x10³ aumentos. El tamaño mínimo de la muestra para el análisis estereológico se determinó mediante la técnica de la media progresiva (con límite de confianza del 95 %). Los parámetros estereológicos analizados son la densidad el volumen de las cisternas respecto al volumen del dictiosoma analizado $V_{V_{cist-G}}$ la densidad

de superficie de las cisternas respecto a la superficie del dictiosoma analizado Sv_{cist-G} y la densidad numérica de número de perfiles túbulo-vesiculares peri-Golgi Nv_{ves-G} . El cálculo de estos parámetros se representa en la siguiente figura:



En el cálculo de la Vv_{cist-G} , P_{cis} corresponde a los puntos de la cuadrícula encontrados el interior de las cisternas y P_G los puntos de la cuadrícula encontrados el interior del área delimitada como dictiosoma del AG. En el cálculo de la Sv_{cist-G} , $I \cdot$ corresponde al número de intersecciones de las membranas de las cisternas del dictiosoma del AG con la plantilla y d en μm es la distancia entre líneas respecto a la estructura analizada calculada como la distancia correspondiente a la cuadrícula entre el número de aumentos de la micrografía. En el cálculo de la Nv_{ves-G} , k es una constante con valor 1.5 y β es una constante de forma que en el caso de una esfera corresponde a 1.328. Na es el área del dictiosoma del AG analizado calculándose como P_G por la distancia d^2 . Por último Vv_{ves-G} corresponde a los puntos de la cuadrícula encontrados el interior de los perfiles túbulo-vesiculares entre P_G . Los valores obtenidos para los distintos parámetros se analizaron estadísticamente mediante análisis t -test para muestras independientes con el programa SPSS 12.0. (Chicago, USA).

8. Tomografía electrónica y reconstrucción 3D

Las células HeLa procesadas para TTEM son químicamente fijadas con la mezcla 2% glutaraldehído-1% formaldehído en 0.1 M tampón cacodilato (pH 7.4) y procesadas según el procedimiento descrito para TEM. Las secciones seriadas obtenidas de 250 nm se recogieron en rejillas de cobre de ojal recubiertas con una película de *butvar* en las que previamente se evaporó carbono para darle estabilidad a las muestras frente al haz de electrones. Las secciones se incubaron con oro coloidal de 10 nm el cual sirve para el enfoque y alineamiento de la muestra durante la toma de imágenes. Se realizaron dos series ortogonales de imágenes a distintos ángulos de inclinación o *tilt series* con un microscopio electrónico Tecnai20

(FEI/Philips, Eindhoven, Holanda) operando a 200 kV equipado con una cámara TemCAM F214 (TVIPS, GMBH, Alemania) y un goniómetro motorizado. Las imágenes se tomaron desde -65° a $+65^\circ$ con incrementos de 1° . Mediante el programa IMOD 3.5.5. (Colorado, USA) se realizó la construcción de sendos tomogramas ortogonales a partir de la proyección inversa o *backprojection* de las series obtenidas a distintos ángulos y finalmente se realizó el modelado 3D de los dictiosomas del AG a partir de la fusión de sendos tomogramas.

9. Medidas del pH citoplasmático y del aparato de Golgi

Las células HeLa co-transfectadas con GT-EGFP/GT-ECFP o GT-EYFP/GT-ECFP tras 24 h se trataron con la toxina de actina correspondiente o con los inhibidores específicos de la H^+ -ATPasa vacuolar Baf o Con a 37°C . A continuación se lavaron rápidamente con medio HBSS suplementado con 24 mM NaHCO_3 , 50 mM HEPES y 10 mM glucosa (pH 7.2) a temperatura ambiente y se mantuvieron en este medio bajo un flujo continuo de 5% CO_2 . Una vez en el microscopio invertido se seleccionaron los AG de interés, se delimitaron sus áreas mediante ROIs o *regions of interest* y se midió la intensidad de ratiofluorescencia asociada al AG entre GT-EGFP/GT-ECFP o GT-EYFP/GT-ECFP. Inmediatamente después las células fueron incubadas con tres tampones de calibración con pH conocido (en el rango de pH 6.0-7.4) resultantes de la mezcla de dos soluciones (A y B) que contienen 70 mM NaCl, 70 mM KCl, 1.5 mM K_2HPO_4 , 1 mM MgSO_4 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM nigericina, 10 mM monensina y 10 mM HEPES (Solución A; pH 8.0) o 10 mM MES (Solución B; pH 5.0). Estas soluciones debido a la presencia de los ionóforos nigericina y monensina imponen a las células y compartimentos intracelulares el pH extracelular. Las tres soluciones establecen una recta de regresión lineal a partir de la cual se extrapola el valor inicial del pH_G . Para la estimación del pH citoplasmático (pH_C) se incubaron las células con 5 μM BCECF-AM 15 min a 37°C realizándose la correspondiente medida de la ratiofluorescencia de esta molécula. Las medidas del pH_G y pH_C se obtuvieron con el programa Aquacosmos 2.5 (Hamamatsu Photonics, Japón) a partir de la intensidad de fluorescencia observada en las imágenes captadas *in vivo* con una cámara Orca-ER acoplada a un microscopio invertido de epifluorescencia Leica DM-IRB. Los filtros de excitación y emisión (Omega Optical, Brattleboro, VT y Chroma Technology Corp. Rockingham, VT) usados fueron respectivamente 430 ± 12.5 nm y 470 ± 17.5 nm para el ECFP y 495 ± 10 nm 535 ± 15 nm para el GT-EGFP y GT-EYFP. En el caso del BCECF, la excitación se realizó a 495 ± 10 nm (zona de sensibilidad a pH para esta molécula) y 430 ± 12.5 nm (zona insensible a pH),

recogiéndose la emisión a 535 ± 15 nm. La significación estadística de los valores de ratiofluorescencia en los distintos tratamientos respecto al control se evaluó mediante análisis *t*-test para muestras independientes en el programa SPSS 12.0.

10. Análisis FRAP y FRAP inverso

En los experimentos de FRAP, las células Vero transfectadas con YFP-actina se trataron con Jpk para generar agresomas de actina filamentosa. A continuación las células se montaron en la cámara del microscopio y se mantuvieron a 37°C con una atmósfera saturada de agua y 5% de CO₂. Para la visualización del YFP se usó el láser con la línea de excitación a 488 nm y un rango de detección de emisión entre 500-600 nm. Se usaron los mismos parámetros y ROI o área sometida a FRAP en células sin tratar (área en el citoplasma) o tratadas con el Jpk (área del FAG) realizando 40 escaneados a intensidad máxima del láser. La recuperación de la fluorescencia en el área fotoblanqueada se detectó cada 0.5 s las primeras 30 imágenes y el resto cada 5 s hasta los 5 min. En los experimentos de FRAP inverso las células Vero se transfectaron con el plásmido correspondiente. Para sincronizar el tráfico del cargo en el TGN se incubaron a 19.5°C durante 2 h en presencia de cicloheximida (100 µl/ml). A continuación las células fueron tratadas con LtB o Jpk en las mismas condiciones, tras esto las células fueron montadas en la cámara del microscopio y mantenidas a 32°C con una atmósfera saturada de agua y 5% de CO₂. Para la visualización del GFP/YFP se usó el láser con la línea de excitación a 488 nm, con rango de detección de emisión entre 500-600 nm. Todo el citoplasma excepto el área del AG se fotoblanqueó realizando 40 escaneados a intensidad máxima del láser. Las imágenes tras el fotoblanqueo fueron registradas cada 0.5 s durante 15 min. Los experimentos de FRAP y FRAP inverso se realizaron en un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania) equipado con una cámara de incubación de células con control de temperatura y niveles de CO₂.

En la cuantificación de los resultados de los experimentos de FRAP inverso se restó la fluorescencia del fondo a todos los valores obtenidos los cuales fueron corregidos y normalizados utilizando la ecuación descrita a continuación. Para cada registro de fluorescencia tras el fotoblanqueo la pérdida relativa de fluorescencia (I_{rel}) en el área del AG se calculó según $I_{rel} = (I_t/I_0) (T_{mean}/T_t)$, donde I_t es la media de la intensidad de fluorescencia en la región no fotoblanqueada a tiempo t , I_0 es la media de la intensidad de fluorescencia en la región de interés previa al fotoblanqueo y T_{mean} , T_t corresponden al promedio de la intensidad

de fluorescencia de toda la célula durante el proceso completo de registro tras el fotoblanqueo o bien al promedio de la intensidad de fluorescencia de toda la célula a tiempo t . La fracción móvil (MF) que refleja la recuperación de fluorescencia en la zona fotoblanqueada del citoplasma se calculó como $MF = (F_{pre} - F_{end})/F_{pre}$, donde F_{pre} es la intensidad de fluorescencia inicial previa al fotoblanqueo y F_{end} la intensidad de fluorescencia tras el proceso completo de registro tras el fotoblanqueo. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis ANOVA y test Bonferroni utilizando el programa Graphpad Prism 3.0. (Graphpad Software, San Diego, CA).

11. Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se valoró mediante el ensayo MTT de reducción del metiltiazol tetrazolio (MTT) (el cual es indicativo de la correcta actividad mitocondrial) o el método de exclusión del azul tripán. Los niveles de MTT de las células control y tratadas con Jpk se detectaron espectrofotométricamente a 550 nm y los resultados se expresan como el porcentaje de células viables normalizado respecto al control. En el método de la exclusión del azul tripán se realizó el recuento de células teñidas por este colorante (no viables) respecto a las células totales. La significación estadística se evaluó mediante análisis t -test para muestras independientes en el programa SPSS 12.0.

12. Fraccionamiento subcelular por gradiente de sacarosa

Las células Vero conteniendo el FAG lavadas con PBS se levantaron de la placa de cultivo con la ayuda de un raspador. Seguidamente se centrifugaron a 300 g durante 5 min a 4 °C y se homogeneizaron mecánicamente en tampón A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 conteniendo 150 mM NaCl, 100 mM ortovanadato sódico, 10 mM fluoruro sódico y 10 μ M leupeptina, 1 μ g/mL pepstatina y 2 mM fenilmetilsulfonil fluoruro). El homogenado se centrifugó a 10.000 g y el *pellet* se resuspendió en el tampón A conteniendo sacarosa al 2.5 M. A continuación el *pellet* se sometió a un gradiente discontinuo de sacarosa obtenido con volúmenes equivalentes de tampón A conteniendo sacarosa a concentraciones decrecientes desde la base 35, 30, 25, 20, 15, 10 y 5% en la parte superior. El gradiente discontinuo de sacarosa se centrifugó a 130.000 g durante 16 h a 4°C en un rotor SW55-Ti. A continuación 10 fracciones se recogieron desde la parte superior del gradiente (#1) a la parte inferior (#10). La captura de los FAG en las distintas fracciones se detectó mediante la tinción con faloidina-TRITC. Los

componentes del citoesqueleto seleccionados y proteínas asociadas se separaron por electroforesis SDS-PAGE y posteriormente se detectaron por *western blot*.

13. Electroforesis y *western blot*

Para la detección de proteínas en primer lugar se realizó una cuantificación de la cantidad de proteína total de los lisados u homogenizados de las muestras mediante el método *Bradford*. Seguidamente se añadió a las muestras tampón de carga (Tris 125 mM, SDS 4%, glicerol 20%, 2 β mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.01% pH 6.8) y se hirvieron a 100°C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas. Las muestras se cargan (con igual cantidad de proteína total) en un gel de poliacrilamida y las proteínas se separan por electroforesis SDS-PAGE tras lo cual se transfieren electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con TBS-Tween-20 0.1% (vol/vol) (TBST)-5% leche liofilizada desnatada durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios son incubados en TBS-1.5% BSA 2 h a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4°C y los anticuerpos secundarios conjugados con HRP son incubados en TBST-5% leche liofilizada desnatada durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente las bandas de proteínas se detectaron empleando el *kit* de detección proteica Supersignal (Pierce, Rockford, IL). El análisis densitométrico de las bandas detectadas se realizó mediante el programa Image J 1.33.

14. Cuantificación de los niveles de F-actina

Para cuantificar los niveles de F-actina las células control o tratadas con LtB cultivadas en placas de 10 cm de diámetro a una confluencia del 90% se lisaron con volúmenes iguales de tampón LAS a 37°C (50 mM PIPES pH 6.9, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 5% (v/v) Glicerol, 0.1 % Nonidet P40, 0.1 % Triton X-100, 0.1 % Tween 20, 0.1% 2-mercaptoetanol) en presencia de inhibidores de proteasas y 250 nM faloidina-TRITC que estabiliza la F-actina de las células. Los lisados se homogeneizan con una aguja de jeringa 25G y se centrifugan a 1.000 g 10 min a temperatura ambiente para eliminar restos celulares. Los sobrenadantes se ultracentrifugan a 100.000 g 1 h a temperatura ambiente, el *pellet* resultante corresponde a la fracción enriquecida en F-actina el cual se resuspende y homogeneiza completamente con la ayuda de una aguja de jeringa 25G en tampón LAS a 4°C en un volumen igual al volumen del sobrenadante resultante de la ultracentrifugación que

contendrá la fracción enriquecida en G-actina. Tras esto se carga un gel SDS-PAGE con volúmenes equivalentes de la fracción F o G-actina de las muestras control o tratadas con LtB y se revela por *immunoblot*. Finalmente se establece el ratio entre la F/G-actina mediante la densitometría de las bandas detectadas mediante el programa Image J 1.33. Alternativamente se estimó la cantidad de F-actina contenida en la muestras mediante espectrofluorimetría. En primer lugar se cuantificó la cantidad de proteína total contenida en lisado inicial mediante el *kit* de de detección proteica Precision Red (Ctoskeleton inc. Denver. USA). Por otro lado se estimó la intensidad de fluorescencia contenida en el *pellet* resuspendido obtenido tras la ultracentrifugación a 100.000 g descrito previamente mediante un espectrofluorímetro SAFAS flx-Xenius (Monaco, Francia) bajo condiciones de longitud de onda de excitación 541 nm y emisión 572 nm a un voltaje de 600 V. El porcentaje de fluorescencia relativo obtenido se normalizó respecto a la cantidad de proteína total del lisado inicial. La significación estadística se evaluó mediante análisis *t*-test para muestras independientes en el programa SPSS 12.0.

15. Actividad proteasomal

Para determinar la actividad tipo quimi tripsina de los proteasomas en primer lugar las células Vero conteniendo el FAG o no, se lisaron en tampón de lisis (50 mM Tris, 20 mM KCl, 0.5 mM MgOAc, 1 mM DTT pH 7.8 a 4°C) en presencia de inhibidores de proteasas. El lisado rápidamente se congela en nitrógeno líquido y se homogeneiza físicamente mediante cinco ciclos de congelación y sucesiva descongelación a 37°C. El homogenado se centrifuga a 10.000 g durante 5 min a 4°C. Los sobrenadantes resultantes se incuban con 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 50 µM of N-Suc-LLVY-MCA con o sin 10 µM lactacistina. La actividad del proteasoma en la muestra frente al péptido fluorogénico se determinó monitorizando en el tiempo la fluorescencia emitida a 460 nm bajo excitación 355 nm por la liberación del MCA, α -4-metil-coumaril-7-amida mediante un espectrofluorímetro VICTOR (Wallac/Victor 1420 Multilabel HTS Counter, Perkin Elmer, Life Sciences). Los registros de fluorescencia emitida se realizaron cada 5 min a 37 °C bajo las condiciones en las que existe una relación lineal entre el producto generado reflejado por un incremento en la fluorescencia a 460 y el tiempo. La significación estadística se evaluó mediante análisis *t*-test para muestras independientes en el programa SPSS 12.0.