

Estudio de la posible participación de IQGAP1 en los efectos del potencial de membrana plasmática sobre el citoesqueleto de actina en epitelios en cultivo.

Cecilia Benech

Licenciatura en Bioquímica

Departamento de Bioquímica,

Facultad de Medicina, UdelaR, 2012

Orientador: Dra. Silvia Chifflet

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a Silvia por haberme aceptado como pasante en su laboratorio, por transmitirme sus conocimientos y experiencia con gran entusiasmo y sobre todo por su gran dedicación como orientadora de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Frances, Cristian, Federico, Lucía y Sebastián. ¡Gracias por los tan agradables momentos que compartimos y por su buena disposición a colaborar conmigo en este trabajo!

Al Dr. Bloom, quien amablemente nos proporcionó el anticuerpo anti IQGAP1.

Al Depto. de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina por haberme permitido utilizar su microscopio sin el cual no hubiera podido realizar este trabajo.

Al frigorífico Las Piedras, que nos brindó las aortas y córneas necesarias para el desarrollo de este trabajo.

Al tribunal por haber aceptado corregir la presente tesis.

Índice

Agradecimientos.....	2
Índice.....	3
1) Introducción.....	4
2) Epitelios	5
3) Uniones Celulares.....	9
4) IQGAP1.....	18
5) Potencial de Membrana Plasmática.....	33
6) Antecedentes Inmediatos.....	35
Objetivos	37
Materiales y métodos	38
Resultados	43
Bibliografía	66

1) Introducción

La proteína IQGAP1 se encuentra vinculada a diversas vías de señalización celular y se ha identificado que posee un rol fundamental en varias funciones tales como: la migración, la motilidad, la formación de las uniones celulares durante el desarrollo embrionario y la modulación del citoesqueleto, entre otras (Brown and Sacks, 2006); (White et al., 2012).

Las primeras observaciones que revelaron que IQGAP1 posee la capacidad de regular el citoesqueleto surgieron a partir de estudios realizados por Bloom y colaboradores, quienes copurificaron IQGAPs de fracciones de actina-F citosólica (Bashour et al., 1997). Estudios posteriores mostraron que IQGAP1 se vincula tanto a los microtúbulos (Briggs and Sacks, 2003); (Brandt and Grosse, 2007) como a los filamentos de actina (Mondal et al., 2010). A estos últimos se une de manera directa en estructuras tales como lamelipodios, “membrane ruffles” y uniones celulares, o indirectamente a través de las proteínas Cdc42 y Rac1 (Mateer et al., 2003); (Mataraza et al., 2007).

El objetivo planteado para este trabajo fue el de presentar evidencias experimentales acerca de la posible vinculación de IQGAP1 en la remodelación del citoesqueleto de actina frente a modificaciones inespecíficas en potencial de membrana. Estudios efectuados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que los cambios de potencial de membrana traen acarreados una reorganización del citoesqueleto de actina en epitelios. Como requisito para que ocurran dichos efectos, fue establecido que el epitelio debe encontrarse confluyente y con sus uniones bien ensambladas (Chifflet et al., 2003); (Chifflet et al., 2004); (Nin et al., 2009).

2) Epitelios

Características Generales

Los epitelios en organismos vertebrados son tejidos formados por células estrechamente adheridas entre sí (Fawcett et al., 1995) las cuales constituyen la mayoría de los órganos de los mamíferos (McCaffrey and Macara, 2011). Se organizan formando uno o varios estratos que descansan sobre una capa de matriz extracelular denominada lámina basal (ibid). Los epitelios cumplen funciones de protección contra agresiones mecánicas, químicas y biológicas y desempeñan un papel importante en el transporte selectivo de agua y solutos (Guyton et al., 2006). Algunos tejidos epiteliales como la epidermis y el epitelio de la córnea limitan con el medio externo, mientras que otros tapizan los órganos huecos (como los que conforman el tubo digestivo y el aparato respiratorio) que limitan el medio interno (Guyton et al., 2006). A su vez, existen epitelios especializados en el transporte y la secreción que constituyen órganos como el hígado, el riñón y el páncreas.

En mamíferos, la presencia de tejido epitelial se observa desde muy temprano en el desarrollo. Durante el estadio de blastocisto ocurre la primer diferenciación celular; proceso de crucial importancia para la implantación del embrión en el útero. Por un lado, se manifiesta un pequeño grupo de células que forman el macizo celular interno (MCI), las cuales darán origen a todas las capas celulares embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) durante el proceso de gastrulación. Por otro lado, rodeando al MCI y a la cavidad denominada blastocelle, aparece una monocapa de células epiteliales denominada trofoectodermo que será el precursor de la placenta (Gilbert, 2006). Asimismo, el tejido epitelial se observa durante la gastrulación en la formación del ectodermo y el endodermo así como también en el momento en el que se forman estructuras epiteliales transitorias como el tubo neural y los somites, posterior a dicho estadio (Gilbert, 2006). Tanto las células epiteliales como las mesenquimáticas constituyen dos de los más abundantes tipos celulares presentes en mamíferos y la conversión entre el epitelio y el mesénquima ocurre desde las primeras etapas del desarrollo embrionario (Larue et al., 2005). Un ejemplo de esto sucede en el proceso de neurulación, en el cual las células de la cresta neural pierden su

distribución polarizada de fenotipo epitelial y sufren una transición a células mesenquimáticas (Gilbert, 2006).

Polaridad celular

Cuando la célula epitelial se encuentra completamente diferenciada presenta un fenotipo caracterizado por su polaridad morfológica y funcional (Nelson, 2003), lo que permite que el tejido posea un funcionamiento correcto. El fenotipo epitelial es generado en un proceso de varias etapas y es necesario que el tejido haya adquirido ciertas propiedades. Por un lado, se requiere la formación de uniones célula- célula tales como las uniones estrechas, las uniones adherentes y los desmosomas (Alberts et al., 1996; Miyoshi and Takai, 2005); (Lajoie et al., 2009). Por otra parte, son necesarias las uniones célula-matriz que anclen el epitelio a la lámina basal, como los contactos focales, integrinas y hemidesmosomas (Mellman and Nelson, 2008); (Deborde et al., 2008). Además, en un tejido epitelial diferenciado, es posible encontrar a los citoplasmas de las células vecinas acoplados a través de uniones comunicantes o gap, que permiten el pasaje de iones y pequeñas moléculas entre las células (Alberts et al., 1996).

Por lo tanto, una célula epitelial típica se caracteriza por presentar contactos célula-célula especializados y una distribución polarizada del citoesqueleto, los organelos celulares, los sistemas de transporte y las proteínas de la membrana plasmática, las cuales se reorganizan para generar los diferentes dominios de membrana (Giepmans and van Ijzendoorn, 2009; Tanos and Rodriguez-Boulan, 2008). El dominio apical, por un lado, limita con la luz de las cavidades y ocasionalmente presenta especializaciones como las microvellosidades y el basolateral, se encuentra en contacto con la lámina basal y las células epiteliales que la rodean (Kreitzer et al., 2003). Asimismo, ha sido descrito que los filamentos de actina se distribuyen en haces periféricos asociados a las uniones adherentes, mientras que los microtúbulos se ubican paralelos a la membrana lateral con su extremo “menos” hacia la membrana apical y su extremo “más” hacia la membrana basal (Ivanov et al., 2006).

Un evento clave en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular es la asignación de rutas de transporte polarizadas de ciertos lípidos y proteínas (Martin-Belmonte and Mostov, 2008); (Jaulin et al., 2007), para provocar una segregación heterogénea característica de dichos

compuestos en la membrana plasmática (Martin-Belmonte and Mostov, 2008); (Mellman and Nelson, 2008); (Deborde et al., 2008). En el caso de las proteínas recién sintetizadas, las mismas son clasificadas en la trama trans Golgi según secuencias específicas de señal y son agregadas en vesículas distintas para su transporte hasta la región de superficie adecuada con la que se fusionan (YEAMAN et al., 1999).

Algunos estudios indican que la identidad de la superficie apical está determinada por el fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato mientras que el fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato está vinculado con la superficie basolateral (Martin-Belmonte and Mostov, 2008). En apoyo a este concepto, fue demostrado que, en células MDCK, al incorporar fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato a la superficie apical la misma sufría un cambio de “identidad”, convirtiéndose en basolateral (ibid). Por otro lado, en experimentos de seguimiento *in vivo*, realizados por Kreitzer y colaboradores, utilizando proteínas apicales y basolaterales marcadas con GFP (green fluorescent protein), se demostró que en células MDCK subconfluentes y no polarizadas las vesículas de transporte apicales y basolaterales se fusionan al azar con la membrana plasmática debido a la distribución no polarizada de la sintaxina 3 y 4 (Kreitzer et al., 2003). Por el contrario, en las células MDCK que se encuentran polarizadas existe una reorganización de las vías de transporte vesicular. Las vesículas apicales se fusionan con el dominio apical dado que allí se localiza la sintaxina 3, mientras que las vesículas basolaterales se fusionan con el dominio basolateral guiado por la sintaxina 4 (Tanos and Rodriguez-Boulan, 2008).

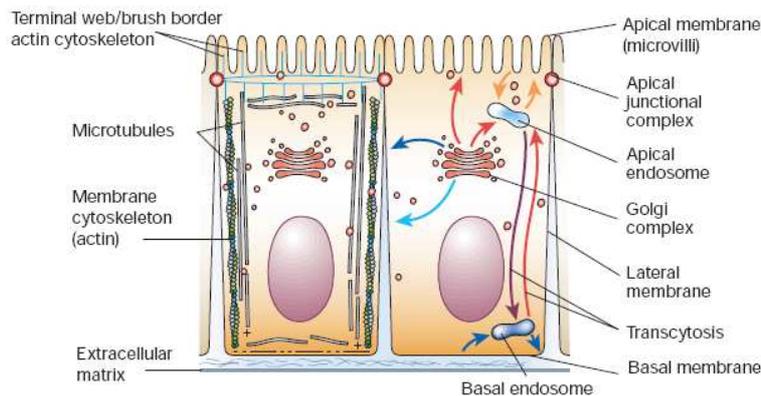


Figura 1: Representación esquemática de la organización subcelular de un epitelio monoestratificado. A la izquierda se esquematiza la organización del citoesqueleto de actina y los microtubulos. A la derecha pueden observarse las rutas de transporte vesicular hacia los diferentes dominios de membrana. Tomado de Nelson, 2003.

Ahora bien ¿cómo determina la célula qué porción de su membrana plasmática debe definirse como basolateral o apical? Los equipos de Rodriguez-Boulán y de Nelson obtuvieron evidencias a favor de que el primer paso en la formación de los dominios de membrana en células no polarizadas involucra la interacción celular a través de moléculas de adhesión como la E-cadherina (Rodriguez-Boulán and Nelson, 1989); (Nelson, 2003) y el complejo nectina-afadina (Takai et al., 2008a). Dicho relacionamiento temprano genera un futuro dominio basolateral en la zona de adhesión y el dominio apical en la zona que no se asocia a otras células. En consecuencia, la actina y los microtúbulos se orientan, de acuerdo a dicho patrón, mediados por las proteínas Rho, Rac1 y Cdc42. Posteriormente, la secreción de la matriz extracelular define la orientación del epitelio (Rodriguez-Boulán and Nelson, 1989); (Nelson, 2003).

Los sistemas de transporte iónicos también juegan un papel importante en la generación de los dominios de membrana, ya que poseen información intrínseca que indica en qué dominio de la bicapa deben ser insertados (Dunbar and Caplan, 2001). Mediante la generación de quimeras entre las subunidades α de las enzimas Na^+ , K^+ -ATPasa y H^+ , K^+ -ATPasa (ubicadas en el dominio basolateral y apical respectivamente), Dunbar y Caplan mostraron que el cuarto dominio transmembrana de la H^+ , K^+ -ATPasa posee la información para que esta proteína se envíe al dominio apical de la membrana plasmática. Experimentos de transfección en células LLC-PK1 con una bomba de sodio quimérica demostraron que la proteína quimérica adquiere una localización apical, perdiéndose la ubicación basolateral de esta enzima (ibid).

La pérdida del fenotipo de tejido epitelial diferenciado es un proceso que puede ser provocado por causas fisiológicas o patológicas. Durante la metástasis tumoral, el tejido epitelial migra descontroladamente (Haustein and Schumacher, 2012) en un proceso que presenta ciertas similitudes con las reiteradas transiciones, que ocurren durante el desarrollo embrionario, del fenotipo epitelial a mesenquimático (Gilbert, 2006).

3) Uniones Celulares

Las uniones celulares poseen un rol crítico durante la morfogénesis, el establecimiento y mantenimiento de la arquitectura tisular, la comunicación célula-célula, el crecimiento y diferenciación celular (Mellman and Nelson, 2008).

Las uniones estrechas u ocluyentes (UOs) y las uniones adherentes (UAs) son estructuras morfológicas características de un epitelio diferenciado, son altamente dinámicas y sufren una constante remodelación (Ivanov, 2008). Las primeras separan los dominios apical y basolateral y las segundas están involucradas en la unión de los dominios laterales de los epitelios. Tanto las UAs, las UOs y los desmosomas son considerados complejos macromoleculares que integran procesos de señalización provocando cambios en la organización y la dinámica del citoesqueleto (Braga, 2002). Las estructuras de adhesión se encuentran asociadas tanto a los filamentos intermedios como a los filamentos de actina, dependiendo del tipo de unión (Braga, 2002).

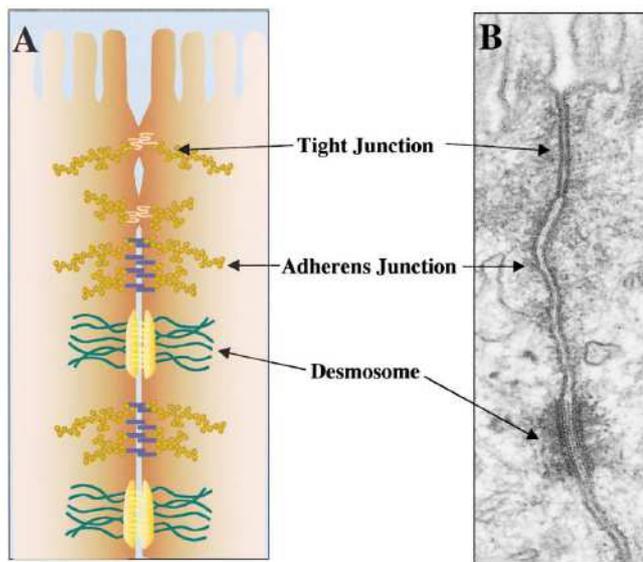


Figura 2: Composición del complejo de unión de las células epiteliales. Desde el dominio apical al basal se encuentran: las uniones ocluyentes (UOs), las uniones adherentes (UAs) y los desmosomas. En A se esquematiza el complejo de unión. En B se observa una micrografía electrónica de transmisión equivalente al esquema A. Tomado de Perez-Moreno, 2003.

Uniones Adherentes

Las UAs se encuentran íntimamente relacionadas con el citoesqueleto de actina (Braga, 2002) y con las IQGAPs, motivo por el cual en este trabajo nos centraremos en estas estructuras de adhesión. En los tejidos epiteliales, la zona donde se localizan las UAs se denomina *zonula adherens* y la actina-F se presenta como una banda continua paralela a la membrana plasmática (Ivanov, 2008). Estas estructuras fueron inicialmente identificadas mediante un análisis ultraestructural y se visualizan como placas electrón-densas enfrentadas y asociadas a la membrana plasmática de células adyacentes (Perez-Moreno et al., 2003) existiendo un espacio de entre 15 y 20 nm entre ellas (Miyoshi and Takai, 2005). Las UAs se localizan por debajo de las UOs y se extienden a lo largo del perímetro celular y al completarse su conformación se ven estabilizadas las uniones célula-célula y la transmisión de señales del medio extracelular al interior celular (Perez-Moreno et al., 2003). Las principales proteínas que conforman las UAs se unen directa e indirectamente a varias proteínas citoplasmáticas y pertenecen a la familia de las cadherinas, siendo la E-cadherina la más destacada (Hartsock and Nelson, 2008).

Estas uniones son de crucial importancia debido a que su ensamblaje trae acarreado una cascada de señalizaciones que conlleva a la formación y al mantenimiento del fenotipo polarizado (Miyoshi and Takai, 2005), al reconocimiento célula-célula, la adhesión, la morfogénesis y la integridad tisular (Yonemura, 2011). Existen tres miembros de la subfamilia Rho GTPasa implicadas en la regulación de las uniones adherentes; Rho, Rac1 y Cdc42, la cual promueve la traslocación complejo PAR/aPKC (una proteína kinasa) a la zona apical de los sitios de unión celular luego de la estimulación mediada por Ca^{2+} . Dicho complejo está compuesto, entre otras proteínas, por la PAR6 quien es la responsable del establecimiento de la polaridad en una variedad de células y tejidos a lo largo del reino eucariota (Perez-Moreno et al., 2003; Tanos and Rodriguez-Boulan, 2008). A su vez, la proteína Cdc42 cumple una importante función en el tráfico polarizado fuera del complejo de Golgi, dado que regula la salida apical y basolateral de las proteínas (Tanos and Rodriguez-Boulan, 2008). Por otro lado, la proteína Rac1 es también reclutada y activada en el sitio de unión y promueve la formación de las UAs mediante la regulación dinámica de los filamentos de actina (ibid).

Principales proteínas que componen las UAs

- **Cadherinas**

Han sido identificados más de 80 miembros de la superfamilia de las cadherinas, las cuales se caracterizan por ser glicoproteínas transmembrana Ca^{2+} dependientes. Un ejemplo es la N-cadherina, localizada en células de endotelio de córnea bovino (BCE), así como la VE-Cadherinas que se encuentra en endotelio de aorta bovino (BAEC) (Noritake et al., 2005). Sin embargo, en este trabajo se hará hincapié en la E-cadherina por ser la más estudiada.

La expresión y función de la E-cadherina es esencial para muchos procesos, no solo durante el desarrollo embrionario sino también en la polarización celular y diferenciación epitelial, debido a su interacción con varias proteínas (Baum and Georgiou, 2011); (Brasch et al., 2012). Posee cinco dominios extracelulares a través de los cuales se observan las interacciones cadherina-cadherina que forman las UAs (Braga, 2002);(Noritake et al., 2005). Estas últimas son un prerrequisito para la formación de otras estructuras de adhesión como las UOs y desmosomas, por favorecer el acercamiento de las membranas plasmáticas de células vecinas. Asimismo, se ha establecido que los contactos cadherina-cadherina traen acarreadas rutas de señalización necesarias para promover el ensamblaje de las demás uniones (Braga, 2002). A su vez, a través del dominio citoplasmático, esta glicoproteína interacciona con las cateninas p120 y β -catenina (Hartsock and Nelson, 2008), las cuales se unen directamente a los filamentos de actina.

Por otro lado, ha sido constatado que la E-cadherina es de significativa importancia en el proceso de tumorigénesis dado que existe una correlación entre la formación de tumores y la pérdida de adhesión célula-célula (Hartsock and Nelson, 2008). Algunos estudios muestran que el 90% de los cánceres son carcinomas derivados de las células epiteliales las cuales han perdido por completo la polaridad celular. (Tanos and Rodriguez-Boulan, 2008). Asimismo, dichos carcinomas se caracterizan habitualmente por poseer un bajo nivel de expresión de E-cadherina o de las cateninas asociadas.

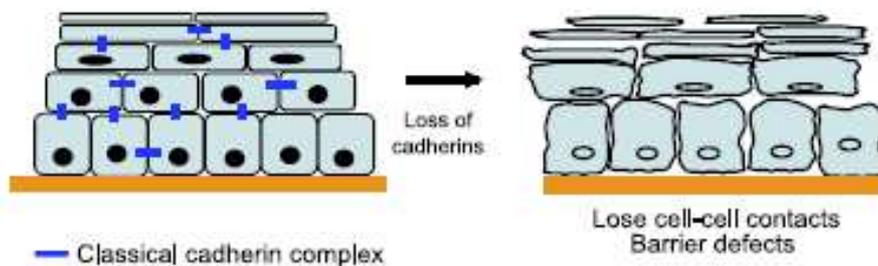


Figura 3: Rol fisiológico de las cadherinas en la integridad tisular. En un epitelio estratificado de la piel, la pérdida de las cadherinas E y P traen como resultado la pérdida de los contactos intercelulares asociados con una pérdida en la función de barrera de la epidermis. Tomado de Niessen, 2011.

- **Cateninas**

Las cateninas son una familia de proteínas que se localizan en los sitios de contacto célula-célula, tales como la *zónula adherens* o los desmosomas, así como también en el núcleo celular. Exceptuando a la α catenina, por definición las cateninas poseen un dominio armadillo central y se encuentran asociadas a las cadherinas (McCrea and Gu, 2010).

En este trabajo se hará referencia con mayor detalle a la β -catenina dado que se encuentra íntimamente relacionada con IQGAP1.

La **β -catenina** es la proteína central de la vía de señalización Wnt y juega un importante rol en la proliferación celular y en las uniones celulares; procesos que se ven desregulados durante la formación de tumores (White et al., 2009). Está compuesta de tres dominios: un dominio central, dominio armadillo, y dos extremos terminales. El extremo C-terminal interacciona con el dominio armadillo y limita la capacidad de β catenina de interaccionar con E-cadherina (McCrea and Gu, 2010).

Los niveles de β -catenina citosólicos son generalmente muy bajos debido a la rápida degradación de su exceso por parte de los proteosomas. Por tanto, es una proteína que se localiza tanto en el núcleo celular, mediando la transcripción de genes relacionados por ejemplo con la proliferación celular, o bien retenida a la membrana celular por medio de su unión a las cadherinas, con quienes forman el complejo cadherina-catenina (Hartsock and Nelson, 2008). Dicho complejo, es el

responsable de estabilizar las uniones celulares al unirse a los filamentos de actina. Por otro lado, se puso de manifiesto que IQGAP1 es una proteína que provoca la desestabilización del complejo cadherina-catenina, causando así un debilitamiento en las uniones celulares, como se comentará más adelante (ibid).

La α catenina, por su parte, es de crucial importancia para nuclear las proteínas que se unen al complejo E-cadherina/ β -catenina. Esta proteína puede unirse directamente a los filamentos de actina a través de su dominio C-terminal así como también puede hacerlo directamente a la vinculina. (Perez-Moreno et al., 2003). Estudios recientes han demostrado que la α -catenina favorece el posicionamiento de la actina-F en las UAs (Maiden and Hardin, 2011).

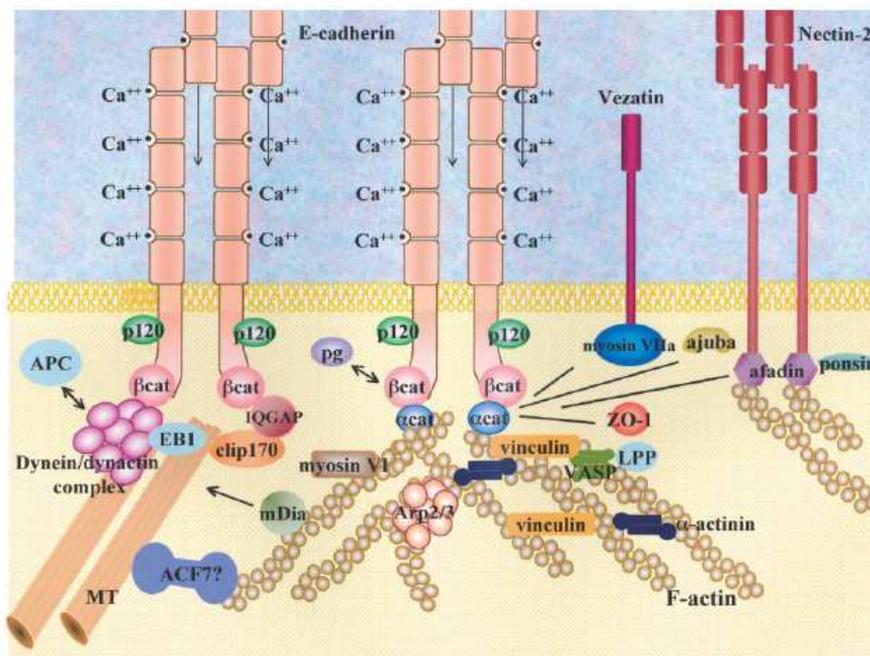


Figura 4: Esquema clásico de las interacciones proteicas en las UAs. La E-cadherina se asocia a la actina-F a través de proteínas asociadas al citoesqueleto como la β -catenina, la cual se asocia a otras proteínas como la α -catenina. A su vez, es capaz de asociarse a los microtúbulos a través de proteínas tales como la IQGAP, APC, y el complejo dyneina/dynactina. La doble flecha en el esquema está mostrando que las dos proteínas pueden competir por el mismo sitio de unión. Tomado de Perez-Moreno, 2003.

- **Complejo nectina-afadina**

Las nectinas, a diferencia de las cadherinas, son proteínas Ca^{2+} independientes y sus regiones extracelulares interactúan tanto homofílica como heterofílicamente, de manera trans con las nectinas de las células vecinas para participar en la formación de las UAs (Kurita et al., 2011; Takai et al., 2008b). Poseen una cola citoplasmática que se une a la afadina, cuya principal función es la de interactuar directamente con los filamentos de actina o con varias proteínas de unión a la actina-F. Asimismo, se ha descrito que la afadina contribuye a la asociación de las nectinas con sistemas de señalización intracelulares que favorecen la formación de las uniones. Ha sido establecido que el complejo nectina-afadina no solamente participa en la formación de las UAs, sino que también se encuentra vinculado al movimiento, la proliferación y la diferenciación celular (Takai et al., 2008a)

Tanto la nectina como la afadina se encuentran expresadas en casi todos los tejidos (embrionario o adulto) y se localizan también en algunos tejidos carentes de cadherinas, en cuyo caso las UAs son igualmente ensambladas. A pesar de ser más débiles, este tipo de UAs son de gran utilidad para el rápido remodelamiento de los tejidos así como también para la diferenciación de las células germinales en los testículos (Takai et al., 2008a ; Takai et al., 2008b).

Estudios utilizando diferentes líneas celulares mostraron que la deficiencia de afadina provoca una inhibición en la formación de las UAs. Estos resultados colocan a estas últimas en un rol protagónico en lo que refiera al establecimiento de los contactos célula-célula; sitios a los cuales es posteriormente reclutada la cadherina. Se ha establecido entonces que la nectina y la cadherina trabajan en conjunto para la formación de las UAs y se encuentran físicamente asociadas por medio de la afadina y la α -catenina (ibid).

Rol de la actina-F en los Epitelios

La actina es una proteína muy conservada a nivel evolutivo y es un componente predominante del citoesqueleto de los eucariotas (Papakonstanti and Stournaras, 2008). Posee la capacidad de polimerizar formando filamentos que son fundamentales, entre otras cosas, para que la membrana plasmática sea estable desde el punto de vista mecánico (Rodgers and Fanning, 2011).

Una de sus características más significativa es la de existir en forma monomérica (actina-G, “actina globular”) o bien como actina filamentosa o actina-F. Esta última es el resultado del ensamblaje de las diferentes subunidades de actina-G bajo ciertas condiciones citosólicas (Lee and Dominguez, 2010). La transición de un estado al otro le confiere gran flexibilidad y le permite participar en una variedad de procesos celulares. Para comprender sus diversos arreglos en la corteza celular es necesario referirse a las proteínas que se unen a la actina o ABPs, dado que poseen la capacidad de regularla (Rohn and Baum, 2010).

La actina-F se asocia a la membrana plasmática de manera indirecta tanto bajo la forma de redes como de haces (Rohn and Baum, 2010). Durante la formación del epitelio dicha proteína se reorganiza de forma dramática alterando la arquitectura y motilidad celular en un proceso regulado por las proteínas Cdc42 y Rac1 (Perez-Moreno et al., 2003). Se han descrito los siguientes pasos en la formación de las UAs en células MDCK: en primer lugar las células entran en contacto y en dichos sitios las cadherinas y cateninas comienzan a formar un conglomerado que conecta con los filamentos de actina. A su vez, la actina-F sufre un remodelamiento perdiendo su arreglo lamelipódico para formar un anillo circunferencial central (Harris and Tepass, 2010) que favorece la formación de las UAs. Dicho anillo circunferencial, encontrado en un epitelio maduro, puede formarse de varias maneras: ya sea mediante la nueva polimerización de los microfilamentos en la proximidad de las regiones donde se localizan las uniones cadherina-cateninas, o mediante una movilización de los filamentos de actina corticales preexistentes hacia los sitios de contacto célula-célula (ibid).

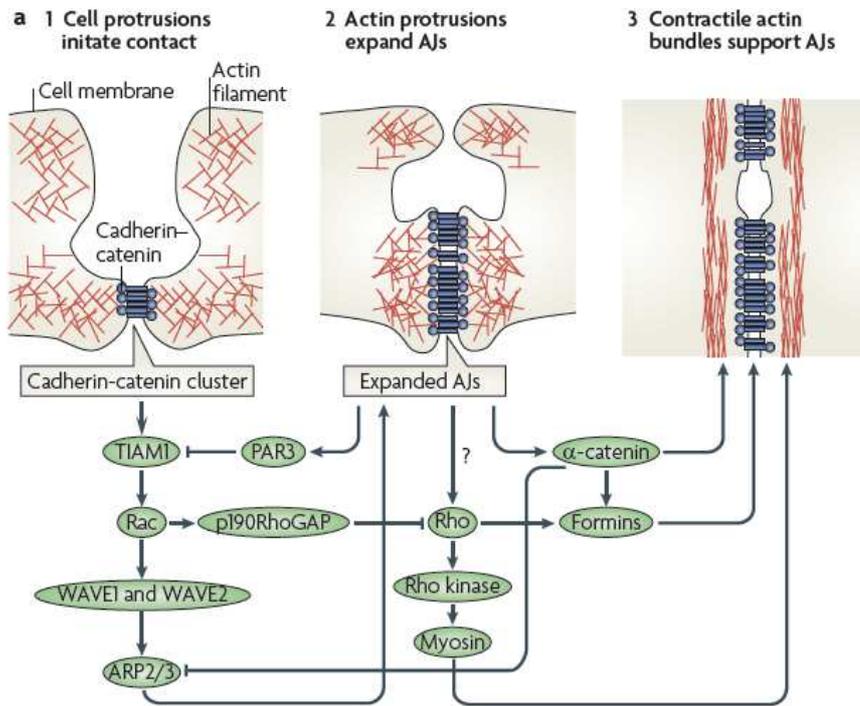


Figura 5: Proceso de ensamblaje de las UAs. Primeramente, los conglomerados de cadherina-catenina promueven la activación de Rac, la cual activa la proteína (Arp 2/3) para que se lleve a cabo la nucleación de la actina. En un segundo paso, ocurre el reclutamiento de las α -cateninas. En tercer lugar la actina se remodela para favorecer la maduración de las UAs. Tomado de Harris and Tepass, 2010.

Estudios posteriores efectuados por Takai y colaboradores establecieron la existencia de al menos cuatro pasos para la formación de las UAs. A diferencia de lo establecido por el equipo de Nelson y colaboradores (Nelson, 2003), los autores de este trabajo ponen de manifiesto que el primer paso comienza con el contacto célula-célula iniciado por el complejo nectina-afadina. En segundo lugar, ocurre una activación de Rac1 y Cdc42 por medio de proteínas de unión a la actina-F como IQGAP1. Esto es importante para el posterior reclutamiento del complejo cadherina-catenina a los sitios de unión celular. A pesar de que las cadherinas comienzan a formar complejos con las cateninas, en este momento no se observan las interacciones entre cadherinas de dos células contiguas. En tercer lugar ocurre la asociación del complejo nectina-afadina con el cadherina-catenina (dentro de la misma célula) por medio de proteínas intermedias, como puede observarse en la **Figura 6**. En este momento comienza la interacción entre las cadherinas, las cuales activan

Rac1 para así inhibir la endocitosis de las cadherinas y favorecer la estabilización de sus interacciones en las UAs (Takai et al., 2008b).

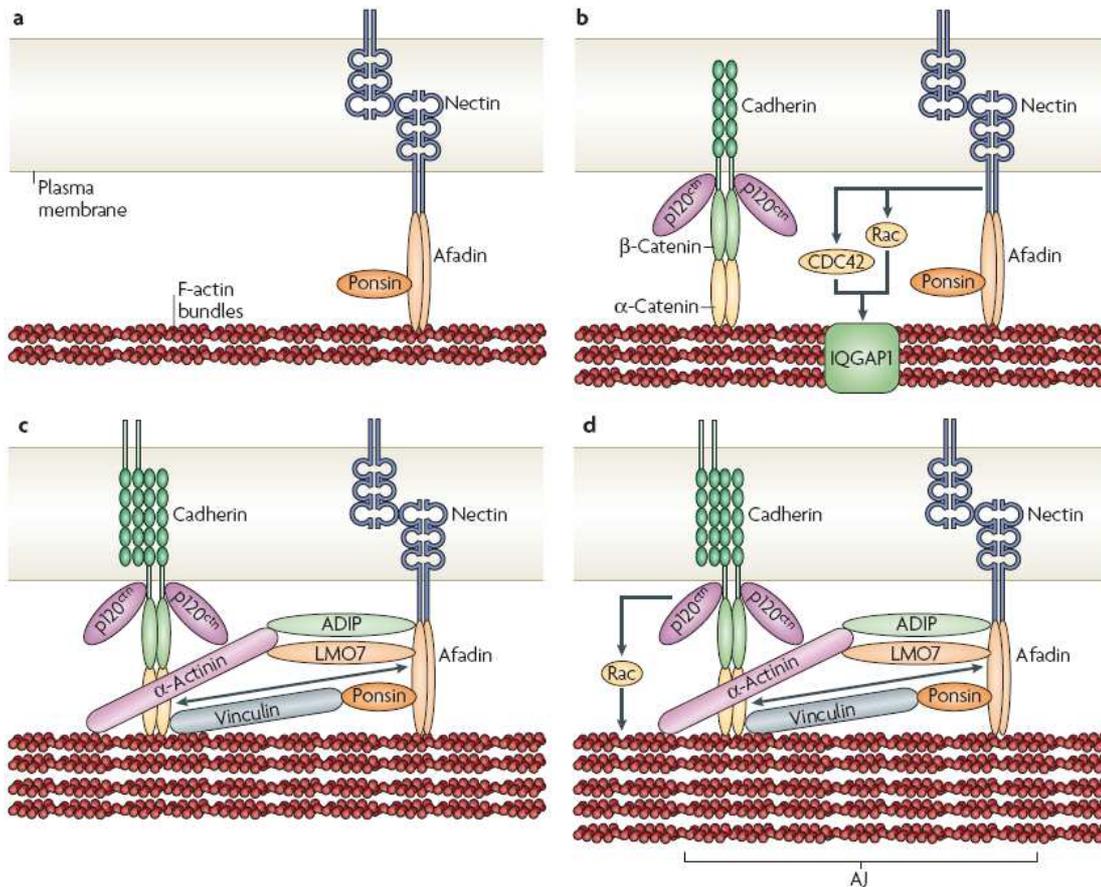


Figura 6: Secuencia de eventos en el establecimiento de las UAs. Los cuatro pasos que se visualizan aquí se detallan en el texto a continuación. De acuerdo a este modelo las nectinas son las primeras proteínas involucradas en la interacción célula célula (A). En (B) las cadherinas comienzan a formar el complejo cadherina-catenina. En (C) y (D) se observa la interacción del complejo nectina-afadina con el complejo cadherina-catenina así como también la interacción trans entre las cadherinas de las células. Tomado de Takai, 2008b.

4) IQGAP1

Generalidades

Las IQGAPs son proteínas muy conservadas a nivel evolutivo desde las levaduras a los seres humanos (Shannon, 2012) y, a pesar de su alta homología, difieren en su localización tisular. Mediante estudios de expresión proteica se identificaron tres isoformas; IQGAP1 que se encuentra en todos los tejidos celulares y es hasta ahora la proteína mejor caracterizada (Johnson et al., 2011); IQGAP2 que está enriquecida en el hígado, en el estómago y en las plaquetas. Por último, IQGAP3 que se encuentra en el pulmón y en el cerebro (Brandt and Grosse, 2007).

En particular IQGAP1, clonada por primera vez en 1992, es una proteína homodimérica de aproximadamente 380 kDa que posee la capacidad de unirse directamente a un amplio espectro de proteínas regulatorias y del citoesqueleto (Bensenor et al., 2007) por lo que es considerada como una proteína de andamiaje (Shannon, 2012); (White et al., 2012). Estas uniones las realiza a través de los dominios que se describen a continuación; 1) el “calponin homology domain” (CHD) ubicado en el dominio amino terminal por el cual se une a la actina-F; 2) el “Ras-GTPasa Activating Protein” (RGCT) encontrado en el extremo carboxilo terminal que interacciona con la proteína de unión a microtúbulos CLIP-170 y es necesario para la interacción con la β -catenina y E-cadherina (Briggs, 2003); 3) el dominio WW, el cual se encuentra únicamente en mamíferos, que media la unión de péptidos ricos en prolina (Machesky, 1998) ; (Mateer et al., 2003); (Li and Stuenkel, 2004) y 4) el dominio IQ que une a la calmodulina (Li and Stuenkel, 2004). Esta última es una de las proteínas más abundantes de las células eucariotas y presenta cuatro sitios de unión al Ca^{2+} , catión al que se une de forma reversible (Pathmanathan et al., 2011). La calmodulina regula la migración celular, la síntesis de ADN y la interacción de IQGAP con la actina-F en el ensamblaje del citoesqueleto (Pelikan-Conchaudron et al., 2011). Estudios vinculados a este tema evidenciaron que cuando la calmodulina no se encuentra unida al Ca^{2+} , la interacción de IQGAP1 con la actina-F se ve impedida (ibid).

A su vez, ha sido descrita la existencia de un quinto dominio denominado “GAP related domain” (GRD) por el cual IQGAP1 se une a las proteínas Rac1 y Cdc42 (Brown et al., 2006); (Bensenor et al., 2007), las cuales son reclutadas a la membrana plasmática de acuerdo a su requerimiento (Del

Pozo et al., 2002). La proteína Cdc42 se encuentra asociada mayoritariamente al aparato de Golgi (Kurokawa et al., 2004) y cuando se encuentra en su estado activo es la responsable de la inducción de la unión de IQGAP1 a los microfilamentos de actina y a CLIP-170 (Fukata et al., 2002). En algunos casos se ha evidenciado que la fosforilación de IQGAP1 por la proteína quinasa C (PKC ϵ) regula un cambio conformacional de un extremo carboxilo terminal que facilita su unión a Cdc42 (Brandt and Grosse, 2007; (Wang et al., 2009).

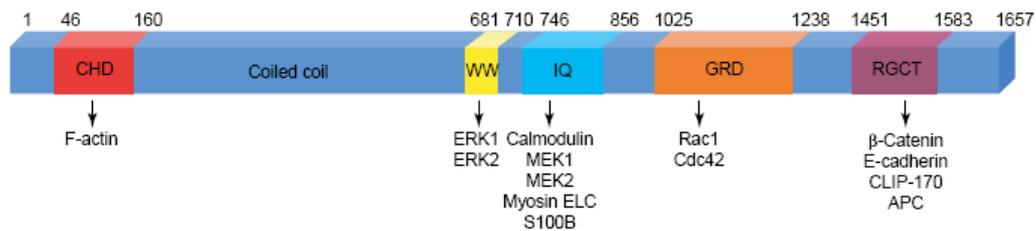


Figura 7: Esquema que muestra los dominios de IQGAP1: CHD; WW; IQ; GRD y RGCT. Tomado de Brown, 2006.

Localización de IQGAP1

Mediante experimentos de inmunofluorescencia se constató que IQGAP1 se concentra típicamente en la periferia celular, donde colocaliza con los filamentos de actina. Ha sido descrito que frente a un incremento de Ca²⁺ intracelular, IQGAP1 es removida del córtex celular, como se muestra en el modelo a continuación (Mateer et al., 2002).

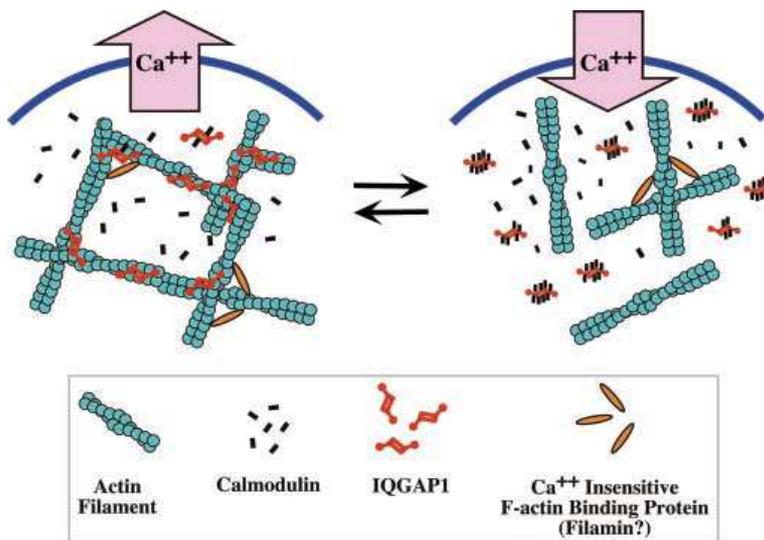


Figura 8: Esquema del modelo propuesto para la regulación de la unión de IQGAP1 a los filamentos de actina en el córtex celular por parte del Ca^{2+} /calmodulina. Cuando se induce un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, la calmodulina se une con más avidez a IQGAP1 por lo que se inhibe la unión de esta última a los filamentos de actina. Lo opuesto sucede en presencia de una baja concentración de Ca^{2+} intracelular. Tomado de Mateer, 2002.

Ha sido constatada también, la participación de Cdc42 como proteína reguladora de la localización subcelular de IQGAP1 (Watanabe et al., 2004). Estudios realizados mostraron que IQGAP1 y los filamentos de actina coinmunoprecipitan en un complejo junto con Cdc42 (Bashour et al., 1997). Adicionalmente, IQGAP1 ha sido detectada en regiones del citoplasma celular como el retículo endoplasmático (Rittmeyer et al., 2008) y la membrana del aparato de Golgi (McCallum et al., 1998), en las ondulaciones de membrana plasmática y en el lamelipodio, pero no ha sido encontrada en las fibras de stress (Bashour et al., 1997; Takemoto et al., 2001); (Katata et al., 2003). Recientes estudios efectuados por el equipo de Johnson y colaboradores, constataron que es posible encontrar a IQGAP1 en la cara citoplasmática de la envoltura nuclear en donde colocaliza con los filamentos de actina (Johnson and Henderson, 2012).

En células polarizadas IQGAP1 se localiza en los sitios de contacto célula-célula de las UAs, junto con la β -catenina y E-cadherina (Noritake et al., 2004). Mediante experimentos de transfección de fibroblastos de ratón con E-cadherina, se concluyó que dicha proteína es capaz de regular la localización de IQGAP1. A través de estos estudios se evidenció que las células no transfectadas con E-cadherina no mostraron señal de IQGAP1 en los sitios de unión celular (Li et al., 1999).

Adicionalmente, fue comparada la localización de IQGAP1 a lo largo de dos líneas celulares; MCF-7 las cuales expresan E-cadherina y las MDA-MB-231 que no la expresan. Como se observa en la **Figura 9** a continuación, en las células MCF-7 IQGAP1 se distribuye a lo largo del citoplasma celular y colocaliza con E-cadherina en las regiones de contacto célula-célula. Por el contrario, las células MDA-MB-231 mostraron un patrón de localización completamente diferente, en el cual no se observa IQGAP1 en las UAs (Li et al., 1999).

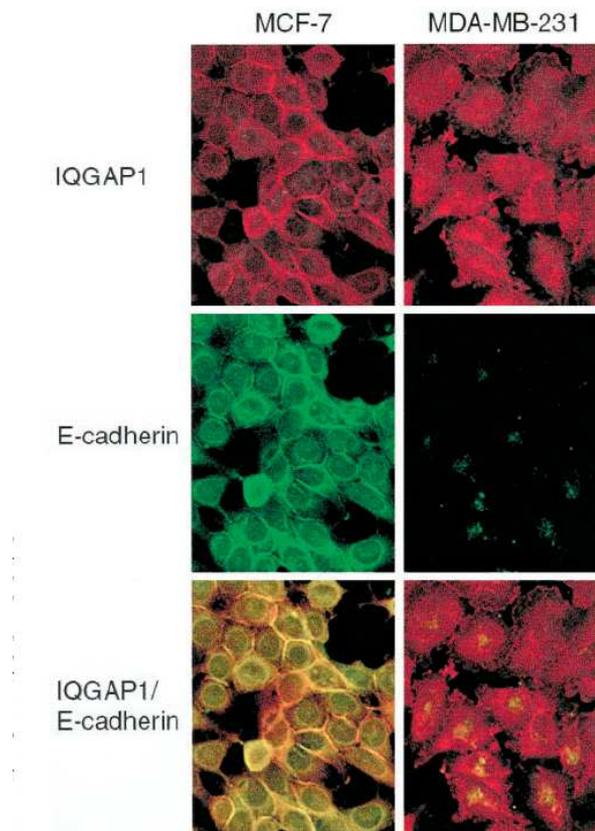


Figura 9: Rol de la E-cadherina en la regulación de la localización de IQGAP1. Las células MCF-7 (panel izquierdo) evidencian la localización de IQGAP1 en los sitios de unión, mientras que en las células MDA-MB-231 (panel izquierdo) no se observa dicho patrón. Tomado de Li, 1999.

Estudios posteriores mostraron que el complejo de adhesión afadina-nectina se encuentra estrechamente vinculado a la regulación de la localización de IQGAP1. Katata y colaboradores examinaron la localización de IQGAP1, de las nectina y E-cadherina durante el desensamblaje de las UAs en células MDCK, provocado por bajas concentraciones de Ca^{2+} en el medio (Katata et al., 2003). En la **Figura 10** se observa que la disminución de Ca^{2+} celular provoca que la E-cadherina pierda su localización periférica y desaparezca de las uniones, mientras la afadina, la nectina e

IQGAP1 permanecen intactas. Estos resultados sugieren que la afadina y la nectina estarían regulando la localización de IQGAP1 en las UAs (ibid).

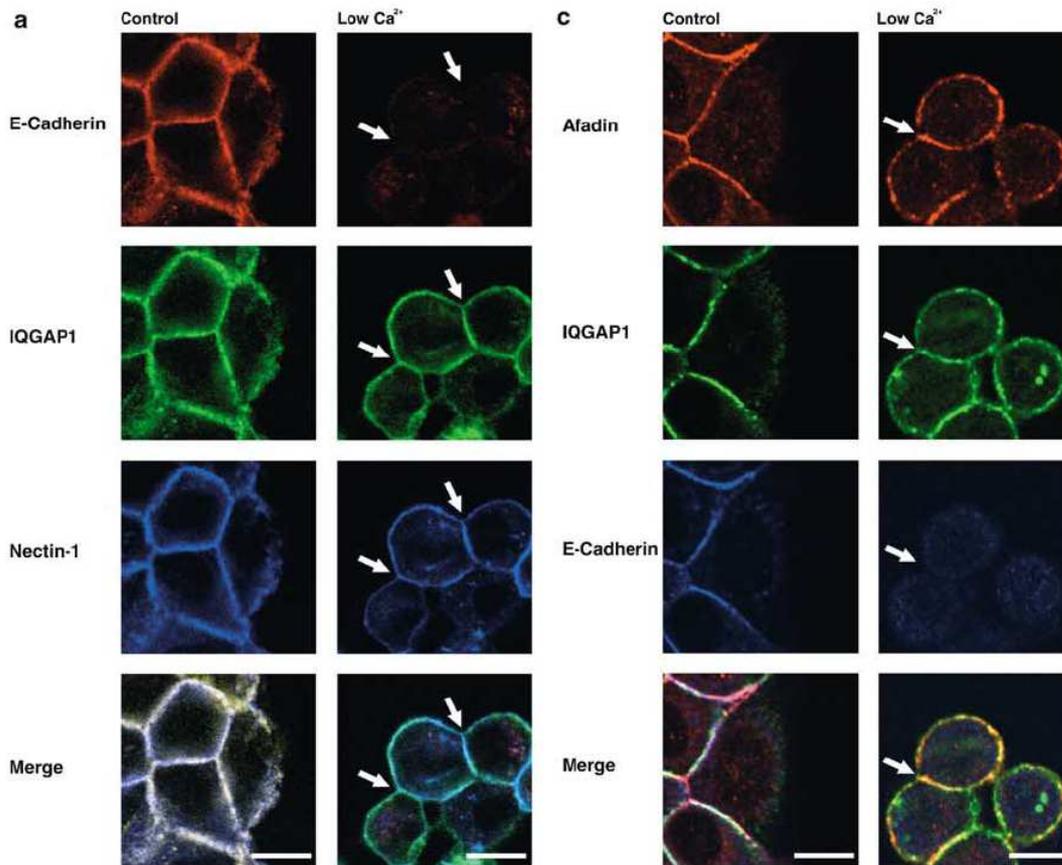


Figura 10: Localización de la nectina, la afadina, la E cadherina e IQGAP1 bajo diferentes condiciones experimentales. En la medida que las células MDCK son incubadas con poca concentración de Ca²⁺, la E cadherina desaparece de las UAs, como se observa en la imagen de la izquierda, mientras que la afadina, la nectina y la IQGAP1 no lo hacen. Tomado de Katata, 2003.

Por otro lado, se ha vinculado a IQGAP1 con el proceso de carcinogénesis y progresión de tumores (Jadeski et al., 2008). En células de cáncer de mama, por ejemplo, IQGAP1 se encuentra sobreexpresada y su localización es variable de acuerdo al tipo y grado de diferenciación del tumor, siendo posible encontrarla únicamente en el citosol o en la membrana plasmática

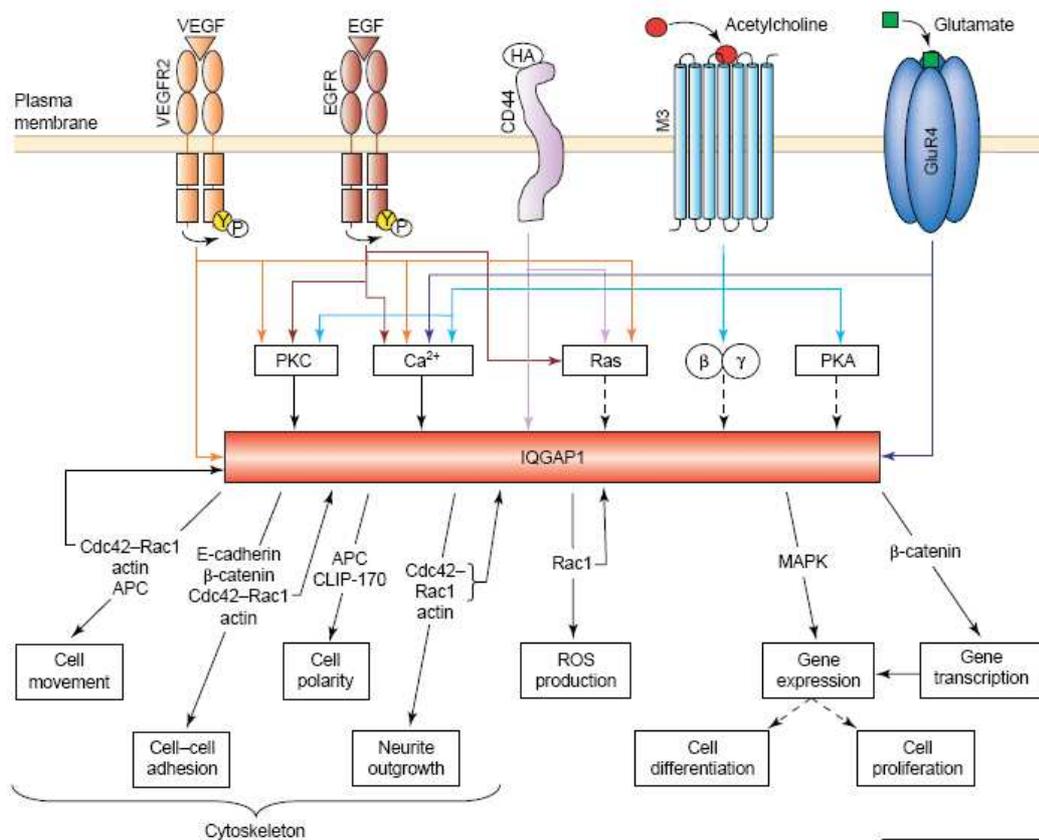
(Takemoto et al., 2001); (Jadeski et al., 2008) dado que su localización nuclear es casi nula (Johnson et al., 2011).

Roles de IQGAP1

La proteína IQGAP1 integra rutas de señalización celular y participa en diversas actividades celulares. En esta sección se comentará el papel que posee IQGAP1 en la modulación del citoesqueleto, la migración, la regulación de las UAs, su involucramiento en algunos eventos nucleares y por último en la proliferación celular.

1) Participación en las vías de señalización

Las IQGAPs interaccionan con diversas proteínas como las GTPasas, las proteínas de unión al Ca^{2+} , las proteínas de unión a microtúbulos, las quinasas y los receptores, entre otras (Shannon, 2012). Dicha interacción les confiere la capacidad de transmitir señales extracelulares las cuales actúan sobre la célula no solo a nivel de su morfología sino también en diversas funciones como la migración y la mitosis (Brandt and Grosse, 2007).



TRENDS in Cell Biology

Figura 11: Modelo de IQGAP1 que integra múltiples vías de señalización. Las flechas de color indican las vías de señalización desde los receptores a los segundos mensajeros o directamente a IQGAP1. Como se observa, IQGAP1 se asocia con VEGFR2, CD44 y GluR4. A su vez, algunos receptores interactúan con IQGAP1 a través de segundos mensajeros como PKC, Ca²⁺, Ras, Gβγ y PKA. Es de esta manera que IQGAP1 regula varias funciones celulares. Tomado de Brown, 2006.

2) Regulación del citoesqueleto

A lo largo de un amplio espectro de organismos, desde las levaduras a los mamíferos, ha sido estudiado que IQGAP1 está involucrada en la modulación del citoesqueleto (Mataraza et al., 2007). Los primeros estudios acerca de este fenómeno surgieron a partir de trabajos realizados en el laboratorio de Bloom, quienes co-purificaron las IQGAPs de fracciones de actina-F citosólica como una proteína con actividad de crosslinking (Bashour et al., 1997). Fue demostrado que esta actividad requiere la oligomerización de IQGAP1 y que a través de su dominio CHD se une a la

actina con alta afinidad (ibid). En efecto, IQGAP1 es capaz de modular a la actina-F (Pelikan-Conchaudron et al., 2011) al unirse directamente a ella en estructuras tales como lamelipodios, “membrane ruffles” y uniones celulares e indirectamente mediante su interacción con Cdc42 y la Rac1 (Mateer et al., 2003); (Bensenor et al., 2007); (Mataraza et al., 2007). Ahora bien ¿cómo es que IQGAP1 puede estimular el ensamblaje de la actina? Ha sido estudiado que IQGAP1 puede promover la nucleación de los microfilamentos vinculándose a dos maquinarias de ensamblaje; el complejo Arp2/3 y las forminas (Brandt and Grosse, 2007). La nucleación por parte de las forminas genera filamentos lineales por elongación, mientras que el complejo Arp2/3 se une a filamentos preexistentes e inicia un nuevo sitio de nucleación denominado “dendritic actin nucleation” con la ayuda de proteínas como WASP (Brandt and Grosse, 2007); (Ivanov, 2008). Se ha propuesto que IQGAP1, al unirse a la proteína Wasp neuronal o WASP-n es capaz de estimular la polimerización *in vitro* de la actina por medio del complejo Arp2/3 (Brandt and Grosse, 2007). Por otro lado, se ha observado que IQGAP1 se une con alta afinidad a una formina denominada Dia1, a la cual recluta a los sitios de ensamblaje de la actina como por ejemplo el frente de crecimiento de células en proceso de migración (Brandt and Grosse, 2007; (Liao and Liu, 2011).

Asimismo, existe un vínculo entre IQGAP1 y los microtúbulos a través de la proteína CLIP170. Esta unión es llevada a cabo en el borde de la célula en proceso de migración y funciona como un puente para unir el extremo positivo de los microtúbulos a los filamentos de actina (Brandt and Grosse, 2007; Briggs and Sacks, 2003).

3) Migración celular

La migración celular es un proceso característico de las células y es necesaria para el correcto desarrollo embrionario, la protección contra infecciones y la cicatrización entre otros (Mataraza et al., 2007). Durante la migración de células individuales se describen cinco etapas integradas: 1) polarización morfológica, 2) extensión lamelipódica, 3) formación de uniones con el sustrato, 4) contracción y 5) liberación de las uniones (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Para llevarse a cabo dicho proceso debe existir una regulación precisa y coordinada entre el citoesqueleto de actina, las moléculas de adhesión y los microtúbulos (Mataraza et al., 2003; (Watanabe et al., 2004). Existen diversas proteínas que participan de la regulación de las estructuras del frente de avance. La

formación de filopodios está regulada por Cdc42, mientras que la formación de lamelipodios es regulada por Rac1, cuya activación estimula la producción de “membrane ruffles”. Finalmente, la formación de adhesiones focales (complejos de adhesión altamente organizados que contienen los extremos de fibras de estrés de citoesqueleto de actina), es regulada por Rho. Esta cascada de eventos se inicia con la activación de Cdc42 (Nobes and Hall, 1995).

Se ha constatado experimentalmente que frente a la sobreexpresión de IQGAP1 existe un incremento en la migración celular, contrario a lo que sucede cuando ocurre un decaimiento de los niveles proteicos (Mataraza et al., 2007). Estos resultados pusieron en evidencia la participación de IQGAP1 en la regulación de dicho proceso celular. El equipo de Mataraza observó que IQGAP1 se ubica en el frente de migración y resulta ser necesaria para que Cdc42 se localice en la membrana plasmática. A su vez, promueve el incremento de los niveles de Cdc42 y Rac1 en el frente de avance de la célula (Mataraza et al., 2003).

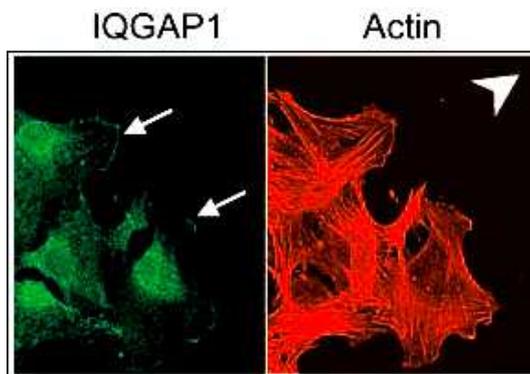


Figura 12: Localización de IQGAP1 en el borde de una célula Swiss 3T3 en proceso de migración. La cabeza de flecha indica la dirección de la migración celular y las flechas en la imagen de la izquierda muestran la localización de IQGAP1 en el borde del lamelipodio. Tomado de Mataraza, 2003.

En la **Figura 12** se observa la esquematización del proceso de migración de una célula aislada. El inicio del proceso se produce en respuesta a un estímulo extracelular que activa a Rac1 y Cdc42. Dichas proteínas inducen la polimerización de la actina-F y marcan el sitio celular donde IQGAP1 debe posicionarse junto a dichos filamentos (Noritake et al., 2005); suceso indispensable para que ocurra la migración (Mataraza et al., 2007). A su vez, IQGAP1 recluta a la proteína de supresión tumoral APC (adenomatous polyposis coli) hacia los sitios donde se localiza la actina-F y captura el extremo positivo de los microtúbulos a través de CLIP 170, (Brocardo and Henderson, 2008). Por otra parte, APC estabiliza los microtúbulos y activa Rac1, la cual regula los filamentos de actina y los microtúbulos a través de varios efectores (Watanabe et al., 2009). Esto provoca un feedback

positivo que favorece el proceso de migración celular (Noritake et al., 2005). Experimentos de silenciamiento de IQGAP1 y de APC mostraron una inhibición de la acumulación de los filamentos de actina en el frente de migración así como también una inmovilización del extremo positivo de los microtúbulos (ibid), por lo que la interacción de ambas proteínas es indispensable para que este proceso celular se lleve a cabo.

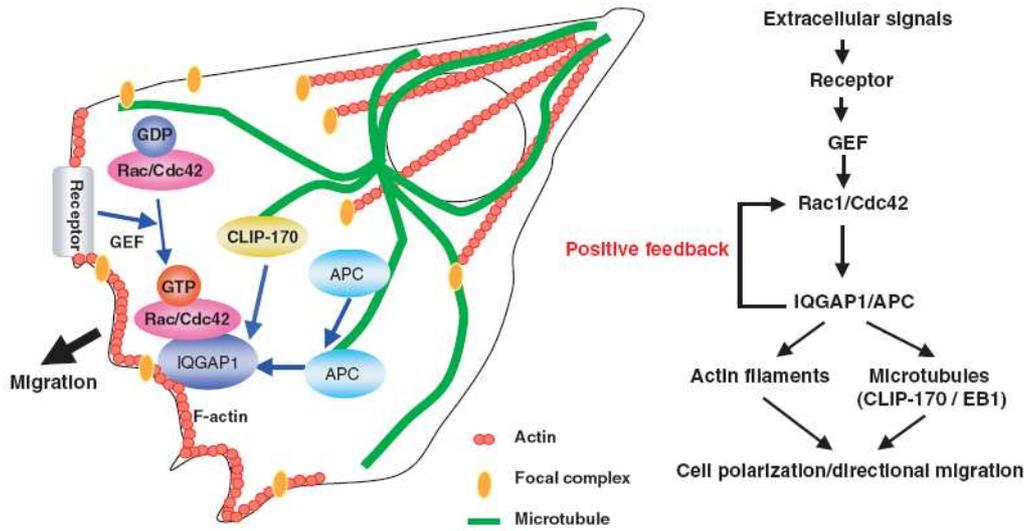


Figura 13: Esquema donde se muestra el proceso de migración celular y las proteínas involucradas en el mismo (Noritake, 2005).

4) Regulación de las UAs

Tal como se mencionó anteriormente, IQGAP se localiza en los sitios de contacto célula-célula y, cuando se encuentra sobreexpresada, es capaz de provocar una reducción en la adhesión celular debido a su fuerte interacción con la β -catenina (Kuroda et al., 1998; Johnson et al., 2011). Hay dos puntos muy importantes a tener en cuenta; en primer lugar, IQGAP1 y α -catenina compiten por el mismo sitio de unión a la β -catenina y en segundo lugar, la formación de las UAs se encuentra regulada por las proteínas Cdc42 y Rac1 (Noritake et al., 2005). Cuando las dos proteínas anteriormente mencionadas se encuentran en su forma inactiva, IQGAP1 se une al dominio citoplasmático de E-cadherina y β -catenina causando la disociación de la α -catenina de los complejos cadherina-catenina y la por ende una disminución de la adhesión celular (ibid). Por el contrario, cuando Rac1 y Cdc42 se encuentran en su forma activa en la membrana plasmática

regulan positivamente la E-cadherina inhibiendo la interacción de IQGAP1 con la β -catenina, fortaleciendo de esta manera las UAs y estabilizando los filamentos de actina (White et al., 2009). Por lo tanto, en los sitios de contacto célula-célula es posible encontrar a la E-cadherina formando un complejo con la β -catenina y la α -catenina ó con la β -catenina y la IQGAP1, como se observa en la **Figura 14** a continuación (Noritake et al., 2005).

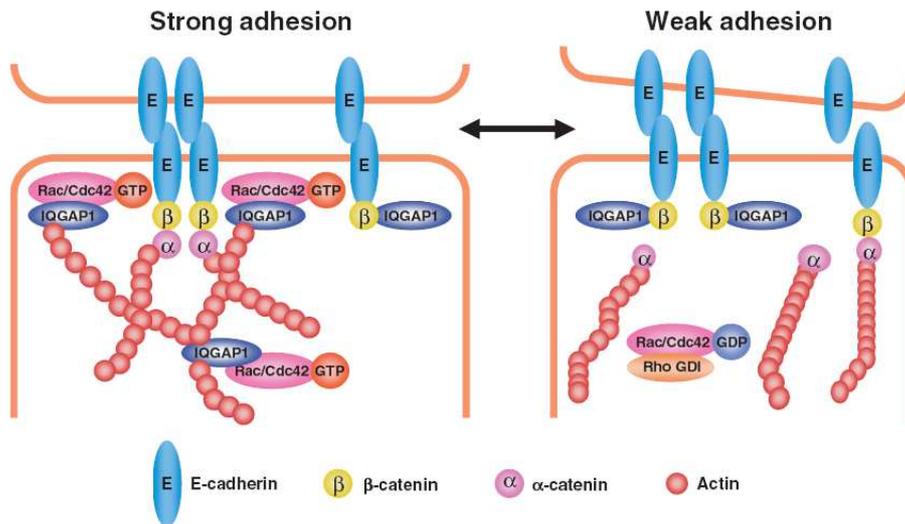


Figura 14: Rol de IQGAP1 en la regulación de las uniones celulares. Cuando IQGAP1 interacciona con Rac1 y Cdc42 su unión a la β -catenina se ve impedida, favoreciendo así las fuertes uniones celulares, como se observa en el esquema de la izquierda. Por el contrario, a la derecha se esquematiza el debilitamiento de las uniones celulares provocado por el desplazamiento de la α catenina del complejo E-cadherina/ β catenina debido a que IQGAP1 no se encuentra unida a Rac1 y Cdc42 y por lo tanto se une a la β -catenina. Tomado de Noritake, 2005.

5) Regulación de eventos a nivel nuclear

Existen también evidencias que confirman que IQGAP1 ingresa al núcleo celular durante las fases G1/S del ciclo celular y se asocia a factores de replicación de ADN como RPA32 y PCNA (Johnson et al., 2009; White et al., 2009); (Johnson et al., 2011).

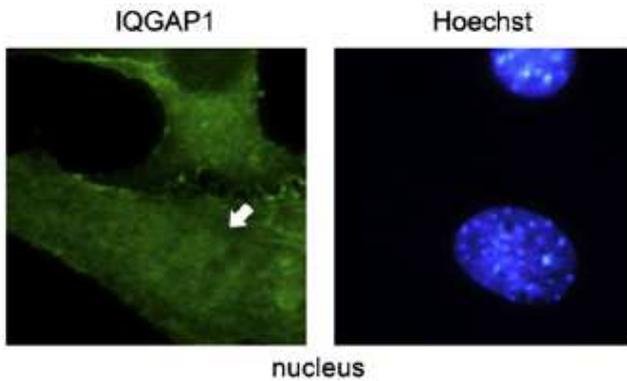


Figura 15: Localización nuclear de IQGAP1 en células NIH3T3. IQGAP1 se observa en verde y el marcador nuclear Hoechst en azul. La flecha indica la localización nuclear de IQGAP1. Tomado de Johnson 2009.

Asimismo, estudios mostraron que la sobreexpresión de IQGAP1 estimuló un incremento en los niveles de la β -catenina. Con el fin de dilucidar si la β -catenina tiene el mismo efecto sobre IQGAP1, se realizaron estudios en células NIH3T3 en las que se expresó β -catenina marcada con GFP “green fluoresnece protein”. Los resultados mostraron que los niveles celulares de IQGAP1 también se ven incrementados en comparación con las células transfectadas únicamente con GFP (utilizadas como control).

Se evidenció también, que la inhibición de la proteína quinasa GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3) provoca un aumento en los niveles nucleares de la β -catenina, lo que llevó a experimentar si provoca el mismo efecto con niveles de IQGAP1. Dichos estudios manifestaron un incremento de 300% en los niveles nucleares de IQGAP1 en respuesta a la inhibición, mediada por cloruro de litio (LiCl), de la proteína quinasa (Johnson et al., 2011). Posteriores experimentos de silenciamiento de la β -catenina utilizando ARN de interferencia revelaron que la acumulación de IQGAP1 en el núcleo no se vio impedida en respuesta al mismo tratamiento con LiCl. Estos resultados estarían indicando que IQGAP1 y la β -catenina son capaces de ingresar al núcleo de manera independiente, aunque puede ser factible que formen un complejo IQGAP1/ β -catenina una vez adentro (ibid).

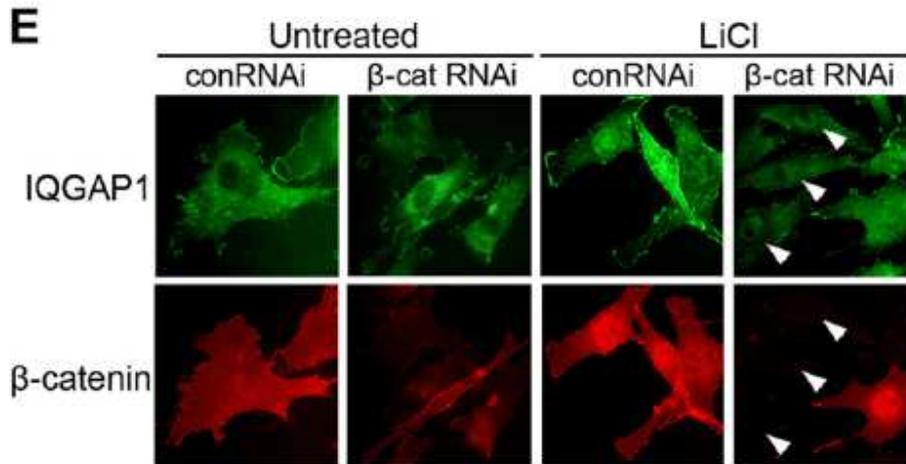


Figura 16: Regulación de la localización nuclear de IQGAP1 por la inhibición de la proteína quinasa GSK-3 β . Las células NIH3T3 fueron transfectadas con RNAi control (RNAi en la figura) y con β -catenina RNAi (β -cat RNAi en la figura). Pasadas las 24 hs. de la transfección, algunas células fueron tratadas con LiCl. La figura de la derecha, en la cual se muestran las células con el tratamiento de LiCl y la utilización de β -cat RNAi, puede observarse que IQGAP (en verde) se encuentra expresado independientemente de la β -catenina (en rojo), la cual está completamente silenciada, como muestran las cabezas de flecha. Tomado de Johnson, 2011.

6) Proliferación celular

La proliferación celular es producto de la coordinación de dos procesos; el crecimiento celular y la división celular (Yang, 2008; Wang, 2009); procesos en los que IQGAP1 se encuentra involucrada. Se ha descrito que, a través de la interacción de su dominio N-terminal con mTOR (mammalian target of rapamycin), IQGAP1 regula el crecimiento celular. A su vez, al interaccionar con Cdc42 a través de su dominio C-terminal, acelera la división celular (Wang et al., 2009). El equipo de Wang y colaboradores sugirió que IQGAP1, mediante el proceso de fosforilación y desfosforilación, alterna su conformación favoreciendo el crecimiento celular así como también la división y la migración celular. De no existir esta alternancia, existiría una proliferación celular descontrolada (ibid).

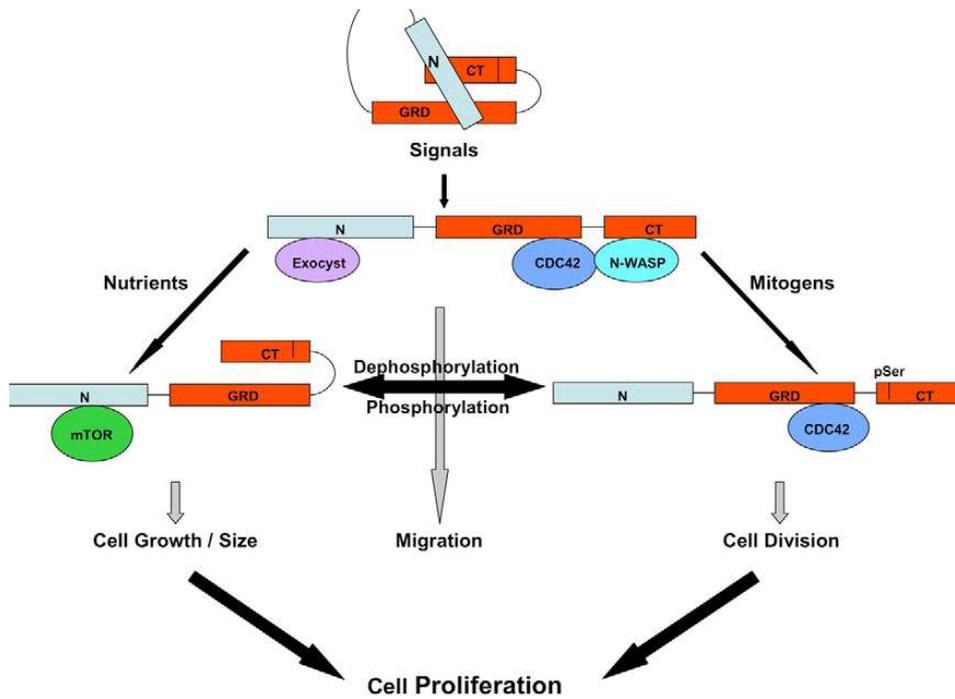


Figura 17: Modelo propuesto respecto al rol de IQGAP1 en el crecimiento y la división celular. IQGAP1 actúa alternando su conformación a través de su fosforilación/desfosforilación y la interacción proteína-proteína. Por un lado, Cdc42 y NWASP promueven la migración en respuesta a señales de motilidad. Por otro lado, IQGAP1 opera mediante el plegamiento del extremo C-terminal e interacciona con mTOR para promover el crecimiento celular. Cuando la célula adquiere un tamaño específico, señales mitogénicas promueven la fosforilación de IQGAP1, activando a Cdc42 y promoviendo así la división celular. Por lo tanto, el dinámico intercambio entre la fosforilación y la desfosforilación de IQGAP1 coordina el crecimiento y la división, lo que regula la proliferación celular. Tomado de Wang, 2009.

IQGAP1 y su vinculación con el Cáncer

Existen diversos eventos celulares interrelacionados que generan la progresión tumoral. Los mismos son: la proliferación de células cancerígenas, la invasión, la migración y la vascularización de la masa tumoral, (Jadeski et al., 2008). Se ha constatado que la β -catenina, E-cadherina, Cdc42, Rac1 y las proteínas involucradas en la cascada MAPK juegan un papel importante en la formación de tumores (White et al., 2009). Este hallazgo fue el que otorgó el puntapié inicial para considerar a la proteína IQGAP1 en el campo de la biología del cáncer. Ha sido documentado que IQGAP1 contribuye directamente en el proceso de tumorigénesis (Jadeski et al., 2008)) y una pregunta que surge luego de observar que los niveles proteicos de IQGAP1 están sobreexpresados en algunos tipos de cáncer, como el de mamas y el carcinoma colorectal (White et al., 2009), es la siguiente: ¿Es la sobreexpresión de IQGAP1 la causante de la formación de células tumorales o es dicha sobreexpresión una consecuencia de la progresión del tumor?. A pesar de que este fenómeno no está del todo claro aún, estudios in vitro del equipo de Jadeski revelaron que cuando IQGAP1 está sobreexpresado en células con fenotipo tumoral de cáncer de mama MCF-7 existe un gran potencial de proliferación de dichas células. Contrariamente, se observó que células con “knock down” de IQGAP1 reducen la proliferación celular in vitro y la tumorigénesis in vivo ((Jadeski et al., 2008); Johnson et al., 2009). Estos últimos acontecimientos reducen los niveles celulares de Cdc42 y Rac1 activos; dos proteínas que son necesarias para que IQGAP1 estimule los mecanismos de invasión en las células tumorales. Por lo tanto, cuando IQGAP1 no puede unirse a Cdc42 ni a Rac1 es incapaz de incrementar la invasión celular (Jadeski et al., 2008). A su vez, fue detectado que la localización subcelular de IQGAP1 se encuentra alterada en procesos de neoplasia. Dicha localización varía dependiendo del grado de diferenciación del tumor y se ha detectado que otorga información respecto al grado de severidad de ciertos tumores como el de mama y el de intestino; (Nabeshima et al., 2002); (Jadeski et al., 2008).

5) Potencial de Membrana Plasmática

El potencial de membrana plasmática (PMP) resulta de la diferencia de cargas eléctricas a ambos lados de la membrana plasmática, debido a un ligero exceso (microscópico) de iones positivos sobre los negativos en un lado y un ligero déficit en el otro (Alberts et al., 1996; (Levin, 2009). Estas diferencias de carga pueden deberse tanto a un bombeo electrogénico activo como a una difusión pasiva de iones (ibid). Cuando existen varios iones permeantes distribuidos desigualmente, el potencial de membrana se aproxima al potencial de equilibrio del ion más permeante. Esto está expresado matemáticamente en la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_K[K^+]_{out} + P_{Na}[Na^+]_{out} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{out}} \right)$$

Siendo:

- $[K^+]_o$ la concentración del ion K⁺ extracelular (similar nomenclatura se aplica para los iones Na⁺ y Cl⁻)

- $[K^+]_i$ la concentración del ion K⁺ intracelular

- R es la constante universal de los gases (8.314 joules·K⁻¹·mol⁻¹)

- T es la temperatura absoluta medida en Kelvin

- F es la constante de Faraday 96,485 coulomb.mol⁻¹)

Las proteínas de la membrana plasmática son susceptibles a las alteraciones de potencial eléctrico (Olivotto et al., 1996), ya sea frente a una despolarización o una hiperpolarización del PMP. Se ha constatado que existe un vínculo entre las modificaciones del PMP y diferentes procesos celulares tales como la proliferación (Pardo, 2004), la diferenciación (Barth and Barth, 1974); (Konig et al., 2004), la cicatrización (Chifflet et al., 2005b) y el cáncer (Wang et al., 1998), entre otros.

La proliferación celular es un proceso estrictamente controlado y regulado por una serie de mecanismos y existe evidencia experimental que indica que los canales de K⁺ juegan un rol importante en dicho proceso. La inhibición de dichos canales conlleva a un decaimiento en la proliferación, tanto en modelos en donde la proliferación es una respuesta fisiológica como los

linfocitos o en aquellos donde es una manifestación de una condición patológica; como en células cancerígenas (Pardo, 2004).

En cuanto a la diferenciación celular, el equipo de Barth demostró mediante la experimentación con un explante de ectodermo de *Rana Pipens*, que es posible diferenciar sus células en una variedad de tipos mediante la modulación del contenido de iones en el medio extracelular en donde eran cultivadas (Barth and Barth, 1974).

En cultivos de epitelio intestinal, el equipo de Rao ha demostrado que existe una activación en la expresión del canal de potasio dependiente de voltaje (Kv) y un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico en el proceso de migración durante la cicatrización del epitelio (Rao et al., 2002). En un modelo de heridas mecánicas producidas en monocapas confluentes de BCE en cultivo se observó que ocurre una despolarización de las células a nivel del borde de la herida y se constató también que si se inhibe dicha despolarización se impide la reorganización característica de la actina presentada durante el proceso cicatrizal normal y la velocidad de cicatrización se ve disminuida (Chifflet et al., 2005). Otros autores, por su parte, han vinculado la despolarización del PMP como determinante en el aumento en la fosforilación de la cadena liviana de la miosina en las células tubulares renales y la activación de Rho (Szászi et al., 2005) y ERK en estas células (Waheed et al., 2010).

Mediante el estudio de líneas celulares normales y cancerígenas ha sido posible establecer una asociación entre el potencial de membrana y el cáncer (Minuk, 2000). En estudios *in vitro* realizados por Minuk y colaboradores ha sido constatado que cuando a una línea de hepatocitos cancerígenos se les restaura el valor de potencial de membrana al valor del de los hepatocitos con fenotipo normal se observa una pérdida de las propiedades malignas de las células así como una disminución en la actividad proliferativa de las mismas (ibid). Asimismo, ha sido establecido que existen diferentes valores de potencial de membrana en varios tipos de células cancerígenas. Esto estaría indicando que las propiedades bioeléctricas podrían ser una herramienta de suma utilidad para la caracterización celular (Sundelacruz et al., 2009).

6) Antecedentes Inmediatos

Despolarización de la membrana plasmática

En trabajos previos en nuestro laboratorio se mostró que la despolarización de la membrana plasmática (PMP) provoca una reorganización del citoesqueleto de diversas células epiteliales en cultivo. En particular, en estudios de endotelio de córnea en cultivo, la despolarización de la membrana plasmática provoca cambios en la morfología celular que consisten mayoritariamente en cambios en la organización del citoesqueleto donde se observa una redistribución de la actina-F y los microtúbulos (Chifflet et al., 2003). Dicha reorganización consiste mayormente en la reubicación de la actina periférica hacia el centro de la célula, proceso que se acompaña de una importante desorganización de las uniones celulares. Los resultados experimentales sugieren que para que ocurran los cambios las células deben estar diferenciadas; con sus filamentos de actina principalmente organizados en haces periféricos que se asocian a las UAs y UOs. En las células no diferenciadas o que carecen de un fenotipo epitelial bien definido no es posible observar este efecto de la despolarización (Chifflet et al., 2004).

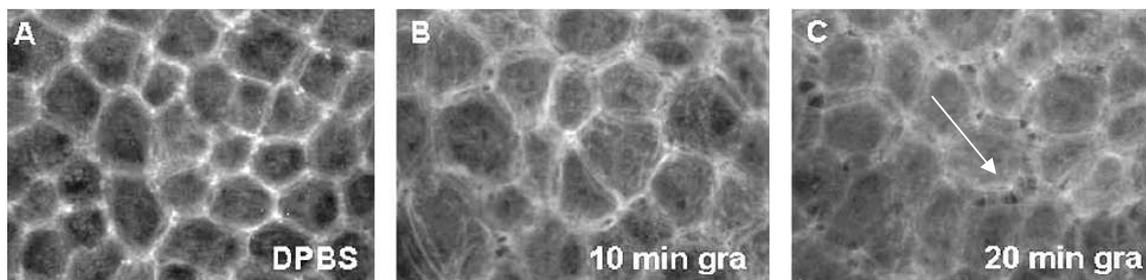


Figura 18: Evolución temporal de la remodelación de los filamentos de actina en células BCE (bovine corneal endothelium) provocados por la despolarización de la membrana plasmática. En la figura A, las células han sido incubadas con DPBS como solución control, mientras que en B y en C puede apreciarse la desorganización de las uniones celulares a medida que aumenta el tiempo de incubación con la solución de gramicidina que provoca una despolarización del potencial de membrana plasmática. Tomado de Chifflet, 2003.

Hiperpolarización de la membrana plasmática

Por otro lado, en nuestro laboratorio fueron explorados los efectos causados por la hiperpolarización de la membrana plasmática. Para generar una hiperpolarización, el sodio del medio fue sustituido por un catión no difusible o se incubó el medio de cultivo con valinomicina, un ionóforo de potasio. Dichos estudios revelaron que la hiperpolarización de monocapas de células BCE en cultivo determina un incremento de la estabilidad de las uniones adherentes y de los filamentos de actina, haciendo que éstos se redistribuyan hacia la membrana plasmática (Nin et al., 2009).

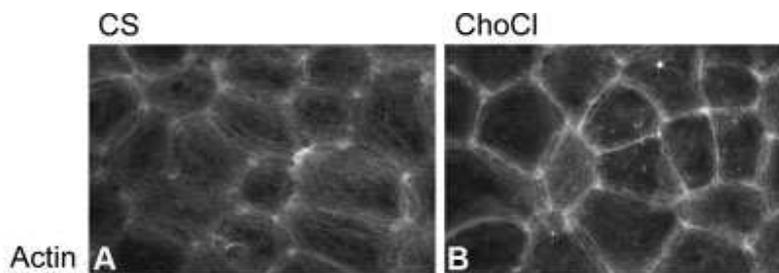


Figura 19: Efecto de la hiperpolarización en la distribución de los filamentos de actina en células BCE. En la Figura A, las células incubadas en una solución control (CS) muestran un arreglo difuso de actina-F. En B, las células tratadas con una solución hiperpolarizante, en las que se sustituye el NaCl por cloruro de colina (ChoCl) presentan sus filamentos de actina en una mayor aposición con la membrana lateral, lo que resulta en un anillo de actina más compacto. Tomado de Nin, 2009.

Objetivos

Objetivos Generales:

Como ha sido mencionado, a través de los trabajos pioneros de Bloom y colaboradores y otros autores se logró establecer que una de las principales funciones de IQGAP1 es la de modular los filamentos de actina y los microtúbulos del citoesqueleto (Bashour et al., 1997). Por otro lado, los antecedentes experimentales de nuestro laboratorio indican que la actina-F sufre cambios en su localización cuando las células son sometidas a cambios de potencial de membrana plasmática (Chifflet et al., 2004; Chifflet et al., 2005a; Chifflet et al., 2003; Nin et al., 2009).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la posible vinculación de IQGAP1 en la remodelación del citoesqueleto de actina frente a modificaciones inespecíficas del potencial de membrana en células de endotelio de aorta bovino (BAEC), endotelio de cornea de bovino (BCE) y epitelio de riñón de perro (MDCK).

Objetivos Específicos

Con el fin de cumplir el objetivo establecido, fueron propuestos los objetivos específicos que se detallan a continuación:

- Observar y comparar la distribución de IQGAP1 en BAEC, BCE y MDCK.
- Estandarizar el momento en el que los filamentos de actina y la proteína IQGAP1 colocalizan en la periferia celular en diferentes líneas de BAEC.
- Evaluar la presencia de modificaciones en la distribución subcelular de IQGAP1 frente a variaciones inespecíficas de PMP en BAEC, BCE y MDCK.

Materiales y métodos

Con excepción de la obtención y el mantenimiento de los cultivos, todas las maniobras experimentales fueron realizadas por el autor de esta tesis.

1) Cultivo celular

Los cultivos de células BCE se obtuvieron de forma rutinaria en nuestro laboratorio a partir de ojos de vaca fresco y cultivados por procedimientos estándar en medio MEM suplementados con 10% de suero hasta alcanzar confluencia, como se describe en (Chifflet et al., 2003)

Las BAEC se obtuvieron a partir de aortas frescas de bovino amablemente brindadas por el Frigorífico “Las Piedras”. Para realizar la extracción de las células endoteliales de las aortas, éstas se trataron con colagenasa (65 U/ml) en DPBS a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, las células endoteliales fueron removidas con una espátula y se cultivaron en medio de cultivo Minimum Essential Media (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), 50 µg/ml de gentamicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B. Cuando alcanzaron la confluencia, las células fueron subcultivadas y mantenidas en el mismo medio.

Las células Madin-Darby canine kidney (MDCK) se cultivaron por procedimientos estándar en medio DMEM suplementadas con 10% suero hasta alcanzar la confluencia.

2) Modificaciones en el PMP

Para estos experimentos fueron utilizadas monocapas confluentes de células BAEC, BCE y MDCK y las soluciones que se detallan a continuación; como se describiera en (Chifflet et al., 2003) y (Nin et al., 2009):

- 1) Solución control: NaCl 127mM, KCl 5.4mM, NaH₂PO₄ 1.02mM, CaCl₂ 3.6mM, MgSO₄ 0.8mM, Hepes 10mM, pH 7.4.
- 2) Solución hiperpolarizante. Solución de cloruro de colina (ChoCl): idem que la solución control, con la sustitución de NaCl por una cantidad equimolar de ChoCl.

- 3) Solución despolarizante. Solución de gluconato de potasio (KGI_n): idem que la solución control, con la sustitución de NaCl por una cantidad equimolar de KGI_n.

El tiempo de incubación con las diferentes soluciones fue de 1 hora.

Inmunofluorescencia

Para visualizar las diferentes proteínas se utilizó el siguiente procedimiento general. Las monocapas celulares se fijaron a temperatura ambiente con paraformaldehído 4 % en DPBS (con CaCl₂ 0.9 mM y MgCl₂ 0.5 mM adicionados en el momento de usar) por 15 minutos. Luego, las células se permeabilizaron a temperatura ambiente con Tritón 0,5% por 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente. A continuación, las células se lavaron tres veces con DPBS y se incubaron con el anticuerpo secundario. Finalmente, las monocapas se lavaron tres veces con DPBS y una vez con agua destilada, y se montaron en glicerol-Tris 1.5 M, pH 8.8 (5:1). Las incubaciones con los anticuerpos se realizaron durante una hora a 37°C en cámara húmeda y las diluciones de los anticuerpos se hicieron en seroalbumina bovina (BSA) 1% en DPBS.

Para la tinción de IQGAP1 y β-catenina, las células se permeabilizaron 5 min con TX-100 0.5% en DPBS. Los anticuerpos se utilizaron a las siguientes diluciones: anti IQGAP1 anticuerpo monoclonal, gentilmente donado por el Dr. George Bloom, a partir de un sobrenadante de hibridoma en una dilución 1/25, y anti β-Catenina con un anticuerpo policlonal (Sigma) a una dilución final de 1/4000. Para revelar IQGAP1 se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes, Inc.) utilizando 1/400 como dilución final. Para visualizar actina-F simultáneamente a los antígenos anteriormente mencionados, las células se incubaron con faloidina conjugada a fluoresceína isotiocianato (FITC), a dilución 1/100 en la solución del anticuerpo secundario. Para revelar la β-catenina fue utilizado el anticuerpo secundario conjugado a Cy3 de Jackson ImmunoResearch a una dilución 1/500.

Las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot utilizando los filtros apropiados con un objetivo PlanFluor (Depto. De Histología y Embriología, Facultad de Medicina, UdelaR), y se fotografiaron con una cámara digital Kodak MDS120 usando el software

MDS120 (Kodak Digital Science) y el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) como aplicación madre.

3) Extracción con detergente y análisis por Western Blot

Se utilizaron monocapas confluentes de células BAEC, BCE y MDCK cultivadas en cajas de Petri de 35 mm. Las placas se colocaron sobre el hielo y las células fueron suspendidas en 200 µl de buffer de extracción frío (DPBS + TX-100 0,5%) por 5 minutos. Inmediatamente después, a la fracción soluble (**S**) obtenida se le agregaron 70 µl de buffer de muestra 4X. La fracción insoluble (**I**), adherida a la placa de Petri, fue resuspendida en 270 µl de buffer de muestra 1X y las células fueron levantadas con la ayuda de un removedor de células (“cell scraper”).

Se cargaron 50 µl de muestra en un gel SDS-PAGE 7 % que se corrió a voltaje constante de 180 V. Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de polivinildene difluoruro (PVDF) (Immobilon, Millipore). Las membranas se bloquearon en leche en polvo descremada al 5% en DPBS y se incubaron con el anticuerpo anti IQGAP1 a una dilución de 1/1000 (ver más adelante) durante 1 hora a 37°C. A continuación, las membranas se lavaron tres veces con DPBS y se incubaron por 1 hora en cámara húmeda con el anticuerpo secundario anti conejo conjugado a peroxidasa de rábano picante (dilución final 1/2000) (Sigma A0545). Los anticuerpos se diluyeron en una solución de leche descremada 1%, Tween-20 0.5% en DPBS. Para visualizar las bandas se utilizó el sistema “Enhanced Chemiluminescence System” (ECL) (Amersham, Arlington Heights, IL) y las placas XAR5 (Kodak, Rochester, NY).

Puesta a punto de la técnica

Con el fin de conocer la concentración de anticuerpo anti IQGAP1 que permitiera poner en evidencia las posibles diferencias de concentración de las bandas proteicas, se realizó una curva de calibración sembrando 3 bandas con diferentes diluciones de la muestra; pura, y diluciones ½ y ¼ de la misma. Se realizaron varios Western Blots según el procedimiento indicado anteriormente. A continuación se presentan los resultados obtenidos con las diferentes diluciones del anticuerpo primario.

Concentración de anti IQGAP1 1/400:

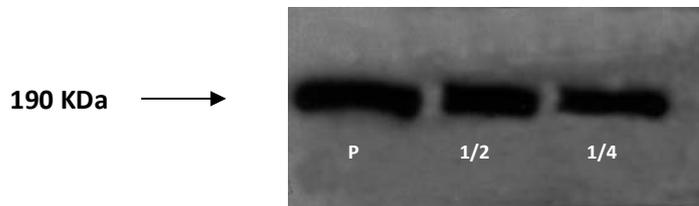


Figura 19: Western Blot de IQGAP1 en células MDCK. La (P) corresponde a la muestra pura; (1/2) a la muestra diluida a la mitad y (1/4) a la muestra pura cuatro veces diluida. Todas las muestras fueron incubadas con una dilución de 1/ 400 de anticuerpo primario anti IQGAP1.

Mediante este resultado, pudo concluirse que la dilución 1/ 400 del anticuerpo primario no era la adecuada para utilizar en el estudio de la expresión de IQGAP1, dado que dicha dilución no permitió distinguir la diferencia de concentración existente entre las bandas.

1) Concentración de anti IQGAP1 1/1000:

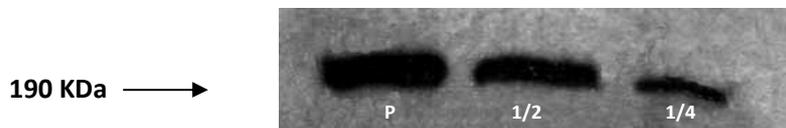


Figura 20: Western Blot de IQGAP1 en células MDCK. La (P) corresponde a la muestra pura; (1/2) a la muestra diluida a la mitad y (1/4) a la muestra pura cuatro veces diluida. Todas las muestras fueron incubadas con una dilución de 1/ 1000 de anticuerpo primario anti IQGAP1.

En este caso, pueden apreciarse las diferencias de concentración de las muestras. Por tanto, **para** el estudio de la expresión de IQGAP1 en las fracciones solubles e insolubles a la extracción con Tritón X-100 fue elegida la dilución 1/1000 del anticuerpo primario anti IQGAP1.

4) Determinación de las modificaciones en el potencial de membrana plasmática

Los cambios en el potencial de la membrana plasmática fueron determinados mediante microscopía de fluorescencia empleando la sonda potenciométrica aniónica Oxonol V (bis-(3-fenil-5-oxoisoazol-4-yl)). El Oxonol V es un compuesto fluorescente hidrofóbico aniónico que se distribuye en las membranas intracelulares de forma dependiente del potencial de membrana. La concentración final de Oxonol V utilizada fue de 0.3 μM en DPBS. Como se ha mostrado en estudios anteriores, un incremento en la intensidad de fluorescencia del Oxonol V se correlaciona con una despolarización de membrana (Chifflet et al., 2003). El Oxonol V fue mantenido a una concentración stock de 0.7 mM en etanol a 4°C. En todos los casos se incubaron las células durante 30 minutos a temperatura ambiente en sus soluciones correspondientes: NaCl (Control), KGI_n, o ChoCl y. Por último, cada laminilla fue montada en una cámara fabricada en nuestro laboratorio como se esquematiza en la **Figura 21**, conteniendo las mismas soluciones salinas en las que fueron incubadas y fueron visualizadas bajo el microscopio de fluorescencia.

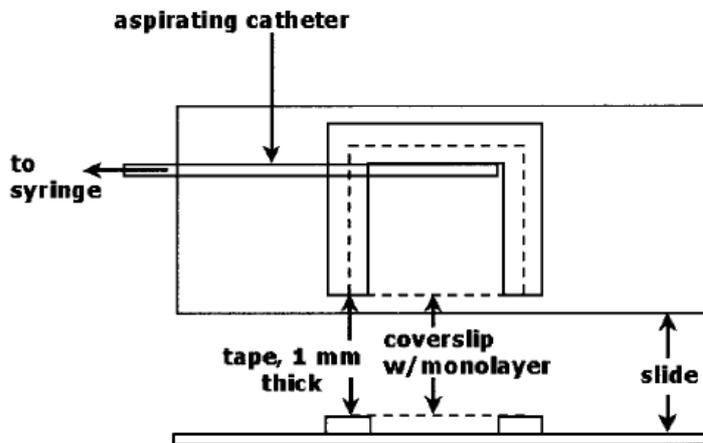


Figura 21: Esquema de la cámara fabricada en nuestro laboratorio para la observación al microscopio de epifluorescencia de las laminillas utilizadas para la determinación de las modificaciones en el potencial de membrana plasmática. Tomado de Chifflet et al., 2003.

Resultados

1) Localización de IQGAP1 en células en cultivo

Como fue descrito en los antecedentes bibliográficos, en células epitelios bien diferenciados es posible observar a IQGAP1 en regiones ricas en actina-F tales como las UAs, donde colocaliza con proteínas de la unión como la E-cadherina y la β catenina.

Con el propósito de obtener información comparativa respecto a la localización de IQGAP1 en epitelios en cultivo, fueron utilizadas tres líneas celulares; MDCK, BCE y BAEC.

Células MDCK

Las células de la línea inmortal de riñón de perro (MDCK) constituyen un modelo ampliamente utilizado para el estudio de las propiedades de los epitelios. Esto se debe a que poseen la propiedad de adquirir un fenotipo altamente diferenciado *in vitro*. La **Figura 22** muestra la localización de IQGAP1 y la distribución de actina-F en monocapas confluentes de MDCK.

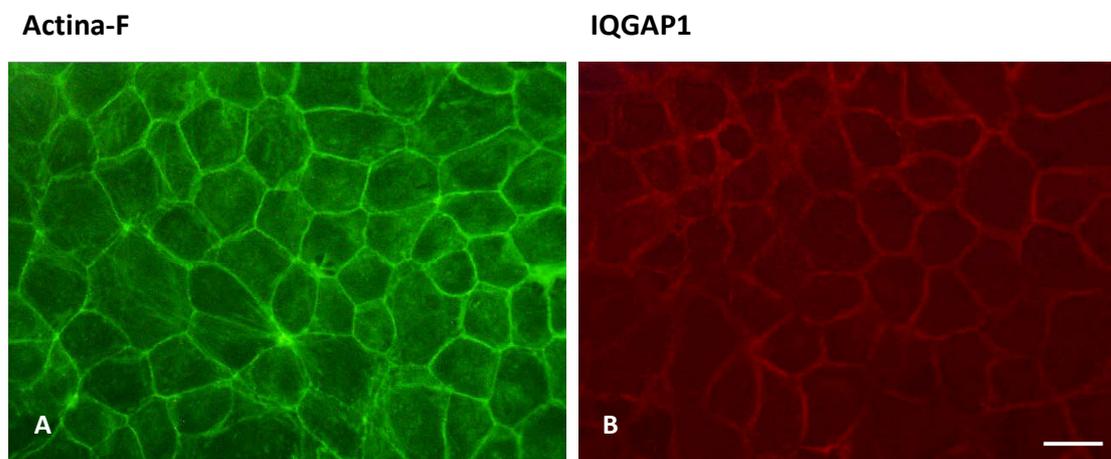


Figura 22: Localización de IQGAP1 en monocapas confluentes de células MDCK sembradas sobre laminillas de vidrio.

A. Tinción con faloidina-FITC para visualizar la actina-F. **B.** Tinción con el anticuerpo anti IQGAP1. Barra: 20 μ m.

Como puede observarse en la **Figura 22**, IQGAP1 posee una localización subcortical y codistribuye con la actina-F, en concordancia con lo encontrado la bibliografía (Bashour et al., 1997).

Células BCE

La localización de IQGAP1 en células BCE confluentes luego de 12 días de cultivo se observa en la **Figura 23**.

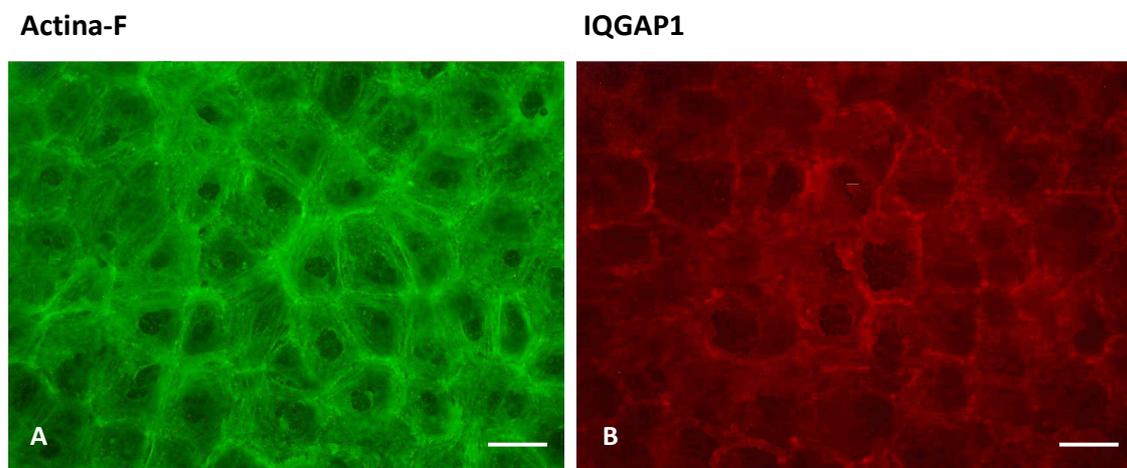


Figura 23: Localización de IQGAP1 en monocapas confluentes de células BCE sembradas sobre laminillas de vidrio. **A.** Tinción con faloidina-FITC para visualizar la actina-F. **B.** Tinción con el anticuerpo anti IQGAP1 para visualizar IQGAP1. Barra: 20 µm.

En células BCE, tanto IQGAP1 como los filamentos de actina, además de poseer un componente citoplasmático tienen un refuerzo en la zona subyacente a la membrana.

Células BAEC

Las células BAEC utilizadas para este trabajo presentaron al microscopio de fase un fenotipo pavimentoso característico, sugiriendo cierto grado de diferenciación celular. Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en los dos tipos celulares anteriores (MDCK y BCE), en células BAEC IQGAP1 se observó exclusivamente en el citoplasma celular (**Figura 24 B**). Con el objetivo de determinar si se trataba de un caso particular de la línea celular seleccionada o de una característica propia de las células BAEC en nuestras condiciones de cultivo, se estudiaron siete líneas celulares a diferentes días de cultivo. En todas ellas se observó un patrón de comportamiento similar, en el cual a medida que el tejido se encontraba más maduro era posible evidenciar zonas en las que IQGAP adoptaba una localización más periférica.

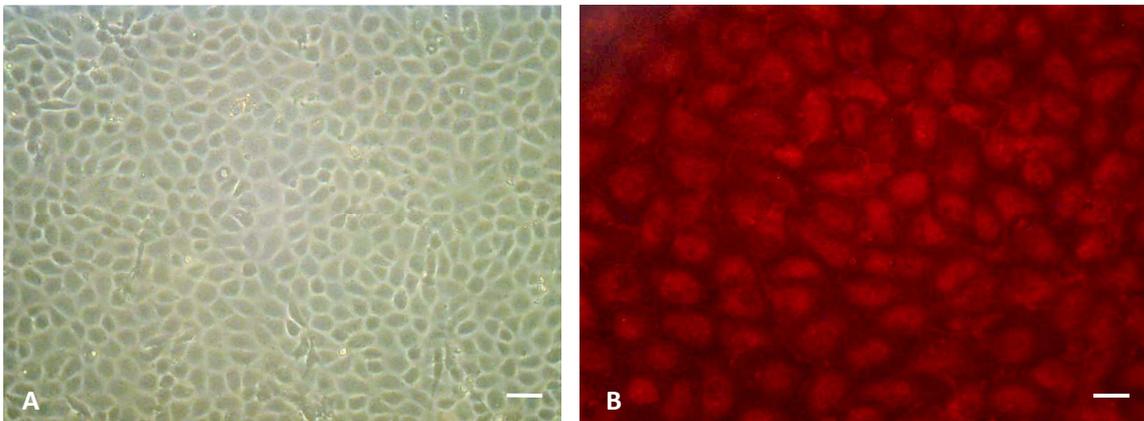


Figura 24: Imágenes características de las monocapas confluentes de BAEC utilizadas en esta tesis.

A. Contraste de fase de una monocapa de células BAEC sembrada sobre laminillas de vidrio. **B.** Inmunofluorescencia de IQGAP1. Barra: 50 μm .

A continuación se presentan las imágenes de las líneas 1 y 2; las más representativas de las siete líneas estudiadas en este trabajo. A continuación, a modo de ejemplo, se presentan las imágenes de las líneas 1 y 2.

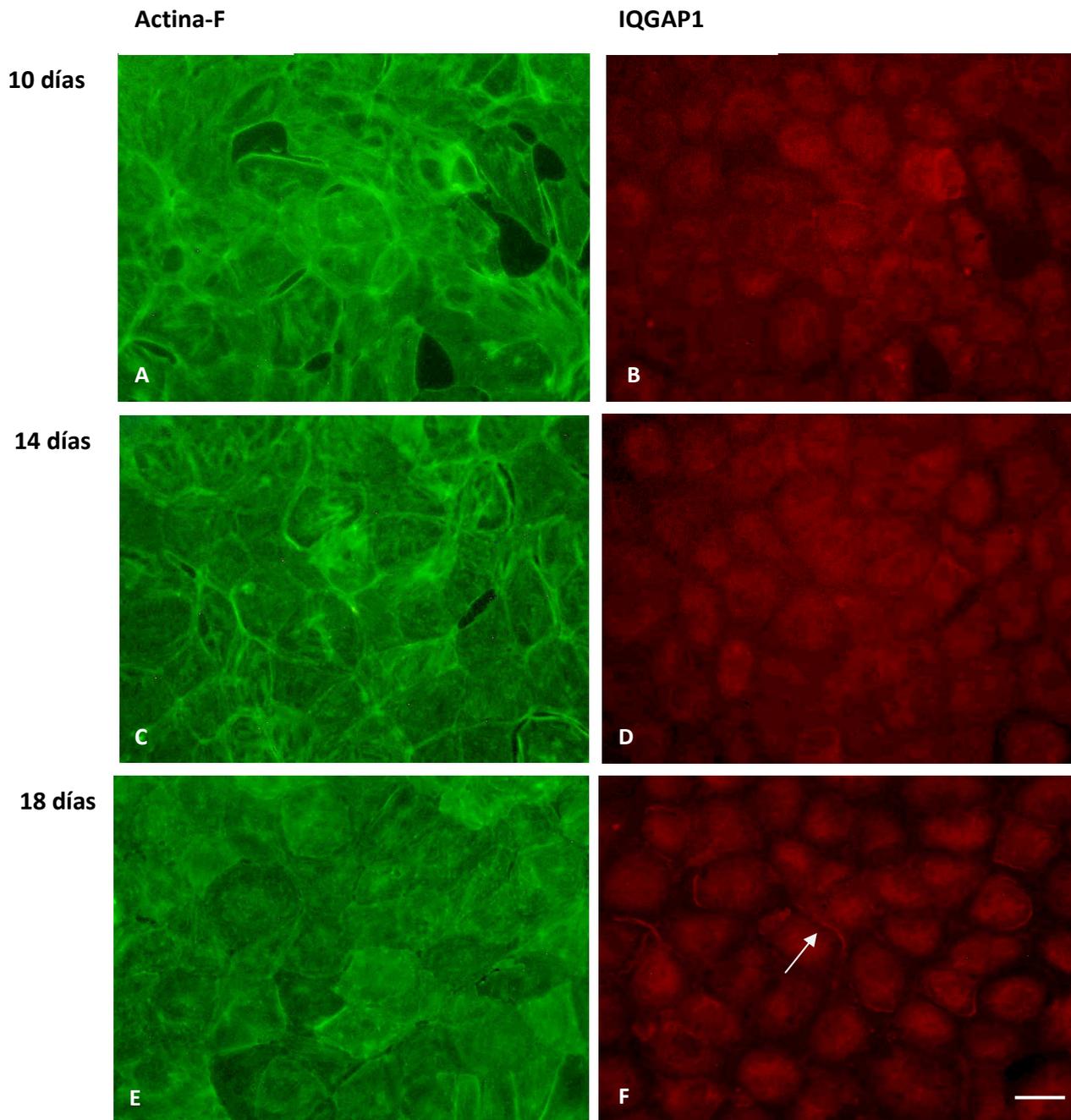


Figura 25: Curso temporal de monocapas de BAEC de la línea 1 sembradas sobre laminillas de vidrio observadas a través del Microscopio de Fluorescencia. Tinción con faloidina-FITC para visualizar la actina-F (verde) y tinción con el anticuerpo anti IQGAP1 (rojo) para visualizar IQGAP1. Las figuras A y B corresponden a 10 días de; las C y D a 14 días y las E y F a 18 días de cultivo. Nótese que a los 18 días de cultivo es posible visualizar a IQGAP1 en regiones periféricas en algunas de las células (flecha). Barra: 50 μ m.

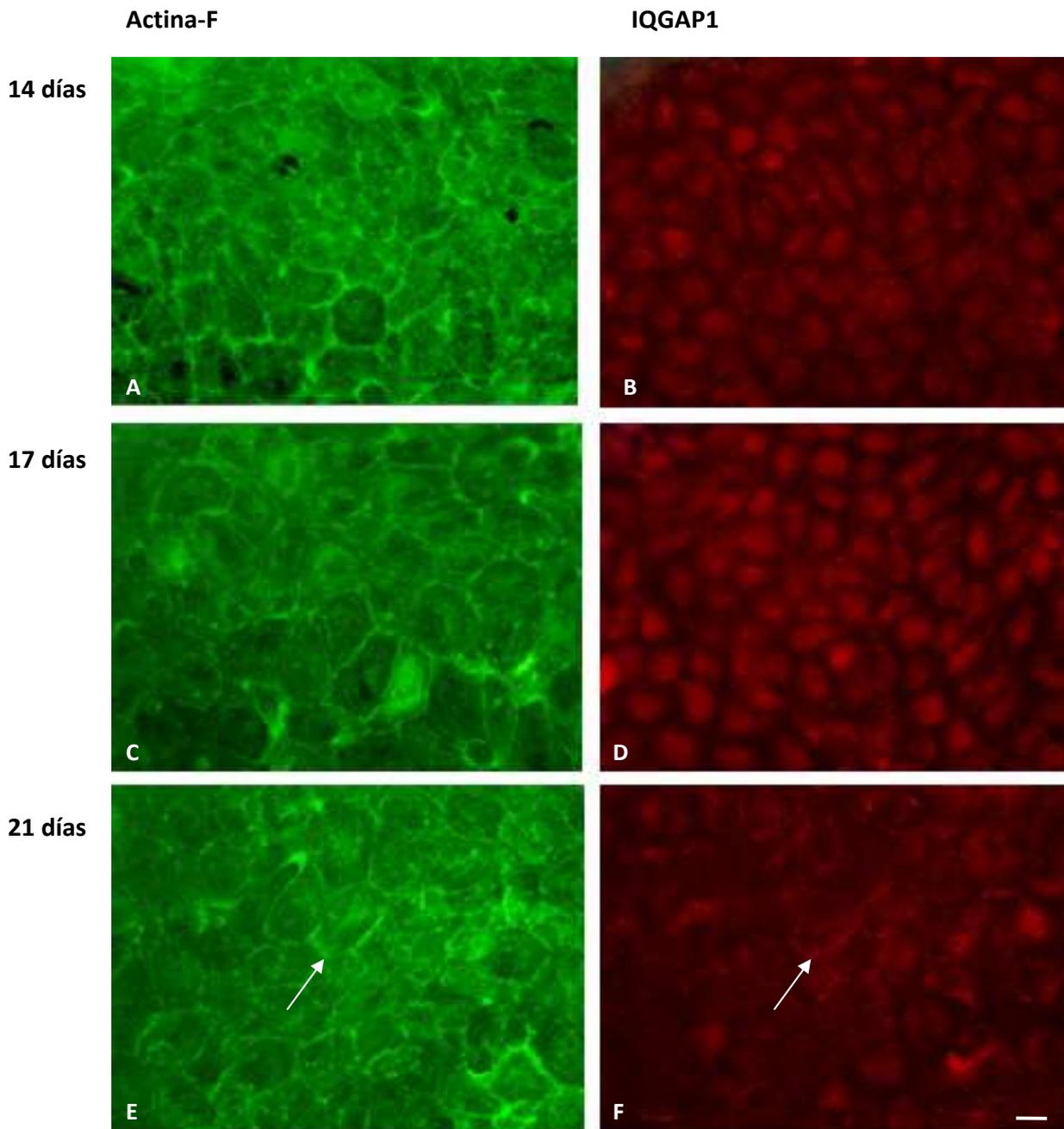


Figura 26: Curso temporal de la localización de IQGAP1 en monocapas de BAEC de la línea 2 sembradas sobre laminillas de vidrio. Tinción con faloidina-FITC para visualizar la actina-F y tinción con el anticuerpo anti IQGAP1 para visualizar IQGAP1. Las figuras A y B corresponden a 14 días de cultivo; las C y D a 17 días y las E y F a 21 días de cultivo. Nótese que a los 21 días de cultivo es posible observar IQGAP1 en la periferia celular en algunas zonas (flecha). Barra: 50 μm .

Si bien en la **Figura 25 F** y **Figura 26 F** es posible evidenciar a IQGAP1 en la periferia celular de algunas células, no fue posible observar una localización subcortical continua como la observada en MDCK y BCE. Adicionalmente, fueron estudiadas otras cinco líneas celulares donde tampoco se constató dicha localización (datos no mostrados). Una dificultad con la que nos enfrentamos fue la imposibilidad de trabajar con células con más de 21 días de cultivo, dado que pasado ese tiempo perdían por completo su adherencia al sustrato (en este caso las laminillas de vidrio). En estudios previos de nuestro laboratorio se ensayó cultivar las células BAEC sobre diferentes sustratos con el fin de observar la respuesta de las células luego de los 21 días de cultivo. Sin embargo, con ninguno de los sustratos ensayados fue posible mantener la adherencia pasados dichos días.

Posteriormente a estos estudios propusimos visualizar la localización de IQGAP1 en endotelio de aorta bovino "in toto". En este caso, fue posible constatar una localización subcortical de IQGAP1 junto con la de la actina-F. Estos resultados no se muestran en este trabajo debido a que las fotografías que tomamos no son lo suficientemente nítidas y en ese momento no contábamos con un microscopio confocal.

Localización de la β -catenina en células BAEC en cultivo

Los equipos de Rodriguez-Boulán y de Nelson obtuvieron evidencias a favor de que el primer paso en la formación de los dominios de membrana en células no polarizadas involucra la interacción celular a través de moléculas de adhesión como la E-cadherina (Rodriguez-Boulán and Nelson, 1989); (Nelson, 2003). Asimismo, el equipo de Takai y colaboradores ha constatado que el complejo nectina-afadina también se encuentra involucrado en dicho proceso (Takai et al., 2008a). Según lo indica la bibliografía, la β -catenina se encuentra unida a la E-cadherina en la membrana celular formando un complejo que, al unirse con los filamentos de actina, estabilizan las UAs (Hartsock, 2008). En esta sección del trabajo nuestro objetivo fue observar la localización de la β -catenina en células BAEC con 10 días de cultivo con el fin de constatar si las UAs se encontraban ensambladas.

Actina-F

β -catenina

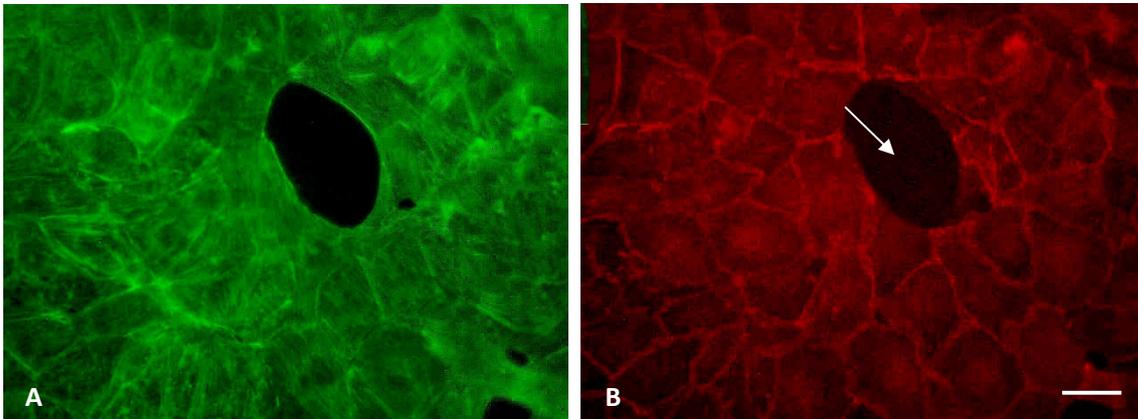


Figura 27: Localización de IQGAP1 en monocapas de BAEC sembradas sobre laminillas de vidrio observadas a través del Microscopio de Fluorescencia. Las células fueron teñidas con faloidina-FITC para visualizar la actina-F (verde) y con el anticuerpo Cy3 para visualizar la β -catenina (rojo). Barra: 20 μ m. (La flecha indica un espacio libre de células)

La **Figura 27** muestra que aun en monocapas subconfluentes la β -catenina se localiza en la membrana lateral. Este resultado sugiere que las células utilizadas para la localización de IQGAP1 las UAs se encontraban ensambladas. De esta forma, fue posible descartar la hipótesis de que la localización citoplasmática de IQGAP1 se debía a la falta de ensamblaje de las uniones celulares. El conjunto de los resultados presentado en las **Figuras 25 y 26** sugieren que, en nuestras condiciones de cultivo, la ubicación de IQGAP1 a nivel de las uniones celulares en BAEC podría ser un evento tardío, posterior a los 21 días de cultivo. Como mencionamos antes, la pérdida de la adherencia al sustrato de las células, no nos permitió estudiar la localización de IQGAP1 en monocapas de más de 21 días de cultivo.

2) Determinación de los cambios en el Potencial de Membrana

En base a los antecedentes experimentales de nuestro laboratorio descritos en la *Introducción*, el objetivo principal de este trabajo fue investigar si IQGAP1 modifica su localización celular en respuesta a las variaciones en el PMP en monocapas de MDCK, BCE y BAEC. Con el propósito de verificar si las soluciones empleadas para modificar el PMP en efecto lo modificaban, se empleó la sonda potenciométrica oxonol V cuya intensidad de fluorescencia aumenta con la despolarización del PMP y disminuye con la hiperpolarización (Lindsay Bashford et al., 1979). En las **Figuras 28-30** es posible observar que en los tres tipos celulares estudiados el tratamiento con la solución ChoCl produjo una disminución de la intensidad de fluorescencia lo cual sugiere una hiperpolarización, mientras que con la solución de KGI_n se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia, consistente con una despolarización.

Células MDCK

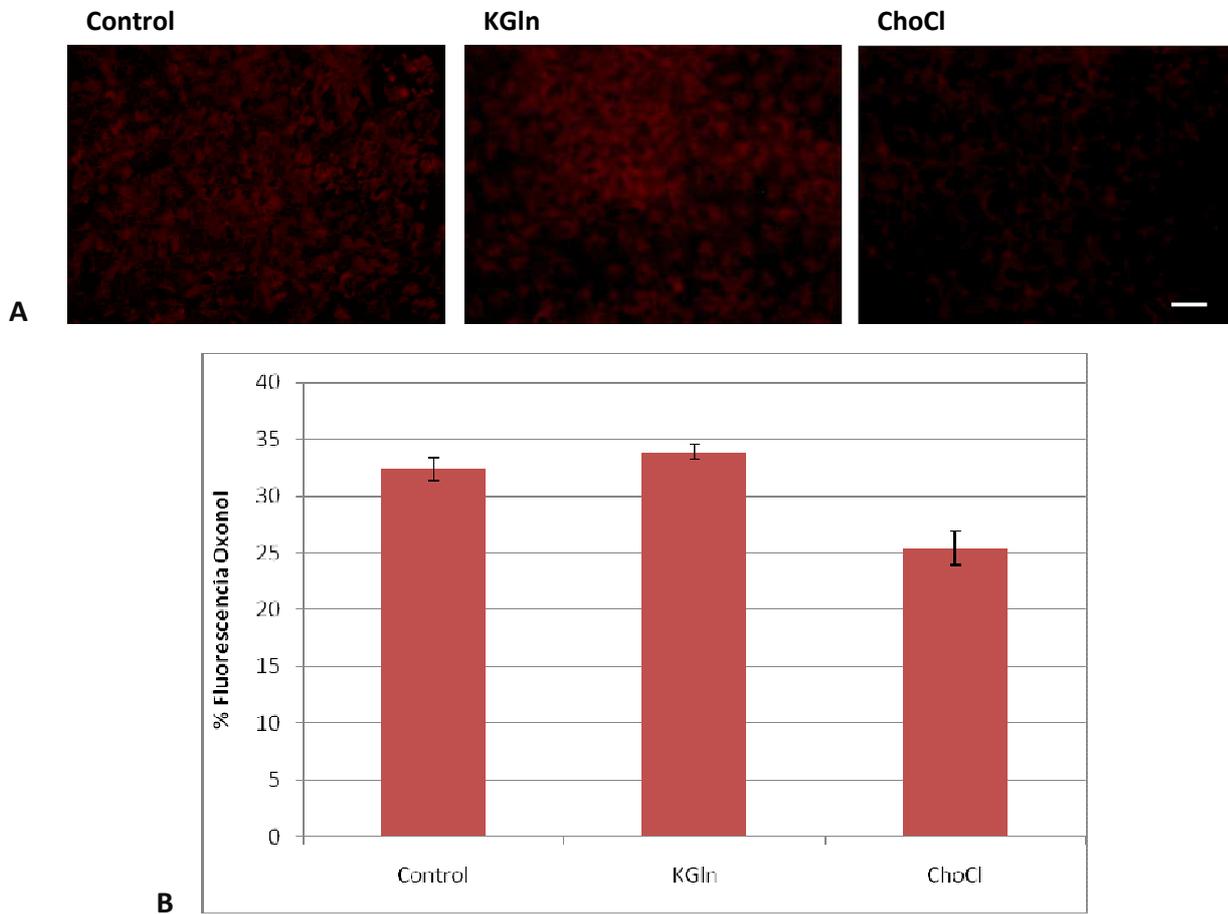


Figura 28: Modificaciones en la intensidad de la fluorescencia de oxonol de monocapas confluentes de células MDCK provocadas por las soluciones de KGI_n y ChoCl. Las monocapas de células BCE se incubaron 30 min en presencia de oxonol V 4.2 μ M en las soluciones correspondientes (control, KGI_n y ChoCl). **A.** Fluorescencia de oxonol V. Barra: 50 μ m. **B.** El gráfico muestra el porcentaje de variación de la intensidad de fluorescencia de oxonol V para cada condición experimental (promedio \pm desvío estándar).

Células BCE

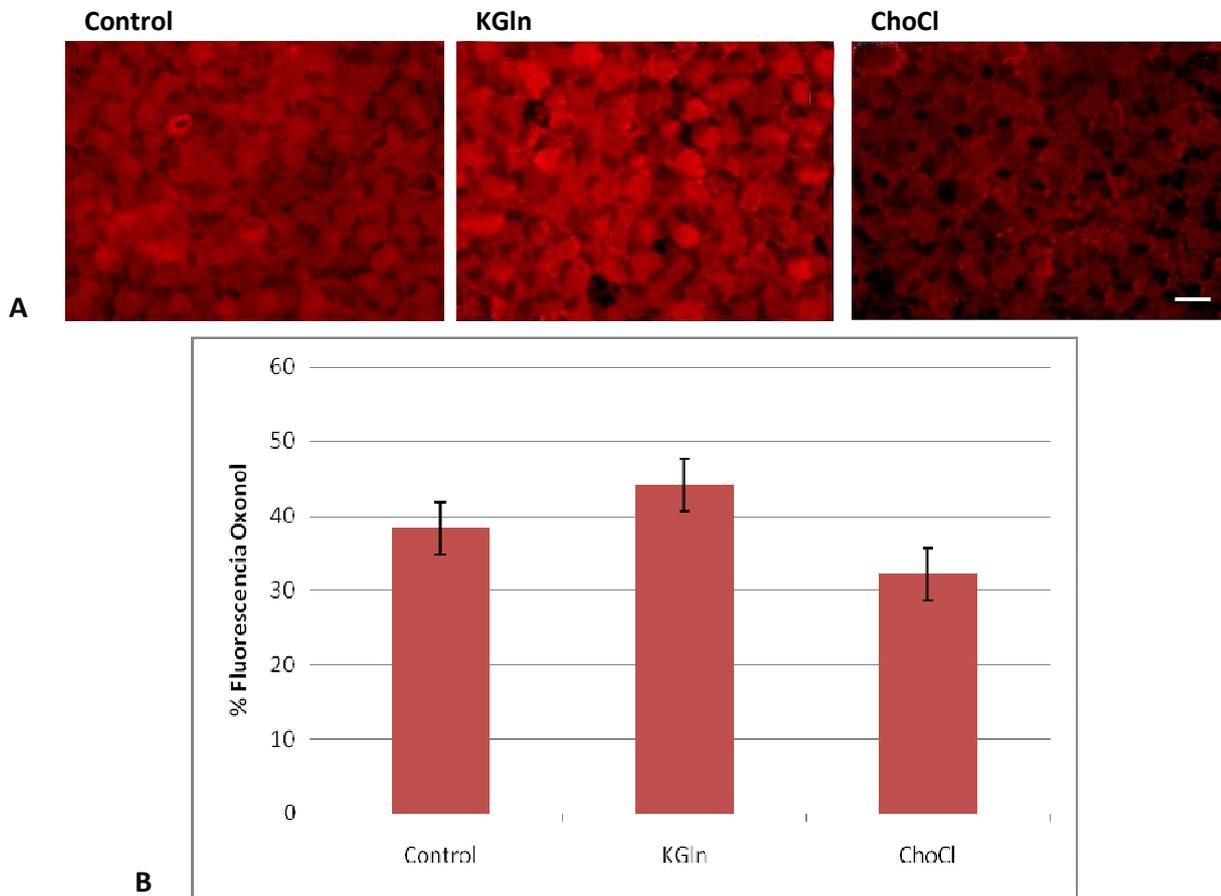


Figura 29: Modificaciones en la intensidad de la fluorescencia de oxonol de monocapas confluentes de células BCE provocadas por las soluciones de KGln y ChoCl. Las monocapas de células BCE se incubaron 30 min en presencia de oxonol V 4.2 μ M las soluciones correspondientes (control, KGln y ChoCl). **A.** Fluorescencia de oxonol V. Barra: 50 μ m. **B.** El gráfico muestra el porcentaje de variación de la intensidad de fluorescencia de oxonol V para cada condición experimental (promedio \pm desvío estándar).

Células BAEC

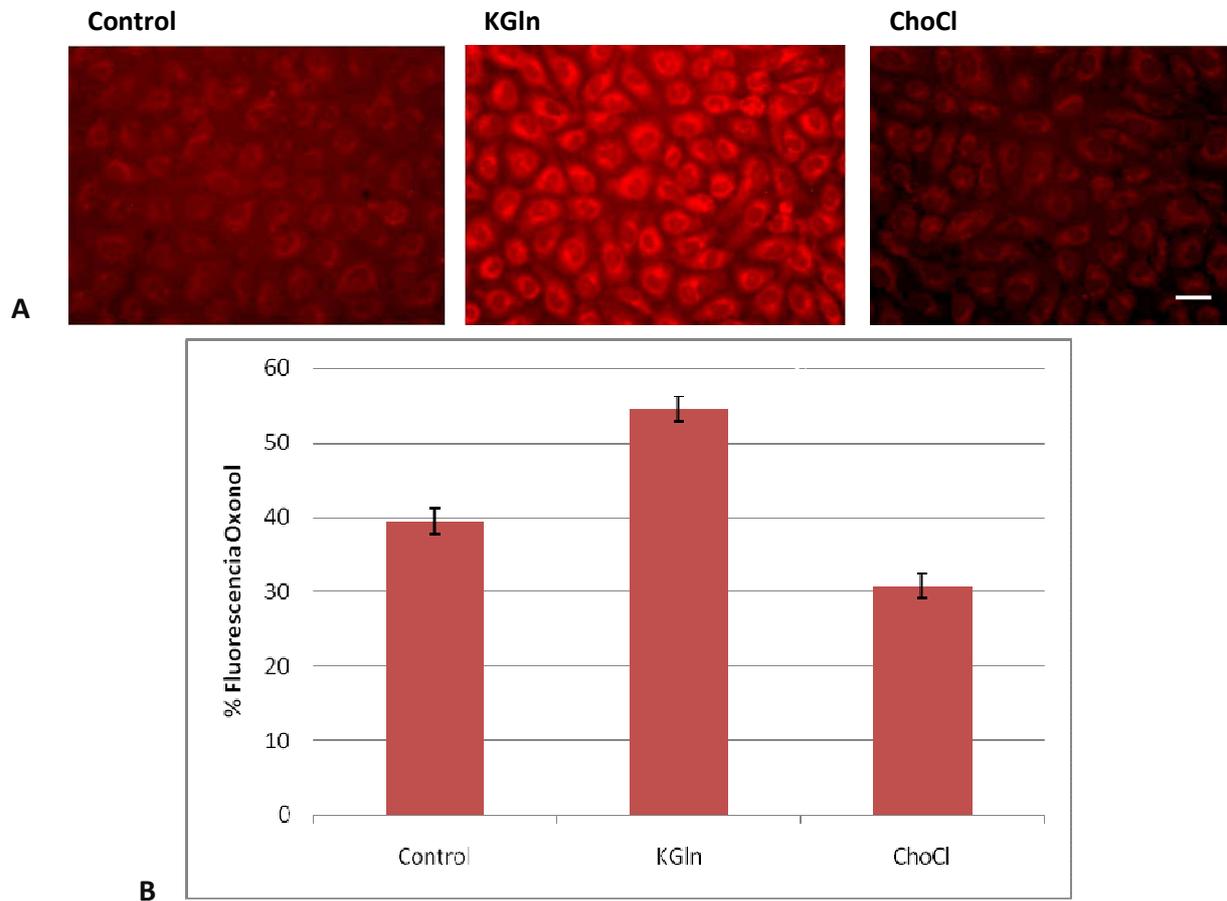


Figura 30: Modificaciones en la intensidad de la fluorescencia de oxonol de monocapas confluentes de células BAEC provocadas por las soluciones de KGlN y ChoCl. Las monocapas de células BCE se incubaron 30 min en presencia de oxonol V 4.2 μ M las soluciones correspondientes (control, KGlN y ChoCl). **A.** Fluorescencia de oxonol V. Barra: 50 μ m. **B.** El gráfico muestra el porcentaje de variación de la intensidad de fluorescencia de oxonol V para cada condición experimental (promedio \pm desvío estándar).

3) Efectos provocados por los cambios en el Potencial de Membrana

Durante varios años nuestro grupo de investigación ha contribuido en el estudio de los efectos los cambios en el potencial de membrana sobre la organización del citoesqueleto (Chifflet et al., 2003; Chifflet et al., 2004; Nin et al., 2009). Entre otros hallazgos, se encontró que la compactación de la actina periférica provocada por la hiperpolarización del PMP contribuye a que las uniones célula-célula sean más estables (Nin et al., 2009), mientras que una depolarización provoca una reubicación de la actina periférica hacia el centro de la célula, proceso que induce una disrupción celular importante en células BCE (Chifflet et al., 2003). Ha sido descrito que para conseguir los cambios en el citoesqueleto en respuesta a la depolarización del PMP la disposición de la actina debe ser periférica y las uniones adherentes deben de estar bien formadas (Chifflet et al., 2004; Nin et al., 2009).

Los efectos de los cambios de potencial de membrana sobre IQGAP1 fueron estudiados en monocapas confluentes de células MDCK, BCE y BAEC y los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Células MDCK

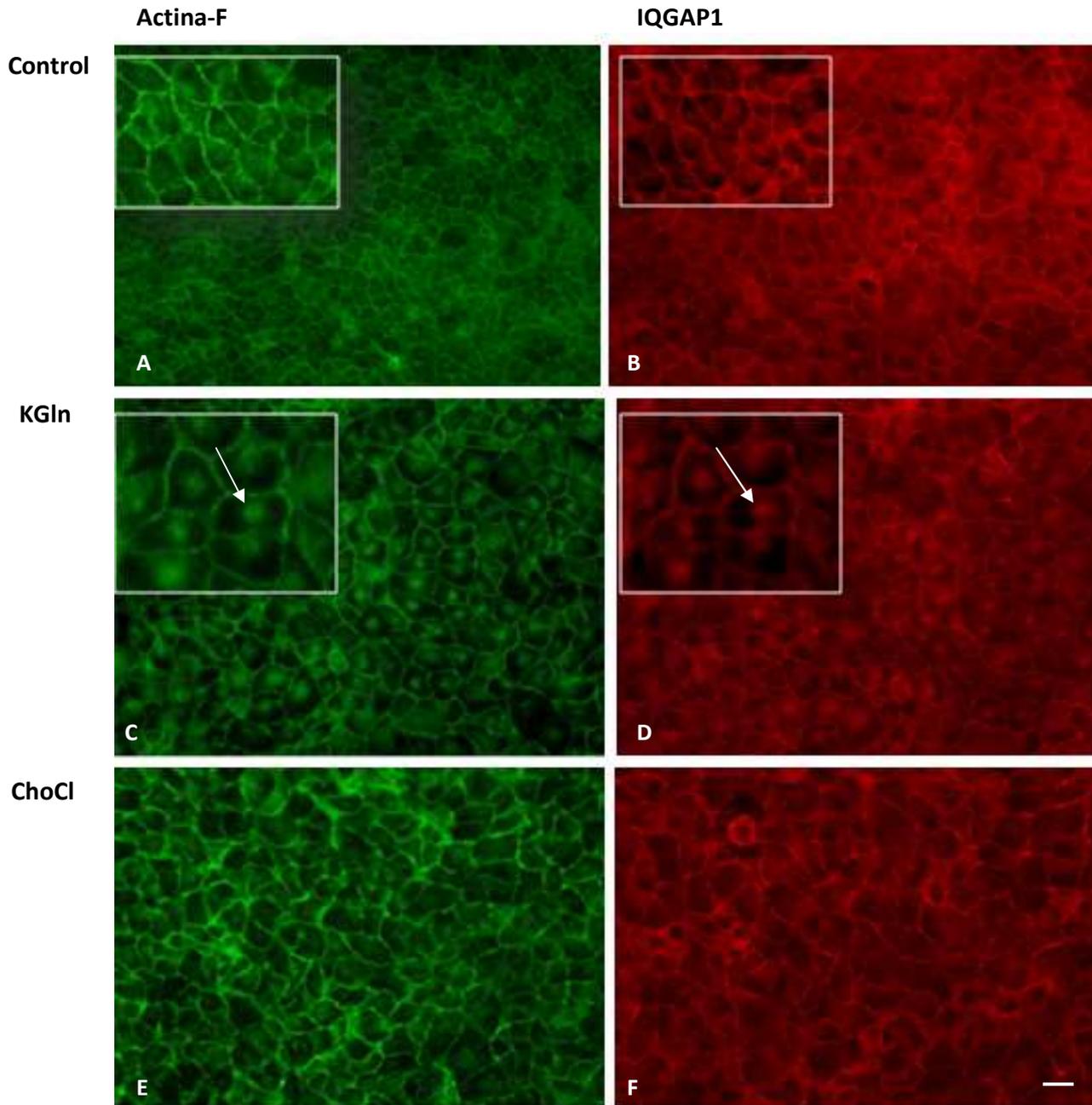


Figura 31: Respuesta del citoesqueleto de actina y de la IQGAP1 a los cambios de PMP en células MDCK. Monocapas confluentes de MDCK con 11 días de cultivo, incubadas en la solución control (A) y (B), en la solución despolarizante (C) y (D) y en la hiperpolarizante (E) y (F) y teñidas para visualizar la actina-F e IQGAP1. Barra: 50 μ m.

Como se observa en la **Figura 31 A y B**, en las células MDCK tratadas con la solución control, la actina-F al igual que IQGAP1 poseían una localización periférica. En respuesta al tratamiento con KGIIn ambas proteínas sufrieron una relocalización al centro de la célula, como se puede evidenciar en la **Figura 31 C y D**. Contrario a lo que sucede en BAEC y en BCE (como se muestra más adelante), las MDCK no mostraron ni una retracción del citoesqueleto de actina ni tampoco se observó una pérdida de las uniones celulares frente a una despolarización de la membrana plasmática. En las **Figura 31 E y F** no se aprecian cambios aparentes significativos por parte de la actina-F ni de IQGAP1 frente al tratamiento hiperpolarizante con ChoCl.

Células BCE

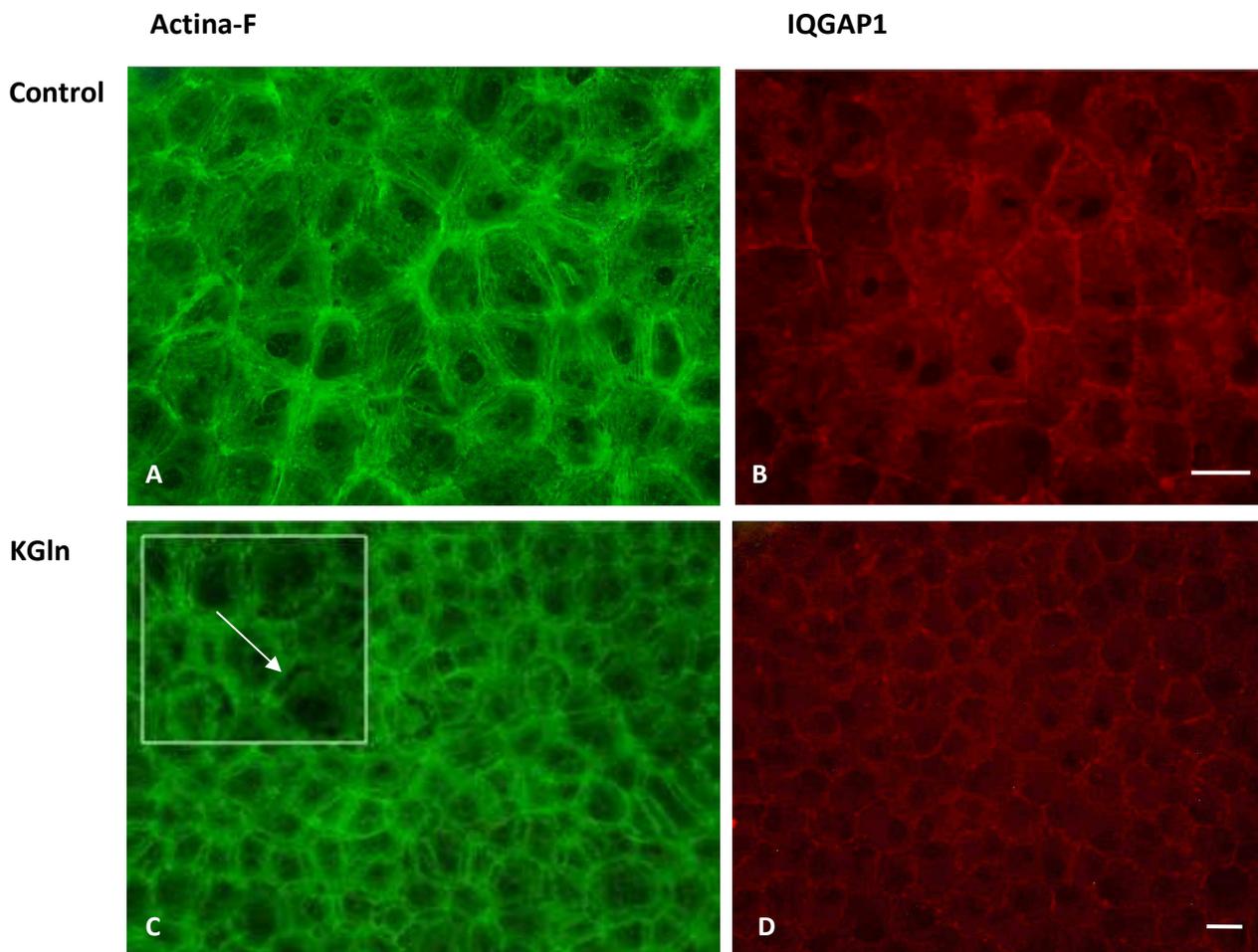


Figura 32: Respuesta del citoesqueleto de actina y de la IQGAP1 a los cambios de PMP en células BCE. Monocapas confluentes de BCE con 12 días de cultivo, incubadas en la solución control (A) y (B) Barra: 20 μm y en la solución despolarizante (C) y (D) y teñidas para visualizar la actina-F e IQGAP1. Barra: 50 μm . La flecha indica el incremento de los espacios intercelulares en el citoesqueleto de actina provocado por el tratamiento con KGl.

En las células BCE con 12 días de cultivo tratadas con la solución control, fue posible observar, que la actina-F desplegaba su morfología típica en la periferia celular a la altura de las UAs y que IQGAP1 se encontraba siguiendo a la actina-F en un anillo circunferencial. Por otro lado, el tratamiento con la solución despolarizante puso en evidencia la existencia de una retracción de los filamentos de actina, mientras que IQGAP1 mantiene su ubicación periférica sin percibirse cambios notables aparentes, tal como lo muestra la **Figura 32 B y C**. El tratamiento hiperpolarizante no fue posible llevarlo a cabo en estas células por razones metodológicas.

Células BAEC

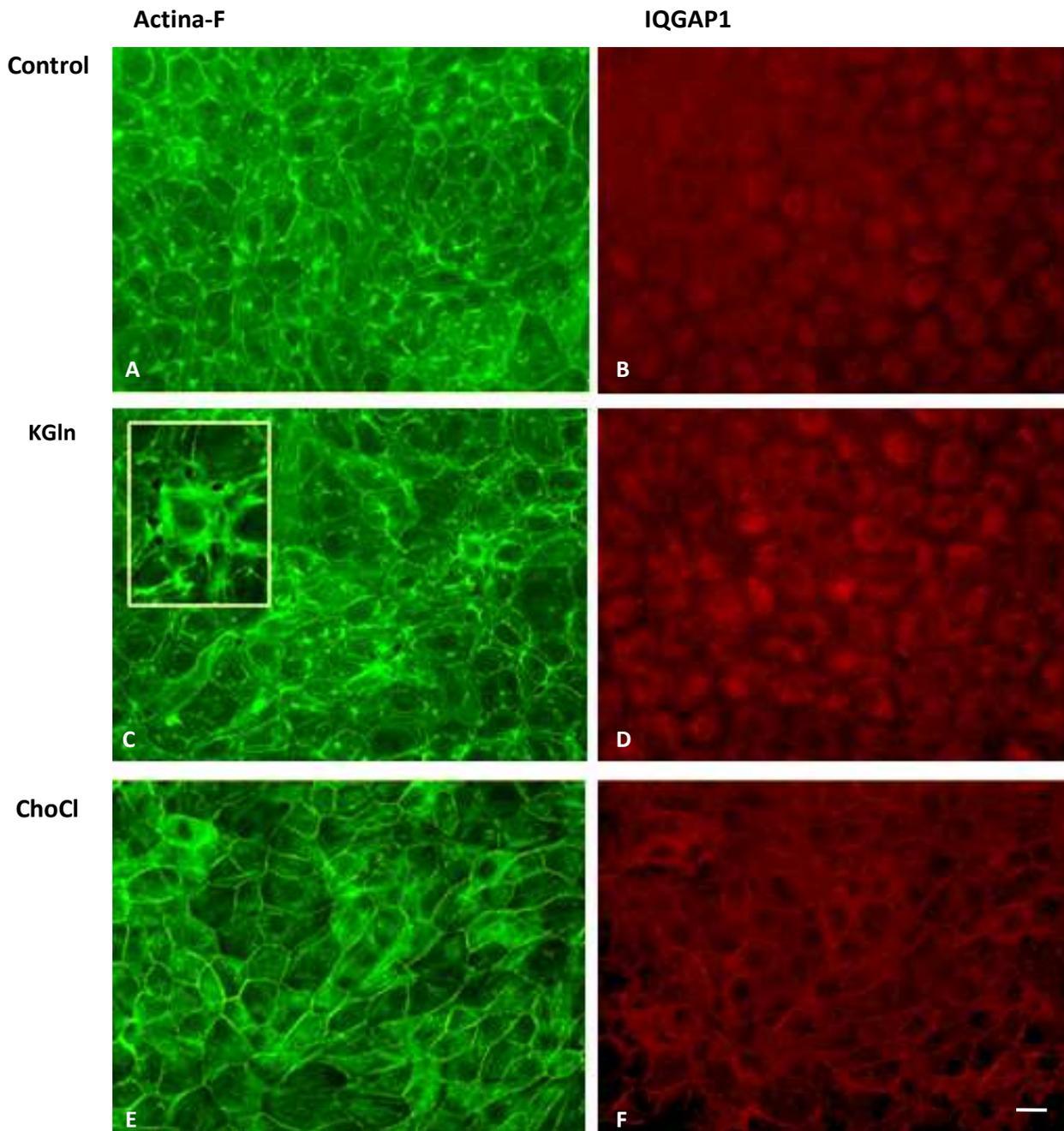


Figura 33: Respuesta del citoesqueleto de actina y de la IQGAP1 a los cambios de PMP en células BAEC. Monocapas confluentes de BAEC con 16 días de cultivo, incubadas en la solución control (A) y (B), en la solución despolarizante (C) y (D) y en la hiperpolarizante (E) y (F) y teñidas para visualizar la actina-F e IQGAP1. Barra: 50 μ m.

En el tratamiento con la solución control en células BAEC con 16 días de cultivo se observó que la actina-F se encontraba periférica, mientras que IQGAP1 poseía una ubicación citoplasmática, como se observa en la **Figura 33 A y B**. Por otro lado, la solución despolarizante condujo a una redistribución de los filamentos de actina asociados a las uniones adherentes hacia el interior celular, lo cual resultó en la pérdida de los contactos intracelulares (**Figura 33 C**). Se observó también que IQGAP1 no sufrió ninguna modificación frente a este tratamiento, como lo evidencia la **Figura 33 D**. Por último, el tratamiento con la solución hiperpolarizante provocó una movilización de los filamentos de actina hacia la periferia celular. En la **Figura 33 E** se puede observar que el anillo de actina periférico pasó a ser más intenso y se encontró mejor delimitado en las monocapas hiperpolarizadas en relación a las monocapas control. IQGAP a su vez mostró un notable cambio en su localización al volverse completamente periférica.

Recientemente en nuestro laboratorio, la Mg. Frances Evans realizó experimentos con otro agente hiperpolarizante, la valinomicina. La valinomicina es un ionóforo selectivo para el potasio, y por lo tanto provoca hiperpolarización por un mecanismo distinto al del ChoCl. Es interesante destacar que con el tratamiento con valinomicina se obtuvieron los mismos resultados que los reportados aquí con ChoCl, sugiriendo que la relocalización de IQGAP1 es en efecto debida a una hiperpolarización y no a un efecto propio del ChoCl.

4) Estudio de la expresión de IQGAP1 en las fracciones solubles e insolubles a la extracción con Tritón X-100 de células MDCK y BAEC

El fraccionamiento realizado utilizando el detergente no iónico Tritón X-100 ha sido ampliamente utilizado en estudios de biología celular y bioquímica en virtud de que preserva la integridad del citoesqueleto (Ramsby and Makowski, 2005). Dicha técnica consiste en la separación de la fracción celular insoluble a dicho tratamiento, constituida fundamentalmente por el citoesqueleto y sus proteínas asociadas y otros componentes celulares como los lipis rafts (Hooper, 1999), de la soluble correspondiente principalmente a aquellas proteínas que se encuentran libres en el citosol.

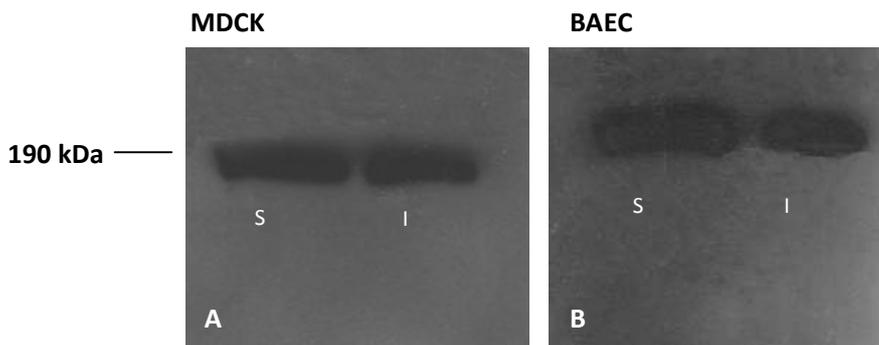


Figura 35: Western Blot de IQGAP1 en las fracciones solubles (S) e insolubles (I) de células confluentes. (A) células MDCK. (B) células BAEC.

Los resultados muestran que en células MDCK, IQGAP1 se encuentra en proporciones aproximadamente iguales en la fracción soluble e insoluble de las células. Por el contrario, en células BAEC se observa mayor cantidad de IQGAP1 en la fracción soluble. Este resultado se discutirá con más detalle en la sección siguiente.

Conclusiones y Discusión

Diversos estudios han demostrado que, tanto las células excitables como las no excitables, poseen la capacidad de generar y de responder a señales eléctricas (Olivotto et al., 1996; Levin, 2009). Por ejemplo, en trabajos anteriores de nuestro laboratorio realizados sobre monocapas confluentes de diferentes epitelios en cultivo, se observó una remodelación en el citoesqueleto cuando las células fueron sometidas a variaciones en el PMP (Chifflet et al., 2004; Chifflet et al., 2005a; Chifflet et al., 2003; Nin et al., 2009).

Este trabajo de tesis se centró en la posible vinculación de IQGAP1 en la remodelación del citoesqueleto de actina frente a modificaciones inespecíficas del PMP en tres líneas celulares: MDCK, BCE y BAEC. La proteína de andamiaje IQGAP1 es esencial para las células, ya que coordina varias vías de señalización. La misma posee múltiples dominios a través de los cuales regula eventos celulares tales como la polimerización de la actina-F (Malarkannan et al., 2012), entre otros. Hemos planteado el estudio de IQGAP1 debido a que, por su interacción con la actina-F (Bensenor et al., 2007); (White et al., 2012), podría actuar como una proteína intermediaria entre los cambios en el PMP y la reorganización que sufre la actina-F frente a los mismos.

Localización de IQGAP1 en células en cultivo

Los trabajos pioneros realizados por el equipo de Bloom y colaboradores mostraron que, en células de mamífero en cultivo, como por ejemplo: MDCK, NIH3T3 (fibroblastos de ratón), NRK (células normales de riñón de rata) y CV-1 (una línea celular procedente de los simios), IQGAP1 se localiza *in vitro* en estructuras específicas del citoesqueleto de actina (Bashour et al., 1997). Dichas estructuras son principalmente los ruffles de membrana, los cuales comprenden sitios que contiene filamentos de actina recién polimerizados. Asimismo, se ha determinado que en células epiteliales polarizadas, IQGAP1 se encuentra en los sitios de contacto célula-célula de las UAs junto con la β -catenina y E-cadherina (Noritake et al., 2004). Adicionalmente, fue visualizada en regiones del citoplasma celular como el retículo endoplasmático (Rittmeyer et al., 2008) y la membrana del aparato de Golgi (McCallum et al., 1998) así como también en la envoltura nuclear (Johnson and Henderson, 2012). Por otro lado, el equipo de Yamaoka-Tojo y colaboradores mostraron que IQGAP1 en el frente de migración de células endoteliales en cultivo (Yamaoka-Tojo et al., 2004).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que, tanto en células MDCK como en BCE, IQGAP1 posee una localización subcortical, como la que presentan los filamentos de actina. Contrario a esto, IQGAP1 fue visualizada únicamente en el citoplasma celular en todas las líneas de BAEC estudiadas. En apoyo a este hallazgo, existen algunos trabajos de investigación en los cuales IQGAP1 se constata en la región citoplásmica perinuclear en células de endotelio vascular en cultivo. A su vez, dichos trabajos resultan muy interesantes debido a que describen que IQGAP1 modifica su localización hacia la periferia celular en diferentes situaciones experimentales, como se comenta a continuación. El equipo de Berdyshev y colaboradores demostró que, mediante la adición exógena de S1P (sphingosine-1-phosphate) así como a través de la inhibición de la proteína S1PL (S1P liasa) responsable de la regulación de la acumulación de SP1 intracelular, es posible inducir un cambio en localización de Rac1 e IQGAP1 hacia la periferia celular (Berdyshev et al., 2011). Otros estudios llevados a cabo por el equipo de Usatyuk pusieron de manifiesto que, cuando la célula se encuentra condiciones de hiperoxia, se provoca la traslocación de IQGAP1 hacia la membrana plasmática así como también un aumento en la interacción de IQGAP1 con Rac1 (Usatyuk et al., 2009).

Mediante la observación de la β catenina, la cual fue constatada en la membrana plasmática lateral, fue posible confirmar que las UAs se encontraban ensambladas a los 10 días de cultivo. Sin embargo, es probable que las uniones no contaran con la madurez ni estabilidad suficiente como para reclutar a IQGAP1 a la periferia celular, por lo que nos planteamos la observación de IQGAP1 en células BAEC a diferentes días de cultivo. Como se muestra en las **Figuras 25 E y F y 26 E y F**, IQGAP1 se visualizó mayormente en el citoplasma tanto a los 18 como a los 21 días de cultivo respectivamente, aunque en algunas regiones existen evidencias de dicha proteína subyacente a la membrana plasmática. Si bien por motivos técnicos no fue posible realizar experiencias con células con más de 21 días de cultivo (dado que las mismas se desprendían del sustrato), este resultado nos lleva a suponer que pasados los 21 días de cultivo IQGAP1 podría adquirir una localización subcortical.

Efectos de los cambios de PMP sobre la actina-F e IQGAP1

Según lo indica la bibliografía, las variaciones en el PMP podrían jugar un rol en el proceso de señalización celular (Olivotto et al., 1996; Hernandez et al. 1998) así como también podrían estar involucrados en el mantenimiento de la estructura celular (Chifflet et al., 2003), al igual que en otros fenómenos celulares.

Por un lado, mediante los experimentos realizados fue posible constatar que el cinturón de actina-F asociado a las UAs en monocapas confluentes de células MDCK, BCE y BAEC en cultivo es sensible a los cambios de potencial de membrana como fuera descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio en el 2003, 2004 y 2009. Durante el proceso de despolarización, en las células MDCK la actina-F se visualizó concentrada en el centro de la célula mientras que en BCE y BAEC se vieron incrementados los espacios intercelulares, tal como fue descrito previamente (Chifflet et al., 2003). En células BAEC la hiperpolarización provocó una redistribución de los filamentos de actina hacia la membrana plasmática, de manera análoga de lo que fuera reportado para las células BCE (Nin et al., 2009). En células MDCK dicho fenómeno no fue perceptible debido a que la actina-F se encontraba muy compactada en la periferia celular.

Por otro lado, mediante el tratamiento despolarizante fue posible observar que, en células MDCK en cultivo, IQGAP1 formaba conglomerados en el centro de la célula adoptando la misma localización observada en los filamentos de actina. A su vez, tanto en células BCE como en BAEC, IQGAP1 no sufrió modificaciones notorias frente a este tratamiento. En el caso de las células BCE, IQGAP1 mantuvo su localización periférica, contrario a lo que sucedió con los filamentos de actina, los cuales sufrieron una importante remodelación. Asimismo, las células BAEC mantuvieron su localización citoplasmática. Sin embargo, mediante el tratamiento de hiperpolarización realizado en dichas células se visualizó una notable traslocación de IQGAP1 hacia la periferia celular, la cual adoptó la misma localización que la actina-F. Debido a que la magnitud del campo eléctrico decrece fuertemente con la distancia, por lo que las proteínas adyacentes al núcleo celular no son afectadas por el campo eléctrico de la membrana plasmática. Este resultado es novedoso dado que estaría sugiriendo que es posible posicionar a IQGAP1 subyacente a la membrana plasmática al realizar cambios en el PMP. A su vez, estaría sugiriendo que podría existir una proteína intermediaria que transmita a IQGAP1 las señales de modificación en el PMP.

Si bien en esta tesis se exploraron únicamente los efectos de la solución de ChoCl, como se mencionara en Resultados, la Mag. Frances Evans obtuvo los mismo efectos al utilizar la valinomicina como agente hiperpolarizante. Este conjunto de hallazgos estaría indicando que IQGAP1 adopta una localización periférica frente a un estímulo hiperpolarizante independientemente del agente y mecanismo de hiperpolarización utilizado.

A través de los resultados obtenidos en este trabajo fue posible determinar que IQGAP1 respondió de manera diferente a los cambios de PMP, dependiendo de la localización que poseía en cada línea celular.

En su conjunto, con estos hallazgos iniciales no es posible afirmar que exista una vinculación de IQGAP1 en la remodelación del citoesqueleto de actina frente a los cambios del PMP, pero sí sugieren que la localización de IQGAP1 se ve afectada por dichos cambios en algunos tipos celulares.

Estudio de la extracción con detergentes de IQGAP1 de células MDCK y BAEC

Mediante la técnica de Western Blot se estudió la distribución de IQGAP1 en las fracciones solubles e insolubles de una extracción con Tritón X-100 de monocapas confluentes de células MDCK y BAEC.

En células MDCK se encontró que existe una proporción proteica similar en las fracciones solubles e insolubles en Tritón X-100. Contrario a esto, en células BAEC el bot reveló una mayor proporción de IQGAP1 en la fracción soluble en Tritón X-100. Este resultado sugiere que en BAEC IQGAP1 podría tener una menor asociación al citoesqueleto que en MDCK.

Perspectivas

Por motivos de tiempo no me fue posible completar los estudios necesarios para concluir si IQGAP1 participa de las respuestas a las modificaciones inespecíficas del PMP. Algunos de los estudios que deberían completarse para estos efectos son:

1. Emplear otros agentes hiperpolarizantes y despolarizantes inespecíficos del PMP con el propósito de verificar si los cambios en la localización de IQGAP1 observados obedecen a cambios en el potencial de membrana o a efectos propios de las soluciones utilizadas en este trabajo para provocar dichos cambios.
2. Realizar el estudio de la de IQGAP1 en las fracciones solubles e insolubles en Tritón X-100 en monocapas confluentes de BCE.
3. Estudiar la expresión de IQGAP1 en las fracciones solubles e insolubles en Tritón X-100 en monocapas confluentes de MDCK, BCE y BAEC sometidas a cambios en el PMP con el fin de observar si existen cambios en las proporciones proteicas y así correlacionar los resultados con aquellos obtenidos mediante la inmunofluorescencia.

De encontrarse que en efecto la localización de IQGAP1 se modifica con los cambios en el PMP, tendríamos un nuevo elemento a estudiar para lograr comprender las respuestas celulares a los cambios en el potencial de membrana plasmática.

Bibliografía

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. 3a Edición. Adhesión celular, uniones celulares y matriz extracelular., Cap 19. 1018-1079 pp.
- Barth, L.G., and Barth, L.J. (1974). Ionic regulation of embryonic induction and cell differentiation in *Rana pipiens*. *Dev Biol* 39, 1-22.
- Bashour, A.M., Fullerton, A.T., Hart, M.J., and Bloom, G.S. (1997). IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. *J Cell Biol* 137, 1555-1566.
- Baum, B., and Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* 192, 907-917.
- Bensor, L.B., Kan, H.M., Wang, N., Wallrabe, H., Davidson, L.A., Cai, Y., Schafer, D.A., and Bloom, G.S. (2007). IQGAP1 regulates cell motility by linking growth factor signaling to actin assembly. *J Cell Sci* 120, 658-669.
- Berdyshev, E.V., Gorshkova, I., Usatyuk, P., Kalari, S., Zhao, Y., Pyne, N.J., Pyne, S., Sabbadini, R.A., Garcia, J.G., and Natarajan, V. (2011). Intracellular S1P generation is essential for S1P-induced motility of human lung endothelial cells: role of sphingosine kinase 1 and S1P lyase. *PLoS One* 6, e16571.
- Braga, V.M. (2002). Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol* 14, 546-556.
- Brandt, D.T., and Grosse, R. (2007). Get to grips: steering local actin dynamics with IQGAPs. *EMBO Rep* 8, 1019-1023.
- Brasch, J., Harrison, O.J., Honig, B., and Shapiro, L. (2012). Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol* 22, 299-310.
- Briggs, M.W., and Sacks, D.B. (2003). IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep* 4, 571-574.
- Brocardo, M., and Henderson, B.R. (2008). APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond. *Trends Cell Biol* 18, 587-596.
- Brown, M.D., and Sacks, D.B. (2006). IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol* 16, 242-249.
- Chifflet, S., Correa, V., Nin, V., Justet, C., and Hernandez, J.A. (2004). Effect of membrane potential depolarization on the organization of the actin cytoskeleton of eye epithelia. The role of adherens junctions. *Exp Eye Res* 79, 769-777.

- Chifflet, S., Hernandez, J.A., and Grasso, S. (2005a). A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C1420-1430.
- Chifflet, S., Hernández, J.A., and Grasso, S. (2005b). A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 288, C1420-C1430.
- Chifflet, S., Hernandez, J.A., Grasso, S., and Cirillo, A. (2003). Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture. *Exp Cell Res* 282, 1-13.
- Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R., and Rodriguez-Boulan, E. (2008). Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* 452, 719-723.
- Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N.B., Meller, N., Hahn, K.M., and Schwartz, M.A. (2002). Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* 4, 232-239.
- Dunbar, L.A., and Caplan, M.J. (2001). Ion pumps in polarized cells: sorting and regulation of the Na⁺, K⁺ and H⁺, K⁺-ATPases. *J Biol Chem* 276, 29617-29620.
- Fawcett, D.W., Bloom, W., and Madero, S. (1995). *Tratado de histología* (Interamericana McGraw-Hill).
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., and Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* 109, 873-885.
- Giepmans, B.N., and van Ijzendoorn, S.C. (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1788, 820-831.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., and Zocchi, L. (2006). *Fisiologia medica* (Elsevier).
- Harris, T.J., and Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 502-514.
- Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778, 660-669.
- Haustein, V., and Schumacher, U. (2012). A dynamic model for tumour growth and metastasis formation. *J Clin Bioinforma* 2, 11.
- Hooper, N.M. (1999). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol Membr Biol* 16, 145-156.
- Ivanov, A.I. (2008). Actin motors that drive formation and disassembly of epithelial apical junctions. *Front Biosci* 13, 6662-6681.

- Ivanov, D., Kaeschel, J., Sokolov, B., and Arkhipov, A. (2006). A Conceptual Framework for Modeling Complex Adaptation of Collaborative Networks
Network-Centric Collaboration and Supporting Frameworks. In (Springer Boston), pp. 15-22.
- Jadeski, L., Mataraza, J.M., Jeong, H.W., Li, Z., and Sacks, D.B. (2008). IQGAP1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of human breast epithelial cells. *J Biol Chem* **283**, 1008-1017.
- Jaulin, F., Xue, X., Rodriguez-Boulan, E., and Kreitzer, G. (2007). Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells. *Dev Cell* **13**, 511-522.
- Johnson, M., Sharma, M., Brocardo, M.G., and Henderson, B.R. (2011). IQGAP1 translocates to the nucleus in early S-phase and contributes to cell cycle progression after DNA replication arrest. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 65-73.
- Johnson, M., Sharma, M., and Henderson, B.R. (2009). IQGAP1 regulation and roles in cancer. *Cell Signal* **21**, 1471-1478.
- Johnson, M.A., and Henderson, B.R. (2012). The scaffolding protein IQGAP1 co-localizes with actin at the cytoplasmic face of the nuclear envelope: implications for cytoskeletal regulation. *BioArchitecture* **2**, 138-142.
- Katata, T., Irie, K., Fukuhara, A., Kawakatsu, T., Yamada, A., Shimizu, K., and Takai, Y. (2003). Involvement of nectin in the localization of IQGAP1 at the cell-cell adhesion sites through the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Oncogene* **22**, 2097-2109.
- Konig, S., Hinard, V., Arnaudeau, S., Holzer, N., Potter, G., Bader, C.R., and Bernheim, L. (2004). Membrane Hyperpolarization Triggers Myogenin and Myocyte Enhancer Factor-2 Expression during Human Myoblast Differentiation. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 28187-28196.
- Kreitzer, G., Schmoranzer, J., Low, S.H., Li, X., Gan, Y., Weimbs, T., Simon, S.M., and Rodriguez-Boulan, E. (2003). Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells. *Nat Cell Biol* **5**, 126-136.
- Kurita, S., Ogita, H., and Takai, Y. (2011). Cooperative Role of Nectin-Nectin and Nectin-Afadin Interactions in Formation of Nectin-based Cell-Cell Adhesion. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 36297-36303.
- Kurokawa, K., Itoh, R.E., Yoshizaki, H., Nakamura, Y.O., and Matsuda, M. (2004). Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol Biol Cell* **15**, 1003-1010.
- Lajoie, P., Goetz, J.G., Dennis, J.W., and Nabi, I.R. (2009). Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology* **185**, 381-385.

- Levin, M. (2009). Bioelectric mechanisms in regeneration: Unique aspects and future perspectives. *Semin Cell Dev Biol* 20, 543-556.
- Li, Q., and Stuenkel, E.L. (2004). Calcium negatively modulates calmodulin interaction with IQGAP1. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 787-795.
- Li, Z., Kim, S.H., Higgins, J.M.G., Brenner, M.B., and Sacks, D.B. (1999). IQGAP1 and Calmodulin Modulate E-cadherin Function. *Journal of Biological Chemistry* 274, 37885-37892.
- Liao, G., and Liu, G. (2011). How and why does Dia1 mRNA localize? *Communicative & Integrative Biology* 4, 560-562.
- Lindsay Bashford, C., Chance, B., and Prince, R.C. (1979). Oxonol dyes as monitors of membrane potential. Their behavior in photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 545, 46-57.
- Machesky, L.M. (1998). Cytokinesis: IQGAPs find a function. *Curr Biol* 8, R202-205.
- Maiden, S.L., and Hardin, J. (2011). The secret life of alpha-catenin: moonlighting in morphogenesis. *J Cell Biol* 195, 543-552.
- Malarkannan, S., Awasthi, A., Rajasekaran, K., Kumar, P., Schuldt, K.M., Bartoszek, A., Manoharan, N., Goldner, N.K., Umhoefer, C.M., and Thakar, M.S. (2012). IQGAP1: A Regulator of Intracellular Spacetime Relativity. *The Journal of Immunology* 188, 2057-2063.
- Martin-Belmonte, F., and Mostov, K. (2008). Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 20, 227-234.
- Mataraza, J.M., Li, Z., Jeong, H.W., Brown, M.D., and Sacks, D.B. (2007). Multiple proteins mediate IQGAP1-stimulated cell migration. *Cell Signal* 19, 1857-1865.
- Mateer, S.C., Wang, N., and Bloom, G.S. (2003). IQGAPs: integrators of the cytoskeleton, cell adhesion machinery, and signaling networks. *Cell Motil Cytoskeleton* 55, 147-155.
- McCaffrey, L.M., and Macara, I.G. (2011). Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 21, 727-735.
- McCallum, S.J., Erickson, J.W., and Cerione, R.A. (1998). Characterization of the Association of the Actin-binding Protein, IQGAP, and Activated Cdc42 with Golgi Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 273, 22537-22544.
- McCrea, P.D., and Gu, D. (2010). The catenin family at a glance. *J Cell Sci* 123, 637-642.
- Mellman, I., and Nelson, W.J. (2008). Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 833-845.
- Minuk, G.Y. (2000). GABA and hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem* 207, 105-108.

- Miyoshi, J., and Takai, Y. (2005). Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 815-855.
- Mondal, S., Burgute, B., Rieger, D., Muller, R., Rivero, F., Faix, J., Schleicher, M., and Noegel, A.A. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton by an interaction of IQGAP related protein GAPA with filamin and cortexillin I. *PLoS One* 5, e15440.
- Nabeshima, K., Shima, Y., Inoue, T., and Koono, M. (2002). Immunohistochemical analysis of IQGAP1 expression in human colorectal carcinomas: its overexpression in carcinomas and association with invasion fronts. *Cancer Lett* 176, 101-109.
- Nelson, W.J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422, 766-774.
- Nin, V., Hernandez, J.A., and Chifflet, S. (2009). Hyperpolarization of the plasma membrane potential provokes reorganization of the actin cytoskeleton and increases the stability of adherens junctions in bovine corneal endothelial cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 1087-1099.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Noritake, J., Fukata, M., Sato, K., Nakagawa, M., Watanabe, T., Izumi, N., Wang, S., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2004). Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Mol Biol Cell* 15, 1065-1076.
- Noritake, J., Watanabe, T., Sato, K., Wang, S., and Kaibuchi, K. (2005). IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci* 118, 2085-2092.
- Olivotto, M., Arcangeli, A., Carlà, M., and Wanke, E. (1996). Electric fields at the plasma membrane level: A neglected element in the mechanisms of cell signalling. *BioEssays* 18, 495-504.
- Papakonstanti, E.A., and Stournaras, C. (2008). Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 582, 2120-2127.
- Pardo, L.A. (2004). Voltage-Gated Potassium Channels in Cell Proliferation. *Physiology* 19, 285-292.
- Pathmanathan, S., Hamilton, E., Atcheson, E., and Timson, D.J. (2011). The interaction of IQGAPs with calmodulin-like proteins. *Biochem Soc Trans* 39, 694-699.
- Pelikan-Conchaudron, A., Le Clainche, C., Didry, D., and Carlier, M.-F. (2011). The IQGAP1 Protein Is a Calmodulin-regulated Barbed End Capper of Actin Filaments. *Journal of Biological Chemistry* 286, 35119-35128.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., and Fuchs, E. (2003). Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112, 535-548.

- Ramsby, M.L., and Makowski, G.S. (2005). Differential Detergent Fractionation of Eukaryotic Cells The Proteomics Protocols Handbook. In, J.M. Walker, ed. (Humana Press), pp. 37-48.
- Rao, J.N., Platoshyn, O., Li, L., Guo, X., Golovina, V.A., Yuan, J.X.-J., and Wang, J.-Y. (2002). Activation of K⁺ channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 282, C885-C898.
- Rittmeyer, E.N., Daniel, S., Hsu, S.-C., and Osman, M.A. (2008). A dual role for IQGAP1 in regulating exocytosis. *Journal of Cell Science* 121, 391-403.
- Rodgers, L.S., and Fanning, A.S. (2011). Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)* 68, 653-660.
- Rodriguez-Boulan, E., and Nelson, W.J. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245, 718-725.
- Rohn, J.L., and Baum, B. (2010). Actin and cellular architecture at a glance. *J Cell Sci* 123, 155-158.
- Shannon, K.B. (2012). IQGAP Family Members in Yeast, Dictyostelium, and Mammalian Cells. *Int J Cell Biol* 2012, 894817.
- Sundelacruz, S., Levin, M., and Kaplan, D. (2009). Role of Membrane Potential in the Regulation of Cell Proliferation and Differentiation. *Stem Cell Reviews and Reports* 5, 231-246.
- Szászi, K., Sirokmány, G., Ciano-Oliveira, C.D., Rotstein, O.D., and Kapus, A. (2005). Depolarization induces Rho-Rho kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in kidney tubular cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 289, C673-C685.
- Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H., and Rikitake, Y. (2008a). The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 309-342.
- Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., and Ogita, H. (2008b). Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 603-615.
- Takemoto, H., Doki, Y., Shiozaki, H., Imamura, H., Utsunomiya, T., Miyata, H., Yano, M., Inoue, M., Fujiwara, Y., and Monden, M. (2001). Localization of IQGAP1 is inversely correlated with intercellular adhesion mediated by e-cadherin in gastric cancers. *Int J Cancer* 91, 783-788.
- Tanos, B., and Rodriguez-Boulan, E. (2008). The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene* 27, 6939-6957.
- Usatyuk, P.V., Gorshkova, I.A., He, D., Zhao, Y., Kalari, S.K., Garcia, J.G., and Natarajan, V. (2009). Phospholipase D-mediated activation of IQGAP1 through Rac1 regulates hyperoxia-induced p47phox translocation and reactive oxygen species generation in lung endothelial cells. *J Biol Chem* 284, 15339-15352. Epub 12009 Apr 15314.

- Waheed, F., Speight, P., Kawai, G., Dan, Q., Kapus, A., and Szász, K. (2010). Extracellular signal-regulated kinase and GEF-H1 mediate depolarization-induced Rho activation and paracellular permeability increase. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 298, C1376-C1387.
- Wang, J.B., Sonn, R., Tekletsadik, Y.K., Samorodnitsky, D., and Osman, M.A. (2009). IQGAP1 regulates cell proliferation through a novel CDC42-mTOR pathway. *J Cell Sci* 122, 2024-2033.
- Wang, S., Melkounian, Z., Woodfork, K.A., Cather, C., Davidson, A.G., Wonderlin, W.F., and Strobl, J.S. (1998). Evidence for an early G1 ionic event necessary for cell cycle progression and survival in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *J Cell Physiol* 176, 456-464.
- Watanabe, T., Noritake, J., Kakeno, M., Matsui, T., Harada, T., Wang, S., Itoh, N., Sato, K., Matsuzawa, K., Iwamatsu, A., *et al.* (2009). Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3 β regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *Journal of Cell Science* 122, 2969-2979.
- Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., and Kaibuchi, K. (2004). Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell* 7, 871-883.
- White, C.D., Brown, M.D., and Sacks, D.B. (2009). IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Lett* 583, 1817-1824.
- White, C.D., Erdemir, H.H., and Sacks, D.B. (2012). IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cell Signal* 24, 826-834.
- Yamaoka-Tojo, M., Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Dikalov, S.I., Chen, Y.E., Tojo, T., Fukai, T., Fujimoto, M., Patrushev, N.A., Wang, N., *et al.* (2004). IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation. *Circ Res* 95, 276-283. Epub 2004 Jun 2024.
- Yeaman, C., Grindstaff, K.K., and Nelson, W.J. (1999). New Perspectives on Mechanisms Involved in Generating Epithelial Cell Polarity. *Physiological Reviews* 79, 73-98.
- Yonemura, S. (2011). Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* 23, 515-522.