

Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Análisis de la función de cortactina en la regulación de la
activación de Rap1 en células endoteliales”**

Tesis que presenta

MVZ Omar Javier Rodriguez Moncivais

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

EN LA ESPECIALIDAD DE

Biomedicina Molecular

Director de Tesis

Dr. Michael Schnoor

México, D.F.

Agosto 2015

Agradecimientos

A Conacyt por la beca recibida durante el periodo 2013-2015 y de esta manera poder realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Michael Schnoor por permitirme formar parte de su laboratorio, y por el apoyo y orientación brindado en el desarrollo del proyecto, y ser parte de mi formación.

A la Bióloga Lourdes Rojas por el apoyo, muy grande, en la unidad de microscopía electrónica.

A mis compañeros de laboratorio M en C. Alexander García, M en C. Ali Citalan, M en C Martha Velázquez, QBP Sandy Chanez y la Dra. Hilda Vargas por todo el apoyo para la realización de la tesis y la paciencia durante el desarrollo del proyecto.

Al MVZ Ricardo Gaxiola Centeno y al técnico especializado Víctor Manuel García Gómez por su apoyo con los animales de laboratorio.

Dedicatoria

A Dios por permitirme llegar aquí y darme la fuerza y fe para poder realizar y cumplir una meta más en mi vida.

A mis padres Esther Monsiváis y Javier Rodríguez por todo su apoyo, comprensión y amor, a pesar de la lejanía, siempre estuvieron presentes e hicieron posible llegar a esta instancia en mis estudios.

A todos mis amigos, en especial a Sandy y Alfredo por ser parte clave de este viaje y hacerlo más ligero, ayudarme y escucharme en todo momento. A Lalo y Yaremi por permitirme compartir momentos con ellos. A mi amiga Gina Ramírez por esperarme en casa y siempre dar una sorpresa.

A mi amiga Vianey Ontiveros, me enseñaste que siempre hay que estar feliz y ser positivo.

Al D.F. por enseñarme que nada es sencillo y no esperar nada de las personas.

Índice

1. Resumen (Abstract)	2
2. Introducción	5
2.1 Sistema circulatorio, función del endotelio vascular	5
2.2 Cortactina: proteína implicada en la dinámica del citoesqueleto	6
2.3 Función de Rap1 en la barrera endotelial	9
2.4 Adrenomedulina y su regulación en la barrera endotelial	12
2.5 Dinamina 2 y el proceso exocítico	15
2.6 Cortactina-dinamina 2 y su relación en el trafico vesicular	17
3. Justificación	21
4. Hipótesis	21
5. Objetivo general	21
6. Objetivos específicos	21
7. Metodología	22
7.1 Cultivo celular	22
7.2 Generación de célula endoteliales de microvaculatura humana knock-down de cortactina	22
7.3 Cuantificación de adrenomedulina por ensayo enzimático competitivo	22
7.4 Perfusión de ratones C57	23
7.5 Extracción y purificación de células endoteliales de microvasculatura endotelial murina	24
7.6 Tratamiento celular con dynasore	25
7.7 Microscopia electrónica	25
7.8 Co-inmunoprecipitación	28
7.9 Western blot	28

8. Resultados	30
8.1 La ausencia de cortactina reduce los niveles secretados de adrenomedulina en sangre	30
8.2 En ausencia de cortactina se observa una desorganización en el aparato de Golgi y un incremento en el tamaño de las vesículas	32
8.3 La inhibición de dinamina en células endoteliales causa un desajuste en el aparato de Golgi	39
8.4 interacción de cortactina con PDZ-GEF y Epac1 en condiciones basales y con C3G en condiciones inflamatorias	41
9. Discusión	43
10. Conclusión	48
11. Perspectivas	49
12. Referencias	50

Resumen

Introducción: El desajuste en la barrera endotelial en un proceso inflamatorio causa edema. La ausencia de cortactina, una proteína de unión a F-actina como a las uniones intercelulares, causa una disminución en la activación de Rap1 en condiciones basales, afectando la estabilidad del endotelio. Además su ausencia en células epiteliales se observó una alteración en el tráfico vesicular, pudiéndose afectar la secreción de proteínas. Sin embargo, no se conoce como cortactina afecta los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la barrera endotelial.

Objetivo: Examinar el papel de cortactina en la morfología celular, en la secreción de adrenomedulina, una hormona endógena que activa Rap1, y su posible interacción con GEFs de Rap1 en células endoteliales.

Resultados: En ratones deficientes de cortactina se disminuye la secreción de adrenomedulina basal. A través de microscopía electrónica se observó un crecimiento en las cisternas del aparato de Golgi y crecimiento de vesículas en ausencia de cortactina. En los capilares pulmonares de ratones KO de cortactina se observó un incremento en el tamaño de las vesículas y un desajuste en el aparato de Golgi. Para evaluar si cortactina interactúa con alguno de los GEFs de Rap1 se realizó una co-inmunoprecipitación en la cual se observa que cortactina está formando un complejo con PDZ-GEF y Epac1, GEFs de Rap1, en condiciones basales en células HMEC-1. En condiciones inflamatorias se perdió la interacción con Epac1 y PDZ-GEF y formó un complejo con C3G, también GEF de Rap1.

Conclusión: Cortactina al interactuar con PDZ-GEF y Epac1 en condiciones basales podría regular la activación constitutiva de Rap1. Durante la fortificación de la barrera endotelial, a cargo de la hormona adrenomedulina, la cual tiene un efecto sobre Epac1/Rap1, se demostró que es probable que la ausencia de cortactina afecte su secreción al acumularse en las cisternas del Golgi o en vesículas, contribuyendo al defecto en activación de Rap1 en condiciones basales. Epac1 está formando un complejo con cortactina y PDZ-GEF sugiriendo una localización cercana a la membrana celular. Durante el estímulo inflamatorio al interactuar con C3G podría estar afectando la recuperación de la barrera endotelial, al afectar la actividad de Rap1.

Abstract

Introduction: Disruption of the endothelial barrier during inflammation causes edema. The absence of cortactin, a protein that connect to F-actin and intercellular junctions, causes a decrease in the activation of Rap1 in basal conditions, affecting endothelial barrier. Moreover the absence of cortactin in epithelial cells was observed to affect vesicular traffic, Golgi morphology and protein secretion. However, it is not known how cortactin affects these process.

Objective: To examine the role of cortactin in cell morphology, secretion of adrenomedullin, a Rap1 activating hormone and its possible interaction with GEFs of Rap1 in endothelial cells.

Results: Cortactin KO mice, showed decreased basal secretion of adrenomedullin. Electron microscopy of cortactin depleted HMEC-1 cells, showed a growth in Golgi cisternae and an accumulation of vesicles in the cytosol. Additionally, pulmonary capillaries of a KO mice of cortactin showed increased vesicle size and a breakdown of Golgi apparatus. To assess if cortactin interacts with any of the GEFs of Rap1, was done a co-immunoprecipitation assay was performed. It showed that cortactin is forming a complex with PDZ-GEF and Epac1, Rap1 GEFs, under basal conditions, in HMEC-1 cells. By contrast, under inflammatory conditions the interaction was lost with Epac1 and PDZ-GEF and instead cortactin formed a complex with C3G also Rap1 GEF.

Conclusion: Cortactin interacts with PDZ-GEF and Epac1 at basal conditions and this might regulate basal activation levels of Rap1. During the fortification of the endothelial barrier by adrenomedullin hormone, which has an effect on Epac1/Rap1, it was shown that the absence of cortactin could be affecting its secretion, accumulating it in Golgi cisternaes contributing to a defect in activation of Rap1 at basal conditions.

Epac1 is complexed with PDZ-GEF and cortactin suggesting a near cell membrane localization. During the inflammatory stimulus, interaction with C3G could be affecting the activity of Rap1 therefore the recovery of the endothelial barrier affect.

2. Introducción

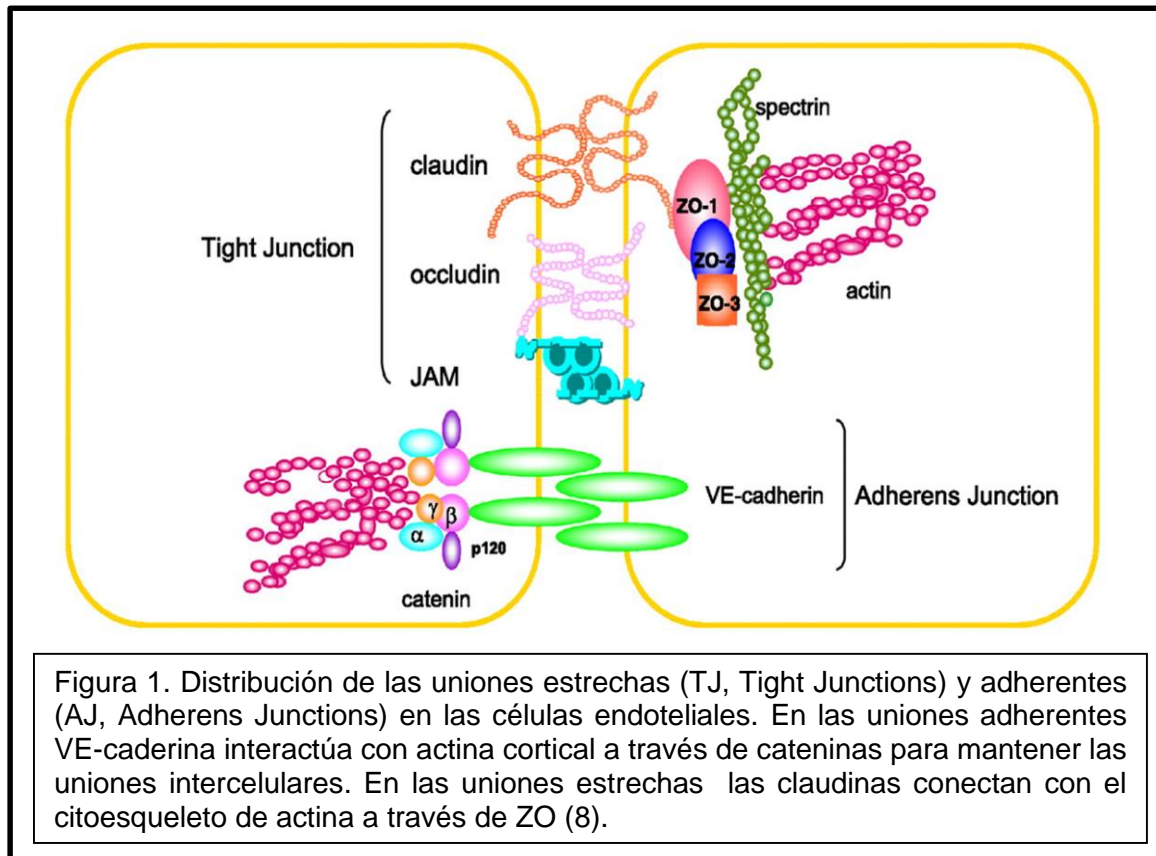
2.1 Sistema circulatorio, función del endotelio vascular

Los vasos sanguíneos son un conjunto de conductos cerrados por donde circula la sangre, que es bombeada por el corazón, haciéndola llegar a los tejidos del cuerpo. Los vasos sanguíneos están formados por 3 capas llamadas túnicas; la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia. La túnica íntima está formada por el endotelio que forma una barrera entre la sangre y el espacio extravascular y al tener un contacto directo con el flujo sanguíneo controlando la extravasación de solutos, macromoléculas y leucocitos (1, 2).

Durante la inflamación hay una disminución de la función de la barrera endotelial llevando a un incremento local de la permeabilidad. Si no es corregido, la hiperpermeabilidad microvascular se asocia con muchas enfermedades agudas y crónicas, llevando a la formación de edemas. Por lo tanto la regulación selectiva en la permeabilidad vascular es crítica para mantener la integridad vascular, en homeostasis y en enfermedades (2, 3).

La permeabilidad vascular está regulada por las uniones intercelulares. Los complejos de unión intercelular pueden transmitir señales para controlar la función de la barrera endotelial (4, 5). Las uniones adherentes (AJ) inician los contactos intercelulares promoviendo su maduración y mantenimiento. Las AJ están compuestas principalmente por VE-caderina que interactúa homofílicamente en una manera dependiente de calcio. VE-caderina interactúa a través de su extremo carboxilo terminal con β -catenina y p120. β -catenina interactúa con α -catenina, que a su vez se asocia con el citoesqueleto de actina. Mientras que las uniones estrechas (TJ) regulan el pasaje de solutos y iones por la ruta paracelular. Las TJ están compuestas principalmente por las proteínas transmembranales ocludina, claudina y moléculas de adhesión intercelular (JAM) que son vinculadas al citoesqueleto vía zonula occludens (ZO)-1, ZO-2, ZO-3. (Figura. 1) (6, 7, 8).

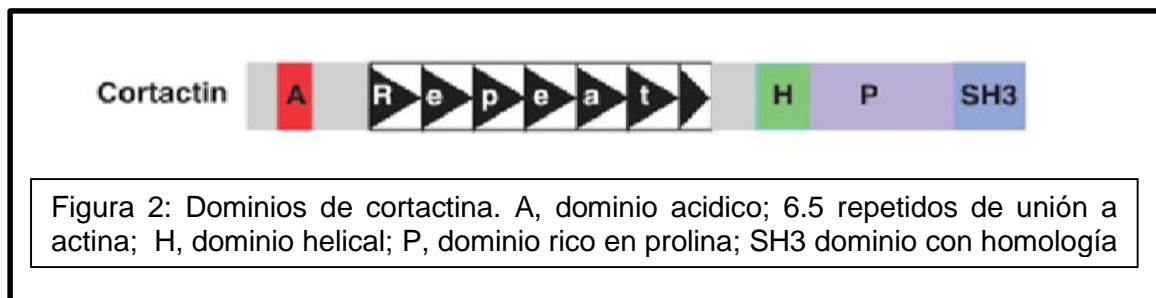
La importancia de la conexión con el citoesqueleto de actina reside que este tiene una función en el mantenimiento de los componentes de las uniones intercelulares y fortificación entre estas, es decir la presencia de actina cortical. Aunque el citoesqueleto de actina también se ve involucrado en la pérdida de la estabilidad de la barrera durante un estímulo inflamatorio, donde las filamentos de actina son perpendiculares a las uniones intercelulares, formando una fuerza de tensión. A estas se les denomina fibras de estrés.



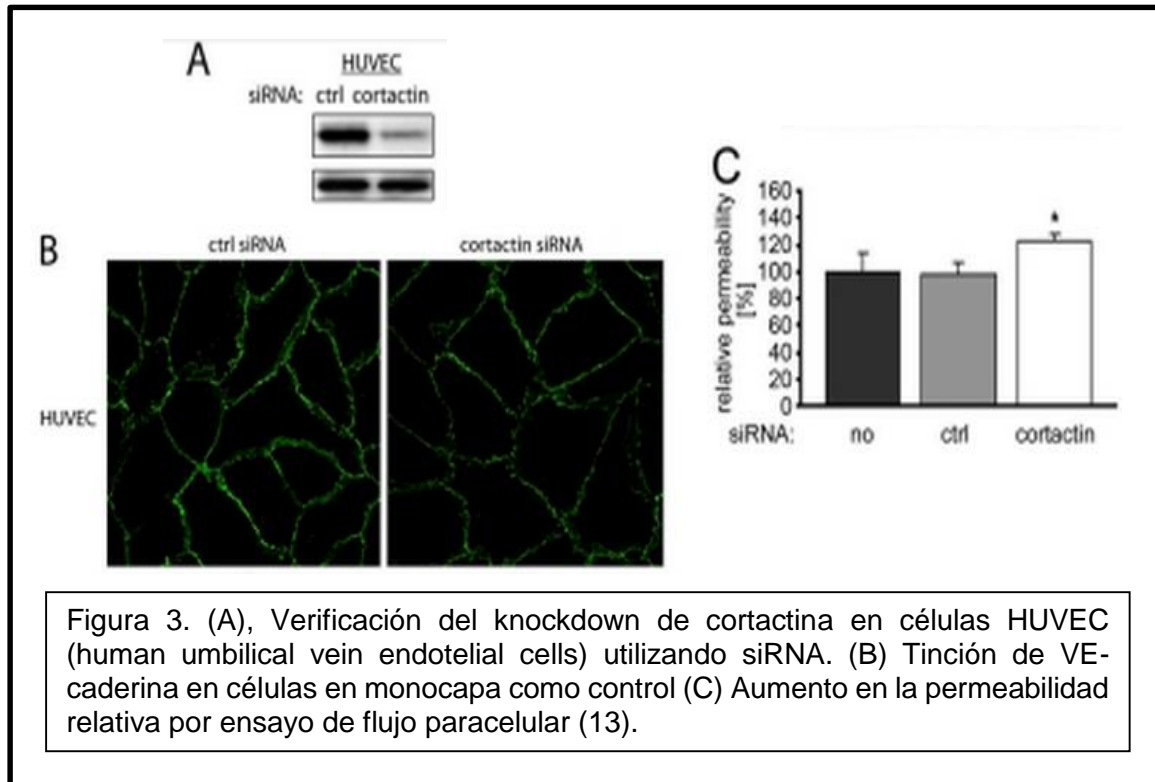
Por lo tanto, es importante mantener filamentos de actina cortical para la estabilidad de la barrera endotelial. Cortactina, una proteína de unión a F-actina cortical, juega un papel importante en la estabilización de los filamentos de actina, y por consiguiente de la barrera endotelial (3).

2.2 Cortactina: proteína implicada en la dinámica del citoesqueleto.

Cortactina es una proteína de 80 kDa codificada por el gen EMS1 (Excess Microsporocytes 1), localizado en el brazo largo del cromosoma 11 en la región 11q13. Dentro de la estructura proteica tiene una región N-terminal de aproximadamente 90 aminoácidos; 21-22 de estos son aminoácidos ácidos, y se denominan dominio ácido N-terminal (NTA). NTA a través de un motivo con 3 aminoácidos (DDW, ácido aspártico, ácido aspártico, triptófano), que es característico en factores promotores de la nucleación de actina, se une al complejo Arp2/3. Arp2/3 al ser un factor nucleador clase I, polimeriza G actina, formando por consiguiente filamentos de actina. Sin embargo, cortactina se considera un factor nucleador clase II. A diferencia de un factor nucleador clase I, un factor nucleador clase II no presenta una región de unión a G-actina, si no que se une a F-actina a través de sus dominios en tándem que exhiben una estructura hélice-giro-hélice (6.5 repeticiones de 37 aminoácidos) lo que le permite estabilizar los filamentos de actina formado por Arp2/3. Después se localiza una región α -helical de aproximadamente 50 aminoácidos y un dominio rico en residuos de prolina, serina, treonina y tirosina que pueden ser fosforilados por Src cinasas. Finalmente en su región C-terminal tiene un dominio SH3 (Src homology 3) con el que tiene la capacidad de unirse a diversas proteínas con dominio PRD. Por lo tanto, todas las características que presenta cortactina sugieren que es un regulador de la estabilidad de actina, importante para mantener las uniones intercelulares. (Figura 2) (9, 10, 11, 12).



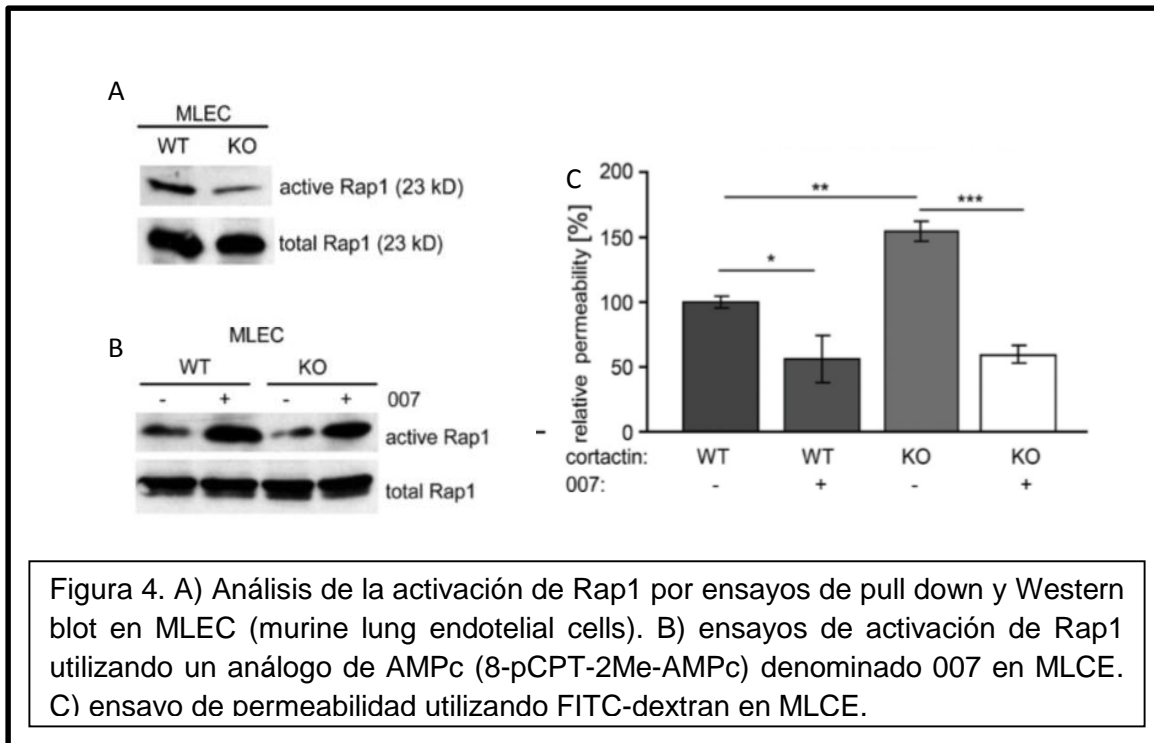
De suma importancia se conoce que la deficiencia de cortactina en células endoteliales se asocia con una permeabilidad incrementada, es decir existe un déficit en la función de la barrera endotelial (Figura 3) (13).



También se sabe que al inhibir la expresión de cortactina se disminuye la activación de Rap1 (Ras-related protein 1). Sin embargo al utilizar un análogo de adenosin monofosfato cíclico (AMPc), que activa específicamente a Epac, un GEF de Rap1, la integridad de la barrera endotelial en el knockout se normaliza. Se sugiere por consiguiente que la activación de Rap1 se encuentra río abajo a cortactina (Figura 4) (13).

La función de la barrera endotelial se encuentra regulada por segundos mensajeros, como el AMPc. Al estimular receptores acoplados a proteínas G (G α s) se activa la adenilil ciclasa produciéndose AMPc para la activación de PKA

y Epac que activa a Rap1. Rap 1 activo estabiliza la barrera endotelial al fortificar la actina cortical (4) (2).



2.3 Función de Rap 1 en la barrera endotelial

Rap1 es una GTPasa pequeña, miembro de la familia Ras, la cual está localizada en los contactos intercelulares y se activa por AMPc intracelular a través de una vía independiente de PKA. Se le ha atribuido una función positiva en la barrera endotelial teniendo efecto sobre las adhesiones intercelulares y la actina cortical (2).

En general las GTPasas son proteínas con la capacidad intrínseca de hidrolizar GTP. La unión de la GTPasa con su sustrato ocurre en una región de la enzima altamente conservada denominada dominio G. Las GTPasas están activas en unión con GTP e inactivas en unión con GDP. La hidrólisis del GTP es iniciada por proteínas específicas denominadas proteínas activadoras de GTPasa (GAPs). Los intercambiadores de nucleótido de guanina (GEFs) causan que se disocie el GDP de la GTPasa llevando a que esta se asocie nuevamente a un GTP (14).

En células endoteliales Rap1 tiene varias funciones como lo es la inhibición de la vía de Rho/ROCK existiendo niveles menores de MLC2 (miosin light chain 2) bifosforilada en T18 y S19 asociado a la disminución en la formación de fibras de estrés. Además el efector de Rap1, Rasip1, se une a ArhGAP29, y permite la inactivación de RhoA disminuyendo las fibras de estrés. Rap 1 activa a Cdc42 permitiendo un incremento de F-actina cortical para fortificar las uniones intercelulares al unirse a N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) que subsecuentemente activa a Arp2/3. También Rap1 regula rearrreglos en el citoesqueleto de actina en células endoteliales vía Rac1, que se requiere para la formación del tubo vascular durante angiogénesis. Al utilizar siRNA de Rap1 hay falla en activar a Rac1/2. (15, 16).

Rap1 tiene varios GEFs que lo activan en diferentes situaciones. Por ejemplo se considera que es constitutivamente activada por PDZ-GEF (GEF con dominio PDZ) en condiciones basales en los sitios de unión intercelular. Esto es sugerido ya que al realizar un pulldown para Rap1-GTP en células knockdown de PDZ-GEF observándose una disminución en su activación (3). C3G (RAPGEF) no se requiere en la función basal pero es activado durante la recuperación de la barrera endotelial después de un estímulo inflamatorio. Finalmente Epac1 (Exchange protein directly activated by cAMP) se ha descrito principalmente su activación durante la fortificación de la barrera endotelial. (Figura 5). A pesar de esto, se conoce que al inhibir a PDZ-GEF en células endoteliales la función de Rap1 es rescatada por Epac1, esto al utilizar un homólogo al AMPc, denominado 007, que es permeable a la membrana celular (16,17). Se han descrito otros GEFs como CalDAG-GEF1 (calcium and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor) el cual es activado por calcio y diacilglicerol, descrito principalmente en leucocitos (18).

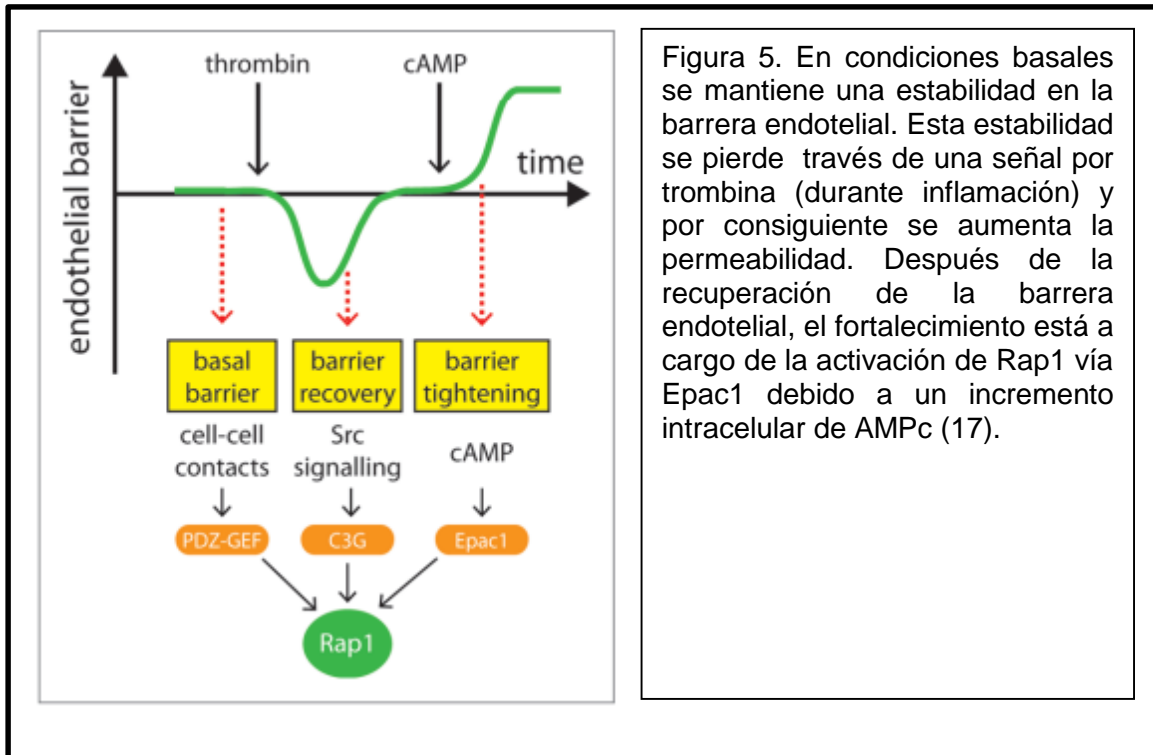
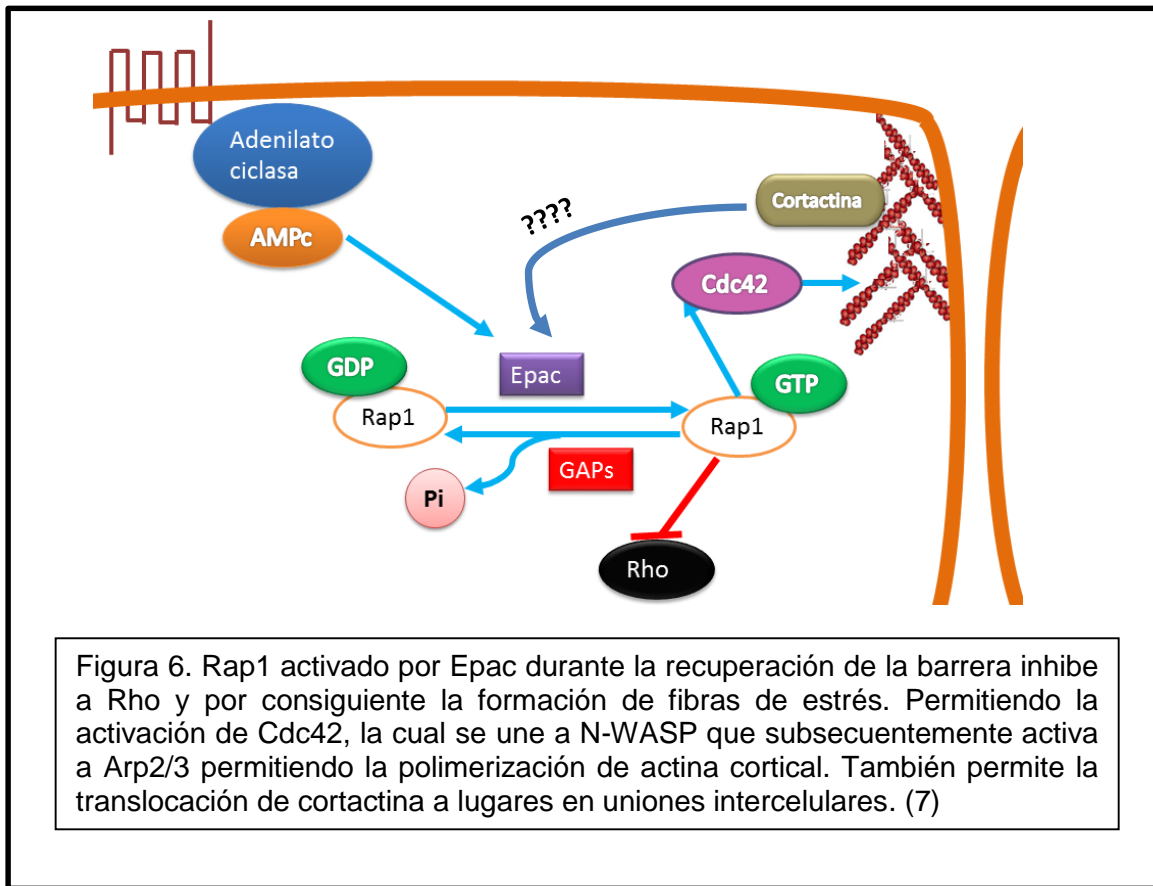


Figura 5. En condiciones basales se mantiene una estabilidad en la barrera endotelial. Esta estabilidad se pierde través de una señal por trombina (durante inflamación) y por consiguiente se aumenta la permeabilidad. Después de la recuperación de la barrera endotelial, el fortalecimiento está a cargo de la activación de Rap1 vía Epac1 debido a un incremento intracelular de AMPc (17).

Un efector importante de Rap1 es KRIT-1 (Krev interaction trapped protein 1), que podría unir a β -catenina por su dominio FERM, controlando su localización en las uniones adherentes, ya que si se elimina KRIT-1 hay translocación de β -catenina y pérdida de las uniones intercelulares (3).

Las GAPs de Rap1 no se han caracterizado bien. Se conoce que Spa-1 en células HeLa inhibe la activación de Rap1 reduciendo la adhesión de la monocapa (19).

Rap1 activa permite la disminución de las fibras de estrés y el incremento de F-actina cortical, donde se localiza cortactina y estabiliza las uniones intercelulares. Entonces Rap1 disminuye la tensión radial y aumenta la función de las uniones intercelulares (Figura 6) (7).



Por lo anteriormente mencionado se sugiere que cortactina se ve involucrada en la activación de Rap1, indicando que puede afectar la activación de GEFs de Rap1 como Epac1, C3G, PDZ-GEF. A su vez Rap1 activada estimula el reclutamiento de cortactina en los contactos intercelulares pudiendo existir una retroalimentación positiva entre cortactina y Rap1.

2.4 Adrenomedulina y su regulación en la barrera endotelial

La adrenomedulina (ADM) es un péptido de 52 aminoácidos con un puente disulfuro y una tirosina amidada en el extremo C- terminal. Tiene un potente y prolongado efecto vasodilatador que es importante en la regulación de la presión sistémica y la hipertensión pulmonar. ADM es codificada por un gen compuesto por 4 exones y 3 intrones, localizado en el cromosoma 11. Existe una síntesis y secreción basal de adrenomedulina, aunque se describe un incremento en su

síntesis en la pared vascular está bajo el estímulo de TNF- α , lipopolisacáridos y/o angiotensina II (20).

La ADM se secreta como una prepro ADM de 185 aminoácidos y después la proADM tiene 64 aminoácidos. El receptor descrito en células endoteliales y fibra muscular lisa vascular pertenece a la súperfamilia de receptores ligados a proteínas G. Describiéndose un receptor similar al receptor de calcitonina (CRLR) transportado a la membrana celular y glicosilado por una proteína modificadora de la actividad del receptor 2 (RAMP2). El musculo vascular liso, algunas células hematopoyéticas y las células endoteliales producen ADM y son blanco mismo, siendo un factor autocrino-paracrino (21).

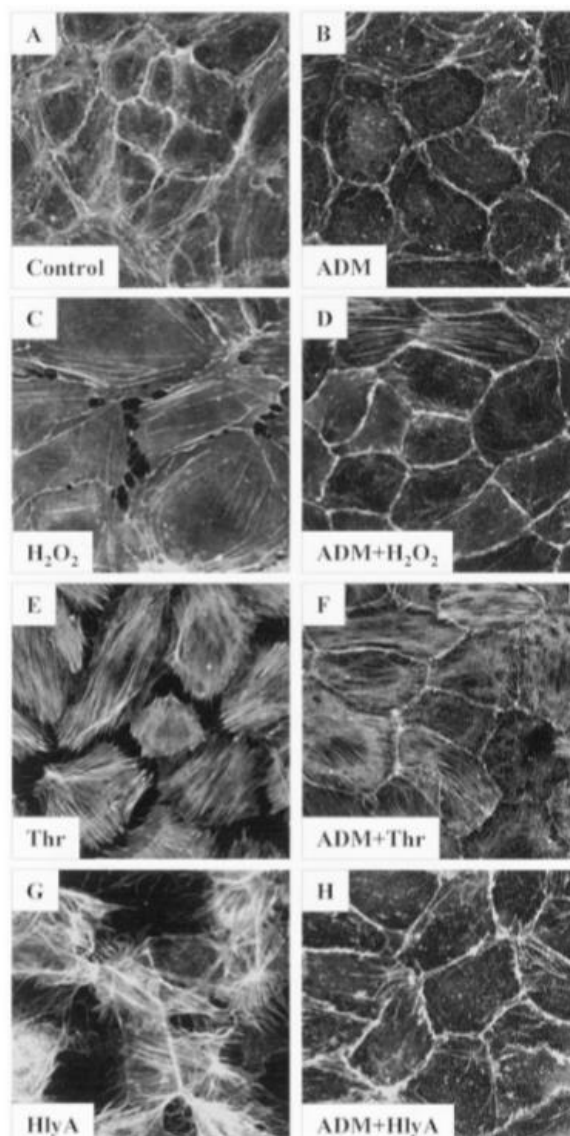
La ADM posee una acción de protección contra la respuesta a un daño vascular posiblemente al inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno. Limita la hiperplasia de la íntima debido a una lesión originada por H₂O₂ que se encuentra en los gránulos liberados por polimorfonucleares. El H₂O₂ activa vías de señalización involucradas en la contracción celular y activación de PKC. (17).

Se demostró en ratones transgénicos que sobreexpresan ADM resisten a un choque séptico inducido por lipopolisacárido. En ratones transgénicos la presión sistólica era en promedio de 10 mm de Hg mientras que en ratones wildtype se encontraba a 25 mm de Hg, indicando un efecto protector vinculado con la vasodilatación (22).

Además se observó que adrenomedulina bloquea la formación de edema pulmonar inducido por H₂O₂ en un modelo de pulmones aislados de conejo. A los pulmones ventilados y libres de sangre, se les administro adrenomedulina 15 minutos antes de perfundir con H₂O₂. Se observaron entonces cambios menores en la presión microvascular pulmonar que en aquellos que no fueron previamente tratados indicando que la prevención del edema pulmonar se debe al mantener las uniones intercelulares del endotelio de la microvasculatura pulmonar.

En cultivo celular de HUVEC, se observó que al tratar monocapas con adrenomedulina 20 minutos previos a un tratamiento con toxina hemolítica, trombina o H₂O₂ existe una disminución en la formación de fibras de estrés, como en la pérdida de uniones intercelulares, indicando un efecto protector sobre la barrera endotelial. Se observó además en los controles donde se trataron a las células solamente con adrenomedulina que incluso existe una fortificación de las uniones intercelulares. (Figura 7). ADM tiene el potencial de ser una herramienta terapéutica estabilizando y protegiendo la barrera endotelial (23).

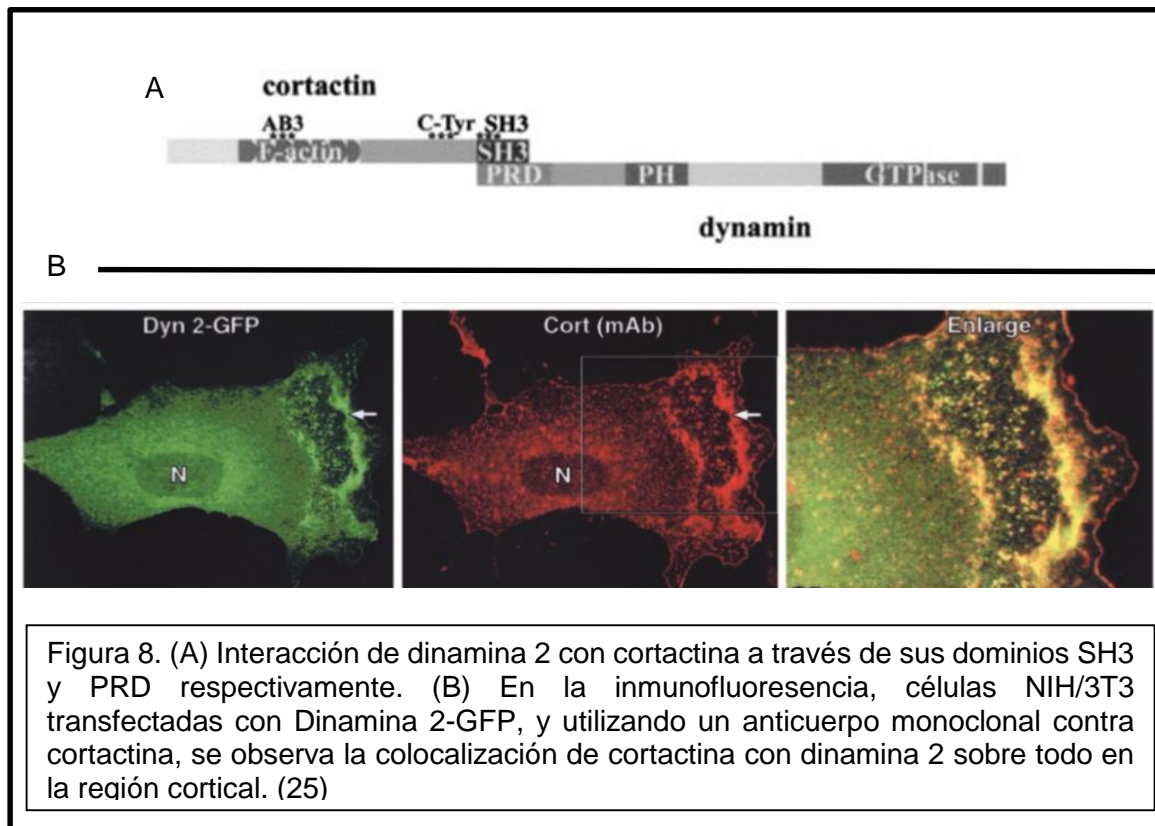
Figura 7. Adrenomedulina previene la reorganización de microfilamentos y la retracción celular inducida por peróxido de hidrogeno, trombina y hemolisina A de *E.coli*. Células HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) sin tratamiento (A) y tratadas con adrenomedulina (1µM) (B). Un tratamiento con adrenomedulina previo a un tratamiento con peróxido de hidrogeno, trombina y Hemolisina A de *E. coli* previene la perdida de las uniones intercelulares y la formación de las fibras de estrés (C, D, E, F, G, H) esto al visualizar actina filamentosa con faloidina Alexa 488 (23).



Adrenomedulina es secretada por proceso de exocitosis. La vesícula exocítica se forma a partir del aparato de Golgi. Un componente de la maquinaria exocítica es dinamina 2, la cual se conoce interacciona con cortactina. Por esta razón se sugiere que cortactina pueda participar en procesos exocíticos y/o del tráfico vesicular.

2.5 Dinamina 2 y el proceso de exocitosis.

La dinamina 2 es una GTPasa grande, que dirige el ensamble de los filamentos de actina en la membrana plasmática para la regulación de muchos procesos, incluyendo la endocitosis, exocitosis, movimiento vesicular, la actividad podosomal y la migración celular (24). Se localiza interactuando con vesículas, relacionándose con el tráfico vesicular. Tiene una región N-terminal con dominio intrínseco de GTPasa, un dominio con homología pleckstrin (PH), un dominio efector de la GTPasa (GED) importante en la oligomerización y un dominio C-terminal que es rico en prolina (PRD) el cual es capaz de interactuar con varias proteínas con dominio SH3, como lo es cortactina (Figura 8) (9).



Como se mencionó dinamina participa en el proceso de exocitosis. La exocitosis es un proceso de transporte activo por el cual las células expulsan macromoléculas de su citoplasma, transportándolas mediante vesículas hacia el medio externo y liberándolas mediante la deformación temporal de la membrana plasmática. Durante la formación de estas vesículas exocíticas; clatrina, dinamina y actina son secuencialmente reclutadas (25).

La exocitosis está clasificada en "kiss and run" y completa. En la primera solo se libera una parte del cargo de la vesícula, siendo el modo dominante de secreción. Se sabe que clatrina, actina y dinamina afectan la fusión de las vesículas en la exocitosis "kiss and run". Clatrina siempre está presente y dinamina se encuentra al momento de la liberación parcial del cargo. (Figura 9) (26). Se sugiere que la regulación directa en la exocitosis por clatrina y dinamina puede deberse a un secuestro de SNAREs (acrónimo derivado de SNAP (soluble NSF attachment protein) Receptor). Los SNAREs son proteínas que se involucran en la secreción. Las vesículas secretorias provenientes del trans-Golgi tienen en su membrana a la proteína v-SNARE conocida también como VAMP (vesicle-associated membrane protein) que se une a la proteína t-SNARE que se encuentra en la membrana plasmática llevándose la fusión de las membranas y secretar la proteína cargo (27). Por lo el secuestro de estos permite fusión ineficiente o incompleta. A su vez, también la presencia de F-actina cortical es importante en impedir fusión completa (26).

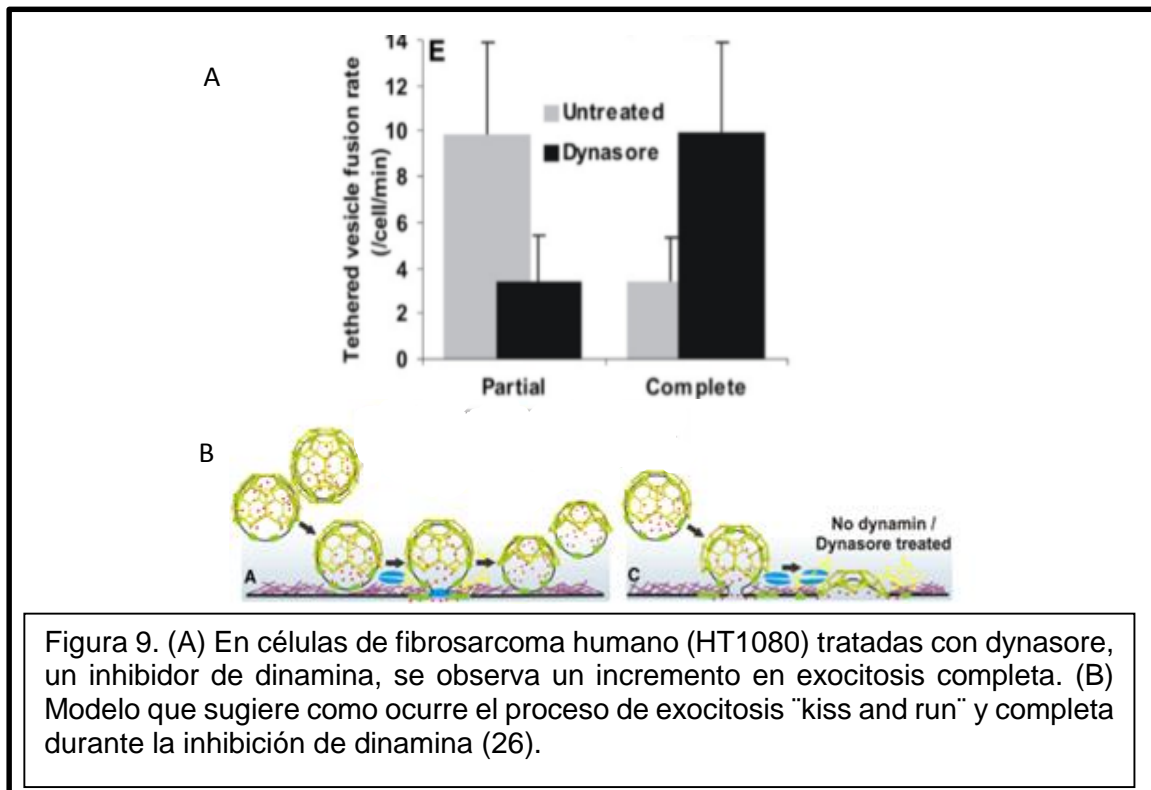
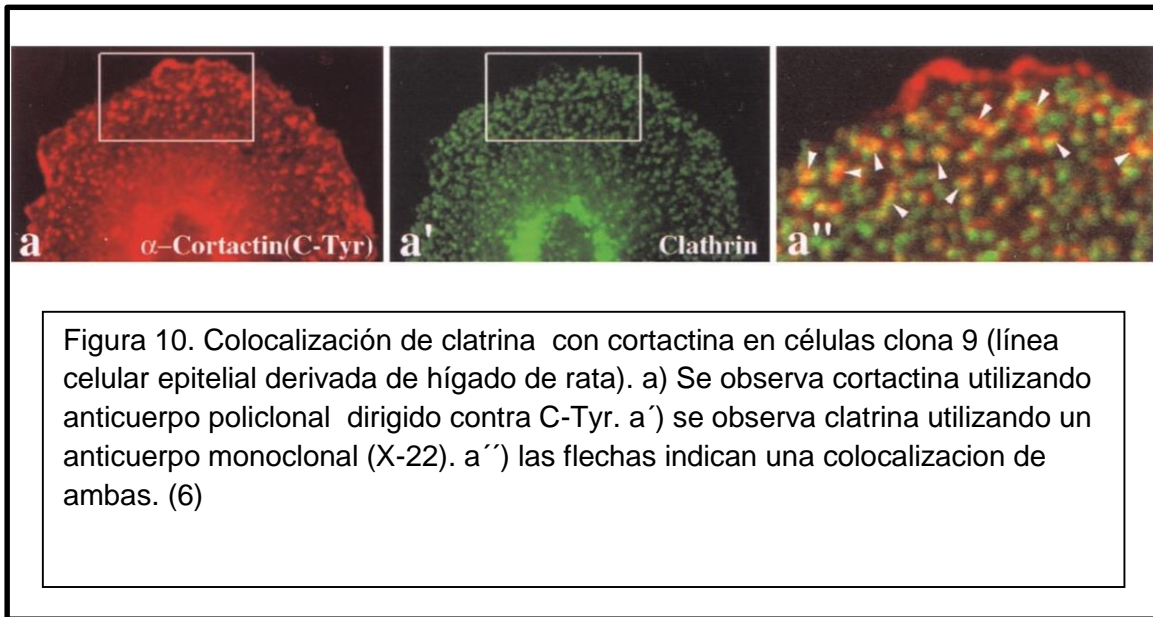


Figura 9. (A) En células de fibrosarcoma humano (HT1080) tratadas con dynasore, un inhibidor de dinamina, se observa un incremento en exocitosis completa. (B) Modelo que sugiere como ocurre el proceso de exocitosis "kiss and run" y completa durante la inhibición de dinamina (26).

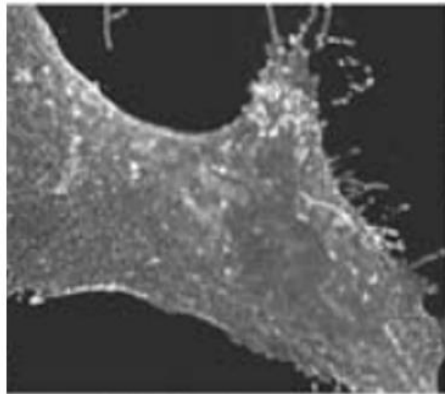
2.6 La interacción Cortactina-Dinamina 2 y su relación en el tráfico vesicular

Se ha postulado que cortactina regula la dinámica de actina para facilitar el proceso de exocitosis aunque no se conoce como pudiese estar participando en este proceso. Cortactina posee una serie de tirosinas en su C-terminal que son altamente fosforiladas por Src cinasas y que pueden implicar una regulación en el remodelamiento de actina durante la motilidad celular o el proceso de exocitosis. Además cortactina colocaliza con clatrina en la región cortical de la célula de esta manera pudiéndose relacionar con endosomas móviles (Figura 10) (6, 24, 28, 29).

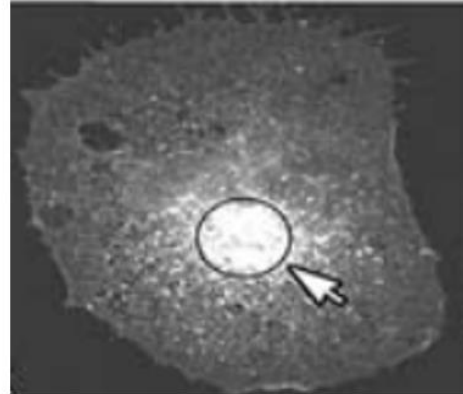
Dinamina 2 se ensambla en polímeros complejos e hidroliza GTP y contrae y altera membranas celulares durante el transporte vesicular, e interviene finalmente en la formación vesículas secretorias a partir del trans-Golgi network. Además en trans-Golgi network se ha localizado cortactina, que por su interacción con dinamina 2, sugiere una participación en la formación de vesículas endocíticas/exocíticas.



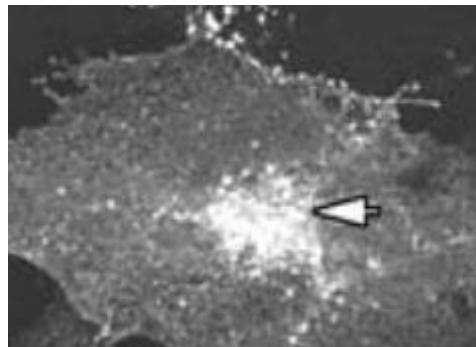
En la microscopía electrónica y con anticuerpos contra cortactina acoplados a oro se observó localización de cortactina en estructuras vesiculares tubulares extendidas características de trans-Golgi y se corroboró la colocalización con dinamina. En un estudio se observó que la glicoproteína de membrana del virus de la estomatitis vesicular (VSVG), se retiene en la región del trans-Golgi network con cualquiera de las 2 proteínas cortas, es decir dinamina 2 sin su dominio PRD o cortactina sin su dominio SH3. Lo que refleja que ambos componentes son esenciales en la dinámica del aparato de Golgi (30) (Figura 11).



Cortactin WT



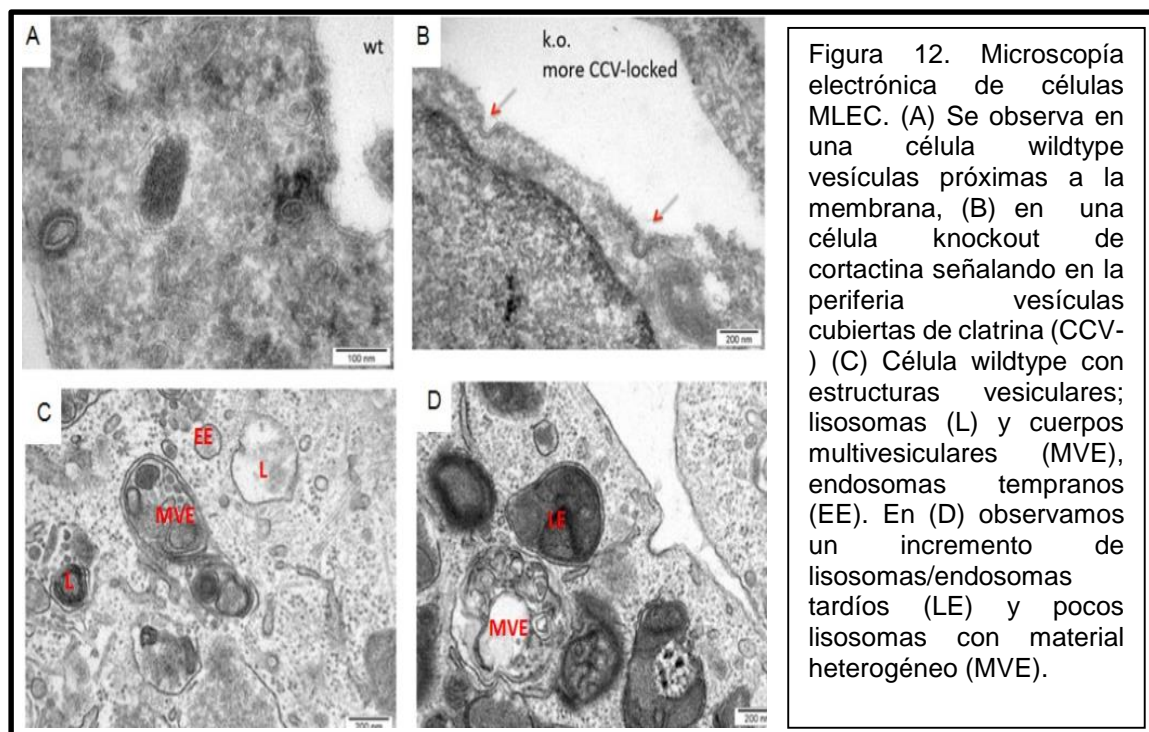
Cortactin ΔSH3



Dyn 2(aa) K44A

Figura 11. VSV-G-GFP se acumula en la región del Golgi en células BHK que expresan una mutante de dinamina o cortactina. Micrografías de células BHK co transfectadas con plásmidos que codifican la proteína secretoria VSVG-ts045-GFP y que expresan una cortactina con una delección del dominio SH3, una dinamina mutante o son wildtype para ambas proteínas. Se incubaron por 16 hrs a 40°C durante este tiempo las células acumularon VSVG-ts045-GFP en el retículo endoplasmico. Las células fueron tratadas con ciclohexamida por 30 min para detener la síntesis proteica y luego llevaron a las células a 32°C por 60 min para permitir el transporte de la proteína VSVG por vía secretoria antes de la fijación.

También utilizando un knockdown de cortactina se observó una acumulación de endosomas tardíos como en lisosomas sugiriendo un defecto en la maduración vesicular y tráfico vesicular. Este efecto es similar al inhibir la maduración de endosomas tardíos y lisosomas, mediante un siRNA de la GTPasa Rab7. Rab 7 es una GTPasa pequeña que se localiza en los endosomas tardíos controlando la agregación y fusión de endosomas tardíos/lisosomas (31). En estudios preliminares se observó en células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) knockout de cortactina que existe un bloqueo en la endocitosis y/o exocitosis completa porque se observa un incremento en estructuras CCV-locked (Clathrin-coated vesicles) y más endosomas tardíos/lisosomas en comparación con células WT. (Figura 12).



Todos los datos anteriores sugieren que la ausencia de cortactina podría causar menor secreción de ADM y disminuir la activación de Rap1 resultando en una barrera endotelial desestabilizada.

3. Justificación

El desajuste en la barrera endotelial durante un proceso inflamatorio puede causar la formación de edema con consecuencias patológicas severas, por lo que es importante conocer la regulación de la permeabilidad endotelial. La ausencia de cortactina en células endoteliales causa una disminución en la activación de Rap1 en condiciones basales. Además en su ausencia en células epiteliales se observó una alteración en el tráfico vesicular. Sin embargo no se conoce como cortactina afecta los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la barrera endotelial.

4. Hipótesis

Cortactina regula la función de la barrera endotelial a través de la secreción de adrenomedulina (afectando el tráfico vesicular) y/o afectando la función de GEFs de Rap1.

5. Objetivo General

Examinar el papel de cortactina en la morfología celular, en la secreción de adrenomedulina y su posible interacción con GEFs de Rap1 en células endoteliales.

6. Objetivos Específicos

1. Examinar si en la ausencia de cortactina se reduce la secreción de adrenomedulina.
2. Evaluar cambios morfológicos en células endoteliales *in vitro* y *ex vivo* por microscopía electrónica.
3. Estudiar posibles interacciones de Epac1, PDZ-GEF y C3G con cortactina.

7. Metodología

7.1 Cultivo celular

Células endoteliales de microvasculatura humanas 1 (Human Microvascular Endothelial Cells 1, HMEC-1) fueron cultivadas en medio MCDB-131 suplementado con suero fetal bovino al 10%, 1ng/ml de factor de crecimiento celular endotelial (ECGF), 1 µg/ml hidrocortisona, L-glutamina y solución antimicótica/antibiótica, a 37°C en atmósfera con CO₂ al 5%. Para llevar a cabo los pasajes, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X, tratadas con tripsina al 0.25%, diluidas en medio fresco y sembradas en cajas de Petri de plástico Corning® de 60mm y 100mm.

7.2 Generación de células HMEC-1 Knockdown (KD) de Cortactina

Las células HMEC-1 KD de cortactina fueron generadas utilizando un sistema lentiviral con los plásmidos pTLA1-Pak, pTLA1-Enz, pTLA1-Env, PTLA1-Rev and pTLA1-TOFF (Thermo Scientific) los cuales codifican las proteínas necesarias para formar partículas virales. shRNA contenido en plásmidos pLKO.1 (scrambled: CCGAGAAGTGGAGAAGCATAC (plásmido control cuya secuencia no interfiere con la expresión de genes) and ctn-directed: CACCAGGAGCATATCAACATA), provistos por el Dr. Charles Parkos (Emory University, Atlant, GA) y el Dr. Porfirio Nava (Cinvestav, México).

7.3 Cuantificación de adrenomedulina por ensayo enzimático competitivo

Se realizó una extracción de sangre de 5 ratones C57 KO de cortactina y 5 ratones WT, a partir de la vena lateral de la cola de ratón, utilizando una jeringa BD Plastipak™ de 1ml con anticoagulante EDTA. La muestra de sangre se centrifugó por 15 min a 1000xg a una temperatura de 4°C, se tomó una muestra de plasma y se realizó el ensayo inmediatamente o se guardó muestras a 80°C para su posterior uso. Se colocaron 50µl de cada muestra en cada pozo de una placa que tiene el anticuerpo monoclonal que captura adrenomedulina de un kit de adrenomedulina (Cloud-Clone Corp®). Existe una reacción de inhibición competitiva entre una adrenomedulina unida a biotina y la adrenomedulina de la

muestra con el anticuerpo. Se colocó posteriormente avidina unida a HRP, la cual con la posterior colocación del sustrato cromogénico TMB es oxidado y hay un cambio de coloración por lo que la acción de la enzima es inversamente proporcional a la concentración de adrenomedulina en la muestra. Se colocó finalmente una solución de paro con la cual se detiene la reacción anterior y se observa una coloración amarilla. Se leyó la muestra en un lector de ELISA a 450nm.

7.4 Perfusión de Ratones C57

2 Ratones C57 WT y KO de cortactina fueron anestesiados con Ketamina a 100mg/Kg de peso y Xilacina a 10mg/Kg de peso. Para proceder a la perfusión se realizó una incisión transversal a la altura del diafragma. Se procedió a levantar las costillas de la caja torácica hasta exponer el corazón. Se realizó una incisión pequeña en el ventrículo izquierdo, introduciendo una cánula por donde fluye la solución de fijación posterior a hacer un lavado con 30ml de buffer de cacodilatos al 0.1M (Figura 13). El cacodilato fue impulsado por una bomba de flujo. Una vez realizado esto se introdujeron 50ml de solución de fijación (glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% en buffer de cacodilatos 0.1M, pH 7.4). Una vez terminada la perfusión se procede a la extracción y corte en pequeños cuadros de 3 mm de los pulmones, posterior se procesan para utilizarse en microscopia electrónica.

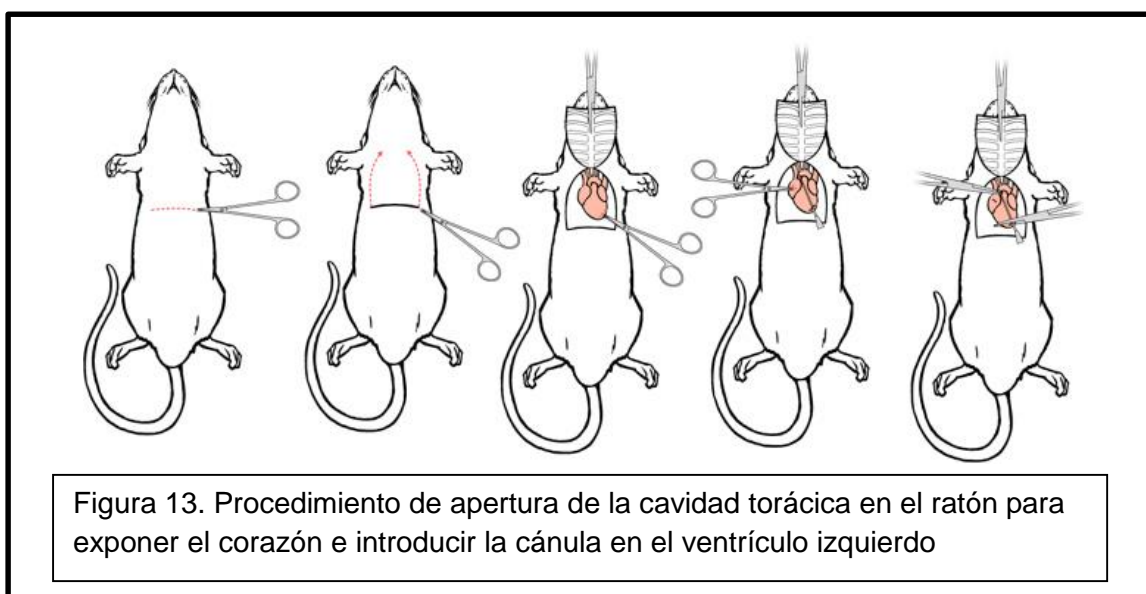


Figura 13. Procedimiento de apertura de la cavidad torácica en el ratón para exponer el corazón e introducir la cánula en el ventrículo izquierdo

7.5 Extracción y purificación de células endoteliales de microvasculatura pulmonar murina

Para la preparación de 2 pulmones, se utilizaron 40µl de Dynabeads® Sheep Anti-Rat IgG (Invitrogen™), las cuales fueron enjuagadas con PBS1X utilizando un separador magnético, y se les colocó 30µl de anticuerpo anti PECAM-1 con 200µl de PBS 1X/0.1% de BSA. Estos se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se realizó el sacrificio de los ratones por dislocación cervical, se continuó incidiendo en el área del tórax hasta exponer los pulmones y extraerlos. Los pulmones fueron enjuagados con PBS1x/Antibiótico/Antimicótico1X. Estos fueron macerados completamente y se transfirieron en una solución de colagenasa previamente calentada a 37°C (20mg de Colagenasa (Colagenasa A, Roche©), 25µl 1M de Cloruro de Calcio, 0.2ml de penicilina/estreptomicina agregando finalmente 20 ml de PBS1X). Se dejó el macerado por 1.5 hrs a 37°C agitando cada 10 minutos. Pasado el tiempo se resuspendieron las células y se transfirieron a un tubo Falcón de 50ml pasando a través de una malla de 70µm agregando 10ml de DMEM al 10% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina/estreptomicina1X. Se centrifugaron a 1200rpm por 5 minutos. Una vez obtenido el pellet se transfirieron a un tubo Eppendorf® con 1ml de DMEM al 10% de SFB agregando 30µl de las perlas acopladas con el anticuerpo contra PECAM-1. Se incubó la suspensión por 45min a 4°C en agitación. Pasado el tiempo se realizaron 3 lavados con DMEM 10% de SFB con ayuda del separador magnético. Finalmente se cultivaron en un pozo de una placa de 6 pozos tratada previamente con Attachment Factor 1X (Gibco®), utilizando DMEM al 20% de SFB con antibiótico/antimicótico 1X, Glutamina 1X. Una vez que el cultivo celular llegó a la confluencia, se desprendieron las células utilizando tripsina al 0.25%. Se centrifugaron las células a 900rpm por 5 min. Se resuspendieron con 1ml de medio DMEM 10% de SFB y se colocaron 10 µl de las perlas magnéticas acopladas al anticuerpo, preparadas como se mencionó anteriormente. Se ponen en agitación por 45 min y nuevamente se volvieron a cultivar. Esto para asegurarnos de tener la mayor cantidad de células endoteliales, este proceso de purificación se repitió de 3 a 4 veces.

7.6 Tratamiento celular con Dynasore

Monocapas confluentes de células MLEC (Murine lung endotelial cell), que fueron obtenidas a partir de pulmones de ratones C57. Se sincronizaron en medio DMEM suplementado con 1% de suero fetal por mínimo 6 hrs. Seguido se cambió el medio con DMEM-1 suplementado con 10% de suero fetal bovino y se realiza un tratamiento con Dynasore (Sigma-Aldrich®), un inhibidor no competitivo de dinamina permeable en la célula. Dynasore se utilizará en concentraciones de 80µM durante 30 min (5), pasado este tiempo se iniciara con la fijación de las células para observarse a la microscopia electrónica.

7.7 Microscopía electrónica

Para observar el tráfico vesicular y la morfología del Golgi se utilizaron monocapas confluentes de HMEC-1; wildtype, scrambled y knockdown de cortactina, tratadas con TNFα a 5nM por 18 horas, con adrenomedulina 1µM por 20 minutos, o un control sin tratamiento. Asi como células MLEC tratadas con dynasore asi como un control sin tratamiento. También el tejido pulmonar obtenido de la perfusión de los ratones C57 WT y KO de cortactina. Todas las células, como el tejido pulmonar, se fijaron con glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% en buffer de cacodilato (Na(CH₃)₂AsO₂) 0.1M pH 7.4 durante 2 horas. Se realizaron 3 lavados con buffer de cacodilato. Se post-fijaron en OsO₄ al 1% y KFeCN al 1.5% en buffer de cacodilato 0.1M pH7.4 por 1 hora (30 minutos a 4°C y 30 min a temperatura ambiente), posteriormente se realizaron lavados con buffer de cacodilatos 0.1M. Se procedió con la deshidratación utilizando alcohol como lo muestra la tabla 1;

Pasos	Concentración de alcohol	Temperatura	Tiempo
1	Alcohol al 60%	4°C	15 min.
2	Alcohol al 70%	4°C	15 min.
3	Alcohol al 80%	4°C	15 min.
4	Alcohol al 90%	4°C	15 min.
5	Alcohol al 100%	4°C	45 min.

Tabla 1. Deshidratación con alcohol. Los pasos son consecutivos, solo se cambiarán las concentraciones de alcohol pasado el tiempo de incubación con cada uno.

Posteriormente se infiltraron las células, como el tejido, con resina de tipo epoxi y de baja viscosidad (Spurr) como se muestra en la siguiente tabla:

1:3resina/alcohol 2hrs	1:1 Toda la noche	Resina pura 2hrs	Resina pura 2hrs	Resina pura Toda la noche
---------------------------	----------------------	---------------------	---------------------	------------------------------

Se realizaron cortes en un ultramicrotomo (Leica®) de la muestra, esta se encontraba dentro de un bloque con resina polimerizada. Los cortes se colocaron sobre una rejilla (32) (Figura14). Una vez obtenidos los cortes, se hicieron dos contrastes. El primero con acetato de uranilo al 4% en etanol al 25% y posteriormente otro con citrato de plomo. Finalmente se observó la morfología celular en el microscopio electrónico (Jeol® JEM-1400).

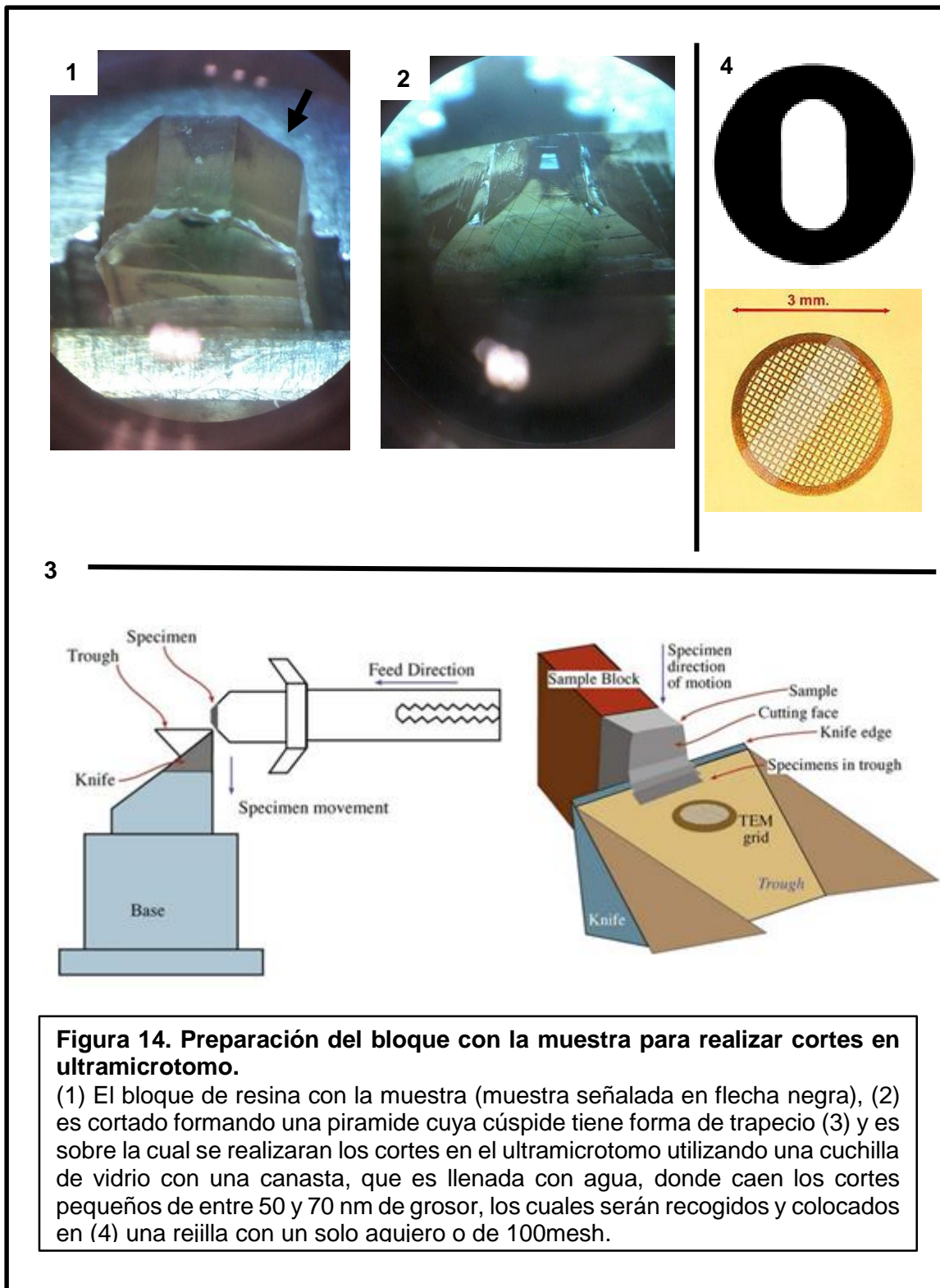


Figura 14. Preparación del bloque con la muestra para realizar cortes en ultramicrotomo.

(1) El bloque de resina con la muestra (muestra señalada en flecha negra), (2) es cortado formando una piramide cuya cúspide tiene forma de trapecio (3) y es sobre la cual se realizaran los cortes en el ultramicrotomo utilizando una cuchilla de vidrio con una canasta, que es llenada con agua, donde caen los cortes pequeños de entre 50 y 70 nm de grosor, los cuales serán recogidos y colocados en (4) una rejilla con un solo agujero o de 100mesh.

7.8 Co-inmunoprecipitaciones

Se obtuvieron lisados totales de proteínas a partir de monocapas confluentes de HMEC-1 en condiciones basales, de HMEC-1 en condiciones inflamatorias (TNF α 5 nM por 18 horas) y al tratar con adrenomedulina 1 μ M por 20 minutos (22). Utilizando buffer de lisis (Imidazol 50mM, Tris-HCl pH8 50mM, NaCl 150mM, Tritón 1%, suplementada con inhibidores de proteasas (NaF 1mM, y Complete 1X (Roche®)); se cosecharon las células con ayuda de un gendarme y después las muestras se incubaron a 4°C por 30 min en agitación. El lisado fue centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C para remover el debris celular. A partir de estos extractos proteicos se realizó la inmunoprecipitación, utilizando un anticuerpo monoclonal contra cortactina (clona 4F11 Millipore Cat # 05-180) unido a perlas de proteína G-Sefarosa, un control sin anticuerpo y otro utilizando suero preimmune. Se realizaron 4 lavados con 1ml de buffer de lisis sin complete, y se centrifugó por 2 minutos a 5000rpm a 4°C. Con los complejos proteicos inmunoprecipitados de cada uno de los casos y el input (una alícuota del lisado total de proteínas) se realiza una SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 8% en condiciones de 100V por 90 min y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa en condiciones de 200mA por 90 min para realizar un Western-Blot.

7.9 Western-Blot (WB)

Las membranas se bloquean con TBST conteniendo 5 % de leche baja en grasas por 1h a temperatura ambiente y se incuban posteriormente a 4°C durante la noche con los anticuerpos contra Epac1 (Cell Signaling # 4155), PDZGEF-2 (Bethyl #A301-967A), C3G (Santa Cruz Biotechnology #sc-32055), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology #sc-48166) y γ -tubulina (Sigma-Aldrich #T6557) diluidos en TBS-T y 0.04% de azida de sodio. Al día siguiente las membranas serán lavadas 3 veces con TBS-T por 10 minutos cada lavado y serán incubados con anticuerpos secundarios especie-específicos acoplados a la peroxidasa HRP por 1h a temperatura ambiente. Después de 3 lavadas por 10 minutos cada una, las señales se observan utilizando un sustrato quimioluminiscente para la

detección de HRP SuperSignal® West Pico o SuperSignal® West Femto observando la señal en un equipo ChemiDoc (BioRad®).

8. Resultados

8.1 La ausencia de cortactina reduce los niveles secretados de adrenomedulina en sangre.

Para analizar si cortactina tiene una función importante en el tráfico vesicular, específicamente con la secreción de adrenomedulina, hormona fortificante de la barrera endotelial. Fueron genotipificados los ratones C57 se realizó una PCR utilizando los primers FW 5'-AGGGTCTGACCATCATGTCC-3' Y RV 5'-GTGCTGTTTCATCCACCATGC-3' observándose una banda de 900 pb para los ratones WT y una de menor peso de 400 pb para los ratones KO, significando que estos tienen una deleción del exón 7, produciendo un mensajero más corto que es degradado antes de producirse la proteína. Genotipificados los ratones WT y KO se comparó la concentración de adrenomedulina en sangre encontrándose una menor concentración de adrenomedulina en el plasma de los ratones KO de cortactina en comparación con los ratones WT, sugiriendo la importancia de cortactina en la secreción de adrenomedulina (Figura 15).

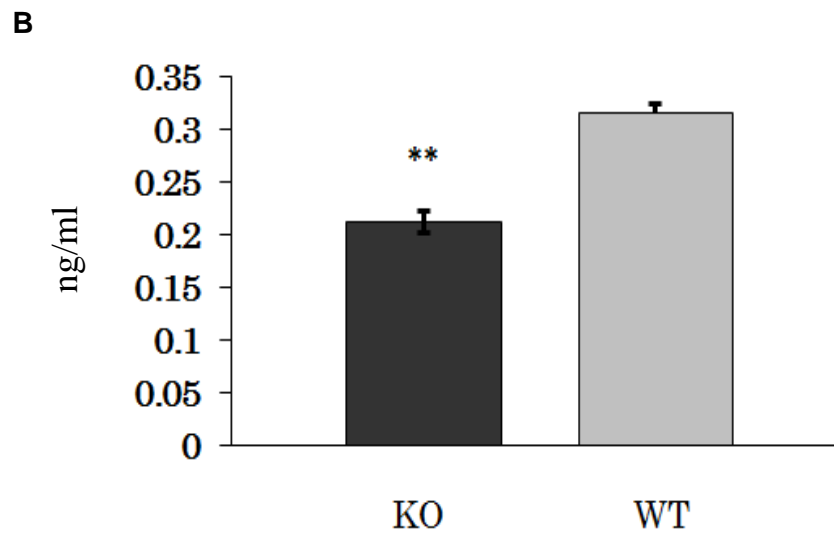
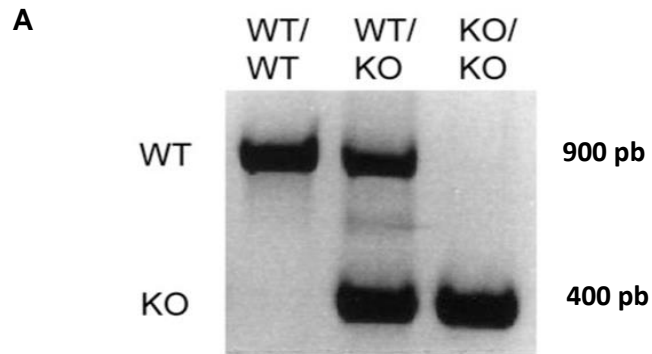


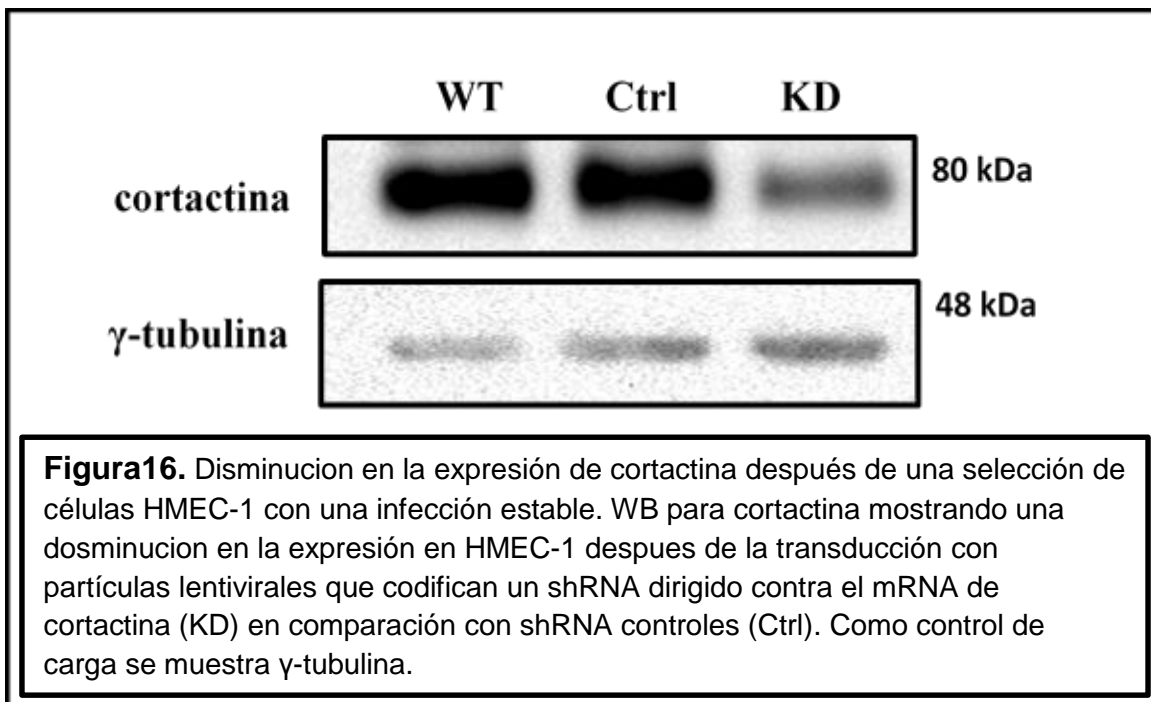
Figura 15. Niveles de adrenomedulina en ratones C57 WT y KO de cortactina.

(A) Genotipificación de ratones utilizando los primers mencionados obteniendo una banda de 900pb para el WT, y una banda de 400pb para el KO. Los ratones heterocigotos se observan ambas bandas pero no se utilizaron en este estudio. (B) Grafico que muestra el promedio de la cantidad detectada de adrenomedulina (ng/ml) en plasma de 5 ratones WT como KO. **p<0.01

8.2 En ausencia de cortactina se observa una desorganización del aparato de Golgi y un incremento en el tamaño de vesículas

Como se observó, la ausencia de cortactina disminuye la secreción de adrenomedulina. Para evaluar porque se ve afectada la secreción, se observaron células endoteliales por microscopia electrónica para visualizar morfología y tráfico vesicular.

En primera instancia se utilizó la línea celular endotelial de microvasculatura pulmonar humana con un KD estable de cortactina utilizando un sistema lentiviral que expresa un RNA complementario al mensajero de cortactina. Para corroborar que las células utilizadas efectivamente tienen una disminución en la expresión de cortactina se realizó un WB y se observó efectivamente una disminución en la expresión en relación con las células WT y las células scrambled (Figura 16).



Estas células fueron fijadas y contrastadas, como se mencionó en la metodología para poder ser observadas al microscopio electrónico. En la figura 17 se observa un aparato de Golgi de una célula endotelial WT con una estructura normal en cuanto a las cisternas es decir, cisternas aplanadas que se encuentran apiladas unas encima de otras. Además se localizó cercanamente el núcleo. Las vesículas que se observan cercanas al aparato de Golgi, de aproximadamente 50nm, son de un tamaño regular. De igual forma se observa en la célula scrambled (Figura 18) un aparato de Golgi con las mismas características, al parecer son un control adecuado.

Sin embargo, en células KD de cortactina existen diferencias en la estructura celular, en relación con las células WT y control, observándose una desorganización de las cisternas del aparato de Golgi y deslocalización del mismo. Además de un distención de las cisternas que pudieran sugerir una acumulación de proteínas. Se observan vesículas de tamaño normal (50nm), pero también se observan vesículas de gran tamaño y un incremento la cantidad de lisosomas.

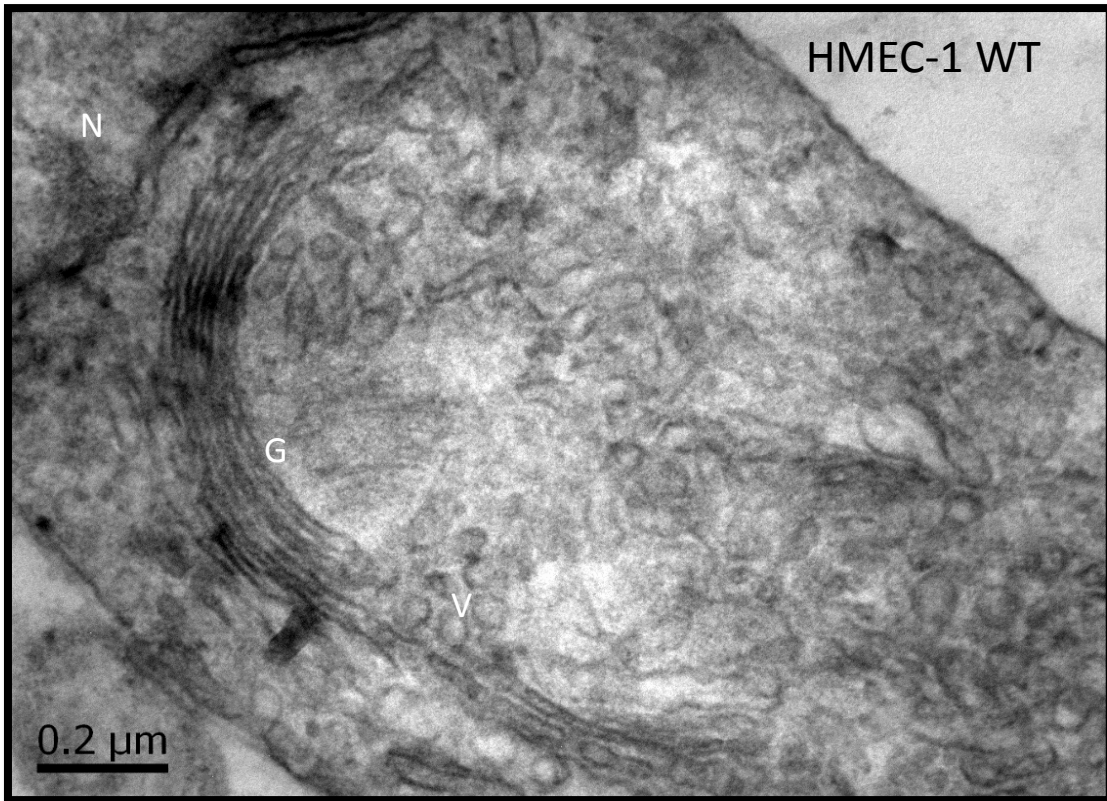


Figura 17. Fotografía de microscopía electrónica de una célula HMEC-1 observando un aparato de Golgi. Alrededor de este encontramos vesículas de aproximadamente 50nm y el núcleo. (G) aparato de Golgi, (V) trafico vesicular, (N) núcleo.

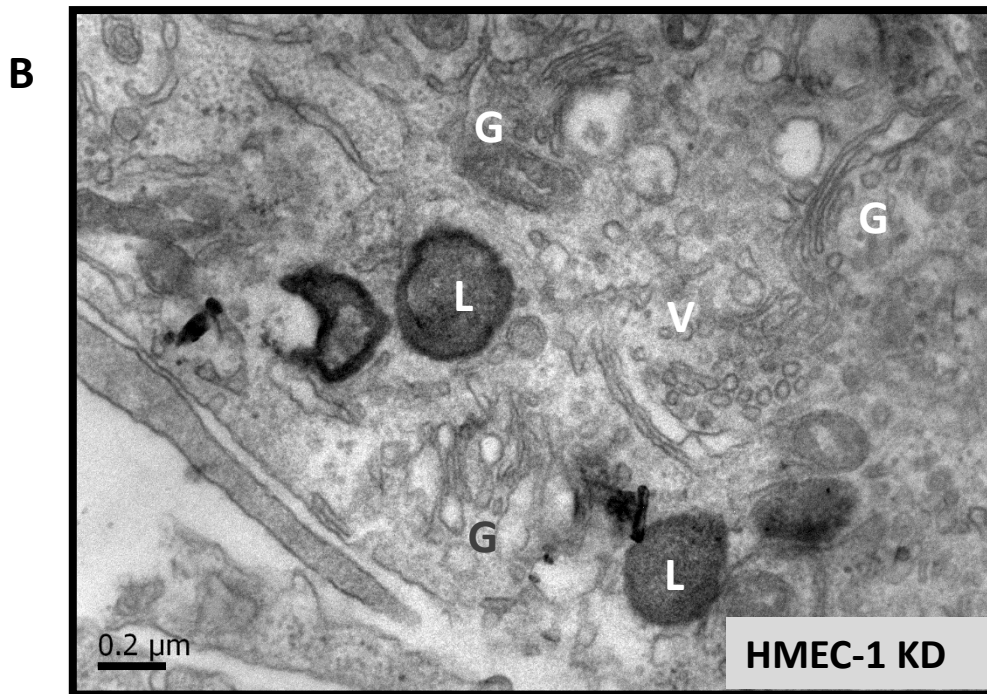
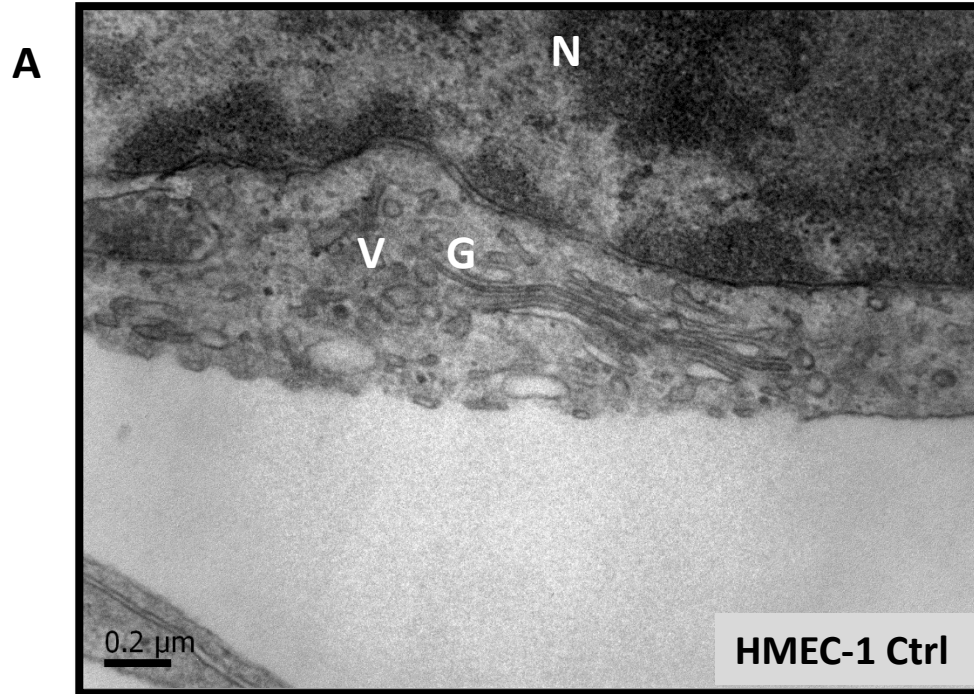


Figura 18. (A) Fotografía representativa de microscopía electrónica de una célula HMEC-1 transducida con un sistema lentiviral control, observando un aparato de Golgi de estructura normal cercano al núcleo. (B) HMEC-1 KD de cortactina con un desajuste en el aparato de Golgi, observándose cisternas del Golgi distendidas además de vesículas de mayor tamaño y un mayor número de lisosomas. (N) núcleo, (V) vesículas, (G) aparato de Golgi, (L) Lisosomas

Para observar si ocurre el mismo efecto in vivo, se obtuvieron los pulmones de ratones C57 WT y KO de cortactina y se observaron las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar murina, de igual forma por microscopía electrónica. Se localizó la microvasculatura al observar un eritrocito dentro.

Las células endoteliales del ratón WT se observan con un gran número de vesículas de tamaño normal y un aparato de Golgi como se describió en células HMEC-1 WT y scrambled. En las células endoteliales del ratón KO, se observan unas vesículas de mayor tamaño. En un acercamiento, cerca de una de las vesículas distendidas se observa una cisterna del aparato de Golgi, sugiriendo que sin la presencia de cortactina existe un crecimiento de vesículas y una desorganización del aparato de Golgi (Figuras 19 y 20).

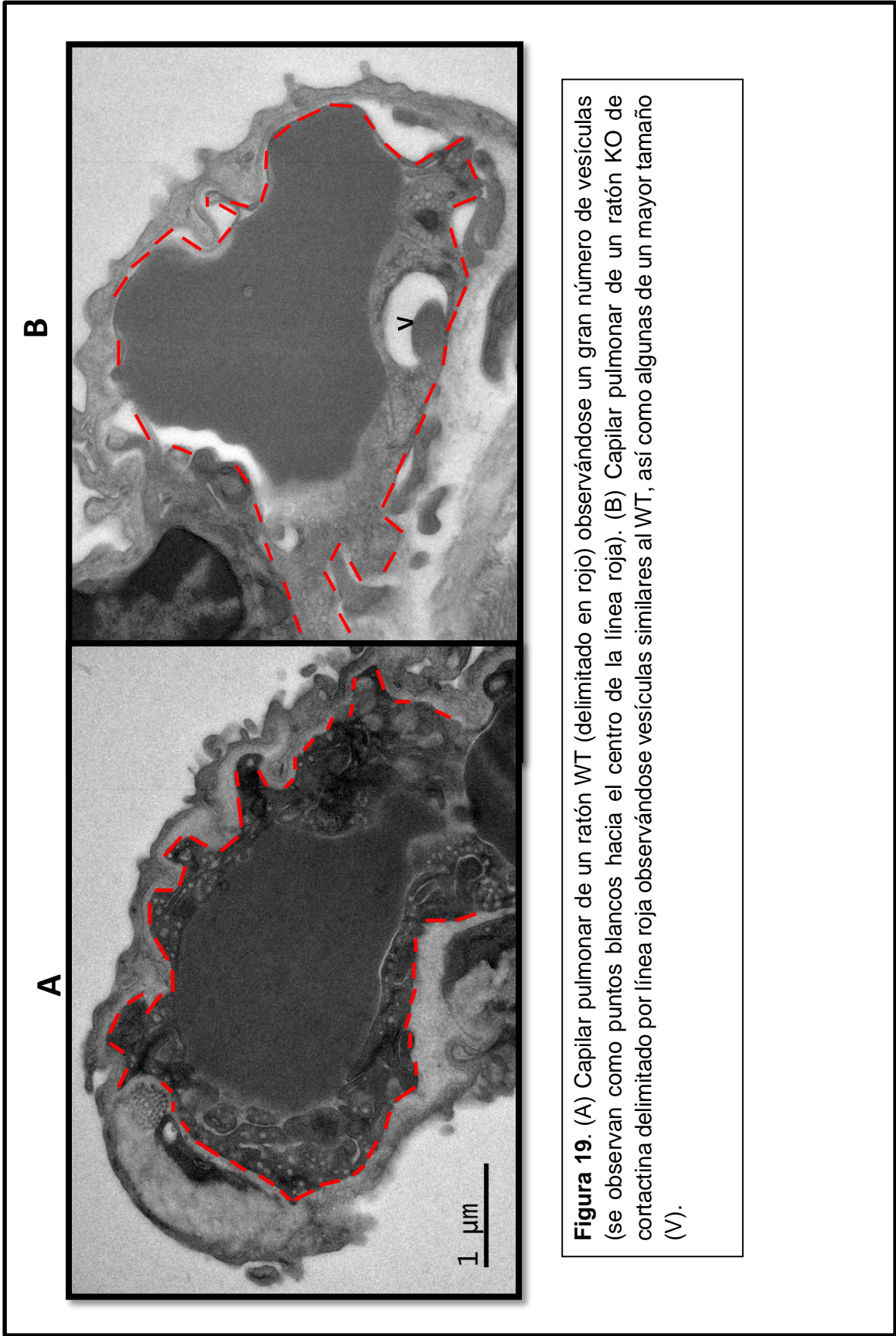


Figura 19. (A) Capilar pulmonar de un ratón WT (delimitado en rojo) observándose un gran número de vesículas (se observan como puntos blancos hacia el centro de la línea roja). (B) Capilar pulmonar de un ratón KO de cortactina delimitado por línea roja observándose vesículas similares al WT, así como algunas de un mayor tamaño (V).

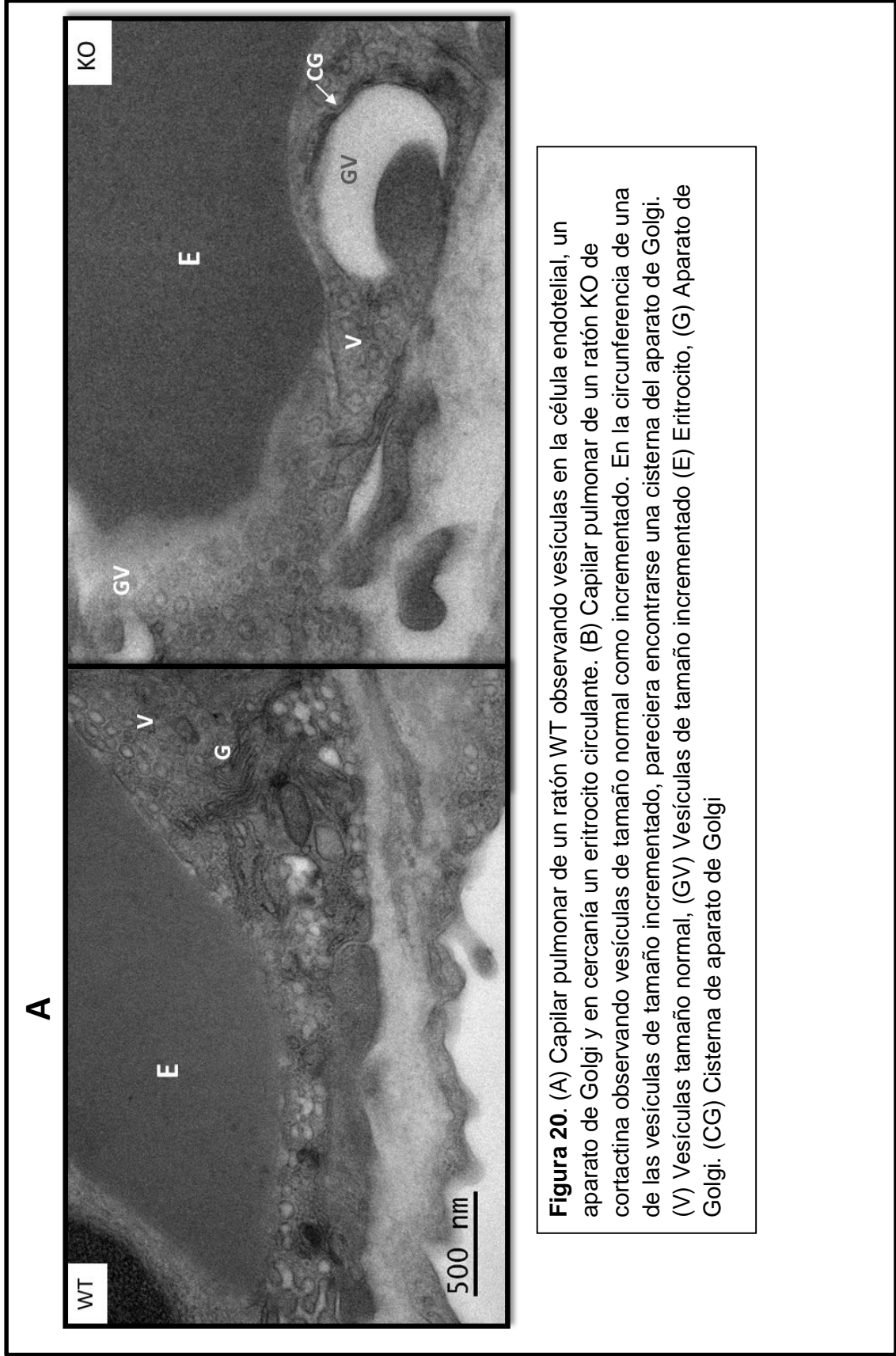


Figura 20. (A) Capilar pulmonar de un ratón WT observando vesículas en la célula endotelial, un aparato de Golgi y en cercanía un eritrocito circulante. (B) Capilar pulmonar de un ratón KO de cortactina observando vesículas de tamaño normal como incrementado. En la circunferencia de una de las vesículas de tamaño incrementado, pareciera encontrarse una cisterna del aparato de Golgi. (V) Vesículas tamaño normal, (GV) Vesículas de tamaño incrementado (E) Eritrocito, (G) Aparato de Golgi. (CG) Cisterna de aparato de Golgi

8.3 La inhibición de dinamina en células endoteliales causa un desajuste en el aparato de Golgi.

Como se observó por microscopía electrónica, un desajuste en las cisternas del aparato de Golgi en ausencia de cortactina. Se sabe que cortactina se une a dinamina y ambos tienen una función en la formación de vesículas a partir del aparato de Golgi. Por eso, se evaluó si existía un efecto similar al inhibir dinamina.

En las células MLEC sin tratamiento se observa una estructura normal en las cisternas del Golgi en comparación con las células con el tratamiento. En las células tratadas con dynasore, las cisternas del Golgi se observan distendidas y no aplanadas como normalmente se observan. Parecido a lo que observamos en ausencia de cortactina. Una diferencia encontrada es que no se observaron vesículas grandes, como se observaron en ausencia de cortactina (Figura 21).

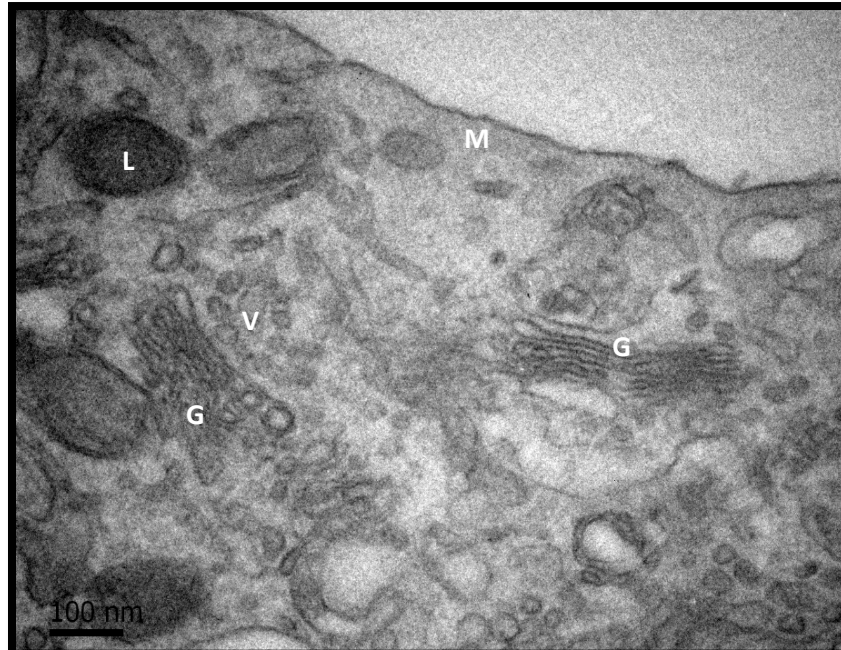
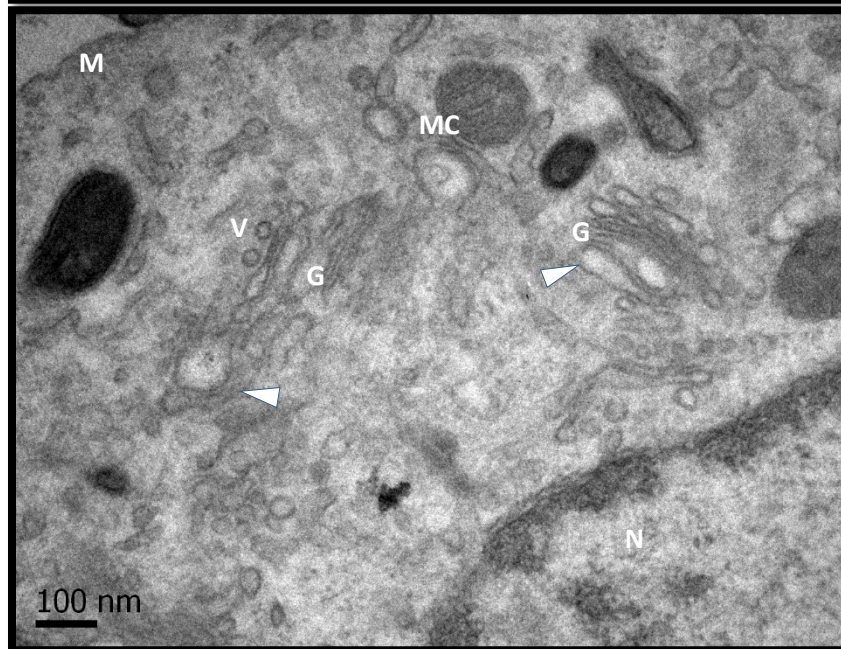
A**B**

Figura 21. (A) Célula endotelial pulmonar murina (MLEC). Observamos 2 aparatos de Golgi, con cisternas de tamaño normal. De igual forma vesículas de tamaño normal. (B) MLEC tratada con dynasore, inhibidor de dinamina, a una concentración de $80\mu\text{M}$ por 30 minutos. Se observa una distensión de las cisternas del aparato de Golgi (señaladas por la cabeza de flecha). (M) Membrana celular, (V) Vesículas, (G) Aparato de Golgi, (L) Lisosoma, (MC) Mitocondria, (N) Núcleo.

8.4 Cortactina interactúa con PDZ-GEF y Epac1 en condiciones basales, y con C3G en condiciones inflamatorias.

La ausencia de cortactina afecta la permeabilidad endotelial y la permeabilidad está regulada directamente por la GTPasa pequeña Rap1. Por tanto es probable que cortactina esté afectando la función de los GEFs activadores de Rap1 al interactuar con ellos.

Para evaluar esto se realizó una co-inmunoprecipitación utilizando como proteína carnada a cortactina y observar por WB que proteínas están formando un complejo con estas. Se observó que cortactina está interactuando, con Epac1 y PDZ-GEF en condiciones basales en células HMEC-1 aunque todavía no se sabe si esta interacción sea de manera directa o indirecta (Figura 22). Además se observó en condiciones inflamatorias una pérdida de estas interacciones y en su lugar una interacción con C3G. Por lo cual es probable que cortactina de cierta manera se encuentre involucrada con la activación de Rap1 a través de diferentes GEFs en condiciones basales e inflamatorias.

Como controles de la coimmunoprecipitación se realizó una co-inmunoprecipitación sin anticuerpo, para observar que no se unen proteínas de manera inespecífica a las perlas de proteína G-Sefarosa, y se utilizó también un suero pre-inmune, para observar que la precipitación por el anticuerpo de cortactina es específico. Como control positivo se conoce que cortactina interacciona con tubulina. Como control negativo, se conoce que GAPDH no tiene ninguna relación con cortactina. Un hallazgo observado es que durante el estímulo con adrenomedulina se observó una pérdida de la interacción de cortactina con tubulina.

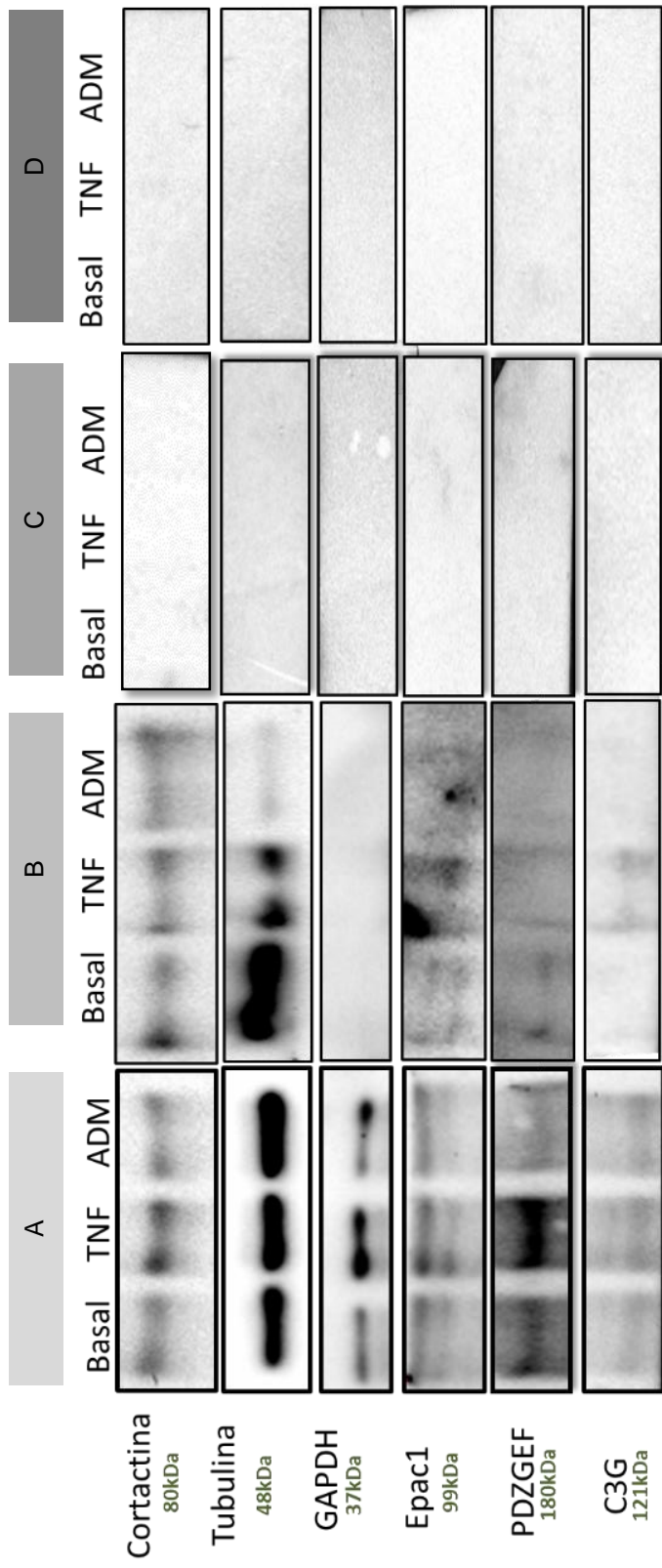


Figura 22. (A) WB del lisado total de células HMEC-1. (2) Co-immunoprecipitación de cortactina revelando en WB los GEF de Rap1 utilizando como control positivo a tubulina y control negativo a GAPDH. (3) Control de co-immunoprecipitación sin anticuerpo contra cortactina. (4) Control de co-immunoprecipitación utilizando suero pre-inmune de rata.

9. Discusión

Cortactina es una proteína que funge como un factor nucleador tipo 2 del citoesqueleto de actina, y tiene un importante papel en el mantenimiento de la barrera endotelial, ya que si se elimina su expresión, se afecta la permeabilidad endotelial, así como las uniones adherentes de células endoteliales adyacentes (13,33).

Además se ha demostrado en células KO de cortactina que existe una disminución en la activación de Rap1 en condiciones basales, por lo que cortactina podría estar afectando dicha activación y además la función de PDZ-GEF. Esto es sugerido ya que también se ha descrito en células endoteliales KD de PDZ-GEF que existe una disminución en la activación de Rap1 (13,8). Como se observó cortactina interacciona en un complejo con PDZ-GEF ya sea de manera directa o indirecta y afectar el mantenimiento de las uniones intercelulares y por tanto la permeabilidad o su localización en la membrana celular. Para comprobar esto último sería necesaria la realización de inmunofluoresencias.

Como se observó en condiciones inflamatorias existe una interacción entre cortactina y C3G. Aunque aún no se sabe si esta es directa o indirecta, se conoce que C3G interactúa de manera directa con proteínas con el dominio SH3 como lo es la proteína adaptadora Crk, Aunque no se conoce si lo hace directamente con cortactina, esta también tiene un dominio SH3. En un estudio se demostró que Crk está involucrada en la activación de C3G por la fosforilación de la tirosina 504 esto por su unión con Src cinasas, conduciendo un cambio conformacional en C3G permitiendo su actividad de GEF. Así como por el reclutamiento de C3G a la membrana plasmática. Se demostró además al hacer una mutación en el dominio SH3 de Crk, se disminuye la activación de C3G. Sin embargo puede ser probable que la función de Crk pueda ser sustituida por otra proteína como podría ser cortactina, ya que si se sobre expresa en la célula Src cinasas existe un mayor nivel de fosforilación de C3G a que si solo se sobre expresa Crk (34).

Se conoce que cortactina tiene la posibilidad de unirse de igual forma a Src cinasas, esta unión a través de un enlace de cistina entre Src C185 en su dominio

SH2 con C112/246 de cortactina que se encuentran en los repetidos 1 y 5 del dominio de unión a actina filamentosa (35). Por eso es tentador especular que cortactina, pudiera ser una proteína de andamiaje involucrada en la fosforilación de C3G al ser una proteína de unión a Src cinasas, facilitando su función, durante la recuperación de la barrera endotelial.

Se demostró que cortactina interacciona en un complejo con Epac1 en condiciones basales. Esta interacción solo podría deberse para mantener a Epac1 cercano a la membrana celular en un estado autoinhibido y al momento de activarse permita la interacción con ezrina. Ezrina es una proteína que conecta la membrana plasmática con el citoesqueleto de actina. Se sabe que la interacción entre Epac1 y ezrina es debida a un incremento en el AMPc intracelular a través del dominio FERM de ezrina, y cuando ezrina se encuentra fosforilada en la T567 (36).

Durante la recuperación de la barrera endotelial que ocurre después de un estímulo inflamatorio existe una fortificación de la misma, al disminuirse las fibras de estrés (tensión radial) y al aumentar la actina cortical (tensión de unión), este proceso es inducido en parte por la hormona adrenomedulina (23). La adrenomedulina incrementa el AMPc intracelular activando a Rap1 a través de Epac1.

Encontré en este proyecto que durante el tratamiento con adrenomedulina en las células endoteliales, es decir en el momento en el que existe la activación Epac1, este ya no interacciona con cortactina. La activación de Epac1 implica que este sufra un cambio conformacional: en ausencia de AMPc, la región regulatoria que contiene el dominio de unión a AMPc interactúa directamente con la región catalítica, inhibiendo la actividad de GEF. Su unión con AMPc induce un cambio conformacional en la proteína liberando el efecto autoinhibitorio del extremo N-terminal (37). Nuestros datos sugieren que la interacción de cortactina con Epac1, podría estar involucrada en el mantenimiento de un estado autoinhibido y/o para mantenerlo cercano a la membrana celular, cuya activación permitiría una interacción con ezrina. Sería importante conocer también si existe una diferencia

en la fosforilación de cortactina en condiciones basales y durante un estímulo con adrenomedulina, para hacer una correlación con lo observado.

Adrenomedulina, una hormona autocrina paracrina de las células endoteliales, incrementa la actina cortical y así fortifica la barrera endotelial, al activar a Epac1. Esta fortificación previene una salida excesiva de líquido durante un estímulo inflamatorio persistente, ya que sin esta fortificación la salida de líquido, es decir la formación del edema, puede tener un efecto patológico. (38). Un hallazgo en este trabajo, fue que durante el estímulo con adrenomedulina, se pierde la interacción con tubulina. Esto podría tener un efecto positivo en la fortificación de la barrera, ya que se ha descrito que la activación de Epac1 está involucrada con la polimerización de microtúbulos, y es independiente a la activación de Rap1. De esta manera no solo exista un incremento en actina cortical, sino que también un incremento de microtúbulos, y ambos mejoren la tensión de unión entre las células. Por lo que la secreción de esta hormona resulta importante en la regulación de la barrera endotelial.

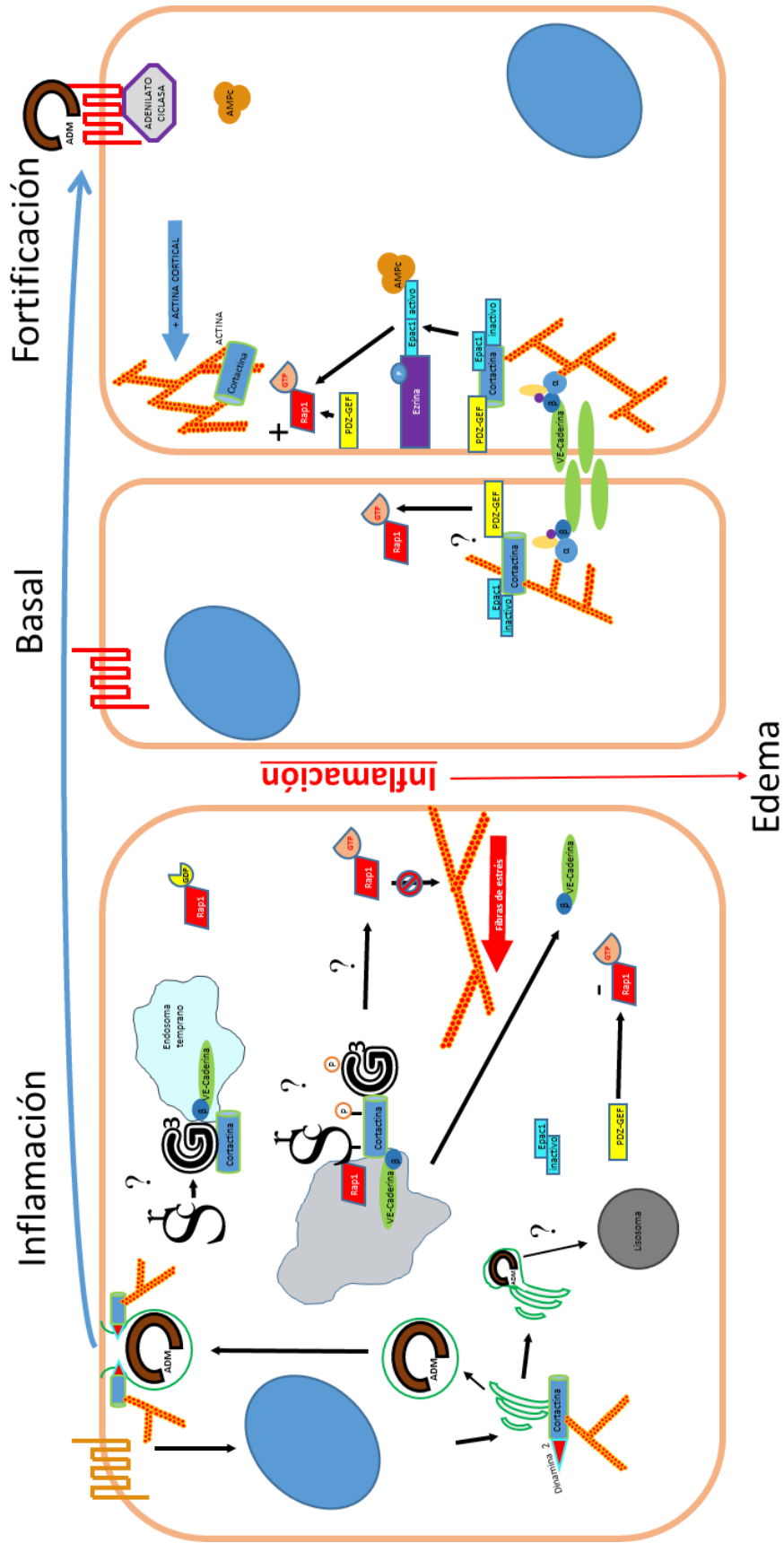
Los procesos involucrados en la exocitosis incluyen la polimerización de actina, la cual crítica en la formación de vesículas a partir del aparato de Golgi, así como la presencia de cortactina (25). Se ha demostrado que la expresión de cortactina carente del dominio SH3, inhibe el tráfico vesicular a partir de trans-golgi, incrementándose el tamaño de las cisternas del Golgi, evitando la secreción de proteínas, esto demostrado en células epiteliales (41,42).

Respecto a lo anterior, se observó en los ratones KO de cortactina un nivel menor de adrenomedulina en plasma sanguíneo en comparación con los ratones WT por lo que es posible que tenga una relación con lo que se observó ex vivo en capilares pulmonares en ratones KO de cortactina donde se encontraron vesículas y cisternas del Golgi distendidas donde se pueda encontrar localizada adrenomedulina que no puede secretarse y de igual forma en condiciones inflamatorias, pueda ser posible encontrar un nivel menor de adrenomedulina en comparación con los WT, lo cual tendría un efecto en la fortificación de la barrera

endotelial y sea más difícil la recuperación de un edema, bajo un modelo de edema pulmonar en estos ratones.

En células endoteliales KD de cortactina como se observó existe este mismo efecto, es decir, distensión de las cisternas del aparato de Golgi y un aumento de tamaño en las vesículas, que probablemente esté afectando el tráfico vesicular y por consiguiente la secreción de proteínas, en general y particularmente de adrenomedulina.

Este efecto es el mismo si es inhibida dinamina, proteína de la maquinaria exocítica que interactúa con cortactina, donde se observó una distensión en las cisternas del Golgi similar en la ausencia de cortactina, que pueda estar afectando de igual forma la secreción de proteínas. Por lo que ambas proteínas tengan una función en el proceso de formación de vesículas exocíticas, siendo probable a su vez que no tengan el mismo mecanismo.



Modelo hipotético de la función de cortactina en la activación de Rap1 en células endoteliales en diferentes estadios. En condiciones basales, cortactina puede afectar la activación de Rap1 al interactuar en un complejo con PDZ-GEF. En un estado inflamatorio cortactina al interactuar con C3G pudiese afectar a este nivel la activación de Rap1 para la recuperación de la barrera endotelial y por consiguiente el inicio en la supresión de la formación en las fibras de estrés. En estado inflamatorio se produce la hormona adrenomedulina que ayuda en el proceso de maduración y fortificación de la barrera endotelial. Además, en el proceso de secreción pudieran estar involucradas cortactina como dinamina. En el periodo de fortificación adrenomedulina permite un incremento de AMPc el cual activa a EpcA1, separándose de cortactina, y pasando de un estado autoinhibido a uno activo, aumentando por consiguiente la cantidad de Rap1 activo.

10. Conclusión

Cortactina al interactuar con PDZ-GEF e Epac1 en condiciones basales podría estar afectando la activación constitutiva de Rap1, y por consiguiente en el mantenimiento de la barrera endotelial. Durante el estímulo inflamatorio al interactuar con C3G podría estar afectando la recuperación de la barrera endotelial. De igual forma al recuperar la barrera endotelial, después de un estímulo inflamatorio, existe un periodo de fortificación, la cual está a cargo de la hormona adrenomedulina, donde se demostró que es probable que la ausencia de cortactina afecte su secreción al acumularse en las cisternas del Golgi o en vesículas. Adrenomedulina tiene un efecto sobre Epac1, el cual evita la interacción con cortactina, y de esta forma se involucra en un incremento en la activación de Rap1 durante la fortificación. Cortactina es indispensable para la integridad de la barrera endotelial por jugar un papel importante en la activación de Rap1

11. Perspectivas

Como se evaluó en ratones KO de cortactina una menor concentración de adrenomedulina basal en muestras de sangre, en relación con los ratones WT. Sería interesante evaluar en estos ratones como se encuentra la concentración de adrenomedulina bajo condiciones inflamatorias, utilizando por ejemplo modelos de sepsis y observando si se afecta la formación y/o recuperación de un edema pulmonar.

Sería importante corroborar la presencia de adrenomedulina en diferentes tipos de vesículas por inmunolocalización utilizando anticuerpos acoplados a oro dirigidos contra adrenomedulina y utilizando anticuerpos dirigidos contra marcadores de endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas para conocer en donde se localiza y si pudiese estar degradando.

Como se sabe en el proceso de secreción de adrenomedulina además de cortactina, está involucrada dinamina, sería importante conocer si bajo la inhibición de dinamina por dynasore en células endoteliales extraídas de ratones KO de cortactina existe un efecto adicional en la disminución de la secreción.

Evaluar si la actividad de Rap1 se ve afectada en células KO de cortactina en comparación con células WT, por un ensayo de pull down bajo un estímulo inflamatorio y un estímulo de fortificación de la barrera con adrenomedulina. Si en condiciones inflamatorias la interacción de cortactina con C3G fuera importante, sería esencial evaluar si dicha interacción, es con un GEF activo (fosforilado). Se podrían utilizar inhibidores de Src cinasas como PP2, y a su vez hacer el pull down de Rap1-GTP. Sería también interesante revisar si la interacción de cortactina con los GEFs directa utilizando proteínas recombinantes.

Sería importante también analizar la co-localización por inmunofluorescencia de cortactina con cada uno de los GEF para saber la localización de estos en condiciones basales inflamatorias o fortificantes.

12. Referencias

1. Ross M, y P. Wojciech. (2011). Histology, a text and atlas. 6a ed. ISBN 978-0-7817-7200-6.
2. Cullere X, Shaw S, Andersson L, Hirahashi J, Luscinckas F y T Mayadas. (2005). Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* 105: 1950-1955.
3. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein B. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: Molecular basis and pathological implications. *Developmental Cell*, 16. 209-221
4. Goddard L, Iruela-Arispe L. (2013). Cellular and molecular regulation of vascular permeability. *Thrombosis and Haemostasis* 109.3, 407- 415.
5. Yamada H, Abe T, Li S, Masuoka Y, Isoda M, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Asai A, Takei K. (2009). Dynasore, a dynamin inhibitor, suppresses lamellipodia formation and cancer cell invasion by destabilizing actin filaments. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 390, 1142-1148.
6. Cao H, Orth J, Chen J, Weller S, Heuser J, McNiven M. (2003). Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cell. Biol.*, 23(6), 2162- 2170.
7. Dubé N, Kooistra M, Pannekoek W, Vliem M, Oorschot V, Klumperman J, Rehmann H, Bos J. (2008). The RapGEF PDZ-GEF2 is required for maturation of cell-cell junctions. *Cellular Signaling*, 20. 1608-1615.
8. Hirase T y K Node. (2012). Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.302: 499-505
9. Schafer D, Weed S, Binns D, Karginov A, Parsons J, Cooper J. (2002). Dynamin2 and Cortactin Regulate Actin Assembly and Filament Organization. *Current Biology*, Vol. 12, 1852-1857.
10. Kirkbride KC, Sung BH, Sinha S y AM Weaver. (2011). Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adh Migr*.(2) 187-198.
11. Daly R. (2004). Cortactin signaling and dynamic actin networks. *Biochem J*. 382; 13-25.

12. Goley E y M Welch. (2006). The Arp2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature*. Vol. 7; 713-726.
13. Schnoor M, Lai F, Zarbock A, Kläver R, Polaschegg C, Schulte D, Weich H, Oelkers J, Rottner K, Vestweber D. (2011). Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo. *The Journal of Experimental Biom.*
14. Bos J, Rehmann H y A Wittinghofer. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins.
15. Yan J, Li F, Ingram D y L Quilliam. (2008). Rap1a is a key regulator of fibroblast growth factor 2-induced angiogenesis and together with rap1b controls human endothelial cell function. *Molecular and Cellular Biology*.5803-5810
16. Pannekoek, W.J., et al., Epac1 and PDZ-GEF cooperate in Rap1 mediated endothelial junction control. *Cell Signal*, 2011. 23(12): p. 2056-64.
17. Ando K, Fukuhara S, Moriya T. Obara Y. Nakahata N, Mochizuki N. (2013). Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. *The Journal of Cell Biology*. Vol 202, No 6. 901-916.
18. Stork P. (2007). Rap1: selective activator of β 2 integrins?. *Blood* 110:3496-3497.
19. Tsukamoto N, Hattori M, Yang H, Bos J y Minato N. (1999). Rap1 GTPase-activating protein SPA-1 negatively regulates cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, No. 26: 18463-18469.
20. Kawai J, Ando K, Tojo A, Shimosawa T, Takahashi K, Onozato M, Yamasaki M, Ogita T, Nakaoka T, Fujita T. (2004). Endogenous adrenomedullin protects against vascular response to injury in mice. *Circulation* 109: 1147-1153.
21. Cases A, Mora-Macía J. (2001). Adrenomedulina: un nuevo péptido vasoactivo. *Nefrología* Vol. XXI. No. 1. 16-25.
22. Shindo T, Kurihara H, Maemurak K, Kurihara Ym Kuwaki T, Izumida T, Minamino N, Juk H, Morita H, Oh-hashii Y, Kumuda M, Kangawa K, Nagai R y K Yazak. (2000). Hipotension and resistance to lipopolysaccharide

- induced shock in transgenic mice over expressing a adrenomedullin in their vasculature. *Circulation* 101; 2309-2316.
23. Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krüll M, Seybold J, Seeger W, Rascher W, Schütte H, Suttorp N. (2002), Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circulation Research*, 91, 618-625.
 24. McNiven M, Kim L, Krueger E, Orth J, Cao H, Wong T. (2000). Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *The Journal of Cell Biology*, 151. 187-198
 25. Merrifield C, Perrais D, Zenisek D. 2005. Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell* 121(4):593-606.
 26. Jaiswal J, Rivera V, Simon S. (2009). Exocytosis of post-golgi vesicles is regulated by components of the endocytic machinery. *Cell*, 137, 1308-1319.
 27. Lodish H, Kaiser C, Bretscher A, Amon A, Berk A, Krieger M, Ploegh H, Scott M. (2013). *Molecular Cell Biology*. 7a ed. Editorial MacMillian. 14; 639 pp.
 28. Cao H, Chen J, Krueger E, McNiven M. (2010). Src-mediated phosphorylation of dynamin and cortactin regulates the constitutive endocytosis of transferrin. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 3, No. 3, 781-792.
 29. Chua J, Rikhy R, Lippincott-Schwartz J. (2009). Dynamin 2 orchestrates the global actomyosin cytoskeleton for epithelial maintenance and apical constriction. *PNAS*, Vol. 106, No. 49, 20770- 20775
 30. Cao H, Weller S, Orth J, Chen J, Huang B, Chen L, Stamnes M y McNiven M. (2005). Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nature*. Vol.7 No. 5: 483-492.
 31. Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J y Deurs B. (2000). Rab7: A key to lysosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell*. Vol. 11: 467-480.
 32. Williams, D and C. Carter. *Transmission Electron Microscopy*. Part 1: Basics. 2a ed. Springer. 2009

33. Garcia-Ponce, A., et al., The role of actin-binding proteins in the control of endothelial barrier integrity. *Thromb Haemost*, 2015. 113(1): p. 20-36.
34. Ichiba, T., et al., Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine 504. *J Biol Chem*, 1999. 274(20): p. 14376-81.
35. Evans, J.V., et al., Src binds cortactin through an SH2 domain cysteine-mediated linkage. *J Cell Sci*, 2012. 125(Pt 24): p. 6185-97.
36. Parnell, E. and S.J. Yarwood, Interactions between Epac1 and ezrin in the control of endothelial barrier function. *Biochem Soc Trans*, 2014. 42(2): p. 274-8.
37. Breckler, M., et al., Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. *Cell Signal*, 2011. 23(8): p. 1257-66 .
38. Murray and Nadel: *Textbook of Respiratory Medicine*, 3a ed. 2000. W.B. Saunders Company.
39. Cao, H., et al., Disruption of Golgi structure and function in mammalian cells expressing a mutant dynamin. *J Cell Sci*, 2000. 113 (Pt 11): p. 1993-2002.
40. Kreitzer, G., et al., Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(2): p. 125-7.