



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Análisis de la expresión de arpin, un inhibidor del complejo Arp2/3,  
en células endoteliales y epiteliales”**

**TESIS**

Que presenta:

**SANDRA DENISSE CHÁNEZ PAREDES**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**Director de la Tesis:**

Dr. Michael Schnoor

México D.F.

Agosto del 2015

## Dedicatoria

A Dios, mis padres y mis hermanos por ser amor, comprensión y apoyo permanentes en mi vida.

“No pienses que no pasa nada simplemente porque no ves tú crecimiento o no escuchas el zumbido de los motores. Las grandes cosas crecen silenciosamente”.

Henry Drummond

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca recibida durante el periodo 2013- 2015 para la realización de este proyecto.

Al Dr. Michael Schnoor por la aceptación en su laboratorio, su tutoría y por brindarme el apoyo para asistir a mi primer congreso internacional, una de las mejores experiencias académicas y personales que he tenido.

A la Dra. Leticia Cedillo por su colaboración en la generación de nuestro anticuerpo monoclonal, su labor como asesora y por hacerme sentir parte de su equipo.

Al Dr. Julio Cordero por su ejemplo de perseverancia y pasión y por su invaluable asistencia técnica para producir nuestro anticuerpo monoclonal.

A mis compañeros Alí y Alex por su buen recibimiento en el laboratorio y ser mis primeros apoyos en el aprendizaje de técnicas de laboratorio.

Al Schnoor's team: Alí, Alex, Marthita, Omar y Karlita, por su ayuda siempre que lo necesité y la calidez en su trato que hizo del trabajo una experiencia más alegre.

A nuestra auxiliar, la Dra. Hilda Vargas por procurar la disponibilidad de los recursos para llevar a cabo nuestro proyecto.

A mi novio Ricardo por sus consejos como colega, por escucharme, animarme y apoyarme en alguna complicación y por compartir conmigo la felicidad de las victorias.

A mi familia del laboratorio de la Dra. Cedillo: Alfredo, Sofia, Julio, Jossy, Paola, Moi, David, Gaurav y Froy, por su amistad y ocurrencias que amenizaron mis jornadas de trabajo.

A mi amiga Blanca por externarme su apoyo y cariño, aún en la distancia.

A mis hermosos tíos, Juana y Alfonso, por su cariño constante, su hospitalidad el tiempo que viví con ellos y darme la satisfacción de conocer nuevos lugares.

A mis amigos, colegas, paisanos y roomies Alfredo y Omar por su valiosa amistad, confianza y cariño.

A la Dra. Rosaura por su tiempo, paciencia, asesoría y observaciones para mejorar mi trabajo.

Al Dr. Polo por su labor como asesor y por la dureza que nos mostró al inicio de la maestría, pues forjó nuestro carácter y nos motivó a superarnos.

A mis padres académicos Tania y Quintín porque cuando manifesté mi deseo de estudiar en esta institución me alentaron y creyeron en mí.

A mis colegas del laboratorio del Dr. Villegas y de la Dra. Manning por tener siempre la disposición y amabilidad de apoyarnos con equipos y reactivos.

A la Q. Leticia Alemán por su apoyo técnico con el microscopio confocal

A los técnicos que amablemente nos asistieron con la limpieza y orden de nuestro laboratorio.

¡Gracias, gracias gracias!

Con cariño, Sandy Chánez

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ixx
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
El endotelio .....	1
El epitelio.....	1
Uniones intercelulares.....	2
Alteración de las uniones intercelulares .....	4
El citoesqueleto de actina .....	6
Nucleadores de actina.....	7
El complejo Arp2/3 .....	8
Estructura del complejo Arp2/3 .....	8
Funciones celulares del complejo Arp2/3.....	8
Modelo de la nucleación y ramificación del complejo Arp2/3 .....	11
Regulación del complejo Arp2/3.....	12
Activación del complejo Arp2/3 .....	12
Inhibición del complejo Arp2/3 .....	13
GMF .....	14
Coronina .....	14
Cofilina .....	14
Gadkin 3.....	14
PICK1 .....	14
Arpin: un nuevo inhibidor del complejo Arp2/3 .....	15
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	19
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	19
<b>MATERIALES</b> .....	20

Material biológico .....	20
Soluciones.....	22
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
Cultivo celular.....	23
Extracción de RNA .....	23
Determinación de la concentración, pureza e integridad del RNA .....	24
Obtención de cDNA.....	24
Amplificación de los genes de arpin, PICK1 y gadkin por PCR de punto final. ....	24
Producción de una proteína recombinante de arpin.....	27
Diseño de <i>primers</i> .....	27
Digestión del gen arpin con enzimas de restricción .....	27
Expresión y caracterización de arpin.....	28
Digestión del DNA plasmídico de pProEx HTa con enzimas de restricción .....	28
Desfosforilación del plásmido pProEx HTa .....	28
Pruebas de ligación.....	29
Preparación de células competentes y transformación de bacterias.....	29
Ligación de DNA plasmídico digerido con el producto de PCR digerido.....	30
Extracción del DNA plasmídico de pProEx HTa- arpin Miniprep.....	30
Caracterización de DNA plasmídico pProEx HTa- arpin con enzimas de restricción .	31
Transformación de células <i>E. coli</i> BL21 Star (D3).....	31
Inducción de la expresión proteína recombinante arpin.....	31
Purificación de la proteína recombinante arpin .....	32
Generación de un anticuerpo anti- arpin .....	32
Determinación de los péptidos inmunogénicos .....	32
Esquema de inmunización .....	33
Ensayos de ELISA .....	33
Fusión de bazo con células de mieloma .....	34
Ensayos de <i>western blot</i> .....	34
Ensayos de inhibición del anticuerpo anti- arpin .....	35
Inmunofluorescencia de células HMEC-1 y CaCo-2 .....	35

Inmunofluorescencia de tejido de ratón.....	36
<b>RESULTADOS</b> .....	37
Determinación de la expresión de arpin en células epiteliales, endoteliales, y de linaje hematopoyético y en tejido de ratón.....	37
Análisis de la expresión del mRNA de arpin bajo un estímulo inflamatorio.....	39
Clonación del transcrito 2 de arpin en el plásmido pProEX- Hta.....	43
Generación de anticuerpos policlonal y monoclonal $\alpha$ - arpin .....	48
Expresión y localización de arpin en células endoteliales. ....	55
Análisis de la regulación de la expresión <i>in vivo</i> .....	57
<b>DISCUSIÓN</b> .....	60
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	65
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	66
<b>REFERENCIAS</b> .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ABP</b>	Proteína de unión a actina
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AJ</b>	Uniones adherentes
<b>AJC</b>	Conjunto de unión apical
<b>Arp</b>	Proteína relacionada a actina
<b>Arpin</b>	Proteína inhibitoria del complejo Arp2/3
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>CaCo-2</b>	Células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal humano
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CIP</b>	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
<b>C<sub>T</sub></b>	Ciclo de umbral de detección
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleósidos- trifosfato
<b>E- caderina</b>	Caderina epitelial
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>Fig.</b>	Figura
<b>Gadkin</b>	Proteína de resistencia brefeldina A gamma 1- adaptina
<b>g</b>	Gramo
<b>GEF</b>	Factor intercambiador de GTP
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato
<b>GMF</b>	Factor de maduración de la glía



<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>h</b>	Hora
<b>HAT</b>	Hipoxantina- Aminopterina- Timidina
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HMEC-1</b>	Células endoteliales de microvasculatura humana
<b><i>H. pylori</i></b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>HT</b>	Hipoxantina- Timidina
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ - D- tiogalactósido
<b>JAM</b>	Moléculas adhesiva de unión
<b>JAILs</b>	Lamelipodios intermitentes asociados a uniones intercelulares
<b>kDa</b>	kilodaltons
<b>KLH</b>	Hemocianina de lapa californiana
<b>L</b>	Litro
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>M</b>	Molar
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnesio
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLCK</b>	Cinasa de la cadena ligera de miosina
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
<b>NPF</b>	Factor promotor de la nucleación

<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>NPF</b>	Factores promotores de la nucleación
<b>O.D.</b>	Densidad óptica
<b>OPD</b>	Diclorhidrato de o-fenilendiamina
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PSB</b>	Buffer fosfato salino
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PICK1</b>	Proteína de interacción con la cinasa C1
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción de la polimerasa en cadena
<b>recom</b>	recombinante
<b>RT- PCR</b>	Reacción de transcripción inversa de la polimerasa en cadena
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>seg</b>	Segundos
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamina
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TJ</b>	Uniones estrechas
<b>VE- caderina</b>	Caderina vascular endotelial
<b>U</b>	Unidad
<b>ZO</b>	<i>Zonula occludens</i>

## RESUMEN

El complejo relacionado a actina 2/3 (Arp2/3) es un factor nucleador de actina. PICK1, gadkin y arpin inhiben a Arp2/3 a través de un motivo ácido. A la fecha, sólo existe una referencia de la caracterización de arpin donde se observó su localización en el borde de los lamelipodios de fibroblastos de ratón, un sitio donde se sabe, reside el complejo Arp2/3 para participar en el ensamblaje de uniones intercelulares. Por ello, creemos que arpin puede jugar un papel importante en la regulación de la función de la barrera y decidimos estudiar su expresión en células epiteliales y endoteliales.

Ambos transcritos de arpin en humano se expresan en proporciones similares en la línea celular endotelial HMEC-1 y epitelial CaCo-2, mientras que en células hematopoyéticas la mayor expresión de arpin corresponde al transcrito 2, sugiriendo una expresión tejido- específica de los transcritos de arpin. En tejido de ratón encontramos que la única isoforma conocida de arpin se expresa en riñón, corazón, hígado y pulmón en cantidades comparables.

Al evaluar cómo influye la inflamación sobre la expresión de arpin, encontramos que los niveles de mRNA de ambas variantes disminuye en células HMEC-1 y CaCo-2.

Para analizar la expresión de la proteína arpin, generamos un anticuerpo policlonal y monoclonal. Los niveles disminuidos de mRNA de arpin durante una inflamación se correlacionan con una disminución en la expresión de la proteína arpin en tejido de ratón en un modelo de sepsis. En condiciones normales, encontramos la colocalización de arpin con la E- caderina, lo cual sugiere su papel en la formación de contactos celulares. Mientras tanto, en un pulmón de ratón séptico la expresión de arpin disminuye y la colocalización con la E- caderina se pierde.

Se observó un patrón “puntiforme” de arpin en el citoplasma de un cultivo subconfluyente de células HMEC-1. Inesperadamente, arpin también se localizó en los núcleos y su función será evaluada próximamente.

En conclusión, arpin se expresa en células epiteliales y endoteliales y la inflamación conduce a una disminución de su expresión en estas células, que se refleja tanto a nivel de mensajero, como de proteína. Por lo tanto, arpin es un candidato interesante para estudiar la regulación en barreras de tejidos durante la inflamación.

## ABSTRACT

The actin related proteins 2/3 (Arp2/3) complex is an actin nucleating factor. PICK1, gadin and arpin inhibit Arp2/3 through an acidic motif. Until now, there is only one publication describing the expression and localization of arpin at lamellipodial cell borders in mouse fibroblasts in colocalization with Arp2/3. Since Arp2/3 is known to play an important role in cell contact formation, we speculate that arpin may also regulate endothelial and epithelial barrier integrity. Thus we decided to analyze expression of arpin in these cells.

According to our expression analysis, both arpin human transcripts are expressed in similar proportions in human endothelial HMEC-1 and epithelial CaCo-2 cell lines, whereas in the hematopoietic cells most arpin expression corresponds to the transcript 2, suggesting a tissue- specific expression of arpin transcripts. Analysis of arpin expression showed that in mouse tissue the only known isoform of arpin is expressed in kidney, heart, liver and lung in comparable amounts.

Evaluating how inflammation influences the expression of arpin, we found that the mRNA levels of both variants decreased in HMEC-1 and Caco-2 cells. In order to analyze arpin protein expression, we generated polyclonal and monoclonal antibodies.

Decreased mRNA levels during inflammation correlated with decreased expression of arpin protein in mouse lung tissue in a model of sepsis. Under normal conditions, we found colocalization of arpin with E- cadherin, suggesting its role in the formation of cell contacts. Meanwhile in a septic lung arpin expression decreased and colocalization with E- cadherin was lost.

We observed “punctate” pattern of arpin within the cytoplasm of HMEC-1 cells in a subconfluent culture. Surprisingly, arpin was also located in nuclei and its function will be assessed soon.

In conclusion, arpin is expressed in endothelial and epithelial cells and inflammation leads to a decreased expression in these cells on both mRNA and protein level. Thus, arpin is an interesting candidate to study tissue barrier regulation during inflammation.

## INTRODUCCIÓN

### **El endotelio**

El endotelio constituye el revestimiento interno de los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) y del sistema linfático. Tiene un papel importante en el control de la fluidez de la sangre al prevenir la adhesión, agregación y activación de las plaquetas<sup>1</sup>. En caso de una disrupción en el endotelio, la exposición de la matriz subendotelial y las fibras de colágeno permiten la agregación de las plaquetas circulantes<sup>2</sup>. El endotelio regula el tono vascular al promover un ambiente ateroprotector mediante la liberación de factores vasoactivos<sup>3</sup>. Es un actor crítico en la regulación del sistema inmune, ya que la transmigración de leucocitos requiere la adhesión del leucocito a la superficie endotelial<sup>4</sup>. La retracción de las células epiteliales durante una inflamación incrementa la permeabilidad de solutos y proteínas del plasma<sup>5</sup>. Las células endoteliales representan un órgano metabólico altamente activo y un órgano endócrino que produce numerosas moléculas, incluyendo hormonas vasoactivas, factores de crecimiento, factores de coagulación y moléculas de adhesión<sup>6,7</sup>. En respuesta a factores angiogénicos liberados alrededor de tejidos hipóxicos, las células endoteliales establecen las estructuras de los nuevos vasos sanguíneos<sup>8</sup>.

Las células del endotelio se conectan entre sí a través de estructuras integrales de membrana denominadas uniones<sup>9</sup>. En el endotelio se conocen dos tipos principales de uniones: las uniones adherentes (AJ) y las uniones estrechas (TJ), ambas necesarias para formar una barrera estable semipermeable, pero a la vez selectiva<sup>2,6</sup>.

### **El epitelio**

El epitelio es el tejido formado por una o varias capas de células, que recubren todas las superficies libres del organismo, y constituyen el revestimiento interno de las cavidades, órganos huecos, conductos del cuerpo y forman las mucosas y las glándulas<sup>10</sup>. Las células epiteliales que revisten diferentes órganos son responsables de separar funcionalmente distintas partes del cuerpo unas de otras y del ambiente<sup>3</sup>.

La mucosa epitelial participa en el intercambio de agua, solutos, nutrientes e incluso células<sup>3</sup>. La formación y el mantenimiento de un compartimento fluido en la superficie apical de los epitelios son críticos para el funcionamiento normal de numerosos órganos. Por ejemplo, la capa de líquido de la superficie de las vías respiratorias es vital para la depuración mucociliar de microorganismos; la generación de un vehículo líquido para la secreción de enzimas digestivas pancreáticas y su entrega en la luz intestinal, y en el intestino, el mantenimiento de un nivel apropiado de fluidez luminal para la digestión<sup>11</sup>.

El epitelio intestinal constituye la superficie mucosa más grande del cuerpo con ~400 m<sup>2</sup> de superficie de área. Como sistema endócrino entérico lleva a cabo la secreción de hormonas reguladoras de la función digestiva. La secreción luminal de mucinas y péptidos antimicrobianos establece una barrera física y bioquímica para el contacto microbiana con la superficie epitelial y con células inmunes subyacentes<sup>12</sup>.

Similar al endotelio, las células del epitelio están unidas mediante TJs y AJs. Sin embargo, dado que el epitelio protege al cuerpo del ambiente exterior, las uniones epiteliales son generalmente más fuertes que las del endotelio y constan de un gran número de moléculas de adhesión intermoleculares. Las TJs y AJs ubicadas en la región más apical de la célula se conocen como el complejo de unión apical (AJC) y se cree que tiene un papel importante en la formación y mantenimiento de la barrera epitelial<sup>13</sup>.

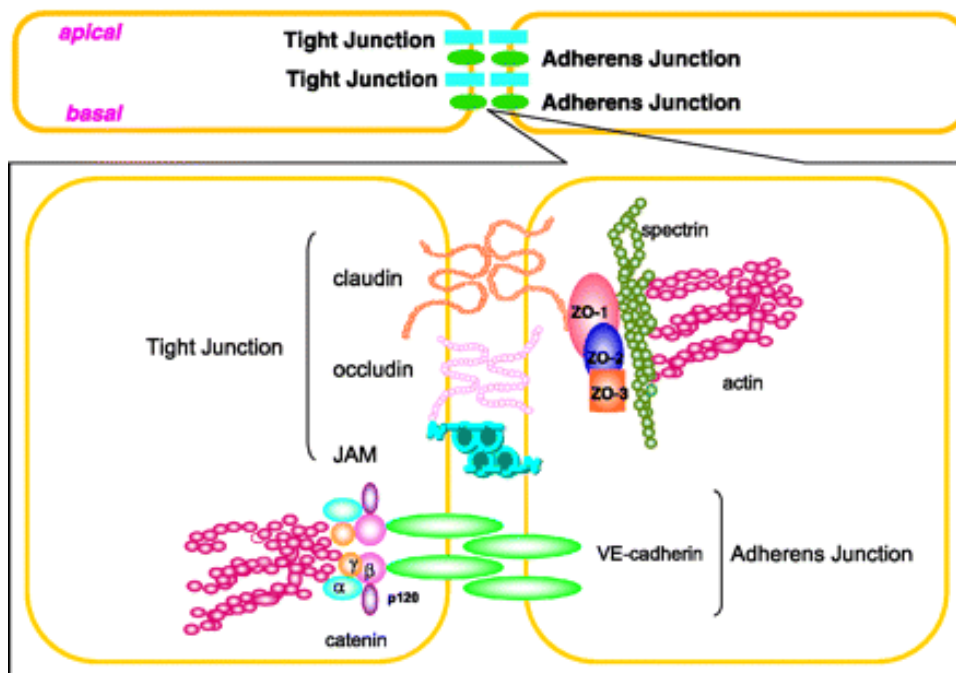
### **Uniones intercelulares**

Las células epiteliales y endoteliales están polarizadas en dos regiones distintas: el dominio apical o lumen, que se comunica con el ambiente externo y el dominio basal, que está en contacto con células vecinas o un sustrato basal.

En el endotelio y en el epitelio las uniones están formadas por proteínas transmembranales que interactúan físicamente para proporcionar un enlace entre dos membranas plasmáticas de células adyacentes y establecer una barrera paracelular eficaz<sup>4</sup>. A su vez, las proteínas transmembranales están vinculadas a proteínas intracelulares específicas, que median el anclaje al citoesqueleto de actina<sup>6,14</sup>.

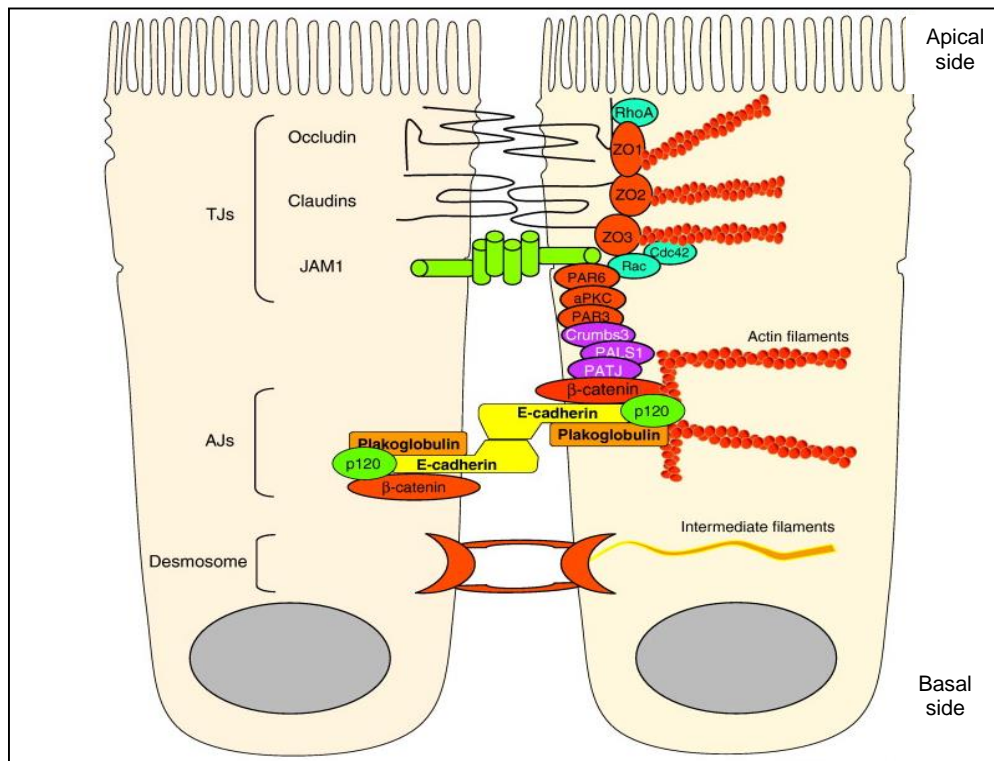
La E- caderina y la VE- caderina son los componentes transmembranales de las AJ epiteliales y endoteliales, respectivamente. Su dominio intracelular contiene un sitio de unión para la catenina p120 y otro para la  $\beta$ - catenina, ésta última puede interactuar a su vez con proteínas de unión a actina como  $\alpha$ - catenina,  $\alpha$ - actinina y la vinculina. Los filamentos de actina pueden anclarse al complejo caderina- catenina<sup>4,9</sup> (Fig. 1 y 2).

Las claudinas son los constituyentes mayoritarios de las TJ transmembranales. Otros componentes transmembranales de las TJ son la ocludina y las moléculas adhesivas de unión (JAMs). Los componentes más estudiados de la placa citosólica de las TJ son los miembros de la familia *zonula occludens* (ZO), los cuales permiten las interacciones entre diferentes proteínas transmembranales de las TJ con el citoesqueleto de actina<sup>15,7,5</sup> (Fig. 1 y 2). Adicionalmente, las células epiteliales presentan desmosomas, que son estructuras de unión localizadas en las regiones más bajas de la membrana lateral de células subyacentes. Por su lado citosólico, los desmosomas se unen a los filamentos intermedios mediante proteínas tipo caderina<sup>3</sup> (Fig. 2).



**Figura 1. Esquema de la arquitectura molecular de las uniones intercelulares en células endoteliales.** Las uniones célula- célula endoteliales sellan el espacio paracelular entre las células como una estructura de cremallera. En las TJ, se encuentran tres tipos de proteínas transmembranales: las ocludina, las claudinas y las moléculas adhesivas de unión (JAM). Estas proteínas se asocian al citoesqueleto de actina vía zonula occludens (ZO)-1, ZO-2 y ZO-3. La caderina vascular endotelial (VE), se localiza en las AJs. La  $\beta$ - catenina, se une a la VE- caderina y también interacciona con la  $\alpha$ - catenina, la cual a su vez se asocia con el citoesqueleto de actina. p120 y la  $\gamma$ -catenina también puede asociarse con la VE- caderina<sup>16</sup>.

En las células epiteliales, las uniones tienen una distribución espacial definida: las TJs se concentran en la parte apical, mientras que las AJ se encuentran por debajo de la TJs (Fig. 2). En contraste, en las células endoteliales, la arquitectura de la unión es menos definida y, a lo largo de la hendidura, las AJ se entremezclan con las TJ y en la mayoría de los lechos vasculares su topología es menos restrictiva que en las células epiteliales<sup>5,6</sup> (Fig. 1).



**Figura 2. Esquema de la arquitectura molecular de las uniones intercelulares en células epiteliales.** La mayoría de las TJs se localizan apicalmente y comprenden a las proteínas transmembranales claudinas, ocludina y JAMs. Las JAMs se unen a las proteínas de polaridad celular Par-3 y Par-6. Las claudinas y ocludinas están asociadas al citoesqueleto de actina por ZO-1, ZO-2, ZO-3 y cingulina. Las AJs se localizan preferencialmente en la región basal y su principal componente es la E-cadherina, la cual interactúa con las proteínas citoplasmáticas p120 catenina, β-catenina y α-catenina para conectar al citoesqueleto de actina. Los desmosomas se localizan en el lado basolateral y consisten de caderinas no clásicas<sup>15</sup>.

### Alteración de las uniones intercelulares

El citoesqueleto de actina está asociado a las uniones intercelulares, lo cual le confiere un papel importante en el ensamblaje y mantenimiento de estas estructuras. La despolimerización y/o reorganización de la actina se ha relacionado con una alteración de las uniones y la integridad de las barreras endotelial y epitelial<sup>10,11,12</sup>.

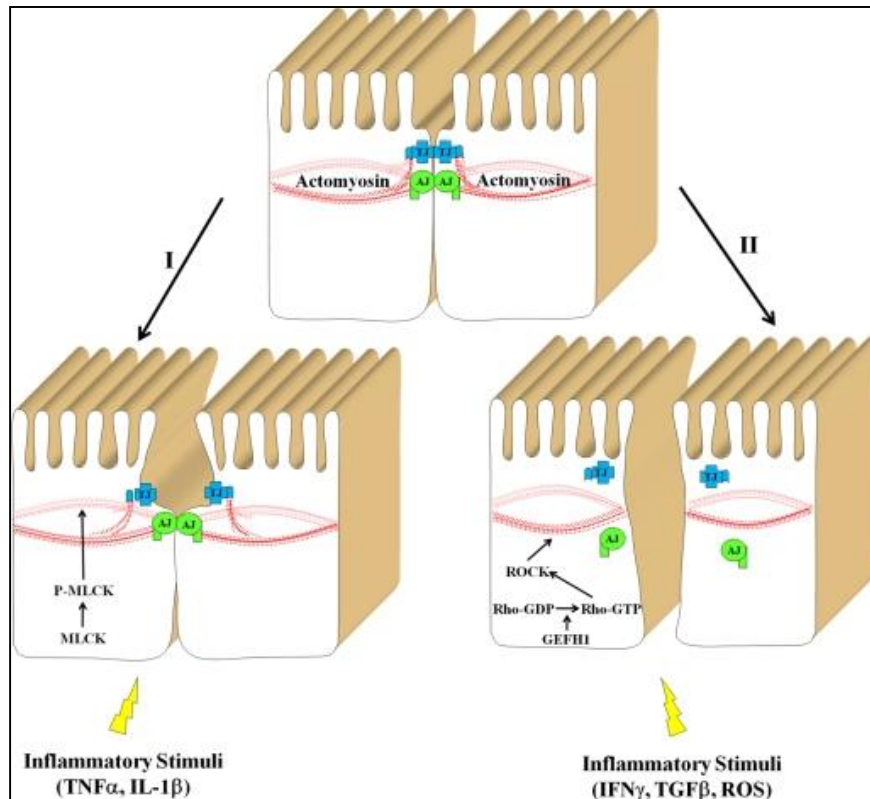


Diversos estímulos inflamatorios inducen la remodelación de los filamentos de actina y se altera la estructura de las uniones intercelulares y, en consecuencia, el efecto protector de la barrera se ve comprometido<sup>17,18,19</sup>.

Según el estímulo inflamatorio se activan dos vías de señalización que dan como resultado la disrupción de la barrera en mayor o menor grado, e involucran la activación de diferentes cascadas de señalización<sup>9,20</sup>.

El TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$ , la infección por *E. coli* y *H. pylori*, la giardiasis, el lipopolisacárido y el acetaldehído provocan la activación de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), la cual se ha asociado con la disfunción de la barrera inducida. La desregulación de la barrera causada por TNF- $\alpha$  a través de MLCK se ha demostrado en el endotelio y el epitelio, tanto *in vitro*, como *in vivo*<sup>14,21</sup>. MLCK fosforila a la cadena ligera de la miosina II dentro del anillo de actomiosina, induciendo una reorganización moderada del citoesqueleto apical de la célula que resulta en un incremento transitorio de la permeabilidad, sin causar defectos en la estructura de las TJs<sup>15</sup> (Fig. 3). La desregulación de la barrera causada por TNF- $\alpha$  a través de MLCK se ha demostrado tanto en el endotelio como en el epitelio, *in vitro* e *in vivo*<sup>14,21</sup>.

La segunda vía involucra la estimulación de la activación de Rho/ROCK río arriba de factores intercambiadores de GDP- GTP (GEFs) por estímulos inflamatorios como IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  y especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta vía dispara un desensamble dramático de las AJs y las TJs y a un aumento de la permeabilidad paracelular<sup>9</sup>.



**Figura 3. Disrupción de la barrera epitelial por diferentes estímulos inflamatorios.** Se presentan dos vías de señalización que son activadas por diferentes estímulos y resultan en la disrupción de la barrera epitelial. La primera vía, involucra la activación de MLCK y produce un efecto modesto en la contracción del anillo de actomiosina y aumenta reversiblemente la permeabilidad paracelular sin cambios significativos en la estructura del AJC. La segunda vía, involucra la activación de la vía GEF- H1- Rho-Rock que conduce a un cambio profundo en la contracción y el desensamble del AJC<sup>9</sup>.

La disfunción continua de la barrera que forman las uniones, como ocurre durante condiciones patológicas severas, tales como sepsis<sup>22</sup>, isquemia<sup>23</sup> o diabetes<sup>24</sup> pueden conducir en algunos casos a una insuficiencia orgánica aguda<sup>2</sup>.

### El citoesqueleto de actina

La actina es una de las proteínas más abundantes y más conservadas de las células de mamíferos<sup>25</sup>. La actina es una ATPasa que puede unirse a las moléculas de ATP o su forma hidrolizada ADP + Pi<sup>26</sup>. En condiciones fisiológicas, existe como actina globular (G), que se ensambla en filamentos largos y organizados, llamada actina filamentosa (F)<sup>27</sup>, que en conjunto con los microtúbulos y los filamentos intermedios, constituyen el citoesqueleto.

Los filamentos de actina son estructuras polarizadas con un extremo de rápido crecimiento, llamado "extremo *plus*", y uno lento llamado "extremo *minus*", una conformación causada por la estructura de las moléculas de G- actina y por la distribución de ATP.

El citoesqueleto de actina en organismos eucariontes tiene un papel importante en una gran diversidad de procesos, algunos de los cuales son esenciales para la supervivencia de la célula<sup>28</sup>.

El citoesqueleto de actina es una red compleja y dinámica que necesita ser remodelada rápidamente en respuesta a un estímulo extracelular. Entre las moléculas involucradas en la dinámica de actina y la remodelación de uniones intercelulares para controlar la permeabilidad vascular están las proteínas de unión a actina (ABP). Las ABP pueden unirse directamente a la actina y afectar su remodelación a través de diferentes mecanismos, por ejemplo la polimerización, la ramificación o la ruptura de filamentos de actina y se encuentran reguladas mediante diferentes cascadas de señalización<sup>2</sup>.

### **Nucleadores de actina**

La nucleación espontánea de actina es cinéticamente desfavorable y es el paso limitante en la polimerización porque los dímeros intermedios de actina son inestables. Por lo tanto, los factores que puedan acelerar este paso son esenciales para el ensamblaje de actina en la célula<sup>29</sup>.

Los nucleadores de actina se requieren para ensamblar filamentos de actina *de novo* o para producir ramificaciones en filamentos existentes. Se han identificado tres clases principales de proteínas que promueven la nucleación de actina: el complejo Arp2/3, las forminas y los nucleadores de unión a monómeros en tándem<sup>30</sup>.

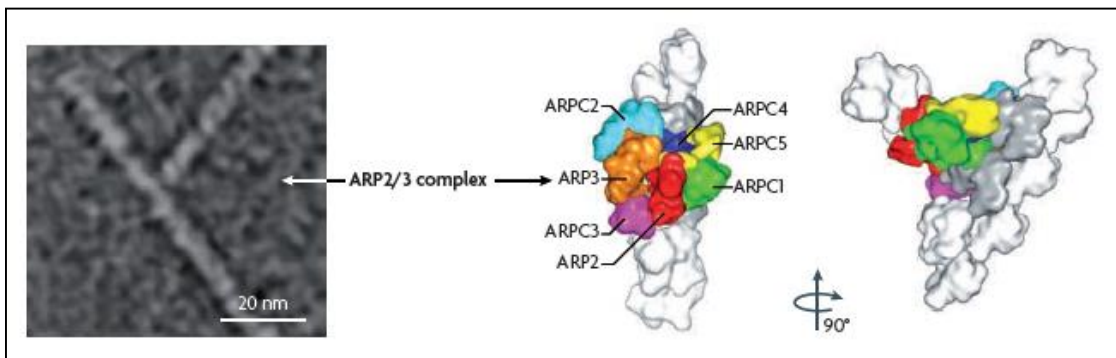
La importancia del complejo Arp2/3 se destaca por experimentos de *knock out* y *knock down* que muestran, que entre las proteínas de unión a actina, es una de las pocas esenciales para algunos tipos celulares o extremadamente importante para la organización de actina en otros<sup>31</sup>.

## El complejo Arp2/3

### Estructura del complejo Arp2/3

Este complejo está compuesto de siete subunidades, dos de las cuales resultaron ser proteínas relacionadas a actina de las subfamilias Arp2 y Arp3, dando al complejo su nombre, el resto de las subunidades no poseen homología con la actina y se conocen como ArpC1, ArpC2, ArpC3, ArpC4 y ArpC5<sup>14</sup>, también llamadas p41-Arc, p34-Arc, p21-Arc, p20-Arc y p16-Arc, respectivamente, según su peso molecular. La mayoría de los eucariontes, cuyos genomas han sido secuenciados, contienen genes putativos que codifican para las siete subunidades. Arp2 y Arp3 son estructuralmente similares a la actina, sin embargo, sus hendiduras de unión a nucleótidos están vacías y abiertas, comparado con la actina unida a ATP. ArpC2 y Arp4 forman el *core* estructural del complejo. ArpC1 es una proteína de siete hojas  $\beta$  plegadas, mientras que ArpC3 y ArpC5 son hélices  $\alpha$  principalmente y son las subunidades más periféricas<sup>29</sup>.

La formación del nuevo filamento que emerge a partir de un filamento existente como resultado de la actividad de Arp2/3 tiene una configuración tipo “y” con un ángulo regular de  $70^\circ$ <sup>29</sup> (Fig. 4).

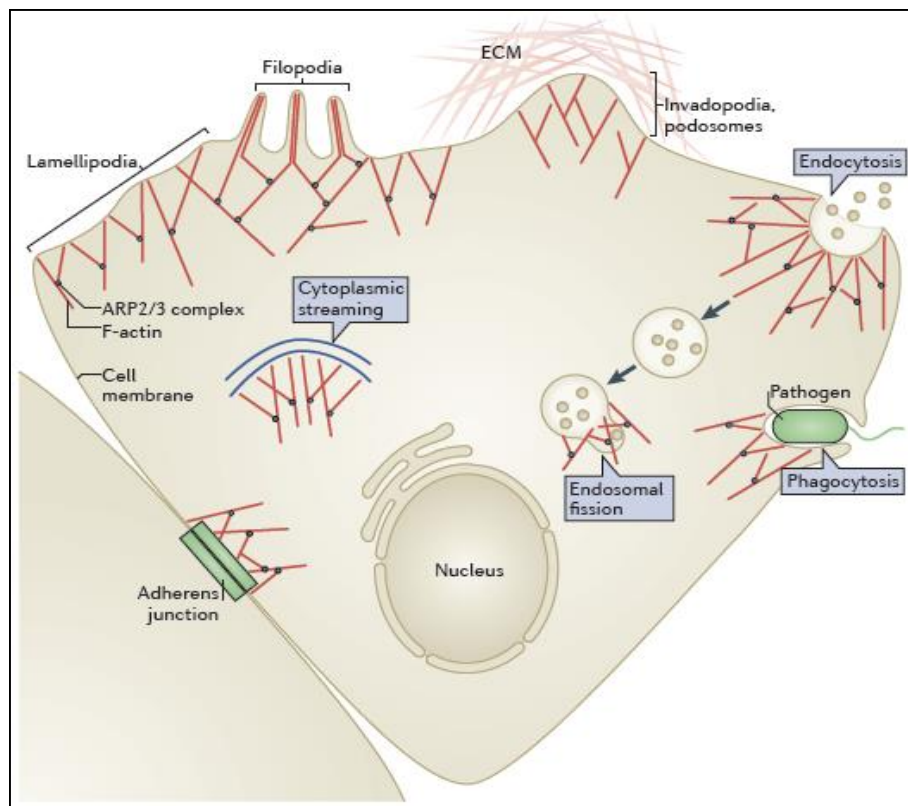


**Figura 4. Ramificación de actina tipo “y” generada por el complejo Arp2/3.** Se muestra la micrografía electrónica de un filamento de actina tipo “y” formado por el complejo Arp2/3 y su modelo estructural basado en una tomografía electrónica. El complejo Arp2/3 consiste de Arp2 y Arp3, así como las subunidades adicionales ArpC1-C5<sup>30</sup>.

### Funciones celulares del complejo Arp2/3

Las ramificaciones de actina producidas por Arp2/3 en el borde líder de la célula le proporcionan a las células la fuerza de protrusión que se requiere para generar y

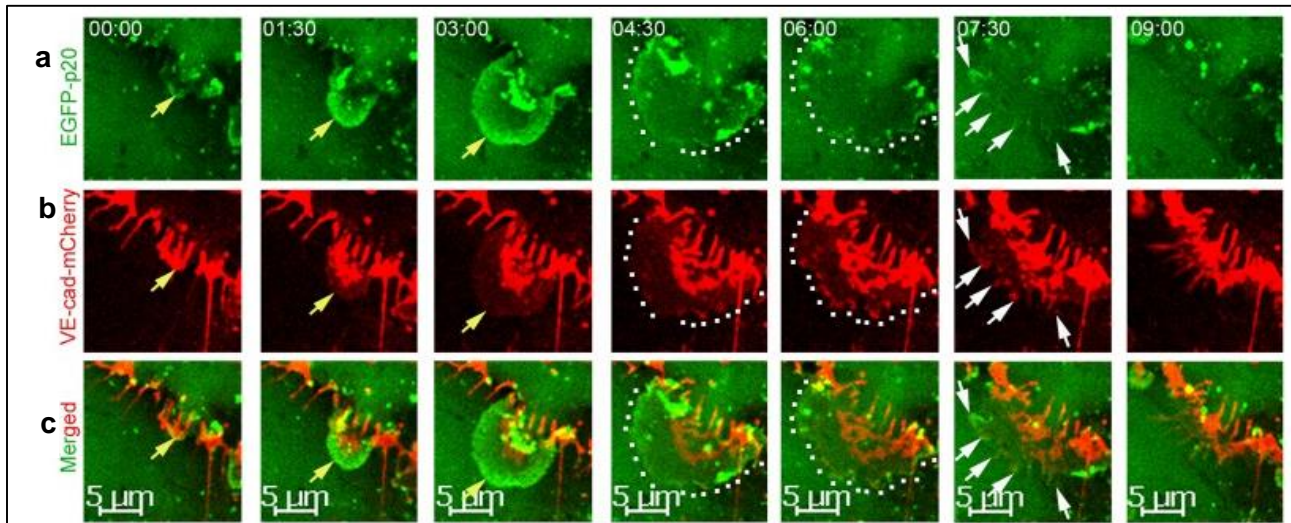
extender protuberancias como los lamelipodios<sup>32</sup> y los filopodios<sup>33</sup>. Arp2/3 también se localiza en invadopodias y podosomas, que son estructuras especializadas ricas en proteasas implicadas tanto en la invasión celular, como en la degradación de la matriz extracelular<sup>34, 35</sup>. Adicionalmente a los fenómenos relacionados a migración celular, se ha demostrado que el complejo Arp2/3 se asocia con la generación de fuerzas que remodelan o transportan membranas durante eventos de tráfico vesicular, por ejemplo la endocitosis<sup>36</sup> y la fagocitosis<sup>37</sup>. Estudios recientes también relacionan a Arp2/3 en la producción de balsas de F-actina durante la corriente citoplasmática<sup>38</sup> (Fig. 5).



**Figura 5. Funciones del complejo Arp2/3.** Las ramificaciones de actina generadas por Arp2/3 se localizan en el borde líder de las células migratorias para generar protrusiones como lamelipodios y filopodios, fagosomas, podosomas, invadopodias y endosomas. El complejo Arp2/3 también reside en las uniones adherentes donde participa en su ensamblaje. Además la polimerización de redes de ramificación de actina contribuye a la corriente citoplasmática<sup>34</sup>.

El complejo Arp2/3 también reside en las uniones adherentes. En endotelio se observó que el complejo Arp2/3 participa en la formación de nuevos sitios de adhesión a través de la aparición lamelipodios intermitentes asociados a uniones intercelulares (JAILs) que son espacial y temporalmente restringidos en sitios de uniones intercelulares

establecidas que carecen de VE- caderina. A medida que se agrupan placas de VE- caderina para establecer una unión entre las membranas de dos células los JAILS formados se retraen e incorporan VE- caderina en las uniones<sup>39,40</sup> (Fig. 6).



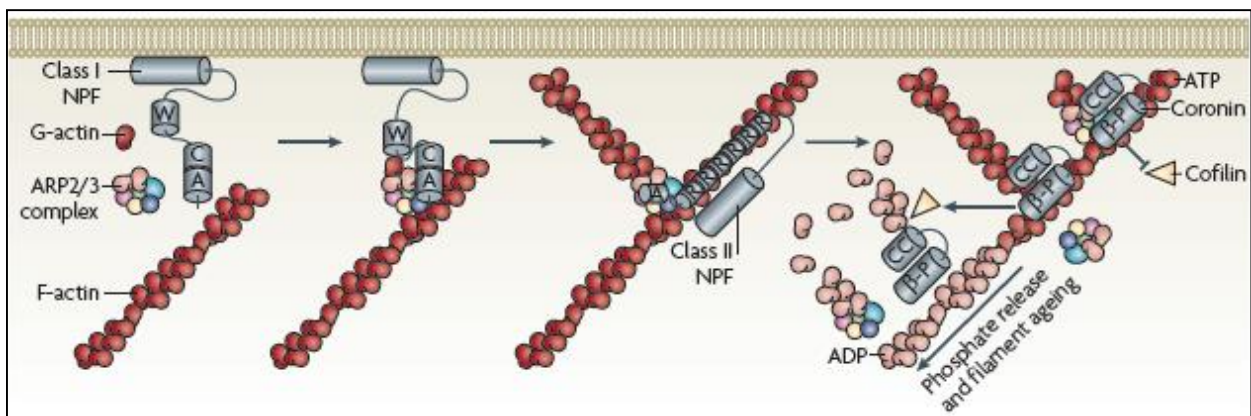
**Figura 6. Los nuevos sitios de adhesión de VE-caderina se desarrollan dinámicamente debido a la formación de JAILS.** Se muestra una magnificación de una serie de imágenes de diferentes lapsos de tiempo de la formación de JAILS mediados por Arp2/3 en un cultivo subconfluyente endotelial que expresa tanto la proteína de fusión EGFP-p20 (una subunidad del complejo Arp2/3) y la VE- caderina marcada con mCherry. **6a)** Un JAIL se desarrolló en las interrupciones de las placas de adhesión de E-caderina, su máxima extensión ocurrió a los 4-5 min (línea punteada en verde). **6b)** Las placas de VE- caderina incrementaron su agrupación (flechas blancas) durante la retracción del JAIL y se ensamblaron en uniones celulares. **6c)** Conforme se expande un JAIL, se induce la formación de nuevas placas de VE- caderina que se van agrupando durante la retracción del JAIL y el ensamblaje de contactos celulares<sup>41</sup>.

En el epitelio, la E- caderina interactúa con el complejo Arp2/3 para dirigir el ensamblaje de actina en contactos adhesivos nacientes<sup>23</sup>. La adhesión de la E- caderina puede regular el citoesqueleto al marcar sitios para que el ensamblaje de actina ocurra en la superficie celular, se sugiere que este ensamblaje dirigido por la E- caderina se manifiesta con la formación de un amplio lamelipodio. El proceso equivalente en células nativas podría ocurrir con la rápida organización del citoesqueleto de actina cuando las células migratorias se ponen en contacto y extienden sus superficies celulares una sobre la otra para formar contactos celulares<sup>16</sup>.



### Modelo de la nucleación y ramificación del complejo Arp2/3

En el siguiente modelo, todas las subunidades del complejo participan en la unión al filamento existente y Arp2 y Arp3 actúan como las primeras dos subunidades del filamento naciente. Arp2/3 es reclutado por los dominios WCA de los factores promotores de la nucleación de clase I (NPFs) en proximidad con la membrana celular. La unión del dominio WCA promueve un cambio conformacional que permite la activación del complejo, lo cual ocurre hasta la unión del ensamblado WCA- actina- Arp2/3 con el filamento existente. Los puntos de ramificación generados por Arp2/3 pueden ser estabilizados por los factores promotores de la nucleación de la clase II, que se unen a actina filamentosa (F- actina), como la cortactina. Las proteínas de la familia de las coroninas interactúan con Arp2/3 y F- actina para prevenir el desensamble de filamentos recién formados mediado por cofilina. La coronina también puede reemplazar a Arp2/3 y sinergizar su actividad con la cofilina para disparar el desensamble de los filamentos más viejos de actina unidos a ADP <sup>30,29</sup> (Fig. 7).

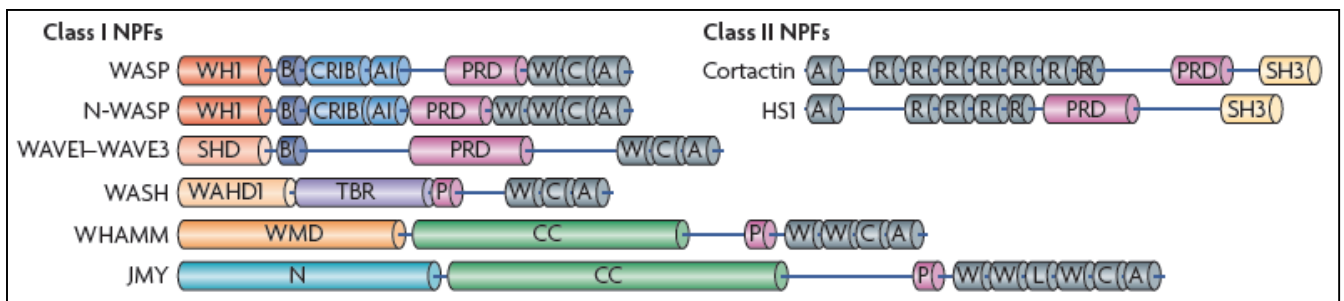


**Figura 7. Modelo de nucleación y ramificación del complejo Arp2/3.** El complejo Arp2/3 es reclutado por dominios WCA de factores promotores de la nucleación (NPFs) de clase I en la proximidad de las membranas celulares. Las actividades colectivas de los segmentos W, C y A sirven para llevar al complejo Arp2/3 con la primera subunidad de actina en el nuevo filamento para generar una ramificación. Los puntos de ramificación pueden estabilizarse por NPFs de clase II que se unen a actina F para prevenir el desensamble mediado por cofilina de los filamentos recién formados. La coronina también puede reemplazar a Arp2/3 y sinergizar su actividad con la cofilina para disparar el desensamble de los filamentos más viejos de actina- ADP<sup>30</sup>.

## Regulación del complejo Arp2/3

### Activación del complejo Arp2/3

*In vitro*, el complejo Arp2/3 es un nucleador de actina débil y su activación depende de la interacción directa con los factores promotores de la nucleación (NPFs) de clase I, que contienen un dominio WCA (dominio WH2, también referido como dominio homólogo a verprolina (V), un dominio conector u homólogo a cofilina y un dominio ácido) o los NPFs de clase II, que carecen de un dominio WCA completo<sup>30</sup> (Fig. 8).

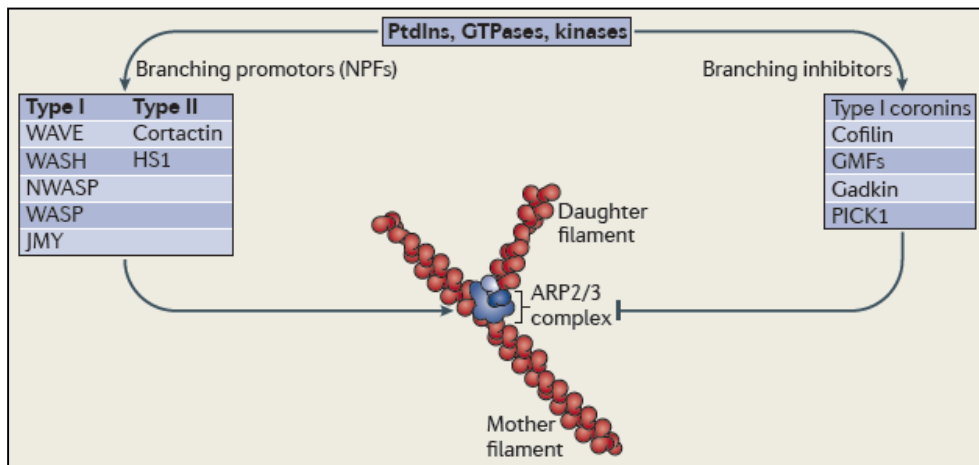


**Figura 8. Los factores promotores de la nucleación del complejo Arp2/3.** Los factores promotores de la nucleación de clase I de mamíferos contienen dominios WCA carboxi-terminales que unen actina globular y al complejo Arp2/3, más regiones regulatorias. Los NPFs clase II contienen dominios ácidos amino terminales que unen a Arp2/3, repetidos centrales que se unen a actina filamentosa<sup>30</sup>.

Los NPFs de la clase I estimulan la nucleación mediada por Arp2/3 usando dominios carboxi-terminales WCA. Su dominio verprolina se une a la actina G en una forma que permite la polimerización del extremo plus del filamento de actina creciente y sus dominios cofilina y ácido median la unión al complejo Arp2/3. Los NPFs clase I incluyen a proteínas de la familia WASP homólogas de la verprolina (WAVE; también conocida como SCAR) [la proteína del síndrome de Wiskott–Aldrich (WASP), WASP neuronal (N-WASP)], homólogos de WASP y SCAR (WASH) y la proteína reguladora-mediadora de unión (JMY). Los NPFs clase II, cortactina y HS1 (proteína específica de células del linaje hematopoyético 1), carecen de dominios WCA, sin embargo, poseen dominios ácidos en su extremo amino terminal que se unen al complejo Arp2/3 y dominios repetidos que se unen a F-actina. La función de los NPFs clase II consiste en la estabilización de la ramificación de actina y no propiamente en la activación del complejo Arp2/3. Los NPFs están regulados por el fosfatidilinositol y la actividad de



GTPasas pequeña y cinasas<sup>29</sup>. El segundo mensajero fosfatidilinositol-(4,5)-difosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) se une a la región básica (B) de algunos NPFs para llevarlos a su estado activo<sup>42</sup>. La familia de las Rho GTPasas, sus efectores tales como la proteína Diaphanous o la serina- treonina cinasa ROCK y las proteínas adaptadoras de la familia WASP tienen una participación crítica en la dinámica de la actina a través del complejo Arp2/3<sup>43,44</sup> (Fig. 8 y 9).



**Figura 9. Regulación del complejo Arp2/3.** Arp2/3 se une a un filamento de actina existente y estimula la nucleación de nuevo filamento de actina con un ángulo de ~70 ° con respecto al filamento existente. Arp2/3 es un nucleador de actina débil *in vitro* y depende de la activación a través de su interacción con factores promotores de la nucleación (NPFs) tipo I, los cuales contienen un dominio WCA (dominio WH2 u homólogo a verprolina, dominio homólogo a cofilina y dominio ácido), o los NPFs tipo II que carecen de un dominio completo WCA. Los NPFs están regulados por fosfatidilinositol (PtdIns) y la actividad de GTPasas pequeñas y cinasas. Se han descubierto otros factores que inhiben al complejo Arp2/3, incluyendo al factor de maduración de la glía (GMF), la coronina, la cofilina, la proteína de resistencia brefeldina A gamma 1- adaptina (gadkin) y la proteína de interacción con la cinasa C 1 (PICK1). Similar a los NPFs, estos inhibidores también están sujetos a regulación por varias vías de señalización<sup>34</sup>.

### Inhibición del complejo Arp2/3

Recientemente, se han descubierto proteínas que inhiben la actividad del complejo Arp2/3, tales como el factor de maduración de la glía (GMF), la coronina, la cofilina, la proteína de resistencia brefeldina A gamma 1- adaptina (gadkin) y la proteína de interacción con la cinasa C 1 (PICK1). De manera similar a los NPFs, estos factores inhibitorios están sujetos a regulación a través de vías de señalización y esto le permite a

la célula afinar el ensamblaje de actina basado en Arp2/3. PICK1 y gadkin poseen un dominio ácido, similar al de los NPFs, para unirse a Arp2/3 (Fig. 9)<sup>34,45</sup>.

### **GMF**

El factor GMF se une al complejo Arp2/3 a través de su subunidad ArpC2. La hidrólisis de los nucleótidos ocurre, principalmente, después de la nucleación, sugiriendo que una afinidad mayor de GMF por Arp2/3-ADP promueve el desensamble de los filamentos más viejos que contienen ADP<sup>46</sup>.

### **Coronina**

Se sugiere que la coronina Crn1 de *Saccharomyces cerevisiae* inhibe al complejo al estabilizar su conformación abierta (inactiva) a través de su interacción directa con la subunidad ArpC2 de Arp2/3<sup>47</sup>. La coronina de humano 1B inhibe la actividad del complejo Arp2/3 al reemplazarlo en la estructura ramificada de actina<sup>48</sup>.

### **Cofilina**

Su función molecular emana de dos actividades: la creación de nuevos filamentos a través del corte de un filamento de actina existente y, por otro lado, la cofilina también disocia las ramificaciones de actina de filamentos más viejos producidos por Arp2/3<sup>16</sup>.

### **Gadkin**

Gadkin se une a Arp2/3 a través de un dominio ácido, sin embargo, el mecanismo de inhibición de gadkin involucra el secuestro de Arp2/3 en sitios intracelulares sin inhibir directamente la actividad del complejo. Ésta proteína se localiza en endosomas y está implicada con la distribución celular y la motilidad<sup>49</sup>.

### **PICK1**

PICK1 contiene una región ácida que media la unión con el complejo Arp2/3. PICK1 se requiere para establecer una morfología neuronal apropiada, puesto que PICK1 previene la ramificación aberrante de la actina. El papel de PICK1 también fue

estudiado en la endocitosis de AMPAR, un receptor para glutamato, donde inhibe la polimerización local de la actina, permitiéndole a la membrana invaginar<sup>50,51</sup>.

### Arpin: un nuevo inhibidor del complejo Arp2/3

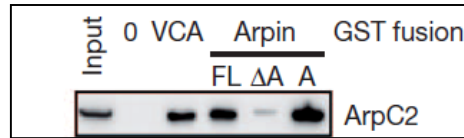
En un artículo reciente, Dang *et al.* (2014), reportaron una nueva proteína que actúa como un inhibidor de la actividad de Arp2/3 y se le asignó el nombre de arpin (proteína inhibitoria del complejo Arp2/3).

Bajo el antecedente de que se han detectado proteínas inhibitorias de Arp 2/3 que contienen un motivo A, como PICK1 y gadkin, en vesículas endocíticas y endosomas, respectivamente, los investigadores se preguntaron si los lamelipodios contenían una proteína inhibitoria de Arp2/3 similar. Para identificar tal proteína, se realizó una búsqueda bioinformática de aquellas proteínas que mostraban un motivo ácido, caracterizado por un residuo de triptófano en su antepenúltima posición. Como resultado, se identificó una proteína no caracterizada (C15orf38) que cumplía con dicha característica<sup>52</sup> (Fig. 10).

N-WASP	DEDDEEDFEDDDEWED
WAVE2	DSEDDSSSEFDEDDWSD
Arpin	EIREQGDGAEDEEWDD
WASH1	PPQQPQAEDEDDWES

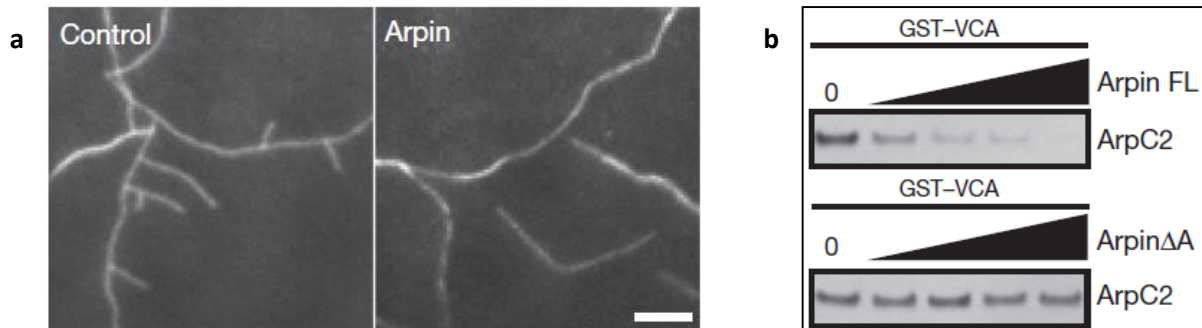
**Figura 10. Alineamiento del extremo carboxilo terminal de tres NPFs y de arpin.** El dominio ácido de arpin se alineó con el dominio ácido de N- WASP, WAVE y WASH1, que son activadores del complejo Arp2/3 que poseen un dominio ácido<sup>52</sup>.

De acuerdo con los análisis de predicción, esta proteína contenía un sitio probable de unión con Arp2/3 en su extremo carboxilo terminal. Esta interacción se demostró experimentalmente con un ensayo de *pull down* donde arpin fue capaz de unirse a ArpC2, una subunidad del complejo Arp2/3, principalmente a través de su región carboxilo terminal ácida. En ausencia de su motivo ácido, la interacción de arpin con el complejo Arp2/3 fue baja, mientras que la interacción se sostuvo con la secuencia completa de arpin e incluso en la presencia sólo de los últimos 16 residuos de la proteína, que corresponden a su dominio ácido<sup>52</sup> (Fig. 11).



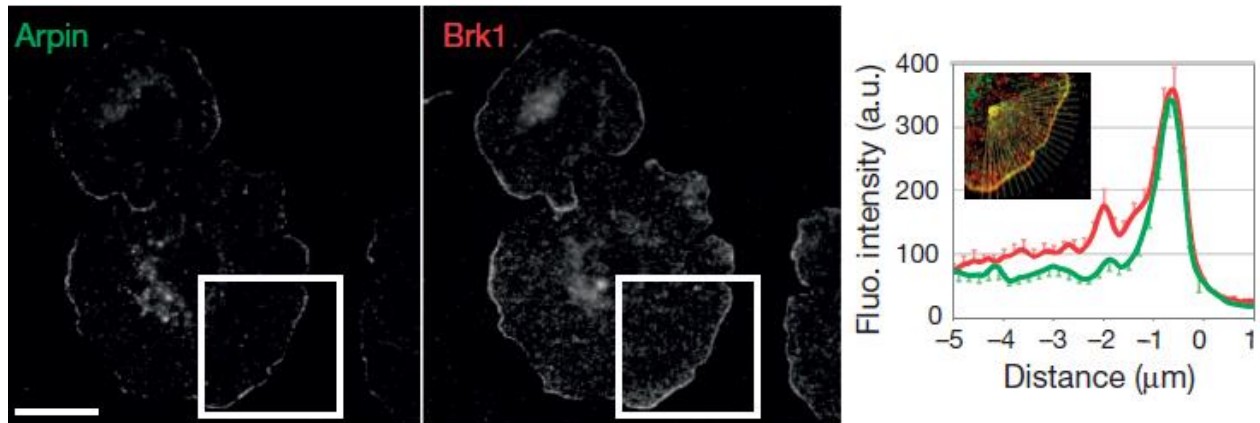
**Figura 11. Arpin se une al complejo Arp2/3 a través de su región C- terminal.**, Ensayo de *pull down* de extractos de células HeLa incubados con diferentes proteínas recombinantes fusionadas a GST: la secuencia completa de Arpin (FL), el motivo ácido (A) de arpin, la secuencia de arpin sin su motivo ácido (Arpin $\Delta$ A), el dominio VCA de N-WASP como un control positivo y como control negativo, glutatión S- transferasa (GST)<sup>52</sup>.

La función molecular de arpin sobre el complejo Arp2/3 se evaluó por microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) utilizando la proteína recombinante de arpin purificada. Arpin fue capaz de inhibir la activación de Arp2/3, dado que en su presencia se observó una menor formación de ramificaciones de actina (Fig. 12a). En un ensayo de competencia se demostró que arpin compete con el motivo VCA de un activador para unirse a Arp2/3. En ausencia de su motivo ácido, arpin no es capaz competir con un VCA por la unión con Arp2/3<sup>52</sup> (Fig. 12b).



**Figura 12. Arpin inhibe la actividad de Arp2/3.** **11a.** El ensamblaje de ramificaciones de actina se monitoreó por microscopía TIRF, para lo cual, se pusieron a incubar actina marcada con rodamina, el motivo VCA de WAVE1 y al complejo Arp2/3, en ausencia o presencia de arpin. **11b.** La secuencia completa de Arpin (Arpin FL), más no Arpin $\Delta$ A (sin su motivo ácido), compete con el VCA de N-WASP por la unión de Arp 2/3<sup>52</sup>.

La localización de arpin se examinó por inmunofluorescencia utilizando fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Arpin se detectó en segmentos restringidos de la membrana plasmática, en la cual también se observó una señal para el marcador lamelipodial Brk, una subunidad del complejo WAVE (Fig. 13). De tal manera que arpin se localiza en la protrusión lamelipodial, donde se nuclea nuevas ramificaciones de actina por los complejos WAVE y Arp2/3<sup>52</sup>.



**Figura 13. Arpin se localiza en los lamelipodios.** Inmunofluorescencia de arpin en fibroblastos de ratón. Arpin colocaliza con Brk1, una subunidad del complejo WAVE (un marcador lamelipodial), en la protrusión lamelipodial. A la derecha se observa el patrón de detección de ambos anticuerpos. Escala de la barra 20  $\mu\text{m}$ <sup>52</sup>.

En las bases de datos del NCBI están reportadas dos variantes transcripcionales del gen arpin en humano, el transcrito 1 de 6114 pb que codifica para una proteína de 226 aa, cuyo peso predicho es de 25 kDa y el transcrito 2 de 6503 pb, que si bien tiene una secuencia 5' UTR más larga que el transcrito 1, su secuencia codificante, es más corta y da origen a una proteína de 130 aa con un peso predicho de 14 kDa. En el ratón, sólo está reportada una secuencia de 2184 pb que codifica para una proteína de 226 aa<sup>52</sup>.

## **JUSTIFICACIÓN**

Un factor nucleador clave para la formación de estructuras de actina y el mantenimiento de contactos intercelulares es el complejo Arp2/3. Arpin es el último inhibidor que se ha descrito para este complejo. En fibroblastos de ratón se observó que arpin se localiza en el borde de los lamelipodios. Por otro lado, estudios recientes destacan la importancia de la formación transitoria de los lamelipodios como estructuras que preceden al establecimiento de uniones intercelulares. Dado que arpin es una proteína de la cual se sabe muy poco, es importante su caracterización y evaluar si su expresión se ve afectada bajo una condición inflamatoria, donde se sabe bien, los contactos intercelulares se desestabilizan.

## **HIPÓTESIS**

Arpin se expresa en células endoteliales y epiteliales y se localiza en la membrana de estas células tanto *in vitro*, como *in vivo*.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de arpin en células endoteliales y epiteliales, así como su localización subcelular.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la expresión de arpin en diferentes líneas celulares y en tejido de ratón.
2. Determinar los niveles de mRNA de arpin bajo condiciones basales e inflamatorias en células endoteliales y epiteliales.
3. Producir un anticuerpo contra arpin para determinar la expresión y localización de esta proteína tanto *in vitro*, como *in vivo*.

## MATERIALES

### Material biológico

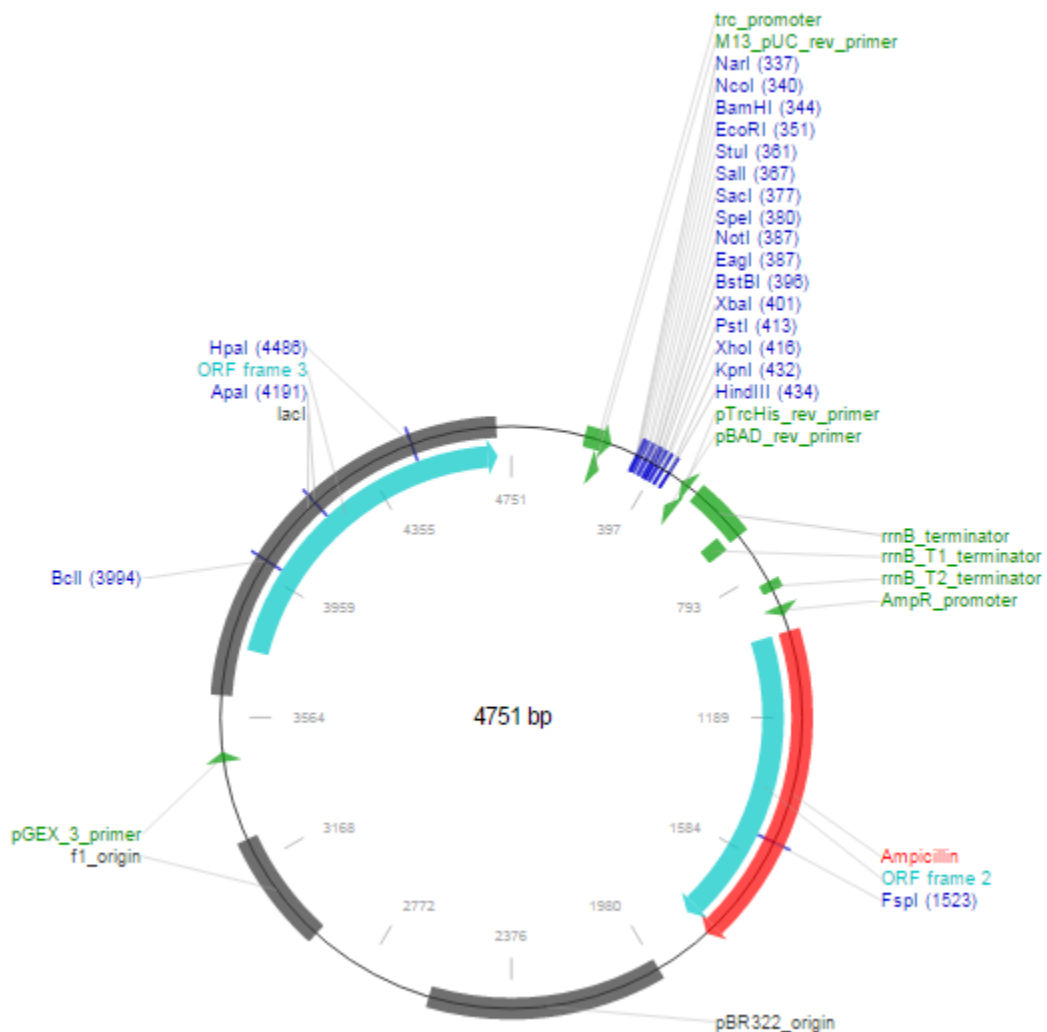
- Cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  Genotipo F<sup>-</sup>  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$  (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>*) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1  $\lambda$ <sup>-</sup>*.
- Cepa *E. coli* BL21 Genotipo F<sup>-</sup> *ompT hsdSB* (*rBmB-*) *gal dcm* (DE3).
- Plásmido pProEX HTa (Fig. 14).
- *Primers* hArpin F (5'-GCC CAG AGT CAC ACA GCT AA- 3') y hArpin R (5'-CTT TCT GAA GGG CAA GGA AG- 3').
- *Primers* hArpin-iso1 F (5' ATGAGCCGCATCTACCACGA 3') y hArpin-iso1 R (5' CCTCCAGCAGGACACCATTT 3').
- *Primers* U1 F (5'-CCATGATCACGAAGGTGGTTT 3') y U1 R (5'-ATGCAGTCGAGTTTCCCACAT 3').
- *Primers* 7SL F (5'-ATCGGGTGTCCGCACTAAGTT 3') y 7SL R (5'-CAGCACGGGAGTTTTGACCT 3').
- *Primers* m $\beta$ -actina (5'- TATCCACCTTCCAGCAGATGT3') y 7SL R (5'-AGCTCAGTAACAGTCCGCCTA 3').
- *Primers* Arpin-XbaI- F (5'CTGCTCTAGAGATGTCGTCCTACAAG 3') y Arpin-KpnI-R (5'GATTGGGAGCCGGTACCCCG 3').
- *Primers* hPICK1 F (5'-ATGATTCAGGAGGTGAAGGG-3') y hPICK1 R (5'-CGGTGCTTGACTTTTCTTCAA-3').
- *Primers* hGadkin F (5'-GAAATGACGACAGCACATCC-3') y hGadkin R (5'-TAAGTGCTGCCCGTAGAATG-3').
- *Primers* mPICK1F (5'- GCCACTCACTGAAGACGAAA-3') y mPICK1R (5'-GGCTAACTGCCTCTGGATTT-3').
- *Primers* mGadkin F (5'- CCCTGGACATTGTGTTGAAG -3') y mGadkin R (5'-ACCAAGCCATCGTTACACAG -3').
- Línea celular CaCo-2 ATCC<sup>®</sup> HTB-37<sup>™</sup> de células epiteliales humanas de adenocarcinoma colorrectal.
- Línea celular HMEC-1 ATCC<sup>®</sup> CRL-3243<sup>™</sup> de células endoteliales humanas de microvasculatura.



- Línea celular HeLa ATCC® CCL-2™ de células epiteliales de cáncer cérvico-uterino.
- cDNA y extractos de proteínas de pulmón, corazón, hígado y riñón de ratón en condiciones normales y sépticas.
- cDNA de la línea celular HL60 de promieloblastos de leucemia aguda transfectada con una secuencia *scramble*, de la línea celular HL-60 deficiente de la proteína HS1, de la línea celular THP-1 ATCC® TIB-202™ de monocitos de leucemia monocítica aguda y cDNA de macrófagos humanos M1 y M1.
- Marcador de peso molecular PageRuler Prestained protein ladder Thermo Scientific.
- Diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) Sigma REF P9029-50G.
- Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer 0.5 µL/µL Invitrogen REF 18418-012.
- Transcriptasa reversa SuperScript® II 200 U/µL Invitrogen REF 18064-014.
- Power SYBR® Green PCR Mater Mix Applied biosystems REF 4367659.
- 10 mM dNTP Mix Invitrogen REF 18427-013.
- DNA Taq polimerasa recombinante 5 U/µL Invitrogen REF 11615-010.
- 1 Kb DNA Plus DNA ladder 1.0 µg/µL Invitrogen REF 10787-018.
- Reactivo Trizol® Life Technologies REF 15596018.
- Enzima de restricción KpnI 10000 U/mL New England REF R01425.
- Enzima de restricción XbaI 20000 U/mL New England REF R01455.
- DNA ligasa T4 5U/µL Thermo Scientific REF EL0011.
- Fosfatasa alcalina de intestine de ternera (CIP) 10000 U/mL REF M029S.
- *AF488 rabbit anti- rat IgG (H+L)* REF A21210 Invitrogen.
- *AF568 goat anti- rabbit IgG (H+L)* REF A11011 Invitrogen.
- *E-cadherin rabbit anti- mouse, rat and human* Santa Cruz REF sc-7870.
- *γ-tubulin mouse anti- Xenopus, canine, chicken, hamster, human, rat, bovine and mouse* Sigma REF T6557.
- *Goat anti- mouse IgG- HRP* Santa Cruz REF sc-2005.
- *HRP- goat anti- rat IgG (H+L)* Invitrogen. REF 629520.
- *AF488 goat anti- rat IgG (H+L)* Invitrogen.

## Soluciones

- TENS pH 5.2 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, 0.5% SDS.
- Buffer de transferencia pH 8.3 20% metanol, 25 mM Tris, 192 mM glicina.
- Buffer de corrida SDS- PAGE pH 8.3 25 Mm Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS.
- Buffer de carga 5X 250 mM Tris- HCl pH 6.8, 10% SDS, 30% glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.02% azul de bromofenol.
- PBS 1X 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- Buffer de bloqueo 5% leche en polvo o BSA PBS 1X.



**Figura 14. Mapa plasmídico del plásmido pProEX-HTa.** El vector de expresión pProEX-HTa se utilizó para clonar y expresar a la proteína recombinante de arpin (Invitrogen™).

## MÉTODOS

### Cultivo celular

Las células CaCo-2 (Células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal humano) se crecieron en medio DMEM (Gibco®) con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 1X L-glutamina, 1X antibiótico/antimicótico, 1X piruvato, 1X aminoácidos no esenciales y 1X piruvato de sodio a 37 °C hasta alcanzar una confluencia del 70- 80% aproximadamente y se trataron por 6 h con medio DMEM con FBS al 1% para inducir la sincronización de todas las células en la misma fase de ciclo celular y una respuesta rápida a un estímulo posterior. Luego, a una placa con células se le dio un estímulo inflamatorio con 5 nM de TNF- $\alpha$  y 500 U/mL de IFN- $\gamma$  durante 48 h y otra placa se incubó sin estímulo como control.

Las células HMEC-1 (Células endoteliales de microvasculatura humana) se crecieron en medio MCB 131 (Gibco®) con FBS al 10%, 1  $\mu$ g/mL de hidrocortisona, 10 ng/mL de factor de crecimiento endotelial, 1 nM de L-glutamina, 100 U de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomina a 37 °C hasta alcanzar una confluencia del 70- 80% aproximadamente y se trataron por 6 h con medio DMEM con FBS al 1%. Luego, a una placa se trató con 5 nM de TNF- $\alpha$  durante 24 h y otra placa se incubó sin estímulo como control.

### Extracción de RNA

Transcurrido el tiempo de incubación con las citocinas proinflamatorias, se realizó la extracción de RNA total de las células con el reactivo Trizol®. Por cada 500,000 – 1X10<sup>6</sup> células se adicionaron 200  $\mu$ L de trizol. Las células se lisaron pipeteando varias veces la muestra. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y luego, se adicionaron 40  $\mu$ L de cloroformo por cada 200  $\mu$ L de trizol empleado, se mezcló por inversión y se incubó la muestra de 2-3 min a temperatura ambiente. A partir de este punto, todos los pasos se llevaron a cabo en frío. La muestra se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4 °C, se separó la fase acuosa y se adicionaron 500  $\mu$ L de isopropanol por cada mililitro de trizol empleado, se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla con 200  $\mu$ L de etanol al 70%, la muestra se centrifugó a 7500 g por 5 min

a 4 °C y se dejó secar la pastilla para disolverla en 20 µL de agua libre de nucleasas DEPC (dietil pirocarbonato). Finalmente, las muestras se incubaron 10 min a 56 °C y el RNA purificado se almacenó a -70°C.

### **Determinación de la concentración, pureza e integridad del RNA**

La pureza y concentración del RNA aislado se evaluó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm ( $A_{260}$ ) y 280 nm ( $A_{280}$ ) por espectrofotometría empleando el nanodrop 2000 (Thermo Scientific). La integridad del RNA se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para identificar las bandas correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S, idealmente en una relación 2:1.

### **Obtención de cDNA**

La síntesis de cDNA se obtuvo a partir del RNA total anteriormente extraído. La reacción de desnaturalización se efectuó mezclando 5 µg de RNA, 1500 ng de oligo dT, 1 mM de dNTPs y se llevó la reacción a un volumen final de 25 µL con agua DEPC. Esta mezcla se calentó a 70 °C por 5 min y se colocó en hielo 1 min. Para la reacción de hibridación, a la mezcla anterior se agregaron 1X de buffer de DTT (ditiotreitolo) (Invitrogen™), 0.01 M de DTT (Invitrogen™) y se llevó a un volumen final de 48 µL con agua DEPC. La mezcla se calentó a 42 °C por 2 min y luego, para la reacción de retrotranscripción se agregaron 400 U de transcriptasa reversa SuperScript® II (Invitrogen™) y se incubaron a 42 °C por 90 min. Finalmente, para inactivar la enzima, la mezcla se calentó a 70 °C por 5 min. La pureza y concentración del cDNA sintetizado se evaluó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm ( $A_{260}$ ) y 280 nm ( $A_{280}$ ) por espectrofotometría con un nanodrop.

### **Amplificación de los genes de arpin, PICK1 y gadkin por PCR de punto final.**

Los *primers* utilizados en los ensayos de PCR de punto final y RT-PCR en tiempo real se diseñaron con la herramienta *Real-time PCR Primer Design* de la página de *GenScript*. Los *primers* hArpin se utilizaron para amplificar una región común de ambas variantes transcripcionales de arpin en humano; los *primers* dirigidos contra el transcrito 1 de arpin en humano fueron los hArpin-iso1 F, PICK1 en humano hPICK1, gadkin en

humano hGadkin, para PICK1 en ratón mPICK1, mGadkin para Gadkin en ratón y para el gen empleado como control de carga, los *primers* U1.

La reacción se preparó mezclando 1X de buffer para PCR, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 μM de *primer forward*, 0.2 μM de *primer reverse*, 1 μg de cDNA y 0.05 U de Taq polimerasa a un volumen final de 20 μL. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.25%.

El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización a 95 °C 5 min, seguido de 37 ciclos de alineación a 95 °C 15 seg, 57 °C 30 seg y 72 °C 45 seg y una extensión a 72 °C 10 min empleando un termociclador Applied Biosystems.

### **Método de cuantificación de productos de RT- PCR en tiempo real**

Para validar el método de C<sub>T</sub> comparativo ( $\Delta\Delta C_T$ ) se demostró que los genes analizados tenían eficiencias de amplificación semejantes entre sí y por lo tanto, eran comparables entre sí. Las eficiencias de amplificación se compararon preparando diluciones seriadas para todos los genes analizados a partir de una misma muestra de cDNA.

Los *primers* dirigidos contra una región común de ambas variantes transcripcionales de arpin en humano fueron los hArpin, para el transcrito 1 de arpin en humano fueron los *primers* Arpin-iso1 y para el gen empleado como normalizador fueron los *primers* 7SL. Sus secuencias se describieron en la sección de materiales.

La reacción se preparó con 2X Power Master PCR super mix SYBR® Green, 0.15 μM de *primer forward*, 0.15 μM de *primer reverse* y 1 μL del estándar de cDNA a un volumen final de 10 μL en agua inyectable. Luego, cada muestra se amplificó en una RT-PCR en tiempo real de dos pasos bajo las siguientes condiciones: 95 °C 10 min; 40 ciclos de 95 °C 15 seg, 62 °C 12 seg y 72 °C 15 seg utilizando el equipo StepOne™ Applied Biosystems.

El programa para la generación de una curva de disociación de los productos de PCR fue el siguiente: 95 °C 15 seg, 60 °C 1 min con un incremento de temperatura de 0.6 °C hasta llegar a 95 °C 15 seg. La presencia de un solo pico bien definido en la curva de disociación indica una amplificación específica.

Los valores de  $C_T$  (ciclo de umbral de detección) obtenidos se usaron para construir una curva estándar para cada gen. La eficiencia de amplificación (E) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E = (10^{-1/S} - 1) \times 100 \quad (S = \text{pendiente de la curva estándar})$$

Para comparar la eficiencia de amplificación de las secuencias, los valores de  $C_T$  de los genes blanco se restaron de los valores de  $C_T$  del normalizador ( $\Delta C_T$ ). Luego, el valor  $\Delta C_T$  se graficó contra el logaritmo de la cantidad de cebado. Si la pendiente de la línea es igual o menor a 0.1, entonces las eficiencias de amplificación son comparables.

Para evaluar las diferencias de expresión de arpin en células HMEC-1 y CaCo-2 bajo un estímulo inflamatorio y en condiciones basales se realizó la cuantificación por el método  $\Delta\Delta C_T$ , el cual se basa en la comparación directa de los valores de  $C_T$ .

Primero, el valor de  $C_T$  para cada muestra se determinó calculando la diferencia entre el valor de  $C_T$  del gen blanco y el valor de  $C_T$  del gen constitutivo.

$$\Delta C_T (\text{Muestra}) = C_T \text{ del gen blanco} - C_T \text{ del gen constitutivo}$$

$$\Delta C_T (\text{Calibrador}) = C_T \text{ del gen blanco} - C_T \text{ del gen constitutivo}$$

Como muestra se consideraron los valores de  $C_T$  de los genes bajo un estímulo inflamatorio y como calibrador, los valores de  $C_T$  en condiciones basales.

Luego, se determinó el valor  $\Delta\Delta C_T$  para cada muestra restando el valor de  $\Delta C_T$  de la muestra en condición inflamatoria del valor  $\Delta C_T$  de la muestra en condición basal.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Muestra}) - \Delta C_T (\text{Calibrador})$$

El nivel normalizado de la expresión del gen blanco se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Nivel de expresión normalizado de una muestra del gen blanco} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

El valor anterior se convirtió a un porcentaje de cambio con la fórmula  $n - 1 \times 100$ , donde n es el nivel de expresión normalizado del gen blanco.

## **Producción de una proteína recombinante de arpin**

Se produjo una proteína recombinante de arpin para tener un control positivo del reconocimiento de arpin por los anticuerpos  $\alpha$ - arpin generados.

## **Diseño de *primers***

Los *primers* Arpin-XbaI- F y Arpin- KpnI-R se emplearon para amplificar la región codificante de la isoforma 2 de arpin que consta de 392 pb. Los sitios de restricción XbaI y KpnI fueron incorporados en el *primer forward* y *reverse*, respectivamente, para la ligación posterior a los mismos sitios de restricción en el plásmido. Se empleó el cDNA de células CaCo-2 o HMEC-1 para amplificar el gen arpin utilizando 1X de buffer para PCR, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.2  $\mu$ M *primer forward*, 0.2  $\mu$ M *primer reverse*, 1  $\mu$ g de cDNA y 0.05 U de Taq polimerasa a un volumen final de 20  $\mu$ L. El programa utilizado fue el siguiente: desnaturalización a 94 °C 2 min, seguido de 37 ciclos de alineación a 94 °C 30 seg, 54 °C 30 seg y 72 °C 1 min y una extensión a 72 °C 7 min.

## **Digestión del gen arpin con enzimas de restricción**

El producto de PCR se llevó a un volumen final de 100  $\mu$ L con agua inyectable, se agregó un volumen de fenol-cloroformo (25:1) y se mezcló vigorosamente en un vórtex. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se extrajo la fase acuosa y se precipitó el DNA con un volumen 1:10 de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó 1 h a -70 °C y luego se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4°C. Se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70 % dos veces, centrifugando a 13,000 rpm por 5 min entre cada lavado. Se retiró el sobrenadante, se dejó evaporar los restos de etanol y la pastilla se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua inyectable.

Para la digestión, al producto de PCR purificado se agregó 1X de buffer de enzima restricción 2 (Invitrogen™), 1X de BSA, 20 U de enzima XbaI (Invitrogen™) y 10 U de enzima KpnI (Invitrogen™) a un volumen final de 30  $\mu$ L. La mezcla se incubó 4 h a 37 °C. Luego, se llevó a cabo la purificación del producto de digestión por el método de fenol- cloroformo, anteriormente descrito. El producto de digestión extraído se corrió en

un gel de agarosa al 1.25 % y se cortó la banda correspondiente al gen arpin para purificarlo utilizando el kit QIAquick® Gel Extraction Qiagen.

### **Expresión y caracterización de arpin**

Como vector de expresión se utilizó el plásmido pProEX HTa (Invitrogen™) (Fig. 14) cuyo origen de expresión bacteriano proviene del plásmido pBR322. Además codifica para una cola de histidinas (6x) y contiene un gen de resistencia para la ampicilina como factor de selección de las clonas recombinantes, el gen lac que permite la transcripción de la proteína de fusión bajo el promotor del operón lac, el cual, al adicionar un análogo de la lactosa como el isopropil tiogalactósido (IPTG) induce la síntesis de la proteína.

### **Digestión del DNA plasmídico de pProEX HTa con enzimas de restricción**

La reacción de digestión se preparó mezclando 3.6 µg de DNA, 1X de buffer de enzima restricción 2 (Invitrogen™), 1X de BSA, 20 U de enzima XbaI (Invitrogen™) y 10 U de enzima KpnI (Invitrogen™) a un volumen final de 20 µL con agua inyectable. La mezcla se incubó 4 h a 37 °C. La digestión del DNA plasmídico se analizó en un gel de agarosa al 1%.

### **Desfosforilación del plásmido pProEX HTa**

Para prevenir la religación del plásmido durante la reacción de ligación, éste se desfosforiló en sus extremos 5', de manera que sólo puedan ser recircularizado al incorporar el inserto de DNA foráneo. Se tomaron 17 µL del producto de digestión anterior y se añadieron 1X de Buffer CIP (Invitrogen™) y 1U de enzima CIP (Invitrogen™) a un volumen final de 30 µL con agua inyectable. Después, el plásmido desfosforilado se purificó por el método de fenol- cloroformo, anteriormente descrito. El plásmido purificado se corrió en un gel de agarosa al 1 % y se cortó la banda correspondiente al plásmido para purificarlo utilizando el kit QIAquick® Gel Extraction Qiagen.



## Pruebas de ligación

Para comprobar la correcta digestión y desfosforilación del plásmido se efectuaron pruebas de ligación con el DNA plasmídico previamente digerido y desfosforilado de acuerdo a las siguientes cantidades:

Reactivo	Reacción	
	Prueba negativa (µL)	Prueba positiva (µL)
DNA plasmídico	2	2
Buffer T4 DNA ligasa 5X	2	2
Enzima ligasa 1U/µL	-	0.5
Agua inyetable	16	15.5

Las reacciones se incubaron toda la noche a 22 °C y se emplearon para transformar a células *E. coli* DH5α.

## Preparación de células competentes y transformación de bacterias.

Se prepararon células competentes de *E. coli* DH5α utilizando TSS 2X pH 6.5 [Medio Luria Bertani (LB) con polietilenglicol (PEG) al 10%, DMSO al 5% y 50 mM de MgSO<sub>4</sub>].

Se inocularon 50 µL de bacterias de la cepa de *E. coli* DH5α en 5mL de caldo LB y se incubaron durante 12 horas a 37 °C h en agitación a 180 rpm. El cultivo se resembró en 40 mL de LB a una dilución 1:20 y se incubó en agitación a 37 °C aproximadamente 1 h 30 min hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.6, leída a 600 nm en un espectrofotómetro Applied Biosystems. El cultivo bacteriano se centrifugó a 3500 rpm por 15 min a 4 °C en tubos Falcon (Corning) de 50 mL. La pastilla se resuspendió en 2 mL de TSS 2X pH 6.5 y se transfirieron 250 µL de células competentes a tubos eppendorf fríos, a los cuales se agregaron individualmente 10 µL de los productos de ligación pProEX HTa- arpin A, B y C, 10 µL de la prueba de ligación positiva, 10 µL de la prueba de ligación negativa y el equivalente a 50 ng del plásmido pProEX HTa sin digerir ni desfosforilar. Los tubos se incubaron a 4 °C por 30 minutos. Posteriormente, se sometieron a un choque térmico incubándolos a 42 °C por 45 seg, seguido de una inmersión en hielo por media hora. Luego, se adicionaron 500 µl de medio LB y se incubó a 37 °C por una hora. Finalmente se sembraron en placas *petri* con agar LB suplementado con 120 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C por 16 h. Como

control negativo se inocularon células competentes frescas en un caja de agar LB con ampicilina 120 µg/mL.

### **Ligación de DNA plasmídico digerido con el producto de PCR digerido**

Se efectuaron tres diferentes reacciones de ligación del gen arpin con el plásmido pProEX HTa variando el volumen del inserto:

Reactivo	Reacción		
	A (µL)	B (µL)	C (µL)
DNA plasmídico	2	2	2
Inserto	2	4	6
Buffer T4 DNA ligasa 5X	2	2	2
Enzima ligasa 1U/µL	0.5	0.5	0.5
Agua inyectable	13.5	11.5	9.5

Las reacciones se incubaron toda la noche a 22 °C y se emplearon para transformar a células *E. coli* DH5α.

### **Extracción del DNA plasmídico de pProEX HTa- arpin Miniprep**

Se realizó la extracción de DNA plasmídico de algunas colonias de células *E. coli* transformadas con el producto de ligación pProEX HTa- arpin, para lo cual se inoculó un cultivo de 10 mL de caldo LB con 120 µg/mL de ampicilina por cada clona seleccionada y se incubó de 12 a 14 h a 37 °C en agitación a 180 rpm. Al día siguiente, las bacterias se empastillaron 6 mL de cultivo en un tubo eppendorf centrifugando alícuotas de 1.5 mL a 13,000 rpm 1 min y se descartó el sobrenadante. Con el remanente, se resuspendió la pastilla y se agregaron 300 µL de TENS pH 5.2 y se mezclaron en un vórtex 5 seg. Se neutralizó el TENS con 150 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 900 µL de etanol absoluto frío para precipitar el DNA, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con 1 mL de etanol al 70% frío centrifugando la pastilla a 13,000 rpm por 5 min entre cada lavado. Se retiró el sobrenadante, se dejaron evaporar los restos de etanol y la pastilla se resuspendió en 20 µL de agua inyectable.

### **Caracterización de DNA plasmídico pProEX HTa- arpin con enzimas de restricción**

La reacción de digestión se preparó mezclando 10 µL del DNA obtenido por Miniprep, 1X de buffer de enzima restricción 2 (Invitrogen™), RNasa, 1X de BSA, 20 U de enzima XbaI (Invitrogen™) y 10 U de enzima KpnI (Invitrogen™) a un volumen final de 20 µL con agua inyectable. La mezcla se incubó 4 h a 37 °C. La liberación del inserto de la construcción pProEX HTa- arpin se comprobó luego de la digestión del DNA plasmídico en un gel de agarosa al 1.25 %.

### **Transformación de células *E. coli* BL21 Star (D3)**

Una vez comprobado el patrón de restricción del plásmido pProEX HTa- arpin se seleccionó el DNA de una clona positiva para transformar bacterias *E. coli* BL21 Star (D3) de acuerdo al procedimiento efectuado para células *E. coli* DH5α. *E. coli* BL21 Star (D3) posee un vector de expresión fuerte que mejora la eficiencia de síntesis de proteínas. Se seleccionaron algunas colonias y se caracterizó el DNA con enzimas de restricción. Una de las clonas se seleccionó para inducir la expresión de la proteína recombinante arpin.

### **Inducción de la expresión proteína recombinante arpin**

A partir de un cultivo de 5 mL de *E. coli* BL21 (D3), se inocularon 100 µL en 10 mL de caldo LB con 120 µg/ml de ampicilina a 37 °C en agitación a 180 rpm durante 12 h y se utilizó como semilla para un cultivo de 250 ml de LB, se incubó a 37 °C en agitación a 180 rpm hasta alcanzar una O.D. entre 0.4 y 0.6 a 600 nm. Luego, se adicionó IPTG a una concentración final de 1.0 mM para inducir la expresión de la proteína recombinante. Se tomaron muestras de 3 mL del cultivo a las 0, 2, 4 y 6 h después de la inducción. Como control negativo se tomaron muestras de un cultivo sin inducir a los mismos tiempos. Se prepararon geles de poliacrilamida al 17% para analizar la inducción de la proteína recombinante arpin mediante un ensayo de WB revelando la membrana con un anticuerpo anti- histidinas y el anticuerpo policlonal de arpin.

### **Purificación de la proteína recombinante arpin**

Después de la inducción con IPTG, se obtuvieron los cuerpos de inclusión formados por las proteínas de fusión dentro del citoplasma bacteriano con el siguiente procedimiento: 240 mL de medio LB inducido se centrifugaron por 30 min a 6000 rpm, se decantó el sobrenadante y se homogenizó la pastilla con 15 mL de la solución I (15% sacarosa, 0.12% tritón 100X y 50 mM Tris pH 8.0), se dio vórtex 10 seg y se puso en hielo 1 min durante un lapso de 10 min, se centrifugó a 8000 rpm por 20 min, se decantó el sobrenadante y se homogenizó la pastilla en 15 mL de la solución II (0.12% tritón 100X, 50 mM Tris y 10 mM EDTA), se dio vórtex 10 seg y se puso en hielo 1 min durante un lapso de 10 min, se centrifugó a 8000 rpm por 20 min, se decantó el sobrenadante y se homogenizó la pastilla en 5 mL de la solución III (50 mM Tris y 10 mM EDTA), se agregó buffer laemmli 5X, se hirvió la muestra 10 min y la muestra se corrió en un gel de poliacrilamida al 17%, el gel se incubó con una solución de  $\text{CuSO}_4$  1 M que produce una coloración blanca en la ausencia de proteínas y bandas translúcidas que corresponden a las proteínas que se separaron, se identificó la banda de la proteína sobre-expresada correspondiente a arpin, se cortó y se incubó toda la noche a 4 °C en 5 mL de PBS 1, la proteína recombinante arpin se concentró con un filtró Amicon® Ultra. La proteína se cuantificó por el método de Bradford y se evaluó su identidad en un ensayo de WB empleando el anticuerpo policlonal anti- arpin y como control negativo suero preinmune.

### **Generación de un anticuerpo anti- arpin**

Para el estudio de la proteína arpin fue necesario generar un anticuerpo, puesto que no existen anticuerpos disponibles en el mercado.

### **Determinación de los péptidos inmunogénicos**

Se seleccionó el péptido más inmunogénico haciendo uso de la aplicación AbDesigner. Se mandó sintetizar, con éste se inmunizó una rata para la generación, por un lado, de un anticuerpo policlonal obtenido a partir del suero de la rata al momento de su sacrificio y por otro lado, para la obtención de un anticuerpo monoclonal extrayendo el bazo de la rata para fusionarlo con células de mieloma, generar hibridomas y

seleccionar a las clonas candidatas productoras del anticuerpo monoclonal por ensayos de ELISA y, finalmente, probar la funcionalidad de los anticuerpos en WB e inmunofluorescencia. Tener un anticuerpo monoclonal nos permite tener una fuente ilimitada de anticuerpos  $\alpha$ - arpin.

### **Esquema de inmunización**

A 2 ratas Wistar de 6 a 8 semanas de 250 g en peso obtenidas del bioterio del CINVESTAV se les tomó una muestra de sangre 15 días previos a la inmunización para separar el suero y emplearlo como suero preinmune, luego se inmunizó una rata intraperitonealmente con cuatro dosis de 250  $\mu$ g de un péptido sintético de arpin acoplado a KLH y otra con la misma cantidad de péptido sin acoplar a KLH a intervalos de 15 días durante 60 días. Una rata Wistar sin inmunizar se empleó como control durante todo el proceso de inmunización. La primera inmunización se realizó en presencia del adyuvante completo de Freund y las siguientes inmunizaciones se administraron con adyuvante incompleto de Freund. Se hicieron ensayos de ELISA del suero de las ratas para evaluar la producción de anticuerpos durante el período de inmunización y seleccionar a la rata con el título más alto. El día de la fusión del bazo con células de mieloma, la rata seleccionada se desangró para obtener el suero policlonal hiperinmune para probar su funcionalidad en la detección de la proteína arpin.

### **Ensayos de ELISA**

Placas de ELISA de 96 pozos (Nunc) sensibilizadas con 1  $\mu$ g/mL del péptido sintético de arpin acoplado y sin acoplar a KLH en regulador de carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M y  $\text{NaHCO}_3$  1 M) a pH de 9.6 durante 12 h a 4 °C, se bloquearon con 100  $\mu$ L de PBS Tween- leche (Tween, SIGMA al 0.1% y leche Nestlé al 5%) durante 1 h. Posteriormente se lavaron las placas cuatro veces con PBS- Tween al 0.1%. Se adicionaron 50  $\mu$ L por pozo de los sueros (1:100- 1:250) a las placas sensibilizadas, las cuales se incubaron a 37 °C por 1 h. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS- Tween y se incubaron con una dilución 1:10000 de anticuerpo IgG [H+L] anti- rata acoplado a HRP (Invitrogen<sup>TM</sup>). Las placas se lavaron cuatro veces con PBS-Tween al 0.1% y se incubaron con 50  $\mu$ L por pozo de la solución formada por 10 mg de OPD

(SIGMA) y 50  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno en 6 mL de buffer de citratos (ácido cítrico 0.1 M y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M a pH de 5). Se leerán las placas a 450 nm utilizando un lector Multiskan FC Thermo Scientific.

### **Fusión de bazo con células de mieloma**

Las células de mieloma de ratón Ag8 se sembraron en medio RPMI al 10% de FBS con antibiótico (100 U/mL). Estas células tienen las características de ser incapaces de producir anticuerpos y tienen deficiencia en la enzima HGPRT, lo cual permite seleccionar a las células fusionadas al ponerlas en presencia de un medio de selección. Se inyectaron 5 millones de células Ag8 a ratones Balb/c vía intraperitoneal para inducirles ascitis. Una vez que los ratones mostraron signos de inflamación se drenaron y se extrajeron las células Ag8. En un tubo, se mezclaron las células del bazo de la rata y células Ag8 en una proporción 10:1. Se añadieron 0.5 mL de PEG al 42 % (para una mezcla de 100,000,000 células de bazo y 10,000,000 de células Ag8) precalentado a 37°C. Estas células se sembraron en 20 placas de 96 pozos en presencia de medio de selección: medio RPMI suplementado con 200 unidades/mL de hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT, SIGMA), FBS al 20%, 100 U/mL de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de piruvato, 100 U/mL L-glutamina y 100 U/mL de antibiótico-antimicótico,  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.1% y 200 U/mL de Mycokill; estas células se incubaron en una atmósfera húmeda con  $\text{CO}_2$  al 5 % a 37°C. Una vez que se evidenció la formación de colonias, se realizaron ensayos de ELISA con los sobrenadantes de los cultivos para evaluar la producción de anticuerpos y se aislaron las clonas que mostraron una mayor absorbancia en la lectura de los ensayos de ELISA. Después de 4 rondas de clonación, la aminopterina se omitió del medio y posteriormente el reactivo HT (SIGMA) se omitió completamente. Las células se crecieron en medio RPMI sin HT al 10% de FBS.

### **Ensayos de *western blot***

Las células se lisaron con buffer RIPA (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 2% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 0.6 M KCl, 5 mM EDTA) en presencia de inhibidor de proteasas (Complete, Invitrogen™). Los lisados celulares se analizaron por SDS- PAGE y las proteínas se

transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad), las cuales se bloquearon con PBS- Tween- Leche durante 1 h. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (sobrenadantes candidatos del anticuerpo monoclonal, suero hiperinmune policlonal 1:500 o suero preinmune 1:500) toda la noche a 4 °C. Se usó. Después, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween al 0.1% a intervalos de 10 min y se incubaron con una dilución 1:10000 de anticuerpo IgG [H+L] anti- rata acoplado a HRP (Invitrogen™) 1 h. Luego, las membranas se lavaron nuevamente y se revelaron con el reactivo SuperSignal® West Pico/Femto Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, a través del equipo ChemiDoc (Bio-rad).

### **Ensayos de inhibición del anticuerpo anti- arpin**

Para verificar la especificidad de la detección de la proteína arpin con el anticuerpo monoclonal se llevó a cabo un ensayo de inhibición del anticuerpo que consistió en incubar 1 mL del sobrenadante del anticuerpo monoclonal con 2.13 y 3.20 mM del péptido con el cual se inmunizó a la rata para bloquear teóricamente el 50 y 100 %, respectivamente, de los sitios activos del anticuerpo, la mezcla se incubó en un tubo eppendorf durante una hora a 37 °C en agitación y ésta se utilizó como anticuerpo primario para ensayos de *western blot* con extractos proteicos provenientes de líneas celulares.

### **Inmunofluorescencia de células HMEC-1 y CaCo-2**

Se sembraron 80,000 células de células HMEC-1 o CaCo-2 por pozo en placas de 24 pozos. Cada pozo contenía un cubreobjetos tratado con poli-L-lisina. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C en un ambiente de humedad al 5% de CO<sub>2</sub>.

Al día siguiente, las células HMEC-1 se lavaron dos veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído (PFA, SIGMA) al 4% en PBS 1X durante 20 min a temperatura ambiente; posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 1X y se permeabilizaron con PBS-Tritón- al 0.2% durante 30 min, seguido de 3 lavados con PBS 1X. Se bloquearon las monocapas con una solución de PBS- Tritón- suero de chivo al 10% por 1 h y luego se incubaron en presencia de los anticuerpos primarios de arpin (Suero preinmune

dilución 1:100, anticuerpo policlonal dilución 1:100, sobrenadante sin diluir de clona de anticuerpo monoclonal) toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se hicieron tres lavados con PBS 1X y se incubaron las células con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488 anti- rata verde a una dilución 1:100 durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad y en agitación a 110 rpm. Se hicieron tres lavados con PBS 1X y un lavado final con agua MQ durante 30 min.

La inmunofluorescencia de células CaCo-2 se hizo con de acuerdo al procedimiento anterior, con la excepción de las soluciones empleadas: para la fijación y permeabilización se empleó etanol frío al 96% durante 20 min y la solución de bloqueo fue PBS- Tween 0.1%- BSA 2%.

Por último, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando Vecta Shield H-1200 con DAPI (Vector) y se analizaron en un microscopio confocal espectral Leica (Leica TCS SP5) para evaluar la expresión y localización de arpin.

### **Inmunofluorescencia de tejido de ratón**

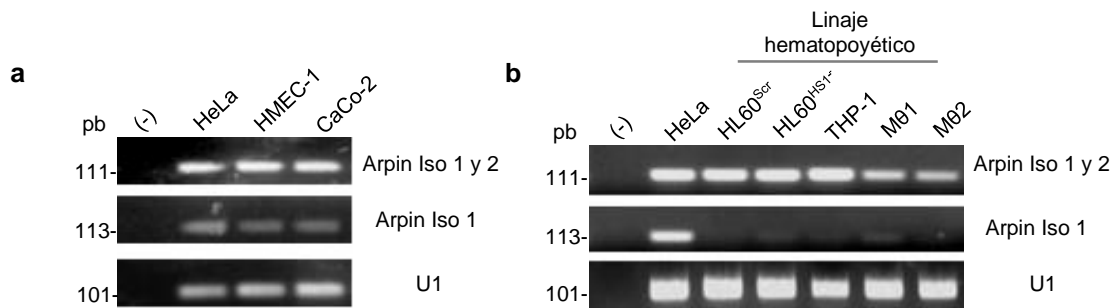
Las muestras de tejido de pulmón de ratón se delimitaron con un plumón hidrofóbico, se fijaron y permeabilizaron con etanol frío al 96% por 20 min y se lavaron tres veces con PBS 1X. Se empleó una solución de PBS 1X- Tween 0.05%- BSA 2% para bloquear el tejido, se hicieron 3 lavados con PBS 1X y se pusieron a incubar los anticuerpos primarios (Suero preinmune arpin dil 1:100, Suero policlonal arpin dil 1:100,  $\alpha$ - E-caderina dil 1:700) y se incubaron toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, se hicieron tres lavados con PBS 1X y luego se pusieron los anticuerpos secundarios AF488 anti- rata verde y AF568 anti- conejo a una dil 1:4000, los tejidos se fijaron 1 h a temperatura ambiente en agitación a 110 rpm, luego se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 min y se hizo un lavado final con agua MQ por 10 min. Lo tejidos se cubrieron con cubreobjetos utilizando Vecta Shield H-1200 con DAPI (Vector) y se analizaron en un microscopio confocal espectral Leica (Leica TCS SP5) para evaluar la expresión y localización de arpin.



## RESULTADOS

### Determinación de la expresión de arpin en células epiteliales, endoteliales, y de linaje hematopoyético y en tejido de ratón.

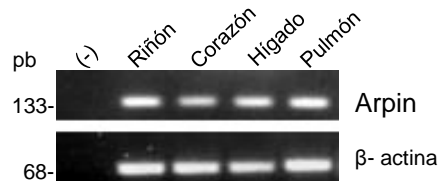
Para analizar si los transcritos de arpin en humano se expresaban en endotelio y epitelio, se analizó su expresión con cDNA de la línea celular endotelial de microvasculatura HMEC-1 y la línea celular epitelial de cáncer colorrectal CaCo-2. La expresión de arpin en células hematopoyéticas se evaluó con cDNA de las líneas celulares de promieloblastos HL60<sup>Scr</sup> y HL60<sup>HS1-</sup>, la línea celular de monocitos THP-1 y cDNA de macrófagos M1 y M2. Todos los análisis se efectuaron por PCR de punto final. Según nuestros resultados, en endotelio y epitelio humano se expresan ambos transcritos de arpin (Fig. 15a), mientras que en las líneas celulares de linaje hematopoyético es evidente que la mayor expresión de arpin corresponde al transcrito 2, puesto que la amplificación del transcrito 1 fue escasa en células HL60<sup>HS1-</sup>, THP-1 y en macrófagos M1 (M01), e incluso indetectable en células HL60<sup>Scr</sup> y en macrófagos M2 (M02) (Fig. 15b). Todos los productos de PCR correspondieron con el tamaño esperado.



**Figura 15. Análisis de la expresión de arpin en células endoteliales, epiteliales y hematopoyéticas.** 15a) Los transcritos de arpin en humano se amplificaron por PCR de punto final con 1000 ng de cDNA de la línea celular endotelial HMEC-1 y la línea celular epitelial CaCo-2, 15b) las líneas celulares humanas de linaje hematopoyético HL60<sup>Scr</sup>, HL60<sup>HS1-</sup> y THP-1, así como cDNA de macrófagos humanos M1 (M01) y M2 (M02). Los productos de PCR se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.25%. Como control de carga se amplificó el gen U1, como control negativo (-) una mezcla de todos los componentes de la reacción de PCR, excepto DNA, y como control positivo, cDNA de la línea celular HeLa.

También se analizó la expresión de arpin en ratón, donde sólo está reportada una isoforma del gen, utilizando cDNA de diferentes tejidos de ratón en una PCR de punto final.

Nosotros observamos que arpin se expresa en cantidades comparables en riñón, corazón, hígado y pulmón, un resultado esperado porque los tejidos están constituidos por células epiteliales, donde ya se demostró la expresión de arpin (Fig. 16).



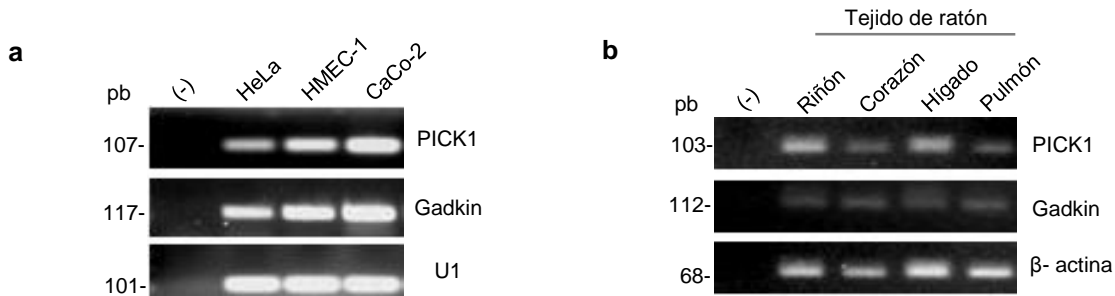
**Figura 16. Análisis de la expresión de arpin en ratón.** El transcrito de arpin se amplificó por PCR de punto final con 1000 ng de cDNA proveniente de tejido de riñón, corazón, hígado y pulmón de ratón. Los productos de PCR se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.25%. Como control de carga se amplificó el gen  $\beta$ -actina y como control negativo (-) una mezcla de todos los componentes de la reacción de PCR, excepto DNA.

### **Determinación de la expresión de Gadkin y PICK1 en células epiteliales y endoteliales y en tejido de ratón.**

Las proteínas gadkin y PICK1, al igual que arpin, inhiben la actividad del complejo Arp2/3 a través de un dominio ácido similar al de los NPFs y nos interesamos en comprobar su expresión porque podrían tener una función redundante con arpin.

Para conocer si PICK1 y Gadkin se expresaban en nuestros sistemas biológicos de estudio se analizó su expresión por PCR de punto final con cDNA de la línea celular endotelial HMEC-1 y la línea celular epitelial CaCo-2, así como cDNA de los tejidos de ratón riñón, corazón, hígado y pulmón.

Los resultados sugieren que PICK1 y Gadkin se expresan más en células CaCo-2, que en células HeLa y HMEC-1 (Fig. 17a). En tejido de ratón, Gadkin se expresa a niveles comparables en todos los tejidos, mientras que PICK1 se expresa más en riñón e hígado (Fig. 17b).

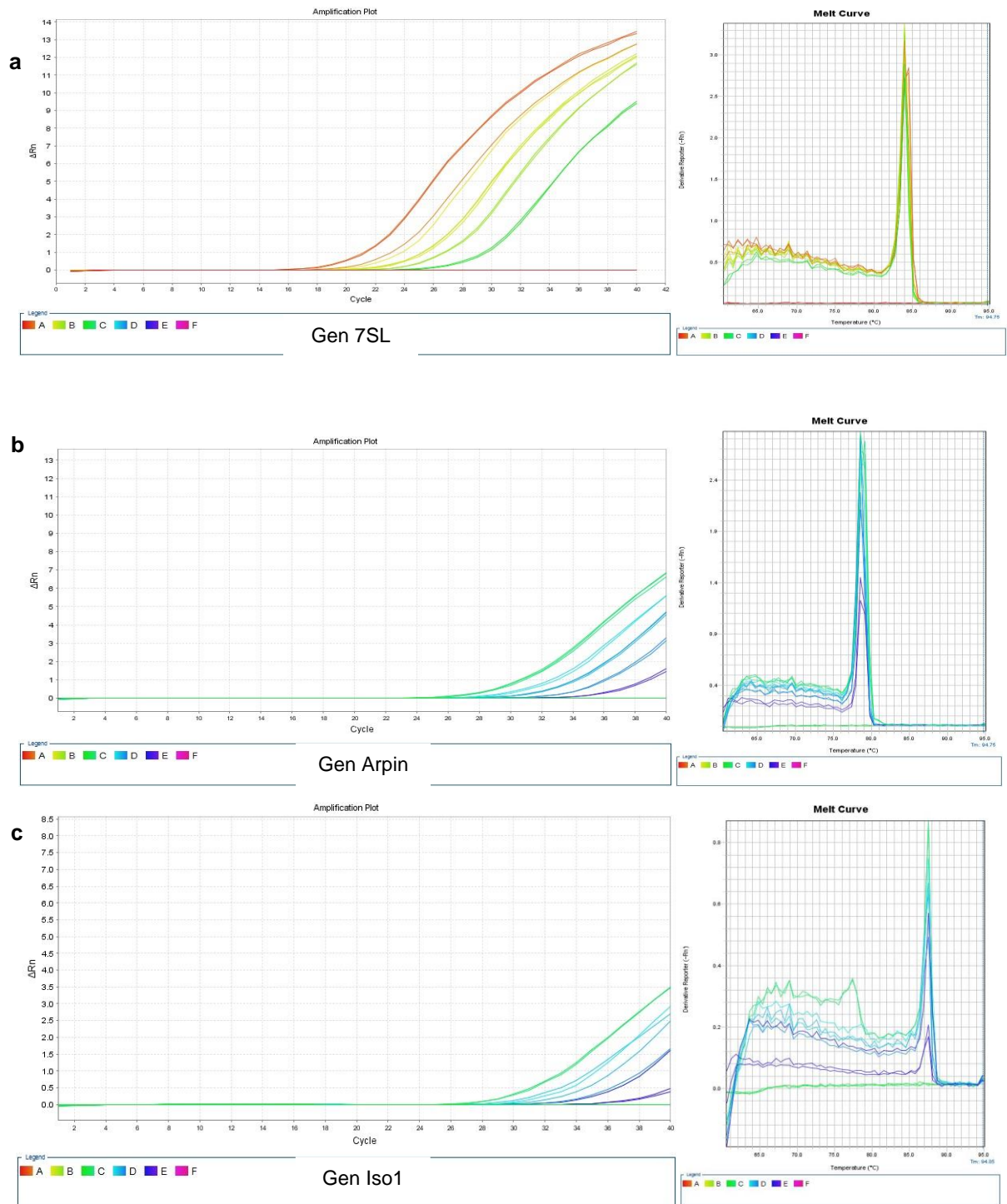


**Figura 17. Análisis de la expresión de PICK1 y Gadkin en células endoteliales y epiteliales y en tejidos de ratón.** 17a) Los transcritos de PICK1 y Gadkin se amplificaron por PCR de punto final con 1000 ng de cDNA de la línea celular endotelial HMEC-1 y la línea celular epitelial CaCo-2 y 17b) 1000 ng de cDNA proveniente de tejido de riñón, corazón, hígado y pulmón de ratón. Los productos de PCR se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.25%. Como control de carga se amplificó el gen U1 de las líneas celulares y el gen  $\beta$ -actina de los tejidos de ratón, como control negativo (-) una mezcla de todos los componentes de la reacción de PCR, excepto DNA, y como control positivo de la expresión en líneas celulares se utilizó cDNA de la línea celular HeLa.

### **Análisis de la expresión del mRNA de arpin bajo un estímulo inflamatorio.**

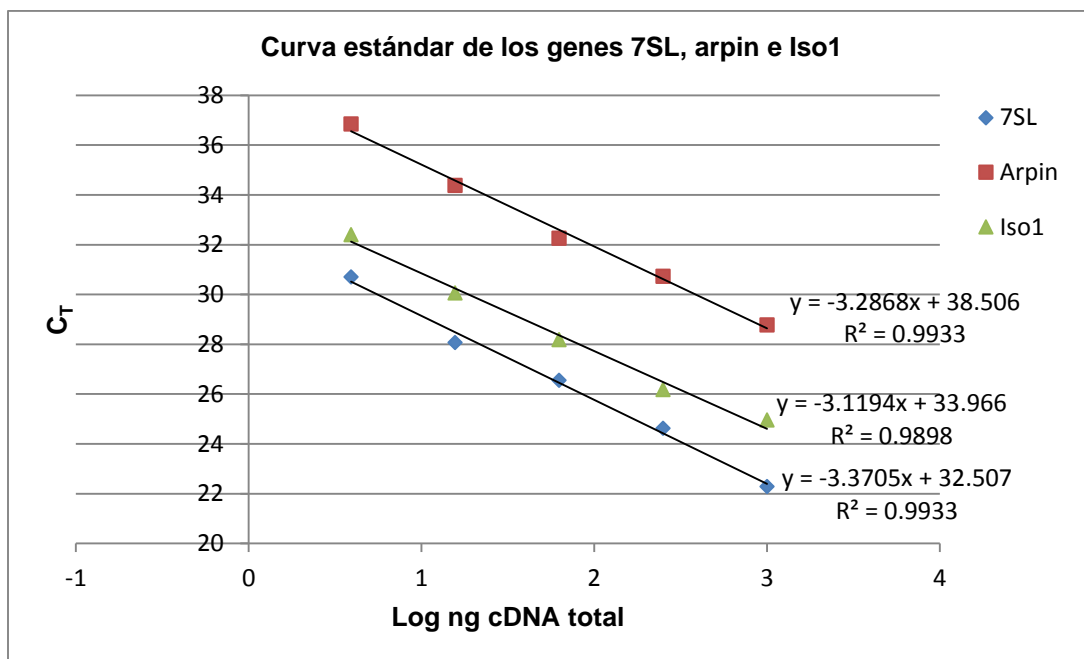
Para saber si existía una modulación de arpin a nivel transcripcional por un estímulo inflamatorio, se analizaron sus transcritos en células endoteliales y epiteliales por RT-PCR en tiempo real.

Como primer paso, se realizó un proceso de estandarización para evaluar si el gen blanco tenía una eficiencia de amplificación similar a la del gen constitutivo en el modelo de estudio. Para ello se prepararon diluciones seriadas con cDNA de células HMEC-1 y cada dilución se amplificó por RT-PCR en tiempo real para el gen constitutivo y el gene blanco. La curva de disociación de *primers* mostró la especificidad de detección de los productos amplificados para arpin (transcritos 1 y 2) y para el gen 7SL en forma de un pico bien definido en la curva de disociación (Fig. 18a y 18b). En cambio, con los *primers* dirigidos sólo contra el transcrito 1, se observaron picos adicionales que podrían ser el resultado de la dimerización de *primers*. Pese a las modificaciones en el programa de RT-PCR estos picos inespecíficos no desaparecieron totalmente (Fig. 18c).



**Figura 18. Curvas de amplificación y disociación de los productos de PCR.** Curva estándar de 5 puntos con cDNA (1000, 250, 62.5, 15.62 y 3.91 ng) de células HMEC-1 amplificado por RT-PCR en tiempo real utilizando Power SYBR® Green PCR Mater Mix Applied biosystems y *primers* específicos para el gen constitutivo 7SL, una región común de los transcritos 1 y 2 de arpin (Referida como arpin) y una región presente sólo en el transcrito 1 de arpin (Referida como Iso1). A la izquierda se presentan las curvas de amplificación para cada gen y a la derecha las curvas de diociación de *primers* que proporciona el equipo de cuantificación.

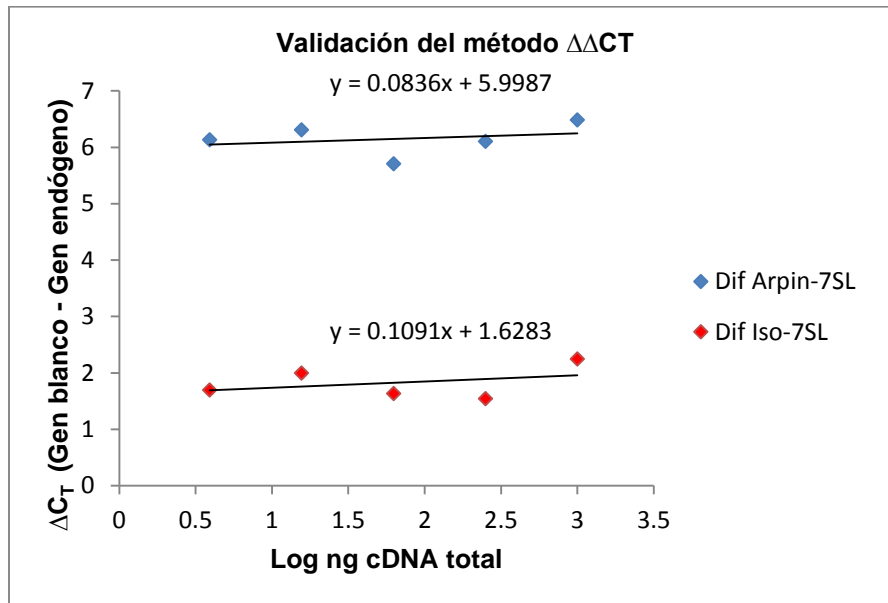
Los valores de CT obtenidos se graficaron contra el logaritmo de la cantidad de cDNA, se obtuvo la pendiente de la línea y la eficiencia de amplificación se determinó con la fórmula  $E = (10^{-1/s} - 1) \times 100$ , donde E representa la eficiencia y s la pendiente de la curva estándar. Las eficiencias de amplificación de los transcritos 1 y 2 de arpin, el transcrito 1 de arpin y del gen 7SL fueron del 101 %, 109 % y 98% respectivamente (Fig. 19). En una RT-PCR en tiempo real, el rango dinámico, consiste en el rango de la cantidad de cDNA más alta y más baja que fue empleada, donde existe una linealidad aceptable de  $R^2 = \geq 0.98$  y una eficiencia, preferencialmente entre el 90 y 110%. Nuestros valores de cuantificación resultaron válidos porque cumplieron con dichos parámetros (Fig. 19).



**Figura 19. Eficiencia de PCR.** Los valores obtenidos de los genes blanco y el gen constitutivo 7SL se graficaron contra el logaritmo de la cantidad de cDNA y la eficiencia de PCR se determinó calculando la pendiente de la línea y sustituyéndola en la fórmula  $E = (10^{-1/s} - 1) \times 100$ , donde E representa la eficiencia y s la pendiente de la curva estándar.

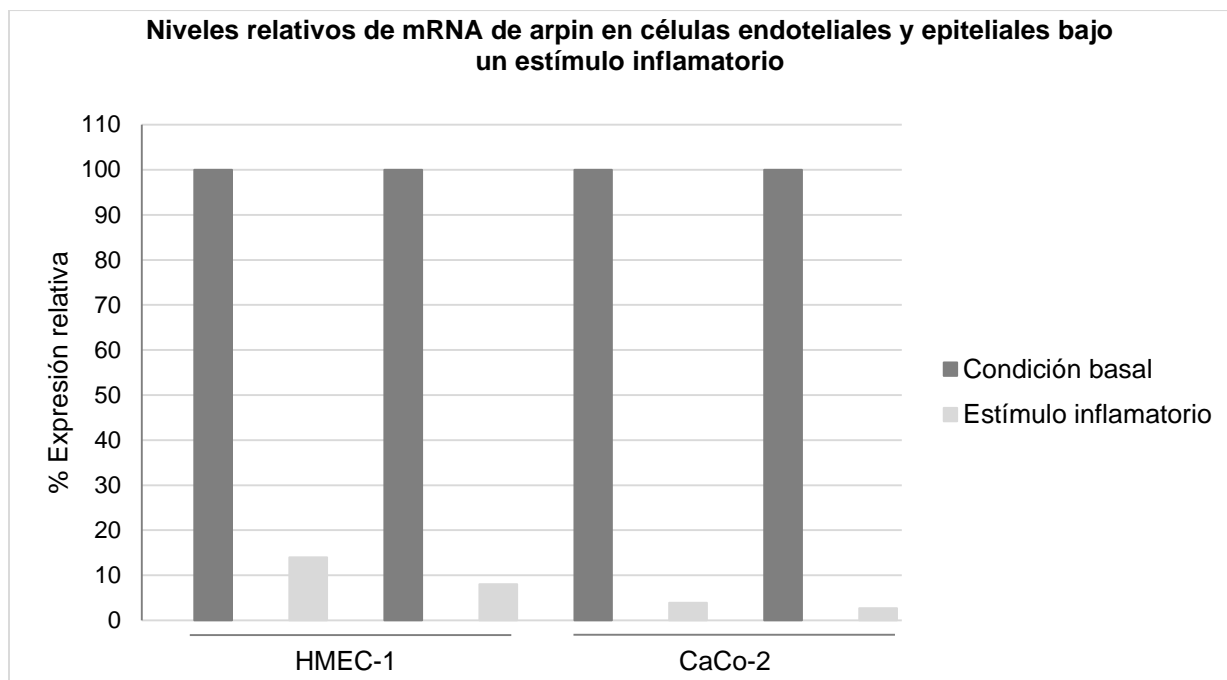
A su vez, consecutivamente se validó el método  $\Delta\Delta C_T$  que se utilizó en los ensayos para el análisis de la expresión de arpin bajo un estímulo inflamatorio. Esto se hizo graficando el  $\Delta C_T$  (la resta de los valores de  $C_T$  de cada gen blanco, menos los valores de  $C_T$  del gen constitutivo) contra el logaritmo de cDNA. Si la pendiente de la línea es

igual o menor a 0.1, entonces las eficiencias de amplificación son comparables. Para arpin, se obtuvo una pendiente de 0.0836 y para Iso1 de 0.1091, ambos dentro del valor aceptable (Fig. 20).



**Figura 20. Comparación de eficiencias de PCR entre los genes blanco y el gen constitutivo.** Los valores de  $C_T$  se determinaron para los genes Arpin (Transcritos 1 y 2 de arpin en humano) e Iso1 (Transcrito 1 de arpin en humano) y el gen 7SL utilizando cDNA de células HMEC-1. Los diferentes valores de  $C_T$  se graficaron contra el logaritmo de la cantidad de cDNA. La diferencia de eficiencia de la reacción de PCR se determinó calculando la pendiente de la línea.

Luego de la validación del método  $\Delta\Delta C_T$  se llevó a cabo la cuantificación de los niveles de expresión de los transcritos de arpin bajo un estímulo inflamatorio. En células HMEC-1 tratadas con  $TNF-\alpha$  la expresión de arpin disminuyó un 86% y en células CaCo-2 tratadas con  $TNF-\alpha$  e  $IFN-\gamma$  un 96% con respecto a los niveles de expresión de sus contrapartes sin tratamiento (Fig. 21).



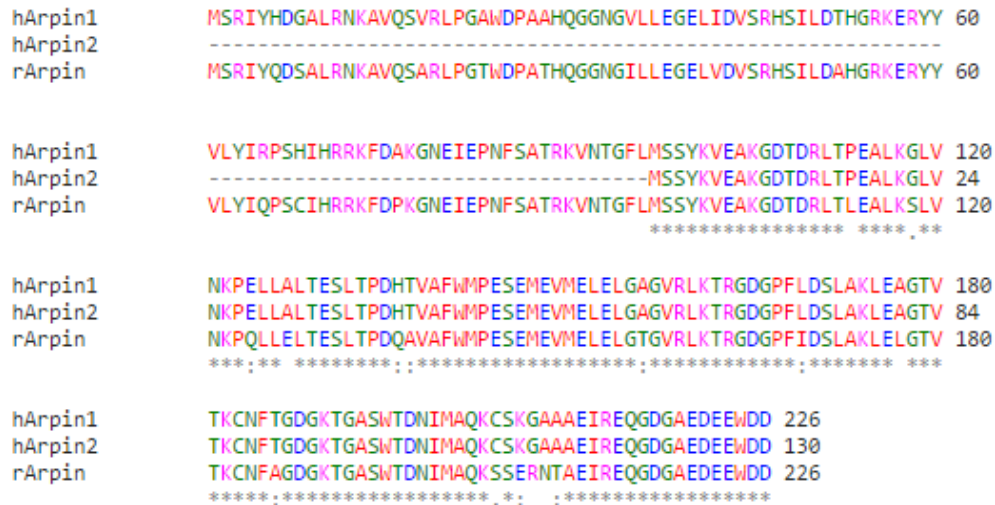
**Figura 21. Niveles relativos de mRNA de arpin en células endoteliales HMEC-1 y epiteliales CaCo-2 bajo un estímulo inflamatorio.** Se obtuvo cDNA de células en condiciones basales y tratadas con un estímulo inflamatorio, se corrió una RT-PCR en tiempo real con las condiciones estandarizadas y los niveles de expresión de los genes blanco se normalizaron con los valores de expresión del gen constitutivo y se graficaron los cambios de expresión como un porcentaje. Estos son los resultados de dos experimentos independientes bajo las mismas condiciones.

Este ensayo demuestra que si existe una disminución de los transcritos de arpin bajo un estímulo inflamatorio. Para saber si ésta disminución se reflejaba en los niveles de la proteína se produjeron anticuerpos  $\alpha$ - arpin como una herramienta para su detección. Como control positivo de la detección de arpin por los *anticuerpos*  $\alpha$ - arpin se generó una proteína recombinante de arpin.

### **Clonación del transcrito 2 de arpin en el plásmido pProEX- HTa**

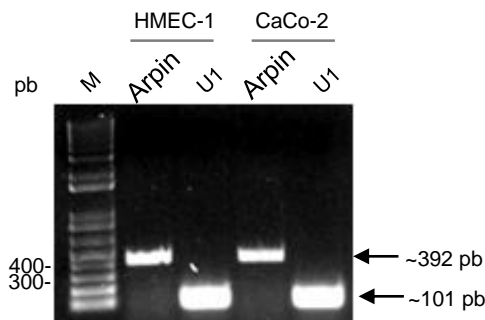
Para la generación de una proteína recombinante de arpin, primero se efectuó un alineamiento (Fig. 22) de las secuencias proteicas de las isoformas de arpin en humano y la secuencia proteica de arpin en ratón en el programa *ClustalW2* para determinar su similitud y elegir una región común entre ellas detectable por el anticuerpo  $\alpha$ - arpin, encontrando que la secuencia proteica de la isoforma 2 tiene una similitud del 100% con la de la isoforma 1 y del 88% con respecto a la de ratón. De tal manera que se

diseñó un juego de *primers* que amplificaran la secuencia codificante completa de la isoforma 2 de arpin constituida por 392 pb.



**Figura 22. Alineamiento proteico de las secuencias codificantes completas de las isoformas 1 (hArpin1) y 2 (hArpin2) de arpin en humano y en ratón (rArpin).** El asterisco (\*), indica que en dicha posición los residuos son 100% idénticos. Los dos puntos (:), indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas. 3. Un punto (.), indica sustituciones menos conservativas.

La secuencia codificante del transcrito 2 de arpin se amplificó por PCR de punto final, empleando como molde cDNA de células HMEC-1 y CaCo-2 (Fig. 23).

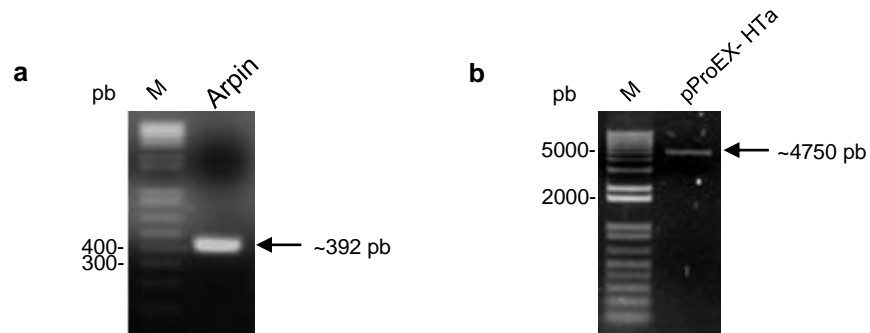


**Figura 23. Amplificación del gen arpin.** Los productos de PCR del gen arpin y U1 en células HMEC-1 y CaCo-2 se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.25%. (M) Marcador de tamaño de pares en bases 1 Kb DNA Plus DNA ladder.

La amplificación del transcrito 2 de arpin se obtuvo tanto con cDNA de células HMEC-1, como de células CaCo-2 en el tamaño esperado (392 pb). Luego, un producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción XbaI y KpnI y el DNA plasmídico del vector de expresión pProEX- HTa se digirió con las mismas enzimas y se desfosforiló.

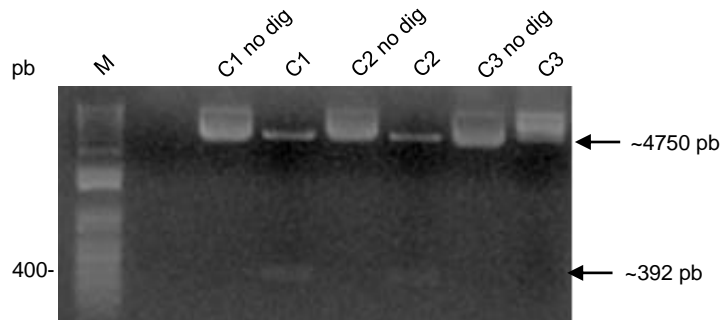


Posteriormente, ambas muestras se purificaron y una alícuota de cada muestra se analizó en un gel de agarosa (Fig. 24).



**Figura 24. Purificación del gen arpin y del plásmido pProEX- HTa.** Separación electroforética en gel de agarosa al 1.25% posterior a la purificación del 24a) producto de PCR de arpin digerido y del 24b) plásmido pProEX HTa digerido y desfosforilado. (M) Marcador de tamaño en pares de bases 1 Kb DNA Plus DNA ladder.

El producto de PCR y el DNA plasmídico se observaron con la pureza y el tamaño esperado después de la purificación, por lo cual se sometieron a una reacción de ligación y con ésta se transformaron células *E. coli* DH5 $\alpha$ , se seleccionaron algunas clonas para realizarles una extracción DNA plasmídico y se caracterizaron con las enzimas de restricción XbaI y KpnI (Fig. 25).

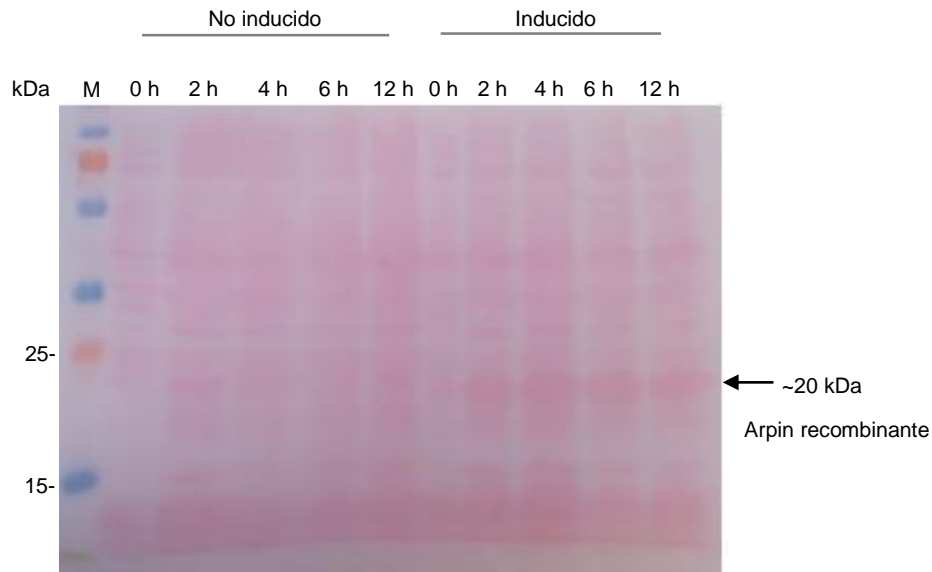


**Figura 25. Clonación de arpin en el vector pProEX HTa.** Se seleccionaron tres clonas transformadas con la construcción pProEX-HTa- arpin, se extrajo su DNA y éste se caracterizó con las enzimas de restricción XbaI y KpnI. Los productos de digestión se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.25 %. (M) Marcador de tamaño de pares de bases 1 Kb DNA Plus DNA ladder.

El análisis en gel de agarosa reveló que 2 de las 3 clonas analizadas presentaron el patrón de digestión esperado de una banda de ~392 pb correspondiente al inserto y una banda de ~4750 pb correspondiente al plásmido.

Para mejorar la expresión de la proteína, se transformaron células *E. coli* BL21 (D3) con el DNA plasmídico parental extraído de una clona de *E. coli* DH5 $\alpha$  positiva para la

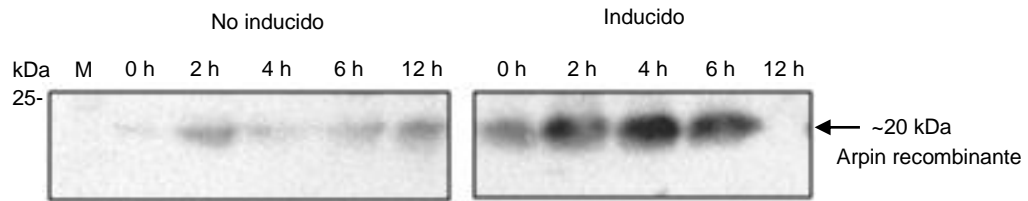
construcción pProEX HTa- arpin. La expresión de arpin en *E. coli* BL21 (D3) se indujo con IPTG y se evaluó la cinética de inducción de la proteína (Fig. 26).



**Figura 26. Inducción de la expresión de la proteína recombinante arpin.** Una clona de *E. coli* BL21 (D3) positiva para la construcción pProEX HTa- arpin se incubó con IPTG a diferentes tiempos y sus extractos proteicos se corrieron en un gel de poliacrilamida al 17%, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y ésta se tiñó con rojo *ponceau* para evaluar la inducción de la expresión de la proteína. En la parte izquierda de la membrana se observan los extractos bacterianos no inducidos y en la parte derecha los extractos bacterianos inducidos a diferentes tiempos. (M) Marcador de peso molecular PageRuler Prestained protein ladder.

En comparación con los extractos bacterianos no inducidos, se observó un enriquecimiento en la expresión de la proteína recombinante a tiempos mayores de inducción. Sin embargo, aunque el peso de la proteína recombinante era de 15 kDa, su peso real fue ligeramente más alto (~20 kDa). La diferencia de peso de la proteína podría deberse a que su carga que le confiere una mayor migración.

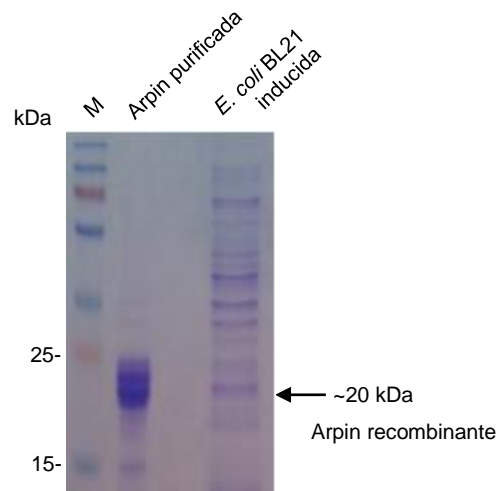
Luego, la membrana teñida con *ponceau* se destiñó y la proteína recombinante se detectó inmunológicamente con un anticuerpo  $\alpha$ - histidina que detecta la bandera de la cola de polihistidina en la proteína recombinante (Fig. 27).



**Figura 27. Expresión de la proteína arpin.** Se llevó a cabo una cinética de expresión de la proteína de interés a diferentes tiempos de inducción con IPTG y se analizaron los extractos bacterianos por *western blot* utilizando un anticuerpo para la detección de la cola de polihistidina. (M) Marcador de peso molecular PageRuler Prestained protein ladder.

Como resultado se observó la detección creciente de la proteína recombinante, en el mismo peso molecular (~20 kDa), a tiempos mayores de inducción, excepto a las 12 h, donde la proteína fue indetectable, probablemente porque la proteína se degradó.

Los lisados bacterianos de una clona de *E. coli* BL21 (D3) inducida se corrieron en un gel de poliacrilamida, se cortó la banda enriquecida correspondiente a arpin y luego de solubilizarla y concentrarla se corrió en un gel de poliacrilamida (Fig. 28).



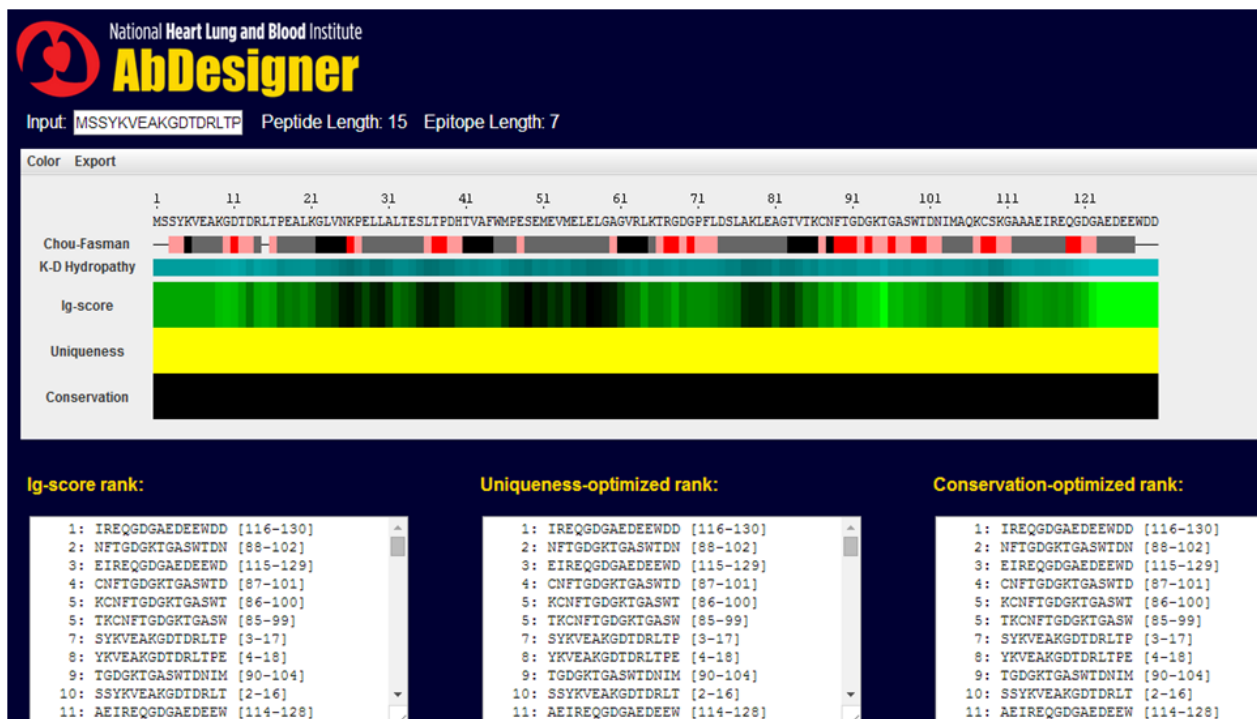
**Figura 28. Purificación de la proteína recombinante arpin.** La proteína arpin se aisló a partir de lisados bacterianos de *E. coli* (D3) BL21 inducida y su pureza se analizó en gel de poliacrilamida al 17% teñido con azul de coomassie. (M) Marcador de peso molecular PageRuler Prestained protein ladder.

La proteína detectada muestra un peso molecular de ~20 kDa, que coincide con el peso de la proteína detectada en el ensayo anterior de *western blot*.

La proteína recombinante de arpin producida se congeló hasta su uso como control positivo en ensayos de *western blot* con los anticuerpos  $\alpha$ - arpin.

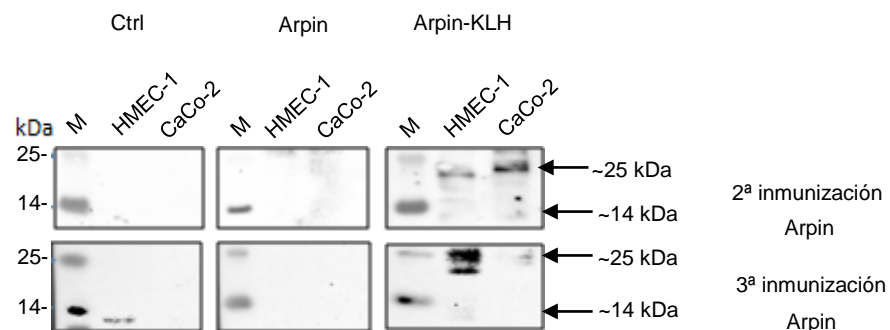
## Generación de anticuerpos policlonal y monoclonal $\alpha$ - arpin

La secuencia proteica de la isoforma 2 humana se utilizó para analizarse en el programa AbDesigner puesto que tiene una similitud del 100% con la de la isoforma 1 humana y del 88% con respecto a la de ratón. El péptido óptimo más inmunogénico para la generación del anticuerpo  $\alpha$ - arpin consiste de 15 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína (Fig. 29), una secuencia conservada entre las isoformas humanas y el ratón. Esto significa que al anticuerpo generado nos permitirá detectar la isoforma 1 humana y de ratón de 25 kDa y la isoforma 2 humana de 14 kDa. En la orden de síntesis del péptido se solicitó una cantidad acoplada y sin acoplar a KLH (una proteína acarreadora), que debido a su gran tamaño y numerosos epítopos podrían generar una respuesta inmune sustancial. El péptido sin acoplar a KLH también sirvió para la sensibilización de placas en ensayos de ELISA. Cabe mencionar que la secuencia del péptido sintético que se empleó para realizar la inmunización está incluida en el extremo carboxilo terminal de las tres secuencias.



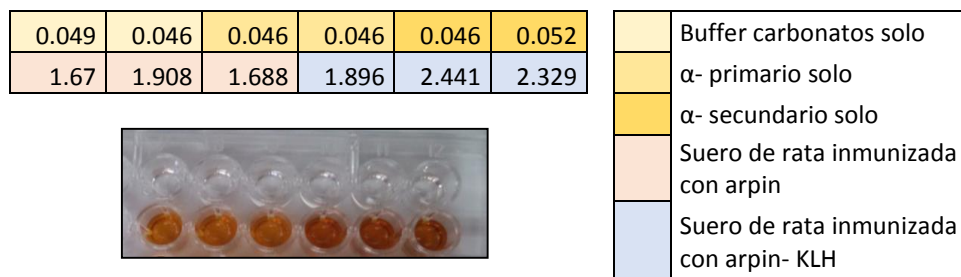
**Figura 29. Análisis de la predicción de la secuencia más inmunogénico de la isoforma 2 de arpin humana con la aplicación online AbDesigner.** En el panel se muestra la puntuación de Chou Fasman para la predicción de estructuras secundarias, el índice de hidrofobicidad, la puntuación de inmunogenicidad, la especificidad y la conservación de la secuencia analizada. Las puntuaciones más altas muestran el color más brillante.

En el transcurso de la inmunización se evaluó la producción del anticuerpo  $\alpha$ - arpin mediante ensayos de *western blot* y ELISA. En la siguiente imagen se presenta un panel de *western blot* de extractos de células HMEC-1 y CaCo-2 probados con los sueros de una rata control sin inmunizar y las ratas inmunizadas con el péptido sintético de arpin sin acoplar y acoplado a KLH obtenidos posteriormente a la segunda y tercera inmunización. Con el suero posterior a la tercera inmunización se observó la detección de una proteína de ~25 kDa en extractos totales de células HMEC-1 y CaCo-2 y una banda poco enriquecida por debajo de los 15 kDa. Estas bandas no se detectaron cuando se usó el suero preinmune (Fig. 30).



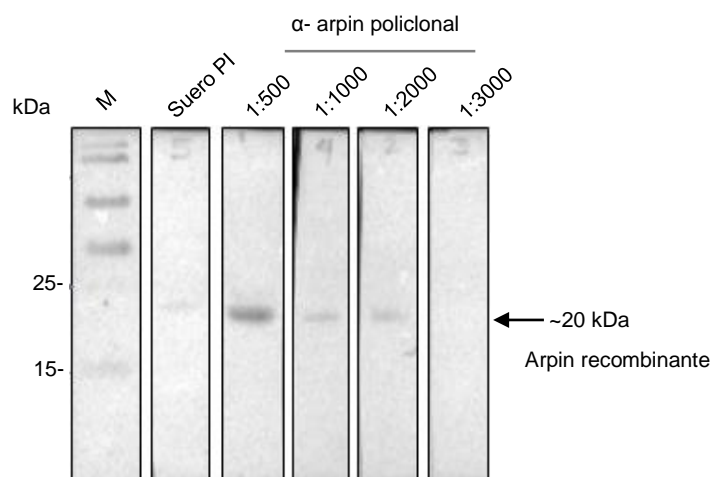
**Figura 30. Evaluación del reconocimiento de arpin con el suero hiperinmune.** Los sueros 1:100 tomados después de la segunda y tercera inmunización de la rata control y las ratas inmunizadas con el péptido de arpin acoplado y sin acoplar a KLH se probaron con extractos proteicos de células HMEC-1 y CaCo-2 en experimentos de *western blot*. (M) Marcador de peso molecular PageRuler Prestained protein ladder.

El ensayo de ELISA con el suero de las ratas obtenido después de la cuarta inmunización reveló que la rata inmunizada con el péptido arpin- KLH tenía niveles más altos del anticuerpo  $\alpha$ - arpin, en comparación con la rata inmunizada con el péptido sin acoplar a KLH y se eligió para obtener su bazo y fusionarlo con células de mieloma para la generación del anticuerpo monoclonal (Fig. 31).



**Figura 31. Análisis del nivel de anticuerpos específicos contra la proteína arpin.** Se realizó un ensayo de ELISA, para lo cual, una placa de 96 pozos se sensibilizó con 1 µg del péptido arpin no acoplado a KLH y se probaron por triplicado los sueros de las ratas inmunizadas con arpin y arpin- KLH después de la cuarta inmunización. A la izquierda se muestra una tabla con los valores de densidad óptica leídos a 450 nm y debajo de ésta se observa la imagen de la reacción colorimétrica al final del ensayo. En la figura de la derecha se explica la simbología de colores de la tabla de lectura de O.D.

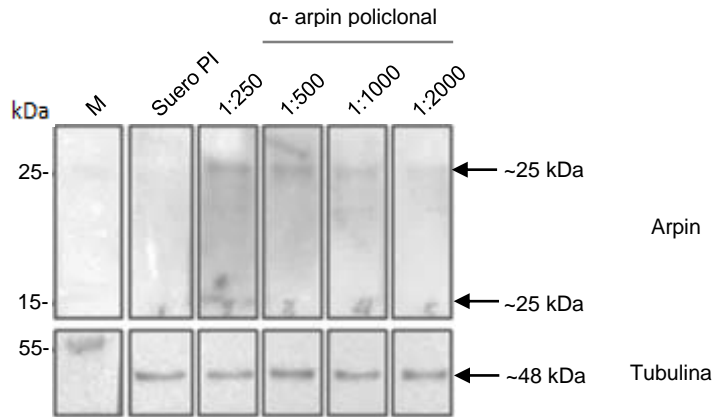
Posteriormente, se probó el suero hiperinmune policlonal para la detección de la proteína recombinante de arpin generada anteriormente (Figura 32).



**Figura 32. Detección de la proteína recombinante arpin con el anticuerpo policlonal α- arpin.** Una muestra de la proteína recombinante arpin se corrió por quintuplicado en un gel de poliácridamida al 17% y su detección se analizó con un ensayo de *western blot* empleado el suero hiperinmune policlonal α- arpin en una dilución 1:500- 1:3000 y como control negativo el suero preinmune a una dilución 1:500. (M) Marcador de peso molecular PageRuler Prestained protein ladder.

La proteína recombinante fue no fue detectable por suero preinmune, pero sí por el anticuerpo policlonal (después de la 4<sup>a</sup> inmunización) (Fig. 32) en un tamaño ~20 kDa, como se observó en el *western blot* de la inducción de la proteína revelado con un anticuerpo α- histidina. Por lo tanto, se validó su uso como control positivo en ensayos posteriores de *western blot*.

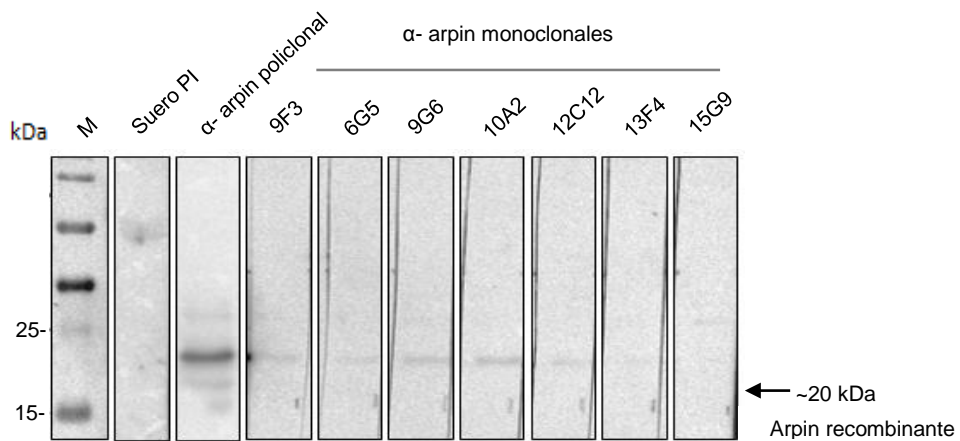
El suero hiperinmune policlonal también se usó para detectar las isoformas de arpin en humano empleando lisados de células HeLa en un ensayo de *western blot* (Fig. 33).



**Figura 33. Detección de arpin humana con el anticuerpo policlonal  $\alpha$ - arpin.** Se emplearon extractos proteicos de células HeLa para probar la detección de las isoformas humanas de arpin por *western blot* utilizando diferentes diluciones del anticuerpo policlonal. Como control de carga se analizó la tubulina. (M) Marcador de peso molecular PageRuler Prestained protein ladder.

El anticuerpo policlonal  $\alpha$ - arpin reconoce específicamente ambas isoformas humanas de arpin (25 y 14 kDa) a una dilución 1:250 en extractos proteicos de células HeLa, sin embargo las bandas que se detectaron fueron poco intensas. Esto podría deberse a una baja expresión de la proteína arpin en los lisados de esta línea celular o que la cantidad de anticuerpo presente en el suero fue baja. Estas bandas no se detectaron cuando se usó el suero preinmune (Fig. 33).

Posteriormente, se probaron los sobrenadantes de clonas candidatas productoras del anticuerpo monoclonal para la detección de la proteína recombinante arpin, utilizando como un control positivo de la detección al anticuerpo policlonal  $\alpha$ - arpin (Fig. 34).



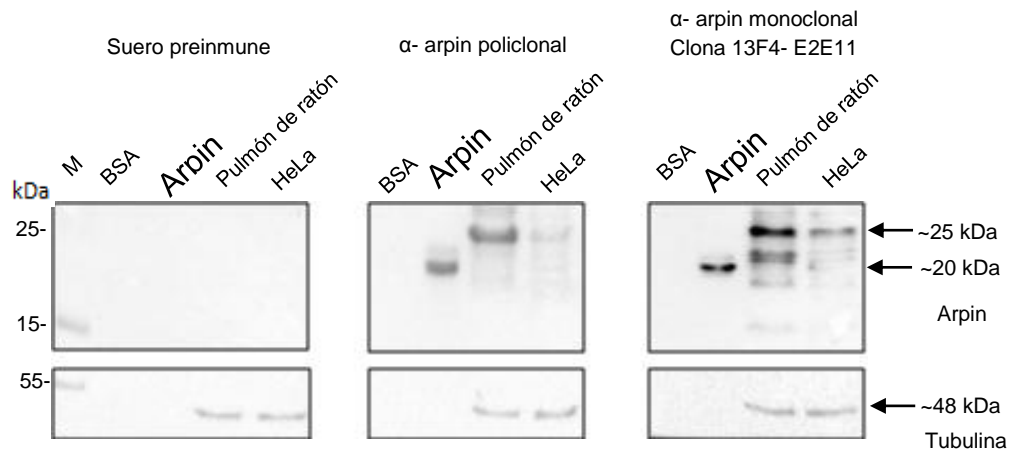
**Figura 34. Evaluación de las diferentes clonas del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ - arpin.** Se usaron lisados bacterianos de *E. coli* BL21 (D3) inducida para probar los sobrenadantes de las clonas 9F3, 6G5, 9G6, 10A2, 12C12, 13F3 y 15G9 en una dilución 1:2 en un ensayo de *western blot*. Como control negativo y positivo se empleó el suero preinmune (PI) y el anticuerpo policlonal  $\alpha$ - arpin a una dilución 1:500, respectivamente. (M) Marcador de peso molecular PageRuler Prestained protein ladder.

Se observó que la mayoría de las clonas candidatas del anticuerpo monoclonal fueron positivas para el reconocimiento de la proteína recombinante arpin de ~20kDa, tal como lo hizo en el anticuerpo policlonal  $\alpha$ - arpin.

Las clonas que reconocieron a la proteína recombinante arpin se subclonaron y se continuó su evaluación para seleccionar a los anticuerpos monoclonales específicos.

La clona 13F4-E2E11 que mostró la mayor positividad en ensayos de ELISA y la mayor especificidad en la detección de arpin por *western blot* se propagó, se recuperó su sobrenadante y se efectuaron experimentos de caracterización de su funcionalidad.

Después, los anticuerpos policlonal y monoclonal  $\alpha$ - arpin se utilizaron en ensayos de *western blot* para la detección de arpin empleando lisados proteicos de pulmón de ratón y de células HeLa. Como control negativo se empleó proteína BSA y como control positivo a la proteína recombinante generada (Fig. 35).



**Figura 35. Detección de arpin por un anticuerpo policlonal y monoclonal.** Extractos de pulmón de ratón y de HeLa se usaron para la detección de arpin. El suero preinmune y el anticuerpo policlonal se emplearon a una dilución 1:500 y el sobrenadante del monoclonal sin diluir. Se empleó BSA como proteína no relacionada y la proteína recombinante de arpin generada como control positivo. Como control de carga se analizó la tubulina.

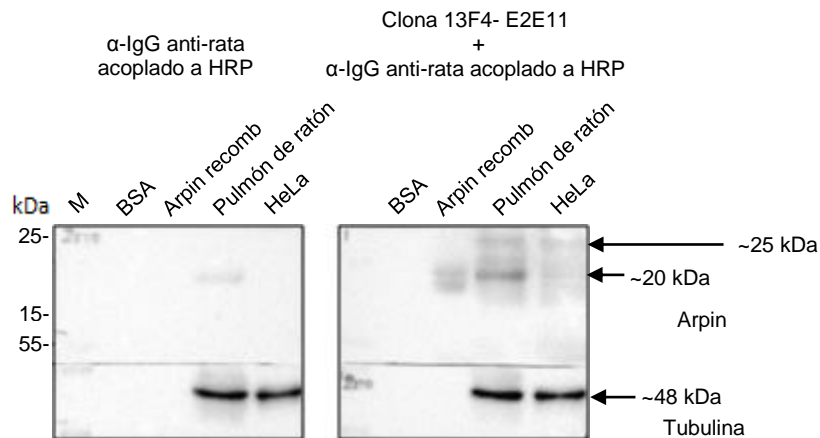
El uso del anticuerpo policlonal y monoclonal de arpin en ensayos de *western blot* reveló que ambos anticuerpos detectan a la proteína más grande de arpin de 226 aa, cuyo peso molecular predicho es de 25 kDa, tanto en lisados de tejido de pulmón de ratón, como lisados de la línea celular HeLa.

Sin embargo, en este experimento la banda de 14 kDa, correspondiente a la proteína corta de arpin humana de 130 aa no fue detectada. Si bien en los extractos de ratón se



observa una banda tenue a la altura de 15 kDa consideramos que se trata de proteína degradada o una bandas inespecífica porque en el ratón no está reportada la isoforma corta de arpin. Tanto el anticuerpo policlonal, como el monoclonal, fueron negativos en la detección de BSA, una proteína control no relacionada. El suero preinmune no detectó ninguna de las bandas del tamaño de arpin.

En el experimento anterior, con el anticuerpo monoclonal, además de la banda de 25 kDa esperada, se observaron otras bandas de peso molecular más bajo. Para descartar la posibilidad de que estas bandas fueran resultado del reconocimiento inespecífico del anticuerpo secundario empleado, dada su naturaleza policlonal, se corrieron nuevamente muestras de extractos de proteínas de tejido de ratón y células HeLa. La membrana se incubó únicamente con el anticuerpo secundario  $\alpha$ - IgG anti- rata acoplado a HRP y se reveló simultáneamente con otra membrana que contenía las mismas muestras, pero fue incubada con el anticuerpo primario y secundario (Fig. 36).

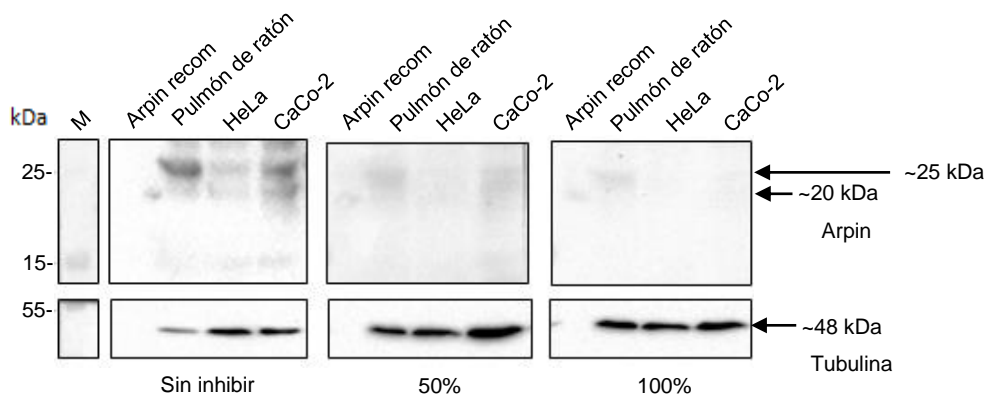


**Figura 36. Evaluación de la especificidad del anticuerpo secundario  $\alpha$ - IgG anti- rata acoplado a HRP.** Extractos proteicos de ratón y HeLa se usaron para la detección de arpin. El sobrenadante del monoclonal se empleó sin diluir y el anticuerpo secundario a una dilución 1:5000. A la derecha se observa la membrana incubada con el anticuerpo monoclonal y el anticuerpo secundario y a la izquierda una membrana con las mismas muestras incubada solamente con el anticuerpo secundario. La proteína BSA se empleó como proteína no relacionada y la proteína recombinante de arpin como un control positivo.

La membrana incubada con ambos anticuerpos mostró una señal en el peso esperado para arpin en lisados celulares y para proteína recombinante producida, mientras que en la membrana incubada con el anticuerpo secundario se observó una señal en el

extracto de ratón a la altura de 25 kDa, sin llegar a tener la intensidad de la banda que se observa a la misma altura en la membrana incubada con ambos anticuerpos.

También se realizó un ensayo de inhibición del anticuerpo monoclonal de arpin. Para ello, se emplearon diferentes concentraciones del antígeno (péptido inmunogénico sintético) para inhibir teóricamente el 50 y 100 % de los sitios activos del anticuerpo y así poder discernir si las bandas adicionalmente detectadas podrían corresponder a isoformas de arpin, formas procesadas de arpin que no han sido reportadas o bien, una inespecificidad del anticuerpo (Fig. 37).



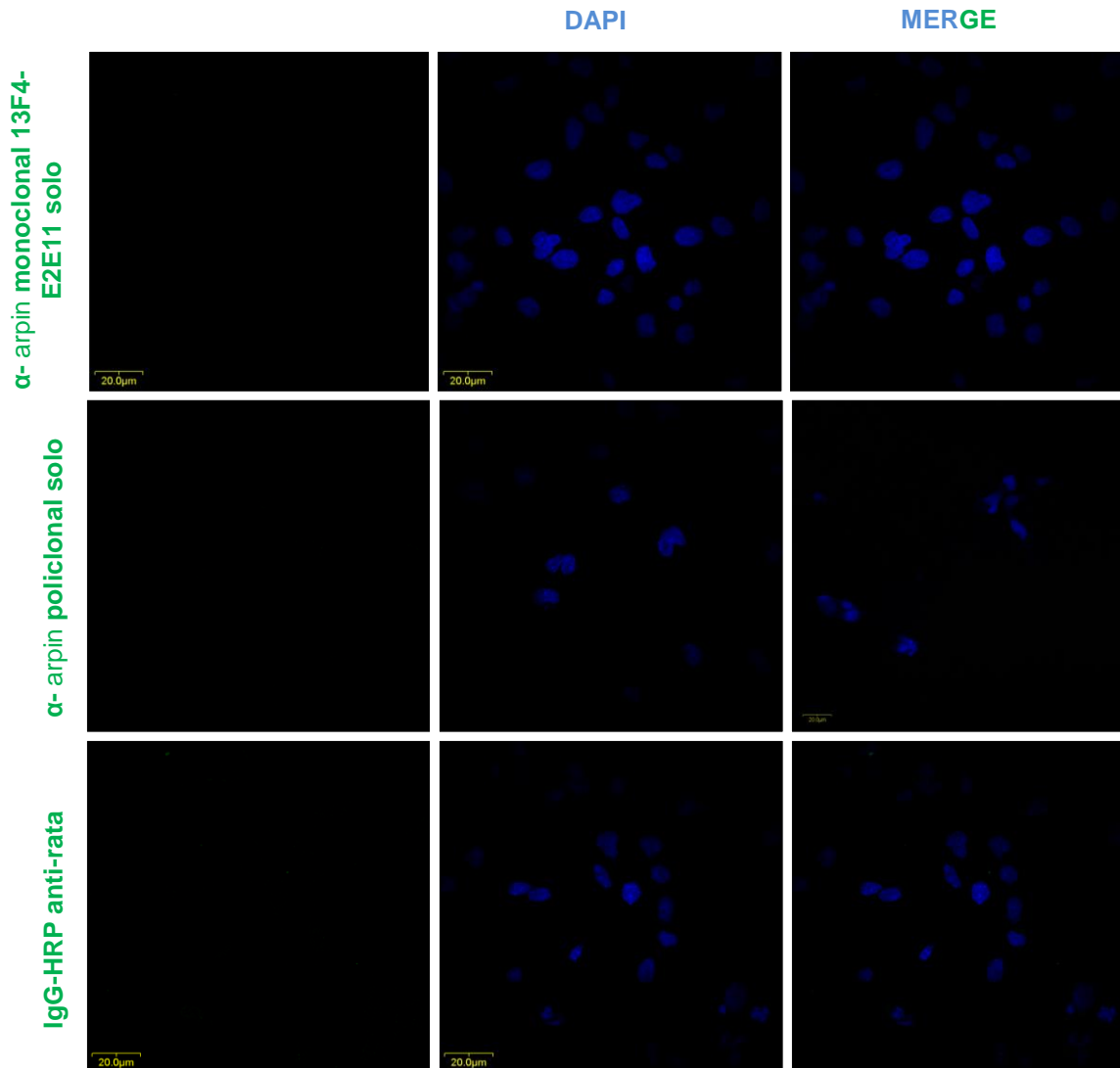
**Figura 37. Ensayo de inhibición del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ - arpin.** El sobrenadante de la clona 13F4- E2E11 se incubó con tres diferentes concentraciones del péptido sintético de arpin para inhibir teóricamente el 50, 100 y 150 % de los sitios activos del anticuerpo y posteriormente se usó como anticuerpo primario en experimentos de *western blot* con extractos de pulmón de ratón, HeLa y CaCo-2. Como control positivo se usó la proteína recombinante arpin y como control de carga a la tubulina.

En la membrana donde se usó el anticuerpo monoclonal sin inhibir se observa la banda correspondiente a la proteína de 25 kDa de arpin y algunas bandas de peso molecular inferior, mientras que en las otras membranas, conforme se aumenta la concentración del antígeno, estas bandas van disminuyendo su intensidad. Esto demuestra que el bloqueo del anticuerpo disminuye la afinidad por la detección de las bandas detectadas por *western blot*.

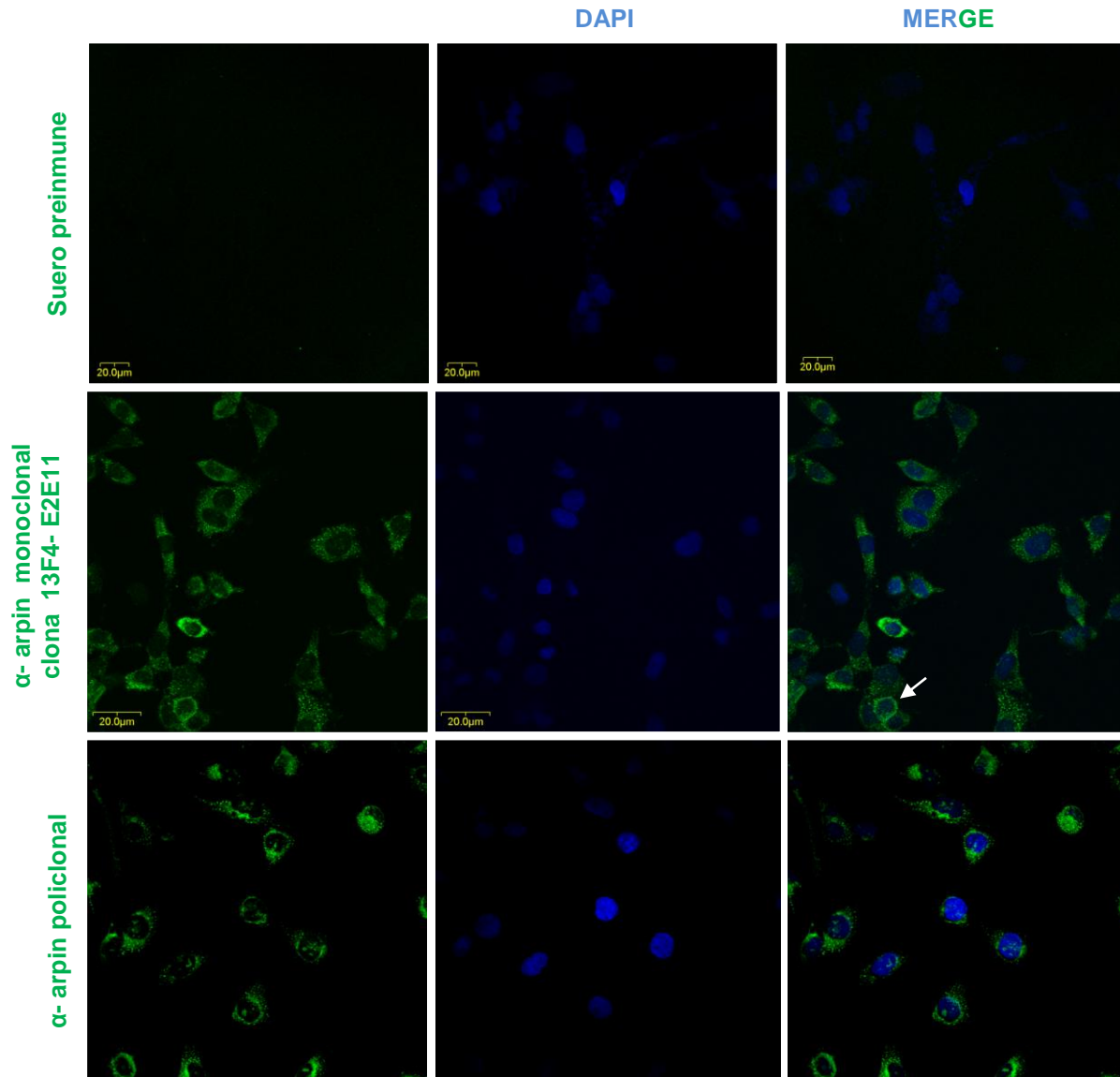
Las bandas de peso molecular inferior podrían corresponder a isoformas de arpin o formas procesadas post- traduccionalmente que no han sido reportadas. No obstante, es necesario efectuar ensayos adicionales para darle una identidad a estas bandas.

### Expresión y localización de arpin en células endoteliales.

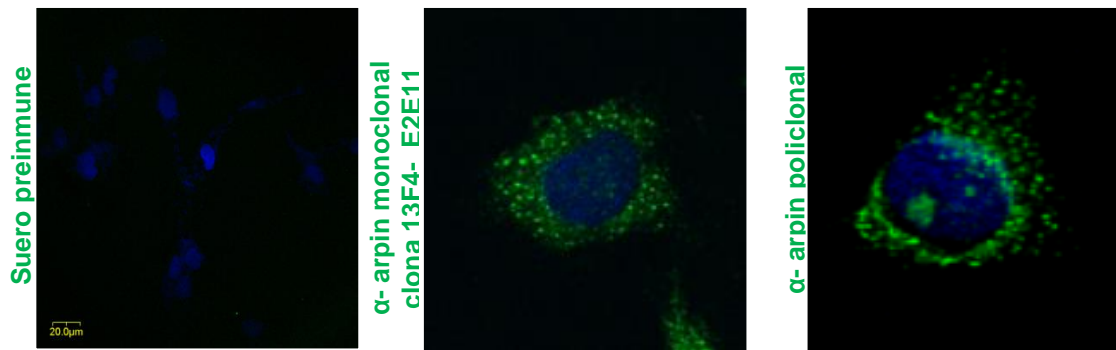
Para evaluar la expresión y localización de arpin se emplearon los anticuerpos  $\alpha$ - arpin generados en ensayos de inmunofluorescencia en cultivos de células HMEC-1 (Fig. 38-40).



**Figura 38. Controles negativos de los anticuerpos  $\alpha$ - arpin generados.** Con el propósito de validar la funcionalidad de los anticuerpos generados, células HMEC-1 se incubaron sólo con los anticuerpos primarios  $\alpha$ - arpin monoclonal clona E2E11 (sobrenadante sin diluir) y  $\alpha$ - arpin policlonal (dilución 1:100) y el anticuerpo secundario solo IgG anti- rata acoplado a HRP (dilución 1:100) en ensayos de inmunofluorescencia. Las imágenes mostradas son el resultado de una proyección máxima 60X.



**Figura 39. Expresión y localización de arpin.** Células HMEC-1 se incubaron con los anticuerpos  $\alpha$ - arpin monoclonal clona E2E11 (sobrenadante sin diluir) y  $\alpha$ - arpin policlional (dilución 1:100). Las inmunofluorescencias demostraron que arpin tiene una distribución citoplasmática y nuclear. Esta señal no fue observada con el suero preinmune. Las imágenes mostradas son el resultado de una proyección máxima 60X.



**Figura 40. Amplificación de imágenes de la expresión y localización de arpin.** Células HMEC-1 se incubaron con los anticuerpos  $\alpha$ - arpin monoclonal clona E2E11 y  $\alpha$ - arpin policlonal. Las inmunofluorescencias demostraron que arpin tiene una distribución citoplasmática y nuclear. Esta señal no fue observada con el suero preimmune. Las imágenes mostradas son el resultado de una proyección máxima 60X.

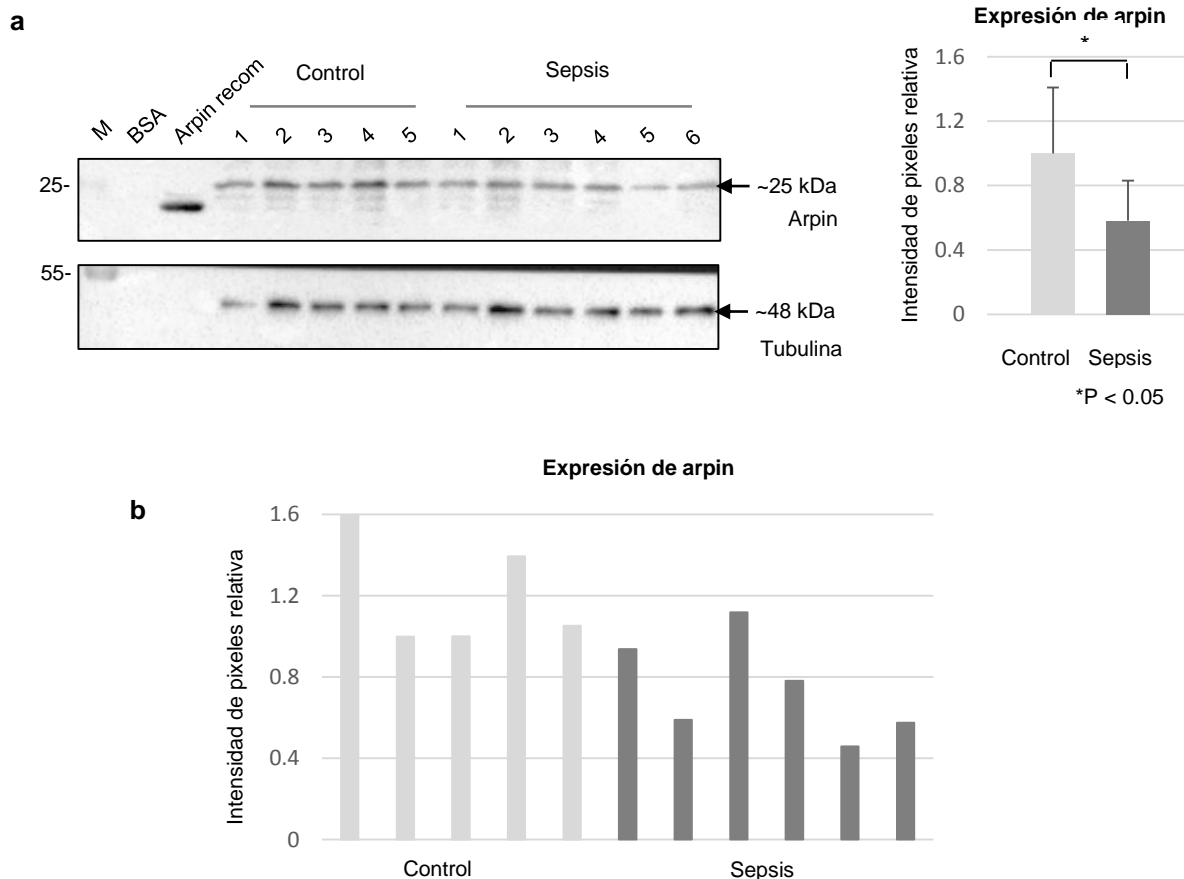
Los anticuerpos  $\alpha$ - arpin detectaron un patrón puntiforme de la proteína distribuido a lo largo del citoplasma de células HMEC-1 y este patrón se observa en la mayoría de las células (Fig. 38, 39 y 40). En aquellas células que empiezan a establecer contactos intercelulares la señal parece que se concentra en el borde. También se observó una señal de localización de arpin en el núcleo, que fue más evidente con el anticuerpo policlonal. Estas señales no se detectaron con el suero preimmune, ni con células incubadas solo con los anticuerpos primarios o el anticuerpo secundario de arpin.

### **Análisis de la regulación de la expresión *in vivo***

El anticuerpo policlonal  $\alpha$ - arpin se empleó en un ensayo de *western blot* para saber si la disminución de la expresión de arpin bajo un estímulo inflamatorio vista a nivel transcripcional se correlacionaba a nivel de proteína.

Para ello, se usó un modelo de sepsis en ratón, una condición inflamatoria que se estudia en nuestro laboratorio y se induce por ligación y punción del ciego (CLP), que consiste en realizar una laparotomía en el ratón, exponer el ciego, puncionarlo, liberar materia fecal en la cavidad peritoneal para generar una respuesta inmune exacerbada inducida por la infección polimicrobiana, cerrar al ratón y transcurridas 24 horas sacrificarlo, y preparar lisados proteicos a partir de los diferentes órganos.

Se analizó la expresión de arpin por *western blot* de los lisados de pulmón de un grupo de 6 ratones sépticos y se comparó con un grupo de 5 ratones normales (Fig. 41).

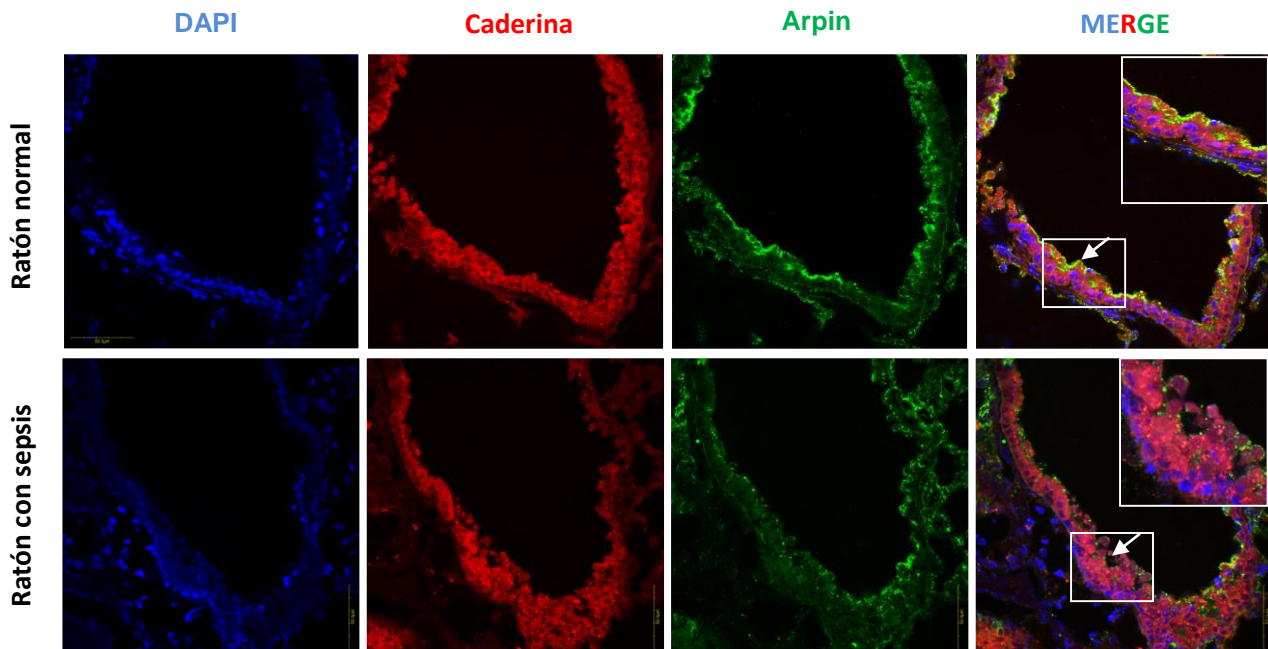


**Figura 41. Evaluación de la expresión de arpin en ratones con sepsis por western blot. a)** La expresión de arpin se evaluó con extractos de pulmón de un grupo de cinco ratones control y seis ratones sépticos por *western blot* empleando el anticuerpo policlonal  $\alpha$ - arpin 1:500. La proteína recombinante de arpin se empleó como control positivo y la proteína BSA como proteína no relacionada. **b)** Análisis densitométrico de los valores individuales de la expresión de arpin para los dos grupos de ratones analizados.

Como resultado, se observó una tendencia a la disminución en la expresión de arpin y al hacer el análisis densitométrico de este gel, encontramos que ésta disminución es estadísticamente significativa con la prueba t- *Student* (Fig. 40a). En la gráfica que muestra los valores de arpin obtenidos para cada ratón puede apreciarse mejor la tendencia a la disminución en la expresión en el grupo de ratones donde se indujo sepsis, comparado con el grupo control (Fig. 40b). Este hallazgo se correlaciona con los resultados obtenidos por RT- PCR en tiempo real, donde se observa que bajo una condición inflamatoria, arpin disminuye sus niveles de expresión.

### Expresión de arpin en tejido de pulmón de ratón

Finalmente, analizamos la expresión y localización de arpin en tejido pulmonar de ratón mediante ensayos de inmunofluorescencia. Se realizó una doble tinción de arpin con E-caderina, ésta última es un marcador de uniones intercelulares epiteliales. En un ratón en condiciones normales, las células del tejido pulmonar muestran una organización adecuada en una estructura tubular identificada como un bronquio y para arpin se observa una señal que se concentra en las células orientadas hacia el lumen del bronquio. En el empalme de las imágenes se muestra una colocalización con E-caderina y arpin en la región apical de las células del bronquio. Mientras tanto, en el tejido pulmonar del ratón séptico, la señal para E-caderina muestra el desarreglo de las estructuras dadas en las células epiteliales, como se esperaba, debido a la fuerte inflamación. De manera interesante, la expresión de arpin en el ratón séptico disminuye en comparación con el ratón control y la señal de colocalización con la E-caderina se pierde (flechas blancas) (Fig. 41).



**Figura 41. Expresión y localización de arpin en tejido de ratón.** El tejido de pulmón de un ratón normal y un ratón séptico se analizó por inmunofluorescencia empleando el anticuerpo policlonal  $\alpha$ - arpin 1:100 para detectar la localización de arpin. Las imágenes son el resultado de la proyección máxima de los planos xyz 60X.

La disminución de la expresión vista por inmunofluorescencia confirma nuestros resultados de la disminución de los niveles de los transcritos de arpin en células HMEC-1 y CaCo-2 bajo un estímulo inflamatorio y la disminución de la expresión de la proteína en ratones con sepsis.

## DISCUSIÓN

Arp2/3 es un factor promotor de la nucleación de actina implicado en procesos celulares que incluyen la migración celular<sup>34</sup>, el tráfico vesicular<sup>37</sup>, la fagocitosis<sup>50</sup>, la citocinesis<sup>53</sup>, la polaridad celular<sup>54</sup> y la función de la barrera a través del ensamblaje de uniones intercelulares<sup>21, 23, 55</sup>. Se han descrito proteínas que inhiben al complejo Arp2/3, tales como el factor de maduración de la glía (GMFS), la coronina, la cofilina, gadkin, PICK1 y arpin, ésta última es la proteína más recientemente identificada. A la fecha, sólo existe una referencia de la caracterización de arpin donde se estudió su localización en fibroblastos de ratón, encontrando que arpin se localiza en el borde de los lamelipodios, un sitio donde se sabe, reside el complejo Arp2/3 para participar en el ensamblaje de uniones intercelulares. Por esto nosotros creemos que arpin puede jugar un papel importante en la regulación de la función de la barrera y decidimos estudiar la expresión de arpin en células epiteliales y endoteliales y desarrollamos anticuerpos para su detección proteica.

La base de datos *Nucleotide* del NCBI reporta la presencia de dos variantes transcripcionales del gen arpin en humano, sin embargo, la expresión de ambas variantes por separado no ha sido probada experimentalmente en líneas celulares y tampoco se ha caracterizado la expresión de la forma única de arpin en ratón. Nosotros encontramos que ambos transcritos de arpin en humano se expresan en células endoteliales y epiteliales de las líneas HMEC-1 y CaCo-2, respectivamente.

En las líneas celulares de linaje hematopoyético analizadas es evidente que, en cantidades similares de cDNA, la mayor expresión corresponde al transcrito 2, pues al amplificar una región específica del transcrito 1, la amplificación fue escasa e incluso, en algunos casos indetectable. Sin embargo para confirmar estos resultados deben



reducirse el número de ciclos empleados en la amplificación y así tener una PCR semi-cuantitativa.

La expresión diferencial de las isoformas de arpin sugiere una expresión tejido-específica. Estos hallazgos son importantes porque demuestran la expresión de arpin en modelos diferentes a los usados en el artículo donde se detalló su identificación. Además, al comparar la secuencia del transcrito 1 y 2 con respecto a la secuencia genómica del gen de arpin encontramos que el transcrito 2 carece de los exones 1, 2 y la mayor parte del 3, lo cual al ser traducido, lo hace tener un extremo amino terminal más corto y la proteína codificante podría carecer de algunas funciones que posee la isoforma 1. Por ejemplo, según la base de datos *MaxQuant Database*, la isoforma 1 en humano tiene un sitio de fosforilación probable en la serina 2 y en la tirosina 5 de su extremo amino terminal. Las fosforilaciones pueden modificar a una proteína activándola o desactivándola y sirven de puente entre un segundo mensajero y las respuestas celulares a un estímulo.

De acuerdo con la herramienta de análisis de sitios funcionales en proteínas de la base de datos *ELM*, la isoforma 1 de arpin posee sitios probables de interacción con moléculas de las MAP cinasas en sus posiciones 11- 20, 55- 64 y 56- 64. La vía de las MAP cinasas está implicada en la transducción de señales en células eucariotas a través de fosforilaciones sucesivas río abajo de los receptores tirosín cinasas, así como la mayoría de los receptores para citocinas.

En su posición 1- 5, la isoforma 1 contiene un motivo de unión a proteínas apoptóticas que podría participar en el desarrollo y supervivencia de la célula. También, en su posición 15- 21, se encuentra un dominio SH3, característico de proteínas de las vías de señalización que regulan el citoesqueleto, así como la regulación de la actividad de proteínas adaptadoras y tirosín cinasas.

El análisis de la expresión de arpin mostró que en tejido de ratón (donde sólo existe una isoforma del gen), arpin se expresa en riñón, corazón, hígado y pulmón en cantidades comparables. A futuro, esto nos permitirá hacer una caracterización más fisiológica de su función *in vivo* utilizando modelos de enfermedades inflamatorias en ratones.

De acuerdo con nuestro control de carga, similar para los diferentes extractos, la expresión de arpin es mayor en el pulmón de ratón analizado; esto es de esperarse,

porque que en estos extractos van incluidas células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas, donde ya se demostró que se expresa arpin, mientras que HeLa constituye una monocapa de células epiteliales.

Las proteínas inhibitorias del complejo Arp2/3, PICK1 y Gadkin, también están presentes en nuestras líneas celulares epiteliales y endoteliales, así como en el tejido de ratón estudiado, lo cual debe tomarse en cuenta porque en ensayos funcionales, aún en ausencia de arpin, podríamos ver un efecto de rescate por parte de estas proteínas. Sin embargo, tal como los NPFs, los inhibidores de Arp2/3 parecen tener una división de actividades: PICK1<sup>20</sup> y arpin<sup>52</sup> inhiben al complejo Arp2/3 en vesículas cubiertas de clatrina y en el borde del lamelipodio, respectivamente (las localizaciones específicas en las cuales, N-WASP y WAVE, respectivamente, activan al complejo Arp2/3), mientras que gadkin<sup>32</sup> secuestra a Arp2/3 en la superficie de los endosomas, donde WASH activa al complejo. Esta observación sugiere la existencia de dos moléculas con funciones antagonistas reguladoras del complejo Arp2/3 en cada compartimento celular, permitiendo una rápida la remodelación de la actina en respuesta a estímulos inflamatorios. Sin embargo, para corroborar la localización diferencial de estos inhibidores se requieren llevar a cabo ensayos de inmunofluorescencia donde se detecte simultáneamente a PICK1, gadkin y arpin, así como su interacción con el complejo Arp2/3. También sería importante determinar los niveles de expresión de PICK1 y Gadkin bajo un estímulo inflamatorio para verificar si existe un enriquecimiento de éstas proteínas que compense la disminución de arpin durante este proceso.

Nosotros creemos que debido a la localización de arpin en los lamelipodios, estructuras ya no sólo implicadas en la migración celular, sino también en el establecimiento de contactos celulares, arpin podría estar interaccionando con Arp2/3 en las uniones intercelulares para regular su ensamblaje.

Las uniones intercelulares exhiben una gran plasticidad y responden rápidamente ante ciertos estímulos, tales como estrés, mediadores de la inflamación, la cicatrización de heridas y la angiogénesis<sup>41</sup>.

La disfunción de la barrera representa un mecanismo común durante la inflamación a través del desensamble de las uniones intercelulares. En la evaluación de un efecto

inflamatorio sobre la expresión de arpin, encontramos que los niveles de mRNA de ambas variantes disminuyeron en células HMEC-1 y CaCo-2.

En la generación de anticuerpos para el análisis de la expresión de la proteína arpin, generamos un anticuerpo policlonal y el primer anticuerpo monoclonal que reconoce arpin humano y de ratón.

Los ensayos de *western blot* mostraron que los anticuerpos monoclonal y policlonal  $\alpha$ -*arpin* generados detectan a la isoforma de 25 kDa de arpin. Sin embargo, con el anticuerpo monoclonal también se detectaron bandas menos enriquecidas y de menor peso al esperado en lisados de ratón y células HeLa. Un experimento de *western blot* donde se usaron lisados de pulmón de ratón y lisados de células HeLa demostró que al revelar la membrana únicamente con el anticuerpo secundario se detecta una banda tenue en el peso de 25 kDa, pero su intensidad no se compara a la de una membrana que fue incubada con el anticuerpo monoclonal y el anticuerpo secundario de arpin. Por lo tanto, las bandas de menor tamaño que se observan no corresponden a una detección inespecífica del anticuerpo secundario dada su naturaleza policlonal.

Tomando en cuenta que el anticuerpo generado contra arpin reconoce el motivo ácido de la proteína y que este motivo también está presente en PICK1 y Gadkin, pensamos en la posibilidad de que las bandas de menor tamaño detectadas por nuestro anticuerpo monoclonal correspondieran a alguna de estas proteínas, sin embargo, al investigar sus pesos moleculares encontramos que existen dos isoformas de Gadkin en humano, que dan origen a proteínas de 30 y 34 kDa y las isoformas de PICK1 en humano tienen un peso de 32 a 46 kDa. Por su parte, en ratón están reportadas 8 isoformas probables de Gadkin que van de los 27 a los 41 kDa y de PICK1 de 32 a 48 kDa. N-WASP y WAVE, algunos activadores de Arp2/3 que poseen un motivo ácido tienen un tamaño predicho de 55 kDa. Por lo tanto, las bandas de menor tamaño observamos por *western blot* con nuestro anticuerpo monoclonal anti- arpin no podrían corresponder a algunas de estas proteínas.

Luego, puesto que arpin es una proteína que se ha estudiado poco, evaluamos la posibilidad de que existan isoformas no reportadas o que su probable procesamiento post- traduccional dé como resultado una proteína más pequeña. Por ello, realizamos un ensayo de inhibición del anticuerpo monoclonal anti- arpin, en el cual observamos

que el anticuerpo bloqueado reduce su afinidad por las bandas de menor tamaño detectadas por *western blot*. Si bien podría tratarse efectivamente de una isoforma de arpin o una forma procesada, se requieren ensayos adicionales como una secuenciación por espectrometría de masas para identificar correctamente la identidad de estas bandas.

Las observaciones de los niveles de mRNA de arpin se correlacionaron con la disminución de la expresión de la proteína arpin en tejido de pulmón de ratón en un modelo de sepsis. Con ensayos de inmunofluorescencia confirmamos que en el tejido pulmonar de un ratón séptico disminuye la expresión de arpin en la región apical de las células del bronquio. Nosotros especulamos que durante una inflamación se requiere que el complejo Arp2/3 actúe creando redes de ramificación de actina que permitan la restauración de las uniones intercelulares y, al ser arpin un inhibidor de la actividad de Arp2/3, la célula responde con una disminución en su expresión para que el complejo pueda llevar a cabo eficazmente su función.

Finalmente, por inmunofluorescencia detectamos un patrón puntiforme de arpin distribuido en el citoplasma en la mayoría de las células HMEC-1 en un cultivo subconfluyente. En aquellas células que empiezan a establecer contactos intercelulares la señal se concentra en el borde. Se requiere investigar la localización de arpin en células confluentes para ver si la localización de arpin cambia.

Se sabe bien que la actina está presente en el núcleo y está involucrada en numerosas funciones, que incluyen la regulación de la transcripción<sup>56</sup>. Se ha sugerido que la actina coexiste en una forma monomérica (G- actina) o en oligómeros cortos y una forma polimérica<sup>57,58</sup>.

Estudios recientes indicaron que la forma nuclear de N-WASP puede inducir la polimerización de actina *de novo* en el núcleo y esta función es importante en la regulación de la transcripción dependiente de la RNA polimerasa II. Posteriormente, se descubrió que Arp2/3 también tiene una localización nuclear y, junto con N-WASP, media la polimerización de actina. El complejo Arp2/3 también se asocia físicamente con la RNA polimerasa II y está involucrado en la regulación transcripción tanto *in vivo*, como *in vitro*<sup>59,60</sup>. Ambas proteínas están implicadas en la elongación de transcritos nacientes de mRNA<sup>59,61</sup>.

Interesantemente, con nuestros ensayos de inmunofluorescencia se evidenció la localización de arpin en el núcleo, una característica que a la fecha no ha sido reportada. Además, el programa *online NLS Mapper* identificamos que el extremo carboxilo terminal de arpin posee una señal de localización nuclear. Podríamos especular que arpin en el núcleo podría inhibir al complejo Arp2/3 para cambiar su interacción con la RNA polimerasa II y así, afectar la regulación de la transcripción. Sin embargo, se requieren ensayos de fraccionamiento núcleo- citoplasmas para confirmar su localización en el núcleo.

Tal como en el citoplasma, la actina nuclear trabaja en conjunto con diferentes tipos de proteínas de unión a actina que regulan las funciones de la actina interacciones y sirven como puente entre la actina y otros componentes nucleares.<sup>62</sup> La función de arpin en el núcleo podría ser impedir la elongación de los transcritos de mRNA a través de la inhibición de la actividad polimerizadora de Arp2/3 y de ésta manera, modular la expresión de ciertos genes.

## CONCLUSIÓN

Arpin se expresa en células epiteliales y endoteliales y su expresión disminuye durante una inflamación, esto lo hace un candidato interesante para estudiar su función en la integridad de la barrera.

En tejido de ratón, arpin colocaliza con la E- caderina, lo cual fundamenta su probable participación en la formación de uniones intercelulares.

La localización nuclear de arpin en células HMEC-1 sugiere que esta proteína, tal como se describió para Arp2/3 y N-WASP, podría participar en la regulación de la transcripción.

Con los anticuerpos monoclonal y policlonal  $\alpha$ - arpin hemos desarrollado valiosas herramientas para estudios posteriores que complementen la caracterización y función de arpin.

## PERSPECTIVAS

- Se requiere realizar ensayos adicionales de RT-PCR en tiempo real para extender el análisis de la expresión de arpin bajo un estímulo inflamatorio empleando otras líneas celulares y tejidos de ratón.
- Hacer la purificación del anticuerpo monoclonal para concentrarlo y mejorar su especificidad.
- Para completar la validación de los anticuerpos  $\alpha$ - arpin generados se requieren controles negativos de detección con un anticuerpo no relacionado.
- La localización nuclear de arpin debe estudiarse en otras líneas celulares y en tejido de ratón con ensayos de inmunofluorescencia y *western blot* de fraccionamiento de proteínas núcleo- citoplasma para confirmar este patrón.
- Para confirmar la localización diferencial de los inhibidores de Arp2/3 que actúan a través de su dominio ácido, es importante llevar a cabo ensayos de inmunofluorescencia que detecten simultáneamente a arpin, PICK1, Gadkin y la colocalización de cada uno con Arp2/3.
- Generar un sistema lentiviral *knock down* para estudiar la función de esta proteína en la regulación de las barreras epiteliales y endoteliales y un sistema *CRISPR/Cas knock out* de arpin para estudiar su función *in vivo*.
- Estudiar la participación de arpin en otros modelos de inflamación como la colitis, la enfermedad de Crohn, diabetes, entre otros.
- Dado que el complejo Arp2/3 es esencial para la formación de invadopodias, protrusiones especializadas degradadoras de matriz celular en células cancerosas, se ha asociado un incremento en la expresión de Arp2/3 con un fenotipo altamente invasivo de células cancerosas. Por lo tanto, estos resultados implican la participación de Arp2/3 en la formación del microambiente invasivo de un tumor<sup>63</sup>. Sería interesante probar el efecto inhibitorio de arpin sobre Arp2/3 en la invasividad de las células cancerosas.

## REFERENCIAS

- 1 Michiels, C. Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology* **196**, 430-443, doi:10.1002/jcp.10333 (2003).
- 2 Verhamme, P. & Hoylaerts, M. F. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta clinica Belgica* **61**, 213-219, doi:10.1179/acb.2006.036 (2006).
- 3 Sandoo, A., van Zanten, J. J. C. S. V., Metsios, G. S., Carroll, D. & Kitas, G. D. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal* **4**, 302-312, doi:10.2174/1874192401004010302 (2010).
- 4 Ley, K. & Reutershan, J. Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. *Handbook of experimental pharmacology*, 97-133 (2006).
- 5 Minshall, R. D. & Malik, A. B. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handbook of experimental pharmacology*, 107-144 (2006).
- 6 De Bock, K., Georgiadou, M. & Carmeliet, P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell metabolism* **18**, 634-647, doi:10.1016/j.cmet.2013.08.001 (2013).
- 7 Baumgartner-Parzer, S. M. & Waldhausl, W. K. The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* **109 Suppl 2**, S166-179, doi:10.1055/s-2001-18579 (2001).
- 8 Egeblad, M. & Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* **2**, 161-174, doi:10.1038/nrc745 (2002).
- 9 Knust, E. & Bossinger, O. Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science (New York, N.Y.)* **298**, 1955-1959, doi:10.1126/science.1072161 (2002).
- 10 Freshney, R. I. F. a. M. G. *Culture of Epithelial Cells*. Second Edition edn, 1-2 (2002).
- 11 Frizzell, R. A. & Hanrahan, J. W. Physiology of Epithelial Chloride and Fluid Secretion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**, a009563, doi:10.1101/cshperspect.a009563 (2002).
- 12 Peterson, L. W. & Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews. Immunology* **14**, 141-153, doi:10.1038/nri3608 (2014).
- 13 Schnoor, M. & Parkos, C. A. Disassembly of endothelial and epithelial junctions during leukocyte transmigration. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 6638-6652 (2008).
- 14 Mullin, J. M., Agostino, N., Rendon-Huerta, E. & Thornton, J. J. Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug discovery today* **10**, 395-408, doi:10.1016/s1359-6446(05)03379-9 (2005).
- 15 Nawijn, M. C., Hackett, T. L., Postma, D. S., van Oosterhout, A. J. & Heijink, I. H. E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization. *Trends in immunology* **32**, 248-255, doi:10.1016/j.it.2011.03.004 (2011).
- 16 Hirase, T. & Node, K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **302**, H499-505, doi:10.1152/ajpheart.00325.2011 (2012).
- 17 Lucas, R., Verin, A. D., Black, S. M. & Catravas, J. D. Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury. *Biochemical pharmacology* **77**, 1763-1772, doi:10.1016/j.bcp.2009.01.014 (2009).
- 18 Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews. Immunology* **9**, 799-809, doi:10.1038/nri2653 (2009).

- 19 Shen, L. *et al.* Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *Journal of cell science* **119**, 2095-2106, doi:10.1242/jcs.02915 (2006).
- 20 Bruewer, M. *et al.* Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **171**, 6164-6172 (2003).
- 21 McKenzie, J. A. & Ridley, A. J. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability. *Journal of cellular physiology* **213**, 221-228, doi:10.1002/jcp.21114 (2007).
- 22 Opal, S. M. & van der Poll, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *Journal of internal medicine* **277**, 277-293, doi:10.1111/joim.12331 (2015).
- 23 Grootjans, J. *et al.* Human Intestinal Ischemia-Reperfusion-Induced Inflammation Characterized : Experiences from a New Translational Model. *The American Journal of Pathology* **176**, 2283-2291, doi:10.2353/ajpath.2010.091069 (2010).
- 24 Moriez, R. *et al.* Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol* **167**, 1071-1079, doi:10.1016/s0002-9440(10)61196-0 (2005).
- 25 Disanza, A. *et al.* Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**, 955-970, doi:10.1007/s00018-004-4472-6 (2005).
- 26 Carlsson, A. E. Dendritic actin filament nucleation causes traveling waves and patches. *Physical review letters* **104**, 228102 (2010).
- 27 Blain, E. J. Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology. *International journal of experimental pathology* **90**, 1-15, doi:10.1111/j.1365-2613.2008.00625.x (2009).
- 28 Pollard, T. D. & Borisy, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465 (2003).
- 29 Goley, E. D. & Welch, M. D. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 713-726, doi:10.1038/nrm2026 (2006).
- 30 Campellone, K. G. & Welch, M. D. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 237-251, doi:10.1038/nrm2867 (2010).
- 31 Millard, T. H., Sharp, S. J. & Machesky, L. M. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *The Biochemical journal* **380**, 1-17, doi:10.1042/BJ20040176 (2004).
- 32 Suraneni, P. *et al.* The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *The Journal of cell biology* **197**, 239-251, doi:10.1083/jcb.201112113 (2012).
- 33 Korobova, F. & Svitkina, T. Arp2/3 Complex Is Important for Filopodia Formation, Growth Cone Motility, and Neuritegenesis in Neuronal Cells. *Molecular biology of the cell* **19**, 1561-1574, doi:10.1091/mbc.E07-09-0964 (2008).
- 34 Rotty, J. D., Wu, C. & Bear, J. E. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 7-12, doi:10.1038/nrm3492 (2013).
- 35 Murphy, D. A. & Courtneidge, S. A. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 413-426, doi:10.1038/nrm3141 (2011).
- 36 May, R. C., Caron, E., Hall, A. & Machesky, L. M. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nature cell biology* **2**, 246-248, doi:10.1038/35008673 (2000).



- 37 Chen, J. L., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Stamnes, M. Cytosol-derived proteins are sufficient for Arp2/3 recruitment and ARF/coatomer-dependent actin polymerization on Golgi membranes. *FEBS letters* **566**, 281-286, doi:10.1016/j.febslet.2004.04.061 (2004).
- 38 Yi, K. *et al.* Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3 complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nature cell biology* **13**, 1252-1258, doi:10.1038/ncb2320 (2011).
- 39 Taha, A. A., Taha, M., Seebach, J. & Schnittler, H.-J. ARP2/3-mediated junction-associated lamellipodia control VE-cadherin-based cell junction dynamics and maintain monolayer integrity. *Molecular biology of the cell* **25**, 245-256, doi:10.1091/mbc.E13-07-0404 (2014).
- 40 Abu Taha, A. & Schnittler, H. J. Dynamics between actin and the VE-cadherin/catenin complex: novel aspects of the ARP2/3 complex in regulation of endothelial junctions. *Cell adhesion & migration* **8**, 125-135 (2014).
- 41 Abu Taha, A., Taha, M., Seebach, J. & Schnittler, H. J. ARP2/3-mediated junction-associated lamellipodia control VE-cadherin-based cell junction dynamics and maintain monolayer integrity. *Molecular biology of the cell* **25**, 245-256, doi:10.1091/mbc.E13-07-0404 (2014).
- 42 Papayannopoulos, V. *et al.* A polybasic motif allows N-WASP to act as a sensor of PIP(2) density. *Molecular cell* **17**, 181-191, doi:10.1016/j.molcel.2004.11.054 (2005).
- 43 Sumida, G. M. & Yamada, S. Rho GTPases and the downstream effectors actin-related protein 2/3 (Arp2/3) complex and myosin II induce membrane fusion at self-contacts. *The Journal of biological chemistry* **290**, 3238-3247, doi:10.1074/jbc.M114.612168 (2015).
- 44 Brunton, V. G., MacPherson, I. R. & Frame, M. C. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochimica et biophysica acta* **1692**, 121-144, doi:10.1016/j.bbamcr.2004.04.010 (2004).
- 45 Krause, M. & Gautreau, A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**, 577-590, doi:10.1038/nrm3861 (2014).
- 46 Boczkowska, M., Rebowski, G. & Dominguez, R. Glia Maturation Factor (GMF) Interacts with Arp2/3 Complex in a Nucleotide State-dependent Manner. *The Journal of biological chemistry* **288**, 25683-25688, doi:10.1074/jbc.C113.493338 (2013).
- 47 Gandhi M, G. B. (Austin (TX), 2000).
- 48 Cai, L., Makhov, A. M., Schafer, D. A. & Bear, J. E. Coronin 1B antagonizes Cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell* **134**, 828-842, doi:10.1016/j.cell.2008.06.054 (2008).
- 49 Maritzen, T. *et al.* Gadkin negatively regulates cell spreading and motility via sequestration of the actin-nucleating ARP2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 10382-10387, doi:10.1073/pnas.1206468109 (2012).
- 50 Nakamura, Y. *et al.* PICK1 inhibition of the Arp2/3 complex controls dendritic spine size and synaptic plasticity. *The EMBO journal* **30**, 719-730, doi:10.1038/emboj.2010.357 (2011).
- 51 Rocca, D. L., Martin, S., Jenkins, E. L. & Hanley, J. G. Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. *Nature cell biology* **10**, 259-271, doi:10.1038/ncb1688 (2008).
- 52 Dang, I. *et al.* Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration. *Nature* **503**, 281-284, doi:10.1038/nature12611 (2013).
- 53 Sun, S. C. *et al.* Arp2/3 complex regulates asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. *PLoS one* **6**, e18392, doi:10.1371/journal.pone.0018392 (2011).

- 54 Xiong, H., Mohler, W. A. & Soto, M. C. The branched actin nucleator Arp2/3 promotes nuclear migrations and cell polarity in the *C. elegans* zygote. *Developmental biology* **357**, 356-369, doi:10.1016/j.ydbio.2011.07.008 (2011).
- 55 Ramirez, S. H. *et al.* Methamphetamine disrupts blood-brain barrier function by induction of oxidative stress in brain endothelial cells. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **29**, 1933-1945, doi:10.1038/jcbfm.2009.112 (2009).
- 56 Weston, L., Coutts, A. S. & La Thangue, N. B. Actin nucleators in the nucleus: an emerging theme. *Journal of cell science* **125**, 3519-3527, doi:10.1242/jcs.099523 (2012).
- 57 Gieni, R. S. & Hendzel, M. J. Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **87**, 283-306, doi:10.1139/O08-133 (2009).
- 58 Bettinger, B. T., Gilbert, D. M. & Amberg, D. C. Actin up in the nucleus. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 410-415, doi:10.1038/nrm1370 (2004).
- 59 Yoo, Y., Wu, X. & Guan, J. L. A novel role of the actin-nucleating Arp2/3 complex in the regulation of RNA polymerase II-dependent transcription. *The Journal of biological chemistry* **282**, 7616-7623, doi:10.1074/jbc.M607596200 (2007).
- 60 Grosse, R. & Vartiainen, M. K. To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 693-697, doi:10.1038/nrm3681 (2013).
- 61 Wu, X. *et al.* Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. *Nature cell biology* **8**, 756-763, doi:10.1038/ncb1433 (2006).
- 62 Visa, N. & Percipalle, P. Nuclear functions of actin. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a000620, doi:10.1101/cshperspect.a000620 (2010).
- 63 Nurnberg, A., Kitzing, T. & Grosse, R. Nucleating actin for invasion. *Nature reviews. Cancer* **11**, 177-187, doi:10.1038/nrc3003 (2011).