



**Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias
Biológicas
Área Biología Celular y Molecular**

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE RIC-8A EN LA
REMODELACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA
DURANTE LA MIGRACIÓN CELULAR**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, área biología celular y molecular

POR: ANDREA WILMA BEYER SOTO
Profesores Guía: **Dr. Marcela Torrejón Quezada**
Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann

Concepción, Chile Mayo 2021

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. Marcela Torrejón Quezada
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas



Dra. Roxana Pincheira B.
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Teresa Caprile E.
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Christian González - Billault
Profesor Evaluador Externo
Universidad de Chile

Dr. Ariel Castro A.
Director Programa Doctorado en Ciencias Biológicas.
Área Biología Celular y Molecular

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Migración celular	1
1.2. Polaridad celular, adhesiones célula – sustrato y motilidad	2
1.3. El citoesqueleto durante la migración celular	5
1.3.1. El citoesqueleto de actina y sus proteínas accesorias en el contexto de la migración celular	6
1.3.2. Función de los microtúbulos en migración.....	8
1.4. GTPasas pequeñas en migración celular	10
1.5. Proteínas G heterotriméricas y migración celular	12
1.6. Ric-8, un GEF para proteínas Gα	16
1.7. Ric-8 en migración celular	18
1.8. Contexto de trabajo de tesis	21
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Plásmidos	24
3.2. Oligonucleótidos	24
3.3. Anticuerpos y Fluoróforos	26
3.4. Construcciones de ADN	26
3.4.1. Clonamiento de Ric-8A para su sobre-expresión	27
3.4.2. Generación de plásmidos para el silenciamiento de mRic-8A con shRNAs.....	28
3.4.3. Construcción de plásmidos para edición genómica por el sistema CRISPR/Cas9	28
3.5. Técnicas de Cultivo Celular	29
3.5.1. Líneas celulares.....	29
3.5.2. Transfección transitoria.....	30
3.6. Técnicas de biología celular	32
3.6.1. Ensayo de cierre de herida.....	32
3.6.2. Ensayo de migración en cámara de Boyden.....	33
3.6.3. Inmunocitoquímica	34
3.6.4. Microscopía confocal en tiempo real	35
3.6.5. Microscopía TIRF	35
3.6.6. Sinapsis Inmune.....	35

3.6.7.	Confección y uso de micropatrones.....	36
3.6.8.	Medición de la actividad de RhoA y Rac1 por FRET	38
3.6.9.	Ensayo de adhesión celular	39
3.7.	Técnicas de Biología Molecular	39
3.7.1.	Inmunoprecipitación desde lisados totales	39
3.7.2.	Identificación de los interactores de mRic-8A por espectrometría de masas	40
3.8.	Análisis y procesamiento de imágenes	41
3.8.1.	Obtención de la velocidad de cobertura de herida de células MEFs	41
3.8.2.	Obtención de la velocidad de cobertura de herida de células NIH3T3	41
3.8.3.	Análisis de la migración de células independientes	44
3.8.4.	Cuantificación de los haces de actina en células NIH3T3	46
3.8.5.	Deconvolución de imágenes	47
3.8.6.	Cuantificación de la actividad de RhoA y Rac1 por FRET	47
3.8.7.	Análisis de la co-localización de proteínas	48
4.	RESULTADOS.....	49
4.1	Construcción de los plásmidos de sobre-expresión y silenciamiento de mRic-8A	49
4.1.1	Clonamiento de mRic-8A desde cerebro de ratón	49
4.1.2	Silenciamiento de mRic-8A utilizando dos shRNAs	50
4.1.3	Deleción de mRic-8A utilizando el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9.....	53
4.2	Análisis del efecto de la sobre-expresión y del silenciamiento de Ric-8A en la migración celular	53
4.2.1	Efecto de la sobre-expresión de mRic-8A en el cierre de herida de células MEF	54
4.2.2	Efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de mRic-8A en la migración de células NIH3T3	57
4.2.3	Efecto del silenciamiento de mRic-8A sobre la migración de células NIH3T3 individuales.....	60
4.3	Estudio del efecto de la sobre-expresión y del silenciamiento de Ric-8A sobre la formación de estructuras migratorias	63
4.3.1	Análisis de la localización subcelular de Ric-8A en diferentes tipos celulares	64
4.3.2	Estudio del efecto de la alteración de los niveles de expresión de Ric-8A sobre la estructura del citoesqueleto de actina.....	69
4.4	Estudio del efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de Ric-8A en la adhesión celular	77

4.5	Análisis masivo de los interactores de mRic-8A por espectrometría de masas	80
4.6	Análisis de la interacción de mRic-8A con otras proteínas por co-inmunoprecipitación	87
5.	DISCUSIÓN	94
5.1.	<i>Ric-8A regula la velocidad de migración celular a través de la modulación de las vías de señalización de proteínas G heterotriméricas.</i>	94
5.2.	<i>En el modelo estudiado, Ric-8A no regula la direccionalidad del movimiento</i>	98
5.3.	<i>Ric-8A regula la migración en respuesta a la interacción de la célula con el medio</i>	99
5.4.	<i>La expresión de Ric-8A no afecta la estructura del citoesqueleto de actina, pero altera su dinamismo.</i>	102
5.5.	<i>Ric-8A interacciona con proteínas relacionadas con la regulación del citoesqueleto</i>	108
5.6.	<i>Ric-8A interacciona con α-tubulina</i>	110
5.7.	<i>Modelo propuesto: Ric-8A se comporta como un integrador de señales que regula el balance y la conversación cruzada entre las vías de señalización que modulan la migración</i>	114
	BIBLIOGRAFÍA	119



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos utilizados	24
Tabla 2. Ensayo de Cierre de herida.....	57
Tabla 3. La alteración de los niveles de expresión de mRic-8A induce una variación en los parámetros migratorios de células NIH3T3.....	63
Tabla 4. Proteínas interactoras de Ric-8A identificadas por espectrometría de masas.	83
Tabla 5. Interactores de Myc-mRic-8A mayormente representados en la muestra. ...	83



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. El citoesqueleto en la migración celular	4
Figura 2. Proteínas G heterotrimericas en migración celular.....	14
Figura 3. Ric-8A participa en la migración celular.	19
Figura 4. Obtención de la velocidad de cobertura de herida para células NIH3T3....	43
Figura 5. Clonamiento, sobre-expresión y silenciamiento de mRic-8A.	51
Figura 6. Análisis del efecto de los niveles de expresión de mRic-8A en el cierre de herida.	55
Figura 7. Análisis de la migración celular por ensayo en cámara de Boyden.	59
Figura 8. Análisis del efecto del cambio de los niveles de expresión de mRic-8A en la migración de células individuales.....	61
Figura 9. Análisis de la localización subcelular de Ric-8A sobre-expresado en diferentes líneas celulares.	65
Figura 10. Localización subcelular de Ric-8A endógeno en distintas líneas celulares.	68
Figura 11. Localización subcelular de mRic-8A en respuesta a la morfología celular.	70
Figura 12. Análisis de la estructura del citoesqueleto de actina en células NIH3T3 en presencia y ausencia de mRic-8A.....	72
Figura 13. Observación del citoesqueleto de actina in vivo en diferentes condiciones de expresión de mRic-8A.....	73
Figura 14. Evaluación de la actividad de Rac1 y RhoA mediante FRET.....	76
Figura 15. Evaluación del efecto de la expresión de mRic-8A en la adhesión celular.	78
Figura 16. Estandarización de la inmunoprecipitación de Myc-mRic-8A.....	82
Figura 17. Análisis de la migración celular en respuesta a la activación de receptores acoplados a proteínas G.	85
Figura 18. Análisis de la interacción de Ric-8A con α tubulina.....	88

Figura 19. Análisis de la interacción de Ric-8A con vinculina y Gα13 mediante con-
inmunoprecipitación.92

Figura 20. Ric-8A modula la migración celular a través de la regulación integrada de
distintas vías de señalización..... 115



RESUMEN

La migración celular, consistente en la traslación de las células o porciones de ellas de un lugar a otro, es un proceso altamente complejo que depende de la correcta coordinación de la extensión de la membrana plasmática, de la adhesión dinámica de la célula al sustrato y de la contracción de las fibras de actina – miosina, eventos que se basan en la remodelación del citoesqueleto.

Estudios realizados en nuestro laboratorio y por otros grupos de investigación, vinculan la actividad de Ric-8A, una proteína con actividad GEF sobre diferentes subunidades $G\alpha$, con el proceso de migración celular. Ejemplo claro de ello es que el silenciamiento de Ric-8A en embriones de *Xenopus tropicalis* inhibe la migración de células de la cresta neural craneal, reduce el número de adhesiones focales establecidas, altera la polaridad celular y disminuye el tamaño de las protrusiones generadas. A pesar de la evidencia existente de los defectos celulares presentes en ausencia de Ric-8A, no se ha descrito en totalidad el mecanismo molecular mediante el cual esta proteína regula la migración y otros procesos celulares ligados a la estructuración del citoesqueleto. Es por ello, que en este trabajo se estudió la función de Ric-8A en la remodelación del citoesqueleto de actina durante la migración. A través del uso de ensayos de cierre de herida se determinó que la alteración de los niveles de expresión de Ric-8A provoca un aumento en la velocidad de migración de células NIH3T3 sin alterar la direccionalidad del movimiento. Además, se encontró que Ric-8A se concentra en los bordes de las protrusiones de diferentes tipos de células en migración. Al analizar el efecto de la deficiencia de Ric-8A en la adhesión célula - sustrato, no se encontró un efecto evidente sobre el número ni tamaño de adhesiones focales; sin embargo, se observó que las células carentes de Ric-8A se adhieren más rápido a fibronectina en comparación a las células control. En último lugar se procedió a realizar un análisis de espectrometría de masas para identificar a las proteínas que forma complejos con Ric-8A, encontrándose entre ellas proteínas $G\alpha$ y, de forma interesante, a α -tubulina y vinculina. Estos resultados en conjunto sugieren que Ric-8A controla la migración celular a través de la regulación de las vías de señalización dependientes de GTPasas y de su acción directa sobre proteínas componentes de las estructuras celulares que permiten la motilidad.

ABSTRACT

Cell migration, the movement of a cell or a part of it from one place to another, is a highly complex process that depends on the accurate coordination of membrane extension, the dynamic cell - substrate adhesion and the contraction of actin – myosin fibers, events that rely on actin cytoskeleton remodeling.

Studies from our lab and other research groups have related cell migration to the activity of Ric-8A, a protein that has GEF activity over different G α subunits. A clear example of that is the fact that Ric-8A silencing in *Xenopus tropicalis* embryos inhibits cranial neural crest cells migration, reduces the established focal adhesions number, alters cell polarity, and diminishes the protrusion size. Despite the evident defects which affect a cell in the absence of Ric-8A, the mechanism by which this protein regulates cell migration and other cytoskeleton remodeling dependent processes is not completely understood. The aim of this work was to study the function of Ric-8A on actin cytoskeleton remodeling during cell migration. Wound healing assays showed that Ric-8A expression disturbance enhances NIH3T3 cells migration speed in spite of any significant alteration in cell directionality. We found that Ric-8A is concentrated in the protrusion edges of different migrating cell types. When analyzing the effect of Ric-8A depletion on cell - substrate adhesion, no differences were observed in the focal adhesions number and size; nevertheless Ric-8A-depleted cells adhere faster to fibronectin when compared to control cells. Finally, a mass spectrometry assay was used to identify Ric-8A interacting partners, being among them different G α subunits and, interestingly, α -tubulin and vinculin. These results show that Ric-8A controls cell migration by regulating GTPases-dependent signaling pathways and by its direct action on proteins which are component of the structures that allow cell motility.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Migración celular

La célula es una estructura altamente dinámica, capaz de comunicarse con su entorno, adaptarse a él y actuar en conjunto con otras células. La migración corresponde a una función celular fundamental consistente en el desplazamiento de una célula, o una porción de ella. Este proceso se lleva a cabo en distintos ambientes y es indispensable para el desarrollo de diversos procesos celulares. Por ejemplo, en la respuesta inflamatoria los leucocitos migran hacia las zonas dañadas donde cumplen su función fagocítica e inmune y los fibroblastos y células endoteliales vasculares migran ante una señal de daño hacia la herida, lugar donde generarán el soporte para la regeneración del tejido y cicatrización (Blanchoin y col., 2014; Cattaneo y col., 2008; Lauffenburger & Horwitz, 1996). Otro proceso en el que la migración celular es de suma importancia es la metástasis, en el que las células tumorales migran desde la masa tumoral inicial para diseminarse hacia órganos foráneos sanos, siendo este proceso la marca distintiva de un cáncer letal. A pesar de esto, la mayoría de los tratamientos anticancerígenos posteriores a la remoción tumoral tienen como blanco terapéutico las células en división, siendo que sería más efectivo para disminuir la letalidad una terapia preventiva de metástasis. Lamentablemente, las drogas anti-metastásicas probadas hasta hoy no han dado resultados consistentes, por lo que es de suma necesidad estudiar y comprender a cabalidad los mecanismos moleculares y celulares que regulan la capacidad migratoria e invasiva de las células cancerosas (Massagué y col., 2017).

Durante el desarrollo embrionario ocurren también diversos episodios de migración celular y son estos reordenamientos celulares los que le dan forma al embrión y a los órganos individuales del cuerpo. Las células pueden migrar de forma individual a través del embrión por rutas definidas, pueden arrastrarse unas encima de otras de forma coordinada para alargar, contraer o hacer más denso un tejido, pueden separarse de sus vecinas para formar grupos separados y pueden cambiar su forma para deformar un epitelio plano hasta formar un tubo o vesícula. Además, las células pueden moverse de forma colectiva sin perder la adhesión con sus vecinas y migrar en masa, como ocurre durante la gastrulación, evento en el que las células en una

región del epitelio superficial de la blástula se invaginan y migran en forma de hoja hacia el interior del embrión para formar las capas germinales (Alberts, 2015; Blanchoin y col., 2014; Lauffenburger & Horwitz, 1996). Más tarde en el desarrollo, la migración de las células de la cresta neural a través de tres corrientes dorso-laterales llamadas mandibular, hioidea y branquial permiten la diferenciación de células endocrinas, células pigmentarias, así como de glías y neuronas del sistema neural periférico, entre otros tipos celulares (Bronner-Fraser, 1995; Dupin y col., 2006; Mayor & Theveneau, 2013; Toro-Tapia y col., 2017). Dada su alta capacidad migratoria, su accesibilidad y fácil visualización, es que en nuestro y otros laboratorios se usa a las células de la cresta neural craneal de *Xenopus* como modelo de estudio *in vivo* de la migración celular. Además, fue en este modelo que se evidenció por primera vez la relación existente entre Ric-8A, la proteína protagonista en este estudio, con el proceso de migración celular (Fuentealba y col., 2013; Leal y col., 2018; Maldonado-Agurto y col., 2011; Toro-Tapia y col., 2018, 2017).

1.2. Polaridad celular, adhesiones célula – sustrato y motilidad

De estudios llevados a cabo principalmente en fibroblastos moviéndose sobre una superficie rígida, se ha generado la visión clásica de la migración celular como un ciclo. En un primer paso se genera una protrusión hacia la dirección de la migración, la que luego se adhiere al sustrato y ello en conjunto con la disociación de las adhesiones en la región posterior y la contracción de las fibras de estrés permite el desplazamiento del cuerpo celular (Abercrombie y col., 1971; Lauffenburger & Horwitz, 1996; Ridley, 2003; Trepap y col., 2012). Esta visión implica que el primer paso para permitir la motilidad es la polarización celular, es decir que se establezca una diferencia tanto morfológica como funcional entre las distintas regiones de la célula. En particular, se requiere que la célula identifique hacia donde tiene que migrar para así distribuir de forma asimétrica y específica la maquinaria molecular que permitirá el desplazamiento. En general, los estímulos que inducen la polarización corresponden a señales externas como ligandos que se unen a receptores transmembrana que inician una cascada de señalización que determina hacia dónde debe polarizarse la célula (quimiotaxia), activación de vías de señalización de integrinas y cadherinas (en respuesta a la adhesión célula – célula o célula – sustrato), estrés mecánico producido por una herida

o flujo (en el caso de ensayos *in vitro*) y cambios en la rigidez de las capas celulares *in vivo*. Todos estos diferentes estímulos provocan que la maquinaria de actina se desplace hacia el frente de migración, el sistema de microtúbulos se alinee en dirección al movimiento y que tanto el centrosoma como el aparato de Golgi se reorienten hacia el frente del núcleo, estableciéndose la distribución sub-celular característica de las células en migración (*Figura 1a*) (Etienne-Manneville, 2004a; Etienne-Manneville & Hall, 2001; Nobes & Hall, 1999; Palazzo y col., 2001; Shellard & Mayor, 2020).

Una vez establecida la dirección del movimiento, el citoesqueleto de actina se reorganiza en el frente celular, polimerizando en forma de una red entrecruzada formándose una extensión membranosa llamada lamelipodio. Es en esta región donde se establecen las adhesiones focales, nuevos puntos de contacto y de transducción de señales entre el citoesqueleto de actina y el sustrato de adhesión. La formación de estos puntos de anclaje es requerida para que la protrusión se estabilice y además corresponden a los puntos sobre los cuales se ejercerá la fuerza de tracción para producir el desplazamiento celular. Las integrinas son la principal familia de receptores promotores de la migración y, a pesar de que no poseen actividad catalítica, pueden sufrir cambios conformacionales que permiten la comunicación tanto del interior de la célula hacia la matriz extracelular (*inside – out*) como del exterior hacia el citosol (*outside – in*). Estas cascadas de señalización permiten regular la formación y fortalecimiento de las adhesiones focales, la organización y dinámica del citoesqueleto y la mantención de la polaridad durante la migración (Huttenlocher & Horwitz, 2011; Ridley, 2003). Los complejos multi-proteicos que conforman la conexión entre las integrinas y el citoesqueleto de actina contienen más de 200 componentes reportados, entre componentes intrínsecos y asociados, considerándose como el adhesoma consenso la adhesión focal compuesta por cuatro niveles: ILK-PINCH-kindlina, FAK-paxilina, talina-vinculina y α -actinina-zyxina-VASP (BurrIDGE, 2017; Horton y col., 2015; Hu y col., 2014; Kanchanawong y col., 2010; Zaidel-Bar y col., 2007; Zaidel-Bar & Geiger, 2010). Una característica de estas adhesiones es que son estructuras altamente dinámicas, con ciclos de vida del orden de minutos. En el lamelipodio recién generado se forma una adhesión naciente que al unir algunos componentes regulatorios como las quinasas FAK y Src, se asocian a actina y forman un complejo focal.

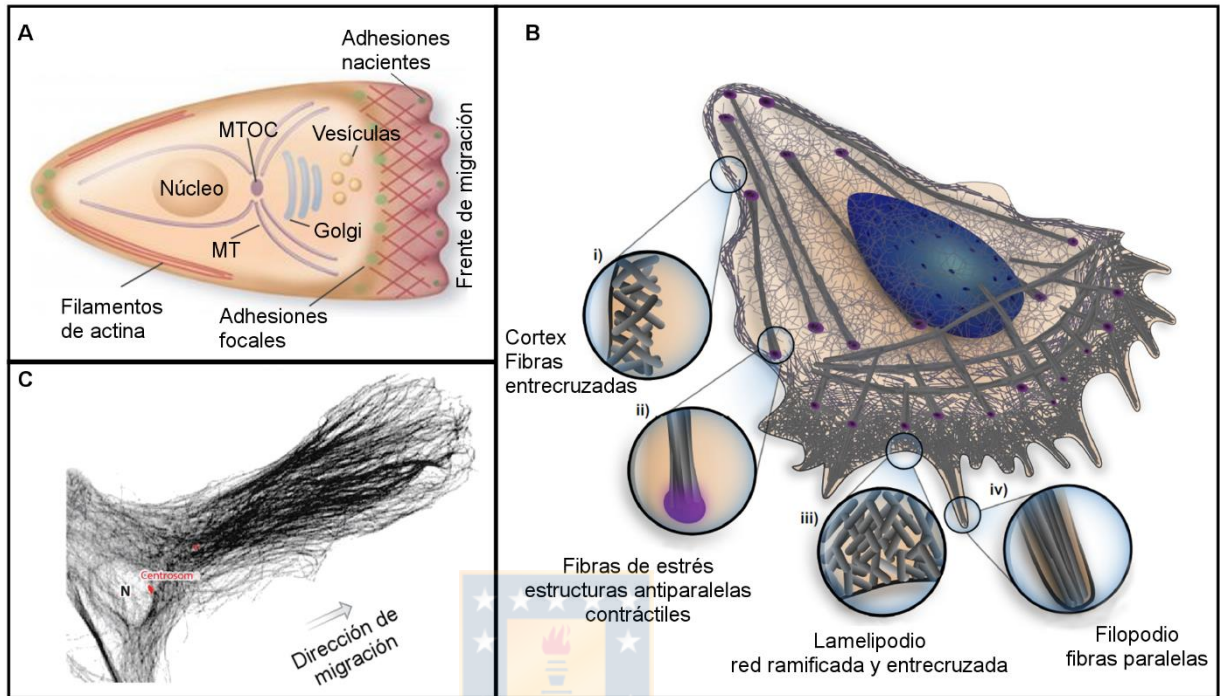


Figura 1. **El citoesqueleto en la migración celular**

A) Polaridad celular en la migración. Durante la migración la célula presenta una polaridad antero – posterior caracterizada por la generación de protrusiones en dirección del movimiento, las que se estabilizan por la generación de adhesiones con la matriz extracelular. Además es característica la disposición espacial del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y el aparato de Golgi enfrentando al núcleo en dirección de la migración (modificado de Ridley, 2003). **B) Citoesqueleto de actina en la migración.** El citoesqueleto de actina presenta una estructuración diferencial durante la migración celular: i) Cortex celular, ii) fibras de estrés, iii) lamelipodio y iv) filopodios. Los puntos morados representan las adhesiones focales (modificado de Blanchoin y col., 2014). **C) Organización de los microtúbulos en la migración.** Los microtúbulos se organizan de forma paralela al frente de migración, lo que favorece el tráfico de componentes celulares hacia la protrusión (modificado de Etienne-Manneville, 2013).

La mayor parte de los complejos focales son desensamblados al llegar a la región posterior del lamelipodio y sólo algunos de ellos pasan a formar adhesiones focales alargadas que persisten hasta llegar a la región posterior de la célula donde deben desensamblarse para permitir la retracción del cuerpo celular, proceso que debe ocurrir de forma coordinada con la contracción de las fibras de estrés para que ocurra la migración (Burrige, 2017; Horton y col., 2015; Nobes & Hall, 1995; Zaidel-Bar y col., 2007).

Al menos dos tipos de fuerza deben ser generadas de forma independiente para movilizar a una célula: la fuerza protrusiva requerida para extender la membrana, que como ya se mencionó es provista por la polimerización de la actina en el frente de migración y la fuerza contráctil que permite el desplazamiento del cuerpo celular, producida por motores moleculares como miosina II sobre las fibras anti-paralelas de actina que componen las fibras de estrés. La tracción ejercida es diferente en cada tipo celular y puede variar también dependiendo del sustrato de adhesión; una fuerza contráctil efectiva debe ser acorde a la resistencia impuesta por las adhesiones focales para que ocurra el desplazamiento del cuerpo celular, pero además la fuerza debe ejercerse de forma asimétrica para evitar la ruptura de las adhesiones focales en el frente celular mientras ocurre la retracción de la región posterior (Blanchoin y col., 2014; Kirfel y col., 2004; Lauffenburger & Horwitz, 1996).

1.3. El citoesqueleto durante la migración celular

La capacidad de las células para cambiar su forma, dividirse y migrar se debe en gran medida a las redes de filamentos que componen el citoesqueleto y a la capacidad de ensamblarse de las proteínas que lo componen. Como ya se ha evidenciado en esta revisión, la reorganización y estructuración diferencial del citoesqueleto de actina juega un papel fundamental en el proceso de migración celular y esto se debe tanto a su capacidad de polimerizar como a la rigidez de las fibras que forma. Sin embargo, los microtúbulos también son requeridos para la migración ya sea a través de su rol en el transporte de vesículas que contienen las moléculas necesarias para el establecimiento de la polaridad y adhesión como a funciones más directas, como la formación y desensamble de adhesiones focales y el lamelipodio (Etienne-Manneville, 2004b).

1.3.1. El citoesqueleto de actina y sus proteínas accesorias en el contexto de la migración celular

La actina es una proteína globular de 42kDa con capacidad de polimerizar en microfilamentos y que une e hidroliza ATP. El citoesqueleto de actina, que se distribuye por toda la célula y es el encargado de mantener la morfología celular y permitir la motilidad, presenta diferentes tipos de organización en diferentes regiones celulares para cumplir funciones específicas (*Figura 1b*). A lo largo de todo el cuerpo de las células no musculares se encuentran las fibras de estrés, compuestas cada una por entre 10 y 30 filamentos de actina y están asociadas a miosina II, lo que le confiere capacidad contráctil. Los filamentos de actina que componen las fibras de estrés presentan una disposición mixta, es decir que se asocian de forma paralela y antiparalela y se mantienen unidos gracias a proteínas entrecruzadoras como α -actinina y fimbrina. Las fibras de estrés ventrales se unen por ambos extremos a adhesiones focales, se disponen de forma paralela a la dirección de la migración y son responsables de la retracción de la cola de la célula para permitir la motilidad (Pellegrin & Mellor, 2007).

Durante la migración, en la membrana plasmática en dirección al movimiento se genera una protrusión de gran tamaño compuesta por una red ramificada de fibras de actina: el lamelipodio (*Figura 1b*). Esta es la principal estructura celular de la migración y es de suma importancia ya que en ella se genera la fuerza para extender la membrana plasmática hacia la dirección del movimiento. El motor que genera esta fuerza es la dinámica polimerización de las fibras de actina que componen el lamelipodio, las que ejercen fuerza contra la membrana hacia adelante provocando su extensión. La polimerización de las fibras de actina es un proceso rápido, continuo y polarizado, caracterizado por la adición de actina y generación de fuerza en el extremo barbado posicionado en dirección hacia el frente de migración y el desensamble de la red ramificada por los extremos puntiagudos en el borde posterior del lamelipodio, para poder así reciclar los monómeros de actina y poder seguir polimerizando, proceso conocido como “*Actin treadmilling*”. Los monómeros de actina que forman los filamentos presentan un comportamiento cinético diferencial dependiendo de si están unidos a ATP o a ADP. El ciclo se inicia con la adición de monómeros de actina-ATP a los extremos barbados (de polimerización rápida) de los filamentos, seguido por la

hidrólisis del ATP, por lo que la mayor cantidad de actina componente de los filamentos es actina-ADP, la que se libera en forma de monómeros desde el extremo menos dinámico del filamento denominado extremo puntiagudo, para luego ser reutilizada en un nuevo ciclo (Rottner & Schaks, 2019; Watanabe & Mitchison, 2002).

Para poder producir la extensión de la membrana, la fuerza extensora debe ser ejercida en diversos puntos de forma coordinada y en ello radica la importancia de la naturaleza ramificada del lamelipodio. Los filamentos de actina polimerizan de forma lineal, por lo que se requiere de la actividad de varias proteínas de unión a actina para estructurar el lamelipodio. Por ejemplo, las subunidades Arp2 y Arp3 del complejo Arp2/3 (que es activado por las proteínas de la familia WASP/WAVE) se asimilan en estructura a la actina, pero con la característica de que permiten la adición de nuevos monómeros en una dirección diferente. Este complejo se une al extremo puntiagudo de un núcleo de actina, a la vez que se asocia con una fibra preexistente a través de un segundo extremo barbado que aporta el complejo, generando así la bifurcación del filamento (Machesky y col., 1999; Svitkina & Borisy, 1999). Otras proteínas involucradas en la estructuración del lamelipodio son las forminas (como mDia1-2) que aceleran la elongación de las fibras, fasina que inhibe el crecimiento de las fibras paralelas para así evitar la formación de filopodios y promover la ramificación para formar la red y cofilina que induce la ruptura de las fibras en la región cercana a la lamela, separándose el filamento en dos y generando nuevos extremos puntiagudos donde se favorece la despolimerización (Rottner & Schaks, 2019). Cabe destacar que existen otras estructuras celulares que presentan una red ramificada de actina, como los “*ruffles*” circulares dorsales, los que se forman a través de un mecanismo molecular similar al lamelipodio pero en este caso la polimerización de actina ocurre en la región dorsal de la célula permitiendo, por ejemplo, la macropinocitosis (Breitsprecher y col., 2011; Kage y col., 2017; Rottner & Schaks, 2019).

Otras estructuras celulares dependientes de actina son los filopodios (*Figura 1b*), estructuras digitiformes que protruyen desde el lamelipodio (algunos se generan dentro del lamelipodio, pero en este caso son llamados microespinas) con diámetros de hasta 200 nm y largo entre 5 a 35 μm (Faix y col., 2009). Los filamentos de actina que conforman los filopodios se ordenan de forma paralela, con sus extremos barbados enfrentando la membrana y entrecruzados entre ellos por α -actinina, fimbrina y fasina.

En el ensamblaje de los filopodios participan proteínas que favorecen la polimerización de los filamentos de actina, como las forminas y las proteínas ENA/VASP que, además de acelerar la polimerización, inhiben la unión de proteínas que enmascaran los extremos barbados de los filamentos para impedir su crecimiento (Blanchoin y col., 2014; Faix y col., 2009; Rottner & Schaks, 2019).

1.3.2. Función de los microtúbulos en migración

Otra red que da soporte a la célula y que tiene entre sus funciones establecer las rutas para el tráfico de organelos y transporte vesicular, son los microtúbulos. Ellos son polímeros tubulares de α - y β - tubulina estructurados de forma polarizada desde su extremo (-) anclado a un centro organizador de microtúbulos (MTOC) hasta un extremo (+) localizado en la periferia celular. En el extremo (+) ocurre un activo cambio entre un estado de polimerización y catástrofe de los microtúbulos, fenómeno denominado inestabilidad dinámica, que permite la búsqueda y captura de diferentes interactores y organelos (Etienne-Manneville, 2013; Lansbergen & Akhmanova, 2006). Existen diversas proteínas que se asocian a microtúbulos (MAPs) ya sea a su extremo (+) como lo hacen las +TIPs, o a lo largo de su estructura tubular, y que regulan su estabilidad y función. Además de las MAPs, dos tipos de motores celulares se asocian a microtúbulos: las quinesinas (transporte hacia el extremo (+) o anterógrado) y la dineína (transporte hacia el extremo (-) o retrógrado). Es a través del deslizamiento de estos motores y sus cargos a través de las rutas conformadas por los microtúbulos que se establece su principal función, el tráfico celular (Alberts, 2015, pp. 925–944). Los microtúbulos poseen además otras funciones en la célula y en cuanto al tema que concierne a este trabajo, se ha reportado ampliamente que la alteración de la estabilidad de los microtúbulos (mediante el uso de drogas) afecta dramáticamente la migración en diversos tipos celulares (Etienne-Manneville, 2013; Euteneuer & Schliwa, 1984; Keller y col., 1984).

Diversos estudios han evidenciado la necesidad de un correcto funcionamiento de los microtúbulos para la formación de protrusiones. Esto se hace evidente, por ejemplo, en células neuronales donde es una red paralela de microtúbulos la que ejerce la fuerza para generar el crecimiento axonal (Etienne-Manneville, 2013; Small, Geiger, y col., 2002). Esta observación es concordante con el hecho de que los

microtúbulos generan la fuerza suficiente para deformar la membrana y que su rigidez es mayor que la de los filamentos de actina (Etienne-Manneville, 2013; Fygenon y col., 1997; Mogilner & Oster, 2003; Pegoraro y col., 2017). No obstante, en la mayoría de las células, entre ellas los fibroblastos que es el modelo de estudio utilizado en esta tesis, el lamelipodio carece de un número significativo de microtúbulos, siendo los filamentos de actina sus pilares estructurales, por lo que el rol de los microtúbulos en la generación de la protrusión debe ser diferente a la de proporcionar la fuerza para extender la membrana (Etienne-Manneville, 2013). Por otra parte, la estabilidad y elongación de los microtúbulos puede ser regulada por MAPs o por modificaciones post-traduccionales como acetilación, fosforilación o metilación, otorgándole a estas estructuras mayor resistencia mecánica (Komarova y col., 2009; Kroboth y col., 2007; Wloga y col., 2017). De hecho, en varios tipos celulares, los microtúbulos se disponen de forma paralela en dirección a la migración (*Figura 1c*), gracias a la acción de quinesina sobre los microtúbulos acetilados, otorgando soporte mecánico a la protrusión (Gundersen & Bulinski, 1988; Hammond y col., 2010; Jolly y col., 2010; Reed y col., 2006). Sin perjuicio de lo anterior, estudios más recientes en los que se utilizaron drogas para alterar solo la dinámica (no la estructuración) de los microtúbulos determinaron que más que como estructuras de soporte, lo que se requiere es la dinámica de los microtúbulos para establecer la migración, lo que se debe a que se requiere de la dinámica de microtúbulos para poder retraer la región posterior de la célula y establecer la direccionalidad del movimiento (Ganguly y col., 2012; Liao y col., 1995).

Dada su función en tráfico, también es posible que el requerimiento de los microtúbulos para la migración celular radique en el transporte a través de ellos de vesículas con componentes estructurales y de señalización necesarios para la generación de la protrusión, así como para la formación y desensamble de las adhesiones celulares. Un ejemplo claro de ello es la necesidad de proporcionar al borde director los componentes lipídicos y proteicos necesarios para extender la membrana plasmática para permitir la formación de la protrusión; también el tráfico polarizado de integrinas desde el retículo endoplásmico para formar los nuevos complejos focales y la reposición de monómeros de actina en el borde celular, contribuyendo al fenómeno de “*Actin treadmilling*” descrito anteriormente (Etienne-

Manneville, 2013; Gu y col., 2011). Además, se ha descrito que se requiere de la internalización de integrinas a través de distintos mecanismos dependientes e independientes de clatrina y caveolina, para favorecer el desensamble de las adhesiones focales (Etienne-Manneville, 2013; L. Liu y col., 2007). De hecho, una de las funciones más estudiadas de los microtúbulos en migración es su rol en el desensamble de las adhesiones focales ya que el tratamiento con nocodazol (una droga que induce la depolimerización de microtúbulos) resulta en la acumulación de integrinas en grandes adhesiones focales y, de forma concordante, la polimerización de microtúbulos induce la pérdida de éstas (Bershadsky y col., 1996; Efimov y col., 2008; I. Kaverina y col., 1998; Irina Kaverina y col., 1999; Pletjushkina y col., 1998; Rinnerthaler, 1988). No se conoce bien el mecanismo mediante el cual los microtúbulos interactúan con las adhesiones focales, pero se ha propuesto que diversas proteínas +TIPs como por ejemplo APC y EB1 en conjunto con componentes de las adhesiones focales como talina, FAK, paxilina y Src, son las proteínas reguladoras y estructurales que median esta interacción (Bouchet y col., 2016; Dubois y col., 2017; Stehbens & Wittmann, 2012; Zhang y col., 2016).

1.4. GTPasas pequeñas en migración celular

La migración celular es un proceso altamente complejo que involucra la ocurrencia coordinada y altamente regulada de diversos fenómenos como la polarización, formación de adhesiones, contracción del cuerpo celular y retracción del cuerpo celular. Para lograr un proceso migratorio efectivo todos estos procesos deben estar finamente regulados para asegurar que ocurran en el lugar correcto y con la intensidad y duración adecuadas a la señal migratoria captada. Las vías de señalización de GTPasas pequeñas de la familia Rho son las encargadas de mediar y coordinar los eventos celulares involucrados en la migración (Machacek y col., 2009; Nobes & Hall, 1999; Raftopoulou & Hall, 2004; Warner y col., 2018). Dichas proteínas se caracterizan por funcionar como un interruptor, pudiendo pasar de un estado inactivo (unidas a GDP) a un estado activo (unidas a GTP), proceso mediado por una familia de proteínas llamadas RhoGEFs (de Rho *Guanine Nucleotide Exchange Factors*). Dentro de la familia Rho, las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42 han sido ampliamente descritas como reguladoras del proceso de migración. Cdc42 se encuentra involucrada en la formación

de filopodios, Rac1 en la formación de lamelipodios y RhoA en la formación y contracción de fibras de estrés (Nobes & Hall, 1999; Raftopoulou & Hall, 2004).

Rac1 es requerida para regular la polimerización de actina en las protrusiones de la membrana; sin embargo, ésta se localiza en todo el citoplasma celular. Ahora, al analizar la localización de esta proteína en su estado activo, se encontró concentrada en el borde director (Filić y col., 2012; Kraynov y col., 2000). Lo mismo sucede con Cdc42 la que, además de regular la polimerización de actina para la formación de filopodios, es requerida para el establecimiento y mantención de la polaridad celular. Cdc42-GTP interacciona con PAR6 para activar a la proteína quinasa C atípica (aPKC ζ) en el borde director, complejo que inhibe a GSK3 β , permitiendo de esta forma reclutar a APC (una +TIP) al complejo, el que a través de su interacción con microtúbulos establece la polarización (Etienne-Manneville, 2004a). Ambas proteínas, Rac1 y Cdc42, regulan la polimerización de actina a través de la activación del complejo WASP/WAVE, el que se une a Arp2/3 activándolo, lo que favorece la polimerización (Raftopoulou & Hall, 2004).

A diferencia de Rac1 y Cdc42, la función de RhoA se asocia a la contracción celular y a la retracción del polo posterior de la célula; RhoA estimula el ensamblaje y contracción de fibras de actina/miosina y la consecuente desvinculación de esta región del sustrato de adhesión. La activación de RhoA señala a través de una cascada que termina en la inhibición de la fosfatasa de la cadena liviana de miosina, incrementando los niveles de fosforilación de ésta, permitiendo que actúe sobre los filamentos de actina para generar la fuerza de contracción (Raftopoulou & Hall, 2004).

Tanto Rac1, Cdc42 como RhoA regulan una amplia variedad de procesos relacionados con la migración celular, desde el establecimiento de la polaridad celular para generar la protrusión, hasta procesos específicos de algunos tipos celulares como el transporte de metaloproteasas a la punta de los invadopodios de células metastásicas para permitir la degradación de la matriz extracelular (Sakurai-Yageta y col., 2008; Warner y col., 2018). Dada la variedad de procesos regulados por estas proteínas, existen mecanismos moleculares que determinan la especificidad de la respuesta generada, lo que se logra a través de la interacción de los reguladores de las GTPasas pequeñas con diferentes proteínas adaptadoras. Por ejemplo, paxilina y FAK (quinasas componentes de las adhesiones focales) también señalizan a través

de GEFs para Rac1 (como β -Pix), localizándolos estratégicamente en las adhesiones nacientes para activar a Rac1 e inactivar a RhoA y regular así la transición de complejos de adhesión nacientes a complejos focales. Más tarde, estos mismos complejos focales señalizan para activar a RhoA, cuya actividad se relaciona con la formación y contracción de fibras de estrés y así permitir la maduración de las adhesiones focales (Warner y col., 2018). Sin embargo, a través del uso de biosensores moleculares, se ha encontrado que estas proteínas son todas activadas en el frente y región posterior de la célula y que se regulan negativamente entre ellas en una escala de tiempo y espacio muy reducida, para permitir la migración (Faix & Weber, 2013; Filić y col., 2012; Pertz y col., 2006; Spiering & Hodgson, 2011). Además de que diferentes RhoGTPasas presentan actividad antagónica entre ellas, existe evidencia de que una misma Rho GTPasa en diferentes localizaciones activa al mismo tiempo a efectores antagónicos (Faix & Weber, 2013; Filić y col., 2012; Tsuji y col., 2002), lo que da paso al estudio de nuevos mecanismos moleculares reguladores de la migración y del citoesqueleto, antes desconocidos.

Existe otro grupo de proteínas, muy similares bioquímicamente a las GTPasas pequeñas, cuya presencia también ha sido descrita como requerida para este procesos: las proteínas G heterotriméricas (Hewavitharana & Wedegaertner, 2012).

1.5. Proteínas G heterotriméricas y migración celular

Otro sistema de señalización que se caracteriza por funcionar como un interruptor son las proteínas G heterotriméricas. Estas vías de señalización se componen, a diferencia de las proteínas G pequeñas, de un receptor de membrana acoplado a proteína G (GPCR), la proteína G heterotrimérica y los efectores que producen un segundo mensajero que señalará hacia el interior de la célula, para que respondan componentes sensores de ellos (como por ejemplo proteínas quinasas) que generan cascadas de señalización específicas a la vía de transducción que esté siendo estimulada (Hewavitharana & Wedegaertner, 2012; Lefkowitz, 2007; Offermanns, 2003).

Las proteínas G heterotriméricas se componen de tres subunidades: una subunidad α que une e hidroliza GTP además de una subunidad β y una γ que forman un dímero funcional e indisociable. Las subunidades $G\alpha$ y $G\gamma$ sufren modificaciones lipídicas de

forma definitiva o modificable, las que son las responsables de que el heterotrímero pueda asociarse a la membrana plasmática y, a través de la interacción con sus efectores, dirigir a sus proteínas blanco a su localización en membrana (Wedegaertner y col., 1995).

Las proteínas G heterotriméricas pueden agruparse en 5 subfamilias, basándose en sus características funcionales y estructurales, las que se clasifican en base a la subunidad $G\alpha$ que los conforman en las subfamilias $G\alpha i/o$, $G\alpha q$, $G\alpha 12/13$, $G\alpha s$ y la menos caracterizada, $G\alpha v$ (Gilman, 1987; Offermanns, 2003; Oka y col., 2009). Las subfamilias $G\alpha i/o$ y $G\alpha s$ clásicamente se han descrito regulando la actividad de las adenilil ciclasas ya sea inhibiendo su función o estimulándola, respectivamente. En el caso de la subfamilia de $G\alpha q$, su función canónica es regular a las isoformas β de la fosfolipasa C y las proteínas $G\alpha 12$ y $G\alpha 13$ pueden activar a la quinasa N-terminal cJun (JNK), al intercambiador Na^+/H^+ y a la fosfolipasa D, entre otros efectores (Offermanns, 2003).

Dentro de la variedad de procesos en que participan este tipo de vías de señalización, se ha descrito que distintas proteínas G participan en migración, polaridad y adhesión a través de la regulación de la remodelación del citoesqueleto de actina (*Figura 2a*) (Cotton & Claing, 2009; Hewavitharana & Wedegaertner, 2012). Por una parte, se ha determinado que la subunidad $G\alpha 12/13$ regula el proceso mediante el cual las células del blastodermo migran sobre la célula vitelínica durante la gastrulación (epibolia) en pez cebra. $G\alpha 12/13$ interacciona con la región carboxilo-terminal citoplasmática de cadherina-E, inhibiendo su actividad y provocando la pérdida de la adhesión celular. Además, se ha determinado que $G\alpha 12/13$ modula el movimiento de las capas de células epiteliales durante la gastrulación (movimientos epibólicos) a través de la regulación del citoesqueleto de actina, mediando la actividad de distintos RhoGEF (Lin y col., 2009). También, tanto en modelos celulares de cáncer de próstata como de mama, $G\alpha 12$ promueve la invasión y la metástasis a través de la activación de la vía de las proteínas GTPasas Rho (Dorsam & Gutkind, 2007; Kelly, Moeller, y col., 2006; Kelly, Stemmler, y col., 2006).

Otra función de las vías de señalización mediadas por GPCR en migración es su participación en el proceso de quimiotaxia (Cotton & Claing, 2009; Hewavitharana & Wedegaertner, 2012) donde las quimioquinas, moléculas indispensables para guiar la

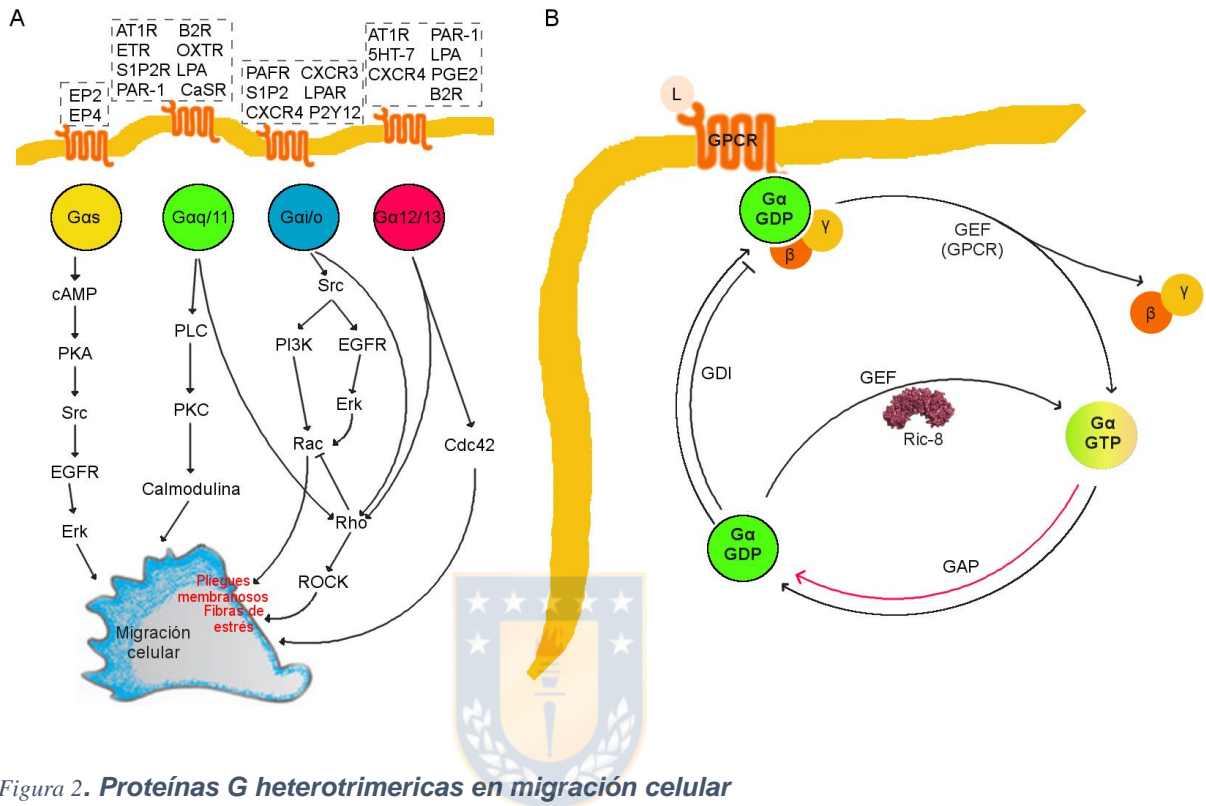


Figura 2. **Proteínas G heterotrimericas en migración celular**

A) Vías de señalización mediadas por proteínas G heterotrimericas que regulan la organización del citoesqueleto y la migración celular. Los receptores acoplados a Gs promueven la activación de PKA, la que en algunos tipos celulares participa en el control de la vía de las MAPK para regular la remodelación del citoesqueleto de actina y migración. Los GPCR acoplados a Gq favorecen la migración activando la vía PLC/PKC/Calmodulina, pero además estimulando a la GTPasa Rho. Los receptores acoplados a Gi activan a Rho y Rac, regulando diferentes aspectos de la remodelación de actina. Finalmente, los receptores acoplados a G12/13 son reguladores de la activación de Rho y Cdc42, controlando la formación de fibras de estrés y filopodios (modificado de Cotton and Claing, 2009). **B)** La unión de un ligando a un GPCR induce la salida del GDP desde la subunidad Gα. Luego, se une GTP a esta subunidad, lo que provoca la disociación de Gα-GTP del dímero Gβγ, los cuales pueden interactuar y modular a distintos efectores. Las proteínas con actividad GAP se unen a Gα-GTP y aceleran la actividad GTPásica intrínseca de Gα, provocando que ésta vuelva a su estado inactivo, se asocie con Gβγ y que termine la señalización. Las proteínas con actividad GEF que no son GPCRs, reclutan a Gα tras la hidrólisis del GTP e inducen el intercambio de GDP por GTP manteniendo el ciclo en su estado activo. Las proteínas GDI reclutan a Gα-GDP impidiendo el intercambio de GDP por GTP y a la vez impidiendo su asociación con Gβγ.

migración, son ligandos para GPCRs. Ciertos estudios han comprobado que la regulación de la migración de células endoteliales ocurre por un proceso angiogénico estimulado por oxitocina y mediado por la vía de Gαq y su proteína efectora fosfolipasa Cβ (Cattaneo y col., 2008). Además, se ha determinado que endotelina actúa sobre la subunidad Gαq, causando la inhibición de la migración de células progenitoras neurales durante la laminación de la corteza cerebral, a través de la activación de la vía de la proteína JNK (de Jun N-terminal Kinase) (Mizuno y col., 2005).

Otro ejemplo de la participación de proteínas G en quimiotaxia es el trabajo realizado en nuestro laboratorio, en el que se encontró que la alteración de la vía de señalización de Gα13, a través del silenciamiento de una proteína GEF, inhibe la migración de células de la cresta neural de *Xenopus tropicalis* *in vitro* e *in vivo* y produce la alteración de la estructura del citoesqueleto de actina (Fuentealba y col., 2013; Toro-Tapia y col., 2018). Además, también en nuestro laboratorio se encontró que el silenciamiento de Gα13 provoca la alteración del citoesqueleto de actina, inestabilidad de las protrusiones y una reducción del número y dinámica de adhesiones focales en células de la cresta neural de *Xenopus tropicalis*. En conjunto con lo anterior, se observó co-localización e interacción de Gα13 con la quinasa de adhesión focal (FAK) y que la expresión de una forma constitutivamente activa de Src, una quinasa involucrada en la formación y maduración de las adhesiones focales, rescata el fenotipo causado por la alteración de la expresión de Gα13 (Toro-Tapia y col., 2018, p.).

Las vías de señalización de las proteínas G heterotriméricas son muy variables en cuanto a sus ligandos y las respuestas generadas. Sin embargo, el mecanismo de acción de todas ellas es el mismo, variando entre un estado activo y otro inactivo, tal como lo hacen las proteínas de la familia Rho ya mencionadas (*Figura 2b*). En el estado apagado, la subunidad Gα se encuentra unida a GDP y unida al heterodímero Gβγ, conformándose por lo tanto el heterotrímero inactivo. Cuando un ligando se une a un GPCR, éste ejerce su actividad GEF sobre Gα-GDP, promoviendo la liberación del nucleótido de guanina y estabilizando la conformación de esta subunidad libre de nucleótido. La subunidad Gα libre de nucleótido une entonces GTP, ya que éste se encuentra en mayor concentración en el citoplasma que el GDP, provocando que se pierda la afinidad de Gα por el heterodímero Gβγ. Una vez que se disocian las

subunidades $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$, éstas pueden interaccionar y regular la función de diferentes efectores como los descritos anteriormente para comenzar la respuesta celular. Luego, debido a que la subunidad $G\alpha$ posee actividad GTPásica intrínseca, ésta cataliza la hidrólisis del GTP a GDP, lo que provoca la reconstitución del heterotrímero y el término de la señalización (Gilman, 1987; Offermanns, 2003; Tesmer, 2010).

La amplitud de la señal transmitida por este sistema de señalización está determinada por la tasa de intercambio del nucleótido de guanina (GDP por GTP) y por la tasa de hidrólisis del GTP por parte de $G\alpha$, lo que determina la cantidad de $G\alpha$ -GTP (activo) que se genera en respuesta a una determinada señal (Zerangue & Jan, 1998). Sin embargo, existen además otras proteínas accesorias de este sistema de señalización, que ayudan a regular la actividad de éste (*Figura 2b*). Dentro de ellas, se encuentran las proteínas RGS (*Regulators of G-protein Signaling*) que regulan negativamente este tipo de vías de señalización y las proteínas con actividad GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*) y GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*) que regulan positivamente la señalización a través del retardo de la reconstitución del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ (Hewavitharana & Wedegaertner, 2012; Sato y col., 2006). Dada la gran cantidad de procesos que son regulados por estas vías de señalización, la actividad de las diferentes proteínas reguladoras es requerida para la correcta funcionalidad de ellas (Sato y col., 2006). Un ejemplo es el ya mencionado estudio de nuestro grupo de investigación donde se mostró que la sola alteración de los niveles de expresión de Ric-8A, un GEF para diferentes proteínas G heterotriméricas, provoca la alteración de la capacidad migratoria de las células de la cresta neural de *Xenopus*. (Fuentealba y col., 2013; Hinrichs y col., 2012; Romo y col., 2008; Tall y col., 2003; Toro-Tapia y col., 2018; Wang y col., 2011).

1.6. Ric-8, un GEF para proteínas $G\alpha$

Ric-8 (Resistente al inhibidor de la colinesterasa mutante 8), es una proteína de localización subcelular principalmente citosólica, de 60 kDa y altamente conservada en vertebrados, que se identificó en un *screening* realizado en *Caenorhabditis elegans* que buscaba mutantes resistentes al efecto del aldicarb, que es un inhibidor de la acetilcolinesterasa y que por lo tanto causa una acumulación tóxica de acetilcolina en

la sinapsis (Miller y col., 1996). En principio, se asociaron a estas proteínas funciones relacionadas con la regulación positiva de la transmisión sináptica y de la vía de señalización de Gαq. Sin embargo, posteriormente se observó que las mutantes para Ric-8 presentaban una alta letalidad en etapas tempranas de la embriogénesis, determinándose así que Ric-8 participaba en el desarrollo embrionario (Miller & Rand, 2000). Es por este motivo que a esta proteína también se le denominó sinembrina, de la combinación de las palabras sinapsis y embriogénesis, para destacar la diversidad de los procesos en los que participa.

En nuestro laboratorio, también se han estudiado las diferentes funciones de las proteínas Ric-8, tanto durante el desarrollo embrionario como en los procesos de transducción de señales. Mediante la técnica de hibridación *in situ*, se determinó que, durante la embriogénesis de *Xenopus tropicalis*, el patrón de expresión de xtRic-8A es dinámico, encontrándose en el polo animal durante los primeros estadios del desarrollo, para luego restringirse a los tejidos de origen neuronal, como el tubo neural, cerebro, ojos y estructuras derivadas de las crestas neurales, lo que sugiere que esta proteína participa en el desarrollo del sistema nervioso (Maldonado-Agurto y col., 2011). También en nuestro laboratorio se encontró que Ric-8 de *Xenopus laevis* poseía actividad GEF tanto *in vitro* como *in vivo* sobre la proteína Gas y que participaba manteniendo a los ovocitos de esta especie en su estado inmaduro mediante su participación en la vía de señalización de Gas, encargada de mantener elevados los niveles intracelulares de AMPc (Romo y col., 2008). Este hallazgo es de gran importancia, ya que fue la primera vez que se describió un GEF para Gas que no fuera un GPCR.

Mediante ensayos de doble híbrido realizados en levaduras se determinó que en mamíferos existen dos parálogos de Ric-8, denominados Ric-8A y Ric-8B, los cuales presentan distintas especificidades de interacción con las subunidades Gα: Ric-8A interacciona específicamente con Gαo, Gαq, Gαi1 y Gα13, mientras que Ric-8B lo hace con Gαq y Gas (Tall y col., 2003). En paralelo, con el fin de encontrar proteínas que tuvieran la capacidad de interactuar con hGas, en nuestro laboratorio se hizo un *screening* por doble híbrido en levaduras usando una genoteca de ADNc de cerebro humano utilizando Gas como carnada. Al realizar este ensayo, se encontró que una de estas proteínas correspondía a Ric-8B y que éste transloca a la membrana

plasmática de células en cultivo derivadas de neuronas en respuesta tanto a isoproterenol, agonista de los receptores $\beta 1$ y $\beta 2$ adrenérgicos acoplados a la vía de señalización de G α s, como a carbacol, agonista de los receptores colinérgicos, acoplados a la vía de señalización de G α q. Estos resultados no se observaron mediante la simple sobre-expresión de Ric-8, lo que indica que se requiere de la activación de un GPCR para que Ric-8 sea translocada a la membrana (Klattenhoff y col., 2003).

En el mismo trabajo en que se encontraron los parálogos de Ric-8, se determinó que Ric-8A presentaba actividad GEF sobre las subunidades G α con las que interaccionaba, produciendo un aumento en la velocidad de unión de GTP γ S, un análogo no hidrolizable del GTP, sobre G α q, G α i y G α o, pero no sobre G α s. Basado en estos resultados, se propuso el siguiente mecanismo de acción: en primer lugar participaría un GPCR que produciría la activación y disociación del heterotrímero G $\alpha\beta\gamma$, mecanismo que constituye la activación canónica del ciclo de las proteínas G; luego, al ser hidrolizado el GTP por la subunidad G α , esta proteína se asociaría a Ric-8, la que induciría nuevamente el intercambio de GDP por GTP en esta proteína, provocando de esta forma que el ciclo se mantenga en su estado activo por un tiempo más prolongado (Tall y col., 2003).

1.7. Ric-8 en migración celular

Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio se determinó que Ric-8A pasa de ser expresado en el polo animal de embriones de *Xenopus tropicalis* en estadios tempranos, a expresarse específicamente en los tejidos de origen neuronal, como el tubo neural, cerebro, ojos y estructuras derivadas de las crestas neurales (Maldonado-Agurto y col., 2011). Para ahondar en la determinación de la función de Ric-8A en el desarrollo embrionario, se estudió cuál es el efecto del silenciamiento de Ric-8A con morfolinós específicos sobre las crestas neurales craneales de *Xenopus tropicalis*, células que se originan entre el tejido neural y el ectodermo no neural que migran desde su origen a otras regiones para dar origen a diversas estructuras. Al silenciar Ric-8A se observaron defectos en la migración de las crestas neurales craneales (Figura 3a) y en la formación del cartílago craneofacial, estructura derivada de estas células. Además, al evaluar la migración de explantes de crestas neurales

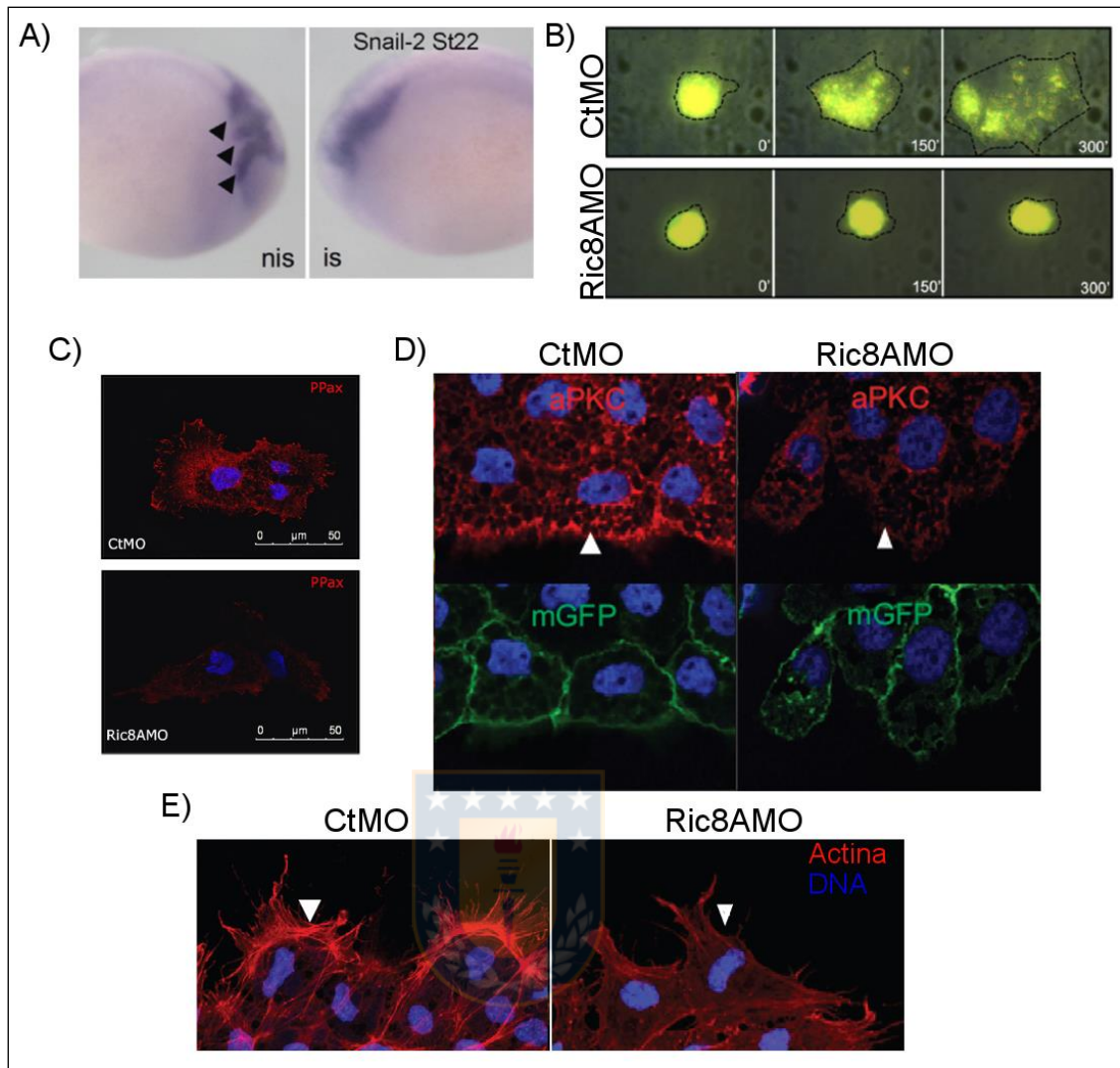


Figura 3. Ric-8A participa en la migración celular.

A) El silenciamiento de Ric-8A en embriones de *Xenopus tropicalis* produce defectos en la migración de las crestas neurales craneales (cabeza de flecha negras). Hibridación in situ contra *snail-2*, un marcador específico de crestas neurales. **B)** El silenciamiento de Ric-8A inhibe la migración de explantes de crestas neurales de *X. tropicalis*, sobre una matriz de fibronectina. **C)** El silenciamiento de Ric-8A produce la disminución del número de adhesiones focales en explantes de crestas neurales de *X. tropicalis*. Inmunocitoquímica contra Paxilina fosforilada (PPax). **D)** El silenciamiento de Ric-8A produce la deslocalización del marcador apical aPKC desde la membrana plasmática (cabeza de flechas blancas) en explantes de crestas neurales de *X. tropicalis*. **E)** El silenciamiento de Ric-8A altera la estructura de actina en explantes de crestas neurales de *X. tropicalis*, produciendo una disminución en el tamaño de los lamelipodios (cabeza de flechas blancas). Modificado de Fuentealba y col., 2013 y Toro-Tapia y col., 2018.

desde embriones morfantes para Ric-8A, se encontró que éstos no son capaces de dirigirse hacia una fuente de Sdf1 (quimioattractante que es un ligando para el GPCR Cxcr4) y que este efecto es rescatado al co-inyectar en conjunto el morfolino y un mensajero para Ric-8A. Al evaluar la dispersión de estos explantes sobre una matriz de fibronectina y en ausencia de un agente quimioattractante, se encontró que éstos tampoco son capaces de migrar (*Figura 3b*), lo que indica que la ausencia de Ric-8A afecta tanto el sistema quimiotáctico como al mecanismo motor de la migración (Fuentealba y col., 2013). Como mencionamos anteriormente, para que pueda ocurrir la migración deben desencadenarse una serie de eventos de remodelación del citoesqueleto de actina, entre ellos el establecimiento de la polaridad celular y de adhesiones focales. De hecho, en nuestro laboratorio se encontró que la pérdida de función de Ric-8A disminuye el número de adhesiones focales (*Figura 3c*), afecta la polaridad celular alterando la localización de aPKC y la actividad de RhoA y Rac1 (*Figura 3d*), y altera la organización del citoesqueleto de actina generando protrusiones inestables y de menor tamaño (*Figura 3e*) (Fuentealba y col., 2013; Leal y col., 2018; Toro-Tapia y col., 2018).

Otras evidencias sobre la participación de Ric-8A en el proceso de migración celular son los estudios que indican que células gliales del cerebelo deficientes en Ric-8A disminuyen la afinidad por componentes de la membrana basal, como lo es laminina. Además, en este estudio *in vivo* se mostró que las malformaciones generadas en el cerebelo en desarrollo de ratones deficientes en Ric-8A son similares a las de ratones mutantes para integrina $\beta 1$, uno de los componentes más importantes en la adhesión celular al sustrato (Ma y col., 2012). Otros grupos de investigación han obtenido resultados concordantes con nuestra investigación, en los que se vincula a Ric-8A con la vía de señalización no-canónica de $G\alpha 13$, participando en la migración celular inducida por factores de crecimiento, a través del establecimiento de la conversación entre las vías de señalización mediada por $G\alpha 13$ y las dependientes de receptores tirosina quinasa. En estos estudios se observó que al silenciar a Ric-8A, $G\alpha 13$ no transloca a la membrana en células previamente inducidas con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y que además éstas presentaban defectos en el citoesqueleto de actina, ya sean defectos en el proceso de *dorsal ruffle turnover* o en

la re-estructuración de éste en respuesta a diferentes sustratos de adhesión, impidiendo la migración celular (Ruisu y col., 2017; Wang y col., 2011).

La evidencia expuesta en esta revisión muestra la directa relación entre las vías de señalización de proteínas G heterotriméricas, sus proteínas reguladoras, y el proceso de migración celular. En específico, se mostró que el silenciamiento de Ric-8A tiene efectos negativos sobre la migración celular, la adhesión, la polaridad y estructuración del citoesqueleto en células de la cresta neural de *Xenopus*, pero es escasa la información de la función de Ric-8A en la migración y estructuración del citoesqueleto de otros modelos celulares. Además, es requerida la realización de más estudios moleculares para describir completamente el mecanismo de acción de Ric-8A sobre la migración celular.

1.8. Contexto de trabajo de tesis

Para que la migración celular se lleve a cabo de forma correcta, deben suceder una serie de eventos moleculares para permitir la reorganización del citoesqueleto para generar la polaridad antero – posterior característica de la migración, para que se extiendan protrusiones, que se establezca esta protrusión a través de la generación de adhesiones entre la célula y la matriz extracelular y para que el cuerpo celular se contraiga y retraiga desde la región posterior para permitir el desplazamiento. En diversos trabajos se ha descrito que distintas vías de señalización de proteínas G heterotriméricas regulan estos procesos y que su función es requerida para que ocurra la migración celular.

Además, en nuestro laboratorio se describió que Ric-8A, un potenciador de la vía de señalización de G α i, G α q y G α 12/13, es requerido para el proceso de migración de las células de la cresta neural de *Xenopus tropicalis* y que la alteración de su expresión afecta la estructuración del citoesqueleto de actina, disminuyendo en su ausencia tanto el número de adhesiones focales como de protrusiones. Sin embargo, este efecto ha sido observado sólo en células de la cresta neural de *Xenopus tropicalis* y no se conoce el mecanismo mediante el cual Ric-8A controla la migración celular.

Como se describió anteriormente, los defectos migratorios inducidos por la alteración de la expresión de Ric-8A han sido vinculados con distintas vías de señalización: el silenciamiento de Ric-8A induce la alteración de las vías de

señalización de Gα13 y RhoGTPasas en *Xenopus* (Leal y col., 2018; Toro-Tapia y col., 2018) y de la vías mediadas por receptores tirosina – quinasa en mamíferos (Wang y col., 2011). Además, esta proteína es un GEF para distintas proteínas G heterotriméricas, incluso para vías con efectos antagónicos en migración (Cotton & Claing, 2009; Tall y col., 2003), lo que sugiere una actividad entrecruzadora de señales para Ric-8A. También se debe considerar que ella es una proteína de andamiaje con capacidad de interaccionar con diversos pares (Figuroa y col., 2009; Srivastava y col., 2019; Srivastava & Artemyev, 2019), por lo que existe la posibilidad de que la acción de Ric-8A sobre el citoesqueleto sea ejercida de forma independiente de proteínas G. Debido a ello, resulta relevante estudiar el mecanismo mediante el cual Ric-8A regula la migración celular y la estructuración del citoesqueleto de actina, si este mecanismo es dependiente de la actividad de proteínas G heterotriméricas y si es un mecanismo conservado en diferentes tipos celulares y organismos. Para resolver la pregunta de investigación, en este trabajo se estudió **la función de Ric-8A en la migración celular y el rol de diferentes subunidades Gα durante la migración.**



2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

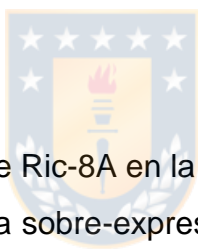
En base a los antecedentes expuestos anteriormente, se propone como hipótesis que

Ric-8A participa en el proceso de migración celular, favoreciendo la polimerización de actina y la reestructuración del citoesqueleto, a través de la regulación de las vías de señalización de proteínas G heterotriméricas.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la función de Ric-8A en la remodelación del citoesqueleto y el rol de diferentes subunidades $G\alpha$ durante la migración

OBJETIVOS ESPECÍFICOS



1. Caracterizar la función de Ric-8A en la migración celular.
 - Analizar el efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de Ric-8A sobre la migración celular.
 - Estudiar el efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de Ric-8A sobre la formación de estructuras celulares migratorias.
 - Estudiar el efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de Ric-8A en la adhesión celular.
2. Identificar proteínas interactoras de Ric-8A involucradas en la regulación de la remodelación del citoesqueleto.
 - Realizar un análisis masivo de los interactores de mRic-8A por espectrometría de masas
 - Analizar la interacción de mRic-8A con proteínas de interés por co-inmunoprecipitación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Plásmidos

Nombre del Plásmido	Nº BD	Uso y Observaciones
LifeAct-GFP	864	Expresión de actina en fusión a proteínas fluorescentes
LifeAct-Cherry	865	
pCS2+6Myc/hRic-8A	674	Sobre-expresión de Ric-8A humano (h) o de ratón (m) en fusión al epítipo c-Myc
pCS2+6Myc/mRic-8A	844	
pEGFP-C3/mRic-8A	887	Sobre-expresión de mRic-8A en fusión a GFP
pSingle-Tts-shRNA/mRic8A322-342	845	Silenciamiento de mRic-8A por shRNA
pSingle-Tts-shRNA/mRic8A704-723	846	
pX330/mRic8Asg1	878	CRISPR/Cas9. Expresa sgRNA y Cas9
pX330/mRic8Asg2	879	
pX330/mRic8Asg3	880	
pX458/mRic8Asg1	881	CRISPR/Cas9. Expresa sgRNA, Cas9 y GFP
pX458/mRic8Asg2	882	
pX458/mRic8Asg3	883	
pX459/mRic8Asg1	884	CRISPR/Cas9. Expresa sgRNA, Cas9 y rPuro
pD1321-Apuro/mRic8Asg1	885	
pCS2+/Rac1 (FRET)	860	Sonda para medir actividad de Rac1 <i>in vivo</i>
pTriEx-1.1RhoA (FRET Biosensor)	817	Sonda para medir actividad de RhoA <i>in vivo</i>

Tabla 1. Plásmidos utilizados

Se muestra una lista de los plásmidos utilizados en este trabajo. Se presenta su nombre, su número en la base de datos de Laboratorio de Señalización y Desarrollo y comentarios sobre su utilización.

3.2. Oligonucleótidos

Oligonucleótidos utilizados para el clonamiento de mRic-8A y mRic-8B:

Nº 737: mRic8ApCS2+MT/EcoRI

5' – GGAATTCGATGGAGCCCCGGGCAG – 3'

Nº 738: mRic8A/as/SacII XbaI

5' – GTCTAGACCGCGTTATCAGTCAGGATCTGAGTCAGGGT – 3'

Nº 739: mRic8BpCS2+MT/EcoRI

5' – GGAATTCGATGGATGAAGAGCGCGCCCT – 3'

Nº 740: mRic8B/as/SacII XhoI

5' – GCTCGAGCCGCGTTATCAGTCTGTGTCCGAGCTGG – 3'

N° 771: mRic8A(C3)EcoRI_Fwd

5' – GGAATTCGGATGGAGCCCCGGGCAG – 3'

Oligonucleótidos utilizados para el silenciamiento de mRic-8A por shRNA:

N°746: shmRic8A(704-723)Rev

5' – AGCTTAAAAAATCAAGAGGGAAGTTGATGAGTGAATTCAACTCATCAACTCCCTCTTG
ACC – 3'

N°747: shmRic8A(704-723)Fwd

5' – TCGAGGTCAAGAGGGAAGTTGATGAGTTGAATTCACTCATCAACTCCCTCTTGATTTT
TTA – 3'

N° 748: shmRic8A(322-342)Rev

5' – AGCTTAAAAAATCCCCAGACATGGATGTCCTCTGAATTCAGAGGACATCCATGTCTGGGG
ACC – 5'

N°749: shmRic8A(322-342)Fwd

5' – TCGAGGTCCCCAGACATGGATGTCCTCTGAATTCAGAGGACATCCATGTCTGGGGATTTT
TTA – 3'

Oligonucleótidos utilizados para construir plásmidos del sistema CRISPR/Cas9

N° 887: Ana-MLD_sgRNA 1_Ric8a_Sens

5' – CACCGAGCTCTGCGGTCGTTCAACC – 3'

N° 888: Ana-MLD_sgRNA 1_Ric8a_Rev

5' – AAACGGTTGAACGACCGCAGAGCTC – 3'

N°889: Ana-MLD_sgRNA 2_Ric8a_Sens

5' – CACCGCTCCTGCTGGGCATCATCGA – 3'

N° 890: Ana-MLD_sgRNA 2_Ric8a_Rev

5' – AAACGCGATGATGCCAGCAGGAGC – 3'

N° 891: Ana-MLD_sgRNA 3_Ric8a_Sens

5' – CACCGGCTGGCGCACATCCGTGCGA – 3'

N°: 892: Ana-MLD_sgRNA 3_Ric8a_Anti

5' – AAACGCGACGGATGTGCGCCAGCC – 3'

3.3. Anticuerpos y Fluoróforos

(IF: Inmunofluorescencia, Wb: *Western blot*, IP: Inmunoprecipitación, R: Recubrimiento)

Anti c-Myc (9E10) sc-40 Santa Cruz (Ratón, IF 1:200, Wb 1:5000)

Anti c-Myc (9E10) sc-40AC, Santa Cruz (Ratón, IP 1ug IgG/mg proteína)

Anti α -Tubulina T9026, Sigma-Aldrich (Ratón, Wb 1:5000)

Anti α -Tubulina [DM1A] (FITC) ab64503, Abcam (Ratón, IF 1:100)

Anti Ric8A SAB1412875, Sigma-Aldrich (Ratón, IF 1:50, Wb 1:3000)

Anti Vinculina (7F9) sc-73614, Santa Cruz (Ratón, Wb 1:100)

Anti Paxilina (pY118) 44-722G, Invitrogen (Conejo, IF 1:20)

Anti G α 13 (A-20) sc-410, Santa Cruz (Conejo, Wb 1:100)

Anti CD45R/B220 553084, BD Pharmingen (Rata, R 0,5 ug/mL)

Faloidina Alexa Fluor -546 (A22283) -647 (A22287), Thermo (IF 1:100)

Hoechst (34580) H21486, Invitrogen (IF 1:100)

Dapi Fluoromount-G 0100-20, SouthernBiotech (IF 7 μ L para cubreobjetos de 12mm)

Anti IgG Ratón Alexa Fluor 546 A-11030, Invitrogen (IF 1:400)

Anti IgG Ratón Alexa Fluor 488 A-21202, Invitrogen (IF 1:200)

Anti IgG Conejo Cy3 711-165-152, Jackson ImmunoResearch (IF 1:400)

Anticuerpo normal ratón IgG sc-2025, Santa Cruz (IP 1ug IgG/mg proteína)

Anti IgG LC Ratón-HRP 115-035-174, Jackson ImmunoResearch (Wb 1:10000)

Anti IgG (H+L) Ratón-HRP 115-035-003, Jackson ImmunoResearch (Wb 1:5000)

Anti IgG (H+L) Conejo-HRP 111-035-003, Jackson ImmunoResearch (Wb 1:5000)

3.4. Construcciones de ADN

Para la construcción de los diferentes plásmidos se utilizaron técnicas básicas de biología molecular estandarizadas en el laboratorio. La transformación bacteriana se realizó en bacterias *E. coli* DH5 α químicamente competentes, la purificación de ADN plasmidial a pequeña escala por el método TENS, las digestiones analítica y

preparativa con enzimas de restricción de *New England Biolabs*, las defosforilaciones con fosfatasa antártica (*New England Biolabs*) y las ligaciones con T4 DNA Ligase (Thermo). Además, se utilizaron kits comerciales: para purificar ADN desde gel de agarosa *Nucleospin Gel and PCR Clean up* (Macherey-Nagel) y para purificar los plásmidos a mediana escala *NucleoBond Xtra Midi* (Macherey-Nagel).

3.4.1. Clonamiento de Ric-8A para su sobre-expresión

Se purificó el ARN total desde un corte de cuerpo estriado de ratón utilizando el kit *Quick-RNA MiniPrep* (Zymo). Luego se realizó RT-PCR a partir de 2 ug de ARN total. Para ello se utilizaron 5 pmol de oligonucleótidos específicos para mRic-8A (Oligo N° 738) y mRic-8B (Oligo N° 740) en reacciones independientes, 0,5 mM dNTPs y el ARN y se incubó a 65°C por 5 minutos y luego en hielo por 2 minutos para denaturar el ARN. Luego se agregó el Buffer FS 5X (Invitrogen), DTT a una concentración final de 10 mM y 40U de *RNasin* (Promega). Esta mezcla se realizó en 19 µL totales y se incubó a 42°C por un minuto antes de agregar 1 µL de *Superscript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) e incubar por 50 minutos a 42°C para proceder con la reacción. Finalmente se inactivó la enzima incubando a 70°C por 15 minutos.

A continuación, se amplificó mRic-8A y mRic-8B por PCR a partir de los cDNA generados anteriormente utilizando la *Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase* (Agilent) en un volumen final de 50 µL utilizando los partidores 737 y 738 para amplificar mRic-8A y los partidores 739 y 740 para amplificar mRic-8B. Se usaron 2 µL de ADNc para cada reacción y 30 ciclos de amplificación consistentes de 20 segundos a 90°C, 20 segundos a 60°C y 1,5 minutos a 72°C. El producto de PCR de mRic-8A se ligó en el vector pCR-II-Blunt-TOPO y luego se digirió este vector con las enzimas EcoRI y XbaI para obtener mRic-8A. Este fragmento se purificó desde gel de agarosa, al igual que el vector pCS2+6Myc digerido y defosforilado y se ligaron ambos ADN para obtener el vector recombinante. Para la selección de colonias transformantes positivas para el vector pCS2+6Myc/mRic-8A, se purificó el ADN plasmidial y se hizo un análisis de digestión con las enzimas EcoRI y XbaI para liberar el inserto (fragmentos esperados de 4347pb y 1593pb) y otro con HindIII que presenta un sitio de corte en el vector y otro en el inserto (fragmentos esperados de 4488pb y 1452pb).

Para la construcción del plásmido pEGFP-C3/mRic-8A se amplificó mRic-8A por PCR desde el plásmido pCS2+6Myc/mRic-8A utilizando los partidores N°771 y N°738. El producto de PCR fue sometido a digestión preparativa con las enzimas EcoRI y SacII y el fragmento fue ligado en el vector pEGFP-C3. Para el reconocimiento de las colonias positivas se realizó digestión analítica al ADN plasmidial purificado, con la enzima BamHI, esperándose un patrón de digestión de dos fragmentos de 5592pb y 719pb.

3.4.2. Generación de plásmidos para el silenciamiento de mRic-8A con shRNAs

Se diseñaron dos shRNAs contra la región codificante de mRic-8A, los que se insertaron en el vector pSingle-tTs-shRNA, el que permite la expresión de los shRNAs en presencia de Doxiciclina. Los oligonucleótidos que contienen los shRNAs poseen sitios de restricción en su forma digerida en los extremos que permiten su inserción en el plásmido: XhoI (TCGAG-) en su extremo 5' y un sitio HindIII (TTCGA-) en el extremo 3' y un sitio EcoRI completo en el *loop* de la horquilla que permite la selección de colonias positivas.

Para construir los vectores se hibridaron 100 ng de cada oligonucleótido con su par complementario (oligonucleótido 746 con 747 y 748 con 749) incubando 30 segundos a 95°C, 2 minutos a 72°C, 2 minutos a 37°C y finalmente 2 minutos a 25°C, en un volumen de 1 µL. Luego, los pares hibridados se ligaron con 100 ng del vector digerido con las enzimas XhoI y HindIII pero sin defosforilar, en 5 µL totales siguiendo el protocolo estandarizado en el laboratorio.

3.4.3. Construcción de plásmidos para edición genómica por el sistema CRISPR/Cas9

Como primer paso se diseñaron tres secuencias guía (sgRNAs) contra tres exones diferentes de mRic-8A. Para ello se obtuvo la secuencia genómica de mRic-8A (Genecode ENSMUSG00000025485.13) desde el *Genome browser* (<https://genome.ucsc.edu/>) y se identificaron los exones sobre ella. Como siguiente paso se identificó el codón de inicio y se buscaron codones ATG dentro de la secuencia codificante que estuvieran en marco de lectura (en caso de haberlos los sgRNAs deben ubicarse río abajo de ellos, sin embargo, es recomendable que la secuencia guía se localice a unos 50pb del codón de inicio para evitar que se logre sintetizar parte de la

proteína funcional). Luego, se utilizó el programa CRISPOR (Haeussler y col., 2016) para encontrar y evaluar los posibles sgRNA; se ingresó en *crispr.tefor.net* y se ingresó de a una por vez la secuencia de los tres primeros exones de mRic-8A, se seleccionó como genoma de referencia “*Mus musculus* – Mouse (reference) – UCSC Dec. 2011 (mm10=C57BL/6J) + SNPs” y como motivo PAM “20bp-NGG – Sp Cas9, SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1”. De la lista de posibles secuencias guía se seleccionó una que tuviera un buen puntaje de especificidad MIT y una alta predicción de eficiencia usando el índice Xu (mientras más cercano a 2 es mejor). Para diseñar los oligonucleótidos y hacer las construcciones en los plásmidos pX330, pX458 y pX459 se siguió el protocolo descrito por Ran y col., 2013 disponible también en <http://www.addgene.org/crispr/zhang/>.

3.5. Técnicas de Cultivo Celular

3.5.1. Lineas celulares

iMEF: Fibroblastos embrionarios de ratón, silvestres inmortalizados. Donados por la Dra. Roxana Pincheira de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Su cultivo se realizó en DMEM alto en glucosa (Gibco) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), 110 mg/mL de piruvato y 2mM L-Glutamina (todos de Hyclone).

NIH3T3: Línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón (ATCC® CRL-1658). Cultivados en DMEM alto en glucosa suplementado con 10% suero de ternero (BCS) y 4mM L-Glutamina.

NSC34: Línea celular murina correspondiente a la fusión de neuroblastoma y células primarias de espina dorsal de ratón enriquecida en motoneuronas (Cashman y col., 1992). Su cultivo se realizó en DMEM alto en glucosa (preparado desde polvo) suplementado con 15% FBS y 4 mM L-Glutamina. Estas células son muy sensibles a cambios de pH e impurezas en suspensión por lo que se cambió el medio de cultivo cada 2 días y al tripsinizarlas se incubó 15 minutos y luego se cambió el medio de

cultivo para deshacerse de las células que no se alcanzaron a adherir en ese tiempo. Para su diferenciación, 16 horas posteriores a la transfección las células fueron cultivadas por 24 horas en medio neurobasal (Invitrogen) en ausencia de suero.

HEK293T: Línea celular embrionaria humana de riñón con características epiteliales. Su cultivo se realizó en DMEM alto en glucosa suplementado con 10% FBS, 2mM L-Glutamina.

MDCK: Línea celular epitelial canina de riñón. Su cultivo se realizó en DMEM alto en glucosa suplementado con 10% FBS, 2mM L-Glutamina.

IIA1.6: Línea celular murina de linfoma B, derivada de la línea celular A20. 3×10^6 células fueron cultivadas en suspensión en 20 mL de medio CLICK (RPMI 1640-Glutamax-I, 10% FBS, 0.1% β -Mercaptoetanol, 2% piruvato de sodio) cada dos días.

* Todas las células se cultivaron en ausencia de antibióticos ya que se observó que ello aumenta significativamente la eficiencia de transfección.

3.5.2. Transfección transitoria

Dependiendo de la línea celular se utilizaron diferentes técnicas y protocolos de transfección, los que fueron estandarizados en este trabajo de tesis para cada tipo celular.

Para las células IIA1.6 se utilizó el sistema *Amaxa Nucleofector* (Lonza). Se utilizaron 2×10^6 células por condición las que luego de lavadas con PBS 1X y centrifugadas a 2000 RPM, se resuspendieron en 100 μ L de *Nucleofector Solution R*, junto con 2 μ g de pEGFP-C3/mRic8A y 2 μ g de LifeAct-Cherry. La suspensión de células se traspasó a una cubeta de electroporación y se utilizó el programa T-016. Posteriormente las células se cultivaron en placas de 60 mm con 2 mL de medio CLICK.

En el caso de las células NIH3T3 se utilizó el sistema de electroporación *Neon* (Invitrogen). Se utilizaron 2×10^6 células por condición las que posterior a un lavado con

PBS 1X y centrifugación a 5000 RPM, se resuspendieron en 100 μ L de *Solución R* (o *Solución T* ya que no se observaron diferencias en la eficiencia de transfección para esta línea celular) junto con 5 μ g del plásmido de interés (si se usa menos ADN es necesario usar un plásmido de relleno como el pBluescript-II-SK(-) para alcanzar mínimo los 5 μ g de ADN, sino se ve afectada la eficiencia de transfección). En el caso de la inhibición de la expresión de mRic-8A por el sistema CRISPR/Cas9 se utilizaron 3 μ g del plásmido del sistema CRISPR (todos de un tamaño de alrededor de 9.5kb) en conjunto con 5 μ g del plásmido pEGFP-C3 (de 4.7kb) para tener una relación equimolar entre ellos y poder seleccionar las células transfectadas. La mezcla de células fue traspasada a una pipeta de electroporación de 100 μ L con cuidado de no aspirar burbujas y ésta se posicionó en la cubeta de electroporación conteniendo 3 mL de *Buffer E2*. El programa utilizado para la transfección fue de 3 pulsos de 1450 V de 10 msec cada uno. Posteriormente las células se cultivaron en una placa de 60 mm con medio DMEM 10% BCS (suplementado además con 5 μ g/mL Doxiciclina en el caso de la transfección de los plásmidos conteniendo los shRNAs contra mRic-8A) y al día siguiente se tripsinizaron y traspasaron las células a una placa de 100 mm. Las células fueron procesadas para los diferentes experimentos 48 horas posteriores a la transfección (a menos que se especifique algo diferente) ya que se observó que tras este tiempo se observa la disminución de la expresión de mRic-8A luego de la transfección con los plásmidos del sistema CRISPR/Cas9, así como la sobre-expresión de las proteínas de interés al utilizar otros plásmidos.

Para la transfección de las iMEF también se utilizó el sistema de electroporación *Neon* siguiendo el protocolo antes descrito, pero en este caso el programa utilizado fue 1 pulso a 1150 V por 35 msec.

Para la transfección de las células MDCK y NSC34 se utilizó *Lipofectamine Reagent 2000* suplementado con el reactivo *Plus* (ambos de Invitrogen). En este caso las células se crecieron en placas de 24 pocillos (100.000 células por pocillo en el caso de las NSC34 o al 60% de confluencia en el caso de las MDCK), que contenían cubreobjetos de 12 mm en su interior. Se mezcló (para cada pocillo) 25 μ L de DMEM sin suero con 1,2 μ L de Lipofectamina y en otro tubo 25 μ L de DMEM sin suero con 400 ng de plásmido de sobre-expresión de Ric-8A y 0,8 μ L de reactivo Plus. Ambos tubos se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se mezclaron e

incubaron por 20 minutos más a la misma temperatura. Pasado este tiempo se agregó la mezcla a las células con 200 μ L de DMEM fresco sin suero, se incubó en la estufa por 4 horas y luego se cambió el medio a DMEM suplementado con 10% FBS. Las células fueron procesadas 24 horas después para realizar inmunocitoquímica o inducir su diferenciación.

3.6. Técnicas de biología celular

3.6.1. Ensayo de cierre de herida

El ensayo de cierre de herida consiste en remover parte de una monocapa de células y evaluar cómo éstas recubren el espacio generado. Durante este trabajo de tesis se utilizaron dos líneas celulares para realizar este ensayo y con cada una de ellas se utilizó un protocolo diferente debido a las diferencias en la viabilidad celular y a los materiales disponibles al momento de la realización de cada experimento.

Para el ensayo de cierre de herida con iMEFs se sembraron 500.000 células previamente transfectadas en placas de cultivo de 6 pocillos marcadas previamente en su parte posterior con una cruz para poder localizar puntos de referencia en el microscopio, en DMEM 10% FBS. El día siguiente se cambió el medio de cultivo a DMEM 1% FBS y se incubó 8 horas en estas condiciones. Posteriormente se removió una franja de células (se hizo una herida) en el centro de la placa utilizando una punta blanca (p10), se lavaron las células con PBS 1X para remover las células en suspensión y se cambió el medio a DMEM sin suero. Se tomaron fotografías correspondientes al tiempo 0 en el microscopio de fluorescencia *Olympus CKX41* acoplado a una cámara *Moticam* (Motic) y luego se cultivaron las células por 16 – 24 horas en la estufa de cultivo. Posterior a ello, se ubicó el mismo punto utilizando la cruz de referencia y se tomaron fotografías correspondientes al tiempo final del ensayo.

En el caso de las células NIH3T3 no fue posible hacer el ensayo en ausencia de suero ya que las células presentaron una alta mortandad antes de terminar el ensayo. Estos ensayos se realizaron en el laboratorio de la Dra. Ana María Lennon-Duménil en la U932 del *Institut Curie-CNRS*, París, Francia y fueron visualizados en el *Cell and Tissue Imaging (PICT-IBiSA)* del mismo instituto miembro del *French National*

Research Infrastructure France-Biolmaging (ANR10-INBS-04). La noche anterior al ensayo se sembraron 500.000 células previamente transfectadas en una placa con fondo de vidrio de 35 mm de diámetro *FluoroDish* (WPI) cubierta con fibronectina 20 ug/mL. El día del ensayo por la noche se realizó una herida en el centro de la placa utilizando una punta amarilla, se lavó con PBS 1X dos veces para remover las células en suspensión y se agregó a la placa DMEM 10% BCS. Las placas de las diferentes condiciones analizadas se dispusieron en la platina móvil de un microscopio invertido de fluorescencia Eclipse Ti-E (Nikon) motorizado, con cámara de incubación a 37°C y 5% CO₂, acoplado a una cámara CoolSNAP HQ (Photometrics), utilizando un objetivo en seco 20X Plan Apo. Se configuró el software *Metamorph* (Molecular Devices) para tomar fotografías cada 5 minutos por 16 horas en campo claro y usando un filtro para GFP (para identificar las células transfectadas), a campos visuales solapados entre sí a modo de poder reconstruir posteriormente la herida completa.

3.6.2. Ensayo de migración en cámara de Boyden

Se recubrieron las cámaras de Boyden (*Transwell Permeable Supports* de 8 µm de tamaño de poro, Costar) con fibronectina. Para ello se ubicaron los insertos invertidos en la tapa de una placa de 24 pocillos (haciéndolos calzar en los círculos dibujados en la tapa) y se colocó sobre cada inserto 100 µL de solución de fibronectina 5 ug/mL. Luego con cuidado se colocó la placa invertida sobre la tapa con los insertos de forma de que éstos calcen en los pocillos y que la gota sobre cada inserto quede aplastada por el fondo de la placa invertida y se incubó a 4°C toda la noche sin abrir la placa. Al día siguiente se retiró la solución de fibronectina y se lavó con PBS 1X dos veces. En cada pocillo de la placa de 24 pocillos anteriormente utilizada se agregaron 600 µL de DMEM sin suero (como control), DMEM 10% BCS, o DMEM sin suero con los diferentes ligandos de GPCRs utilizados como quimioattractantes (50 µM Isoproterenol, 12,5 µM Quinpirrol o 50 µM Carbacol) y sobre los pocillos se posicionaron los insertos previamente recubiertos con fibronectina.

Las células previamente transfectadas se tripsinizaron pero sin usar suero para inactivar la tripsina ya que se debe evitar la presencia de trazas de factores de crecimiento en la suspensión de células. Se lavaron las células con medio sin suero y se agregaron 100.000 células a la cámara superior de cada inserto; las células se

incubaron por dos horas en la estufa de cultivo. Una vez finalizado el ensayo se aspiró el líquido de ambas cámaras y se limpió el interior de cada inserto pasando suavemente una tórula de algodón aplanada contra la mesa para facilitar el contacto con el fondo. Posteriormente, éstos se lavaron dos veces con PBS 1X y se introdujeron en una placa de 24 pocillos conteniendo solución fijadora con Cristal Violeta 1X diluida en NaCl 0,15 M (stock 5X: 0,5% Cristal Violeta en Metanol 100%). Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente tras lo cual los insertos fueron sumergidos en agua destilada 2 o 3 veces para eliminar las gotas remanentes de cristal violeta. Se dejó secar los insertos tras lo cual se procedió a tomar fotografías en el microscopio de fluorescencia *Olympus CKX41* acoplado a una cámara *Moticam* (Motic), para contar las células en la parte inferior del inserto, es decir las células que lograron cruzar completamente la membrana del inserto.

3.6.3. Inmunocitoquímica

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos sin tratar o cubiertos con fibronectina 10 ug/mL y fueron tratadas según se especifica en cada ensayo. Se retiró el medio de cultivo, se lavó tres veces con PBS 1X y las células se fijaron incubando con 100 µL de PFA 4% por 10 minutos (no se debe exceder de este tiempo para evitar la retracción de las protrusiones) a temperatura ambiente. Tras lavar 3 veces con PBS 1X se incubó con Glicina 100 mM por 5 minutos y se volvió a lavar con PBS 1X. Posteriormente se hizo un lavado con solución de bloqueo (PBS 1X, 0,05% Saponina, 0,2% BSA) y se incubó toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Se retiraron los anticuerpos primarios, se lavó 5 veces con PBS 1X y una vez con solución de bloqueo y se incubó dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo.

Finalmente se lavó dos veces con PBS 1X, una vez con solución de bloqueo y dos veces más con PBS 1X, para finalmente hacer un lavado con agua destilada antes de proceder a montar en medio de montaje Dako (Agilent) o DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech).

3.6.4. Microscopía confocal en tiempo real

Para la evaluación de la localización de Ric-8A durante la migración, se plaquearon 150.000 células NIH3T3 previamente transfectadas con el plásmido pEGFP-C3/mRic-8A en un *Fluorodish* de 35 mm (WPI) cubierto con fibronectina 10 ug/mL. Al día siguiente se hizo una herida usando una punta blanca (p10), se lavó dos veces con PBS 1X para remover las células en suspensión y se incubaron las células 1,5 horas en la estufa de cultivo para permitir la migración de las células. Las placas se dispusieron en una cámara de incubación a 37°C y 5% CO₂ en un microscopio confocal Zeiss LSM780 (Centro de microscopía avanzada CMA Bío-Bío, Universidad de Concepción) y se tomaron fotografías cada 30 segundos por 10 minutos a células fluorescentes que se encuentren en el frente de migración, usando un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil.

3.6.5. Microscopía TIRF

Para la visualización de la formación y desensamble de los haces de actina se utilizó microscopía TIRF. Para ello se co-transfectaron células NIH3T3 con 5 ug del plásmido LifeAct-GFP y 15 ug de plásmido pD1321-Apuro/mRic8Asg1 o 15 ug del plásmido pCS2+6Myc/mRic-8A. Al momento de transfectar se sembraron 150.000 células en *Fluorodishes* de 35 mm (WPI) cubiertos con Fibronectina 10 ug/mL y el resto de las células se sembraron como se especifica en el protocolo de transfección, para analizar los niveles de expresión de mRic-8A por *Western Blot*. Al día siguiente las células fluorescentes se observaron utilizando microscopía TIRF, en un microscopio invertido Eclipse Ti-E (Nikon) con cámara de temperatura a 37°C y 5% CO₂ acoplado a una cámara EMCCD Evolve (Photometrics) usando un objetivo 100X CFI Apo TIRF oil 1.49 y excitando a 405 nm con un láser de 100 mW de potencia, del *Nikon Imaging Centre del Institut Curie-CNRS*, miembro del *French National Research Infrastructure France-Biolmaging (ANR10-INSB-04)*. Se tomaron fotografías cada 1 segundo por 5 minutos para analizar la formación y desensamble de los haces de actina en el tiempo.

3.6.6. Sinapsis Inmune

Para inducir la activación de los linfocitos B y la formación de la sinapsis inmune es necesario que éstos se pongan en contacto con un antígeno. Para ello, se

recubrieron Fluorodishes de 35 mm (WPI) con la porción F(ab')₂ de IgG de cabra contra ratón (MP Biomedicals), poniendo sobre ellos 10 µL de PBS 1X conteniendo 10 ug/mL de IgG y 0,5 ug/mL de anticuerpo anti CD45R/B220 (BD Pharmingen) y sobre la gota se ubicó un cubreobjetos de 12 mm. Se incubó toda la noche a 4°C tras lo cual se lavó tres veces con PBS 1X.

Se tomaron 50.000 células co-transfectadas con los plásmidos pEGFP-C3/mRic-8A y LifeAct-Cherry y se sembraron sobre los Fluorodishes (WPI) previamente recubiertos con IgG y se dispusieron de inmediato en la cámara de incubación a 37°C y 5% CO₂ en un microscopio confocal invertido Leica TCS SP8 MP de la U932 del *Institut Curie-CNRS* usando un objetivo HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL. Se tomaron fotografías cada 30 segundos por 15 minutos del plano de contacto de la célula con la superficie de la placa para visualizar la localización de actina y Ric-8A durante la formación de la sinapsis inmune.

3.6.7. Confección y uso de micropatrones

Se imprimieron micropatrones en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro según las instrucciones de Nicolas Carpi de la UMR 144 del *Institut Curie-CNRS* las que se detallan en Azioune y col., 2010.

Como primer paso se procedió a lavar los cubreobjetos, asegurándose de que no quedaran pelusas o partículas de polvo sobre ellos. Para ello, los cubreobjetos fueron posicionados en un soporte de cerámica (parecido a un secador de platos pequeño) de modo que no estuvieran en contacto entre sí y el soporte con los cubreobjetos en él fue introducido en un vaso precipitado lleno con etanol 70%. El vaso precipitado fue introducido en un baño de agua y se sonicaron los cubreobjetos por 5 minutos. Posteriormente se secaron los cubreobjetos dentro del mismo soporte con ayuda de una pistola de aire.

Una vez limpios y secos los cubreobjetos, se procedió a activar la superficie de éstos. Para ello, se introdujo el soporte con los cubreobjetos a un *Plasma Cleaner PDC-32G* (Harrick) y se trató con plasma de aire por 30 segundos a 300 mTorr (la activación también puede hacerse tratando los cubreobjetos con luz UV de λ menor a 200 nm por 5 minutos). Posteriormente se recubrió un lado de los cubreobjetos (los que tendrán el patrón) con PLL-g-PEG (Surface Solutions) 0,1 mg/mL en 10 mM

HEPES pH 7.4 posicionando cada cubreobjeto sobre una gota de 15 μL de la solución en una cámara húmeda y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación se lavó dos veces con PBS 1X y una vez con agua destilada y se dejaron secar completamente sobre una toalla de papel absorbente cubierta por una placa para evitar el polvo, o se almacenaron en PBS 1X para su tratamiento posterior.

Para el estampado de los micropatrones se utilizó una fotomáscara de cuarzo sintético (Toppan) (facilitada por el Dr. Philippe Benaroch de la U932 del *Institut Curie-CNRS*) con diseños de ballesta y de triángulo de 50 μm de alto (la forma de los patrones incluidos en la fotomáscara se muestra en la *Figura 11* de este trabajo) y con una separación de 60 μm entre figuras. Se limpió el lado café de la máscara con agua destilada y dos veces con etanol, para luego secarla con un papel suave. Luego se pusieron de a uno los cubreobjetos sobre la máscara con la cara cubierta con PLL-g-PEG en contacto con ella (hacia abajo). Para ello se puso una gota de 0,7 μL de agua destilada sobre la máscara, se ubicó un cubreobjetos sobre ella y se presionó con la parte posterior de una punta amarilla para desplazar el agua y que éste quede adherido a la máscara (se forman anillos de colores en los cubreobjetos cuando están adheridos a la máscara). Se introdujo la fotomáscara en un *UVO Cleaner* (Jelight) con el lado plateado hacia arriba (en contacto con la luz) y se expuso a luz UV de baja longitud de onda por 10 minutos. Con este procedimiento se destruyó el PEG que recubría los cubreobjetos, pero sólo en los lugares por donde pasa la luz a través de la máscara, por lo que con este procedimiento quedaron los cubreobjetos estampados. Para retirar los cubreobjetos de la máscara se agregó una gota de agua destilada por el costado de cada cubreobjeto hasta que éste flotó, se retiró con una pinza y se escurrió el agua sobre una toalla de papel. Los cubreobjetos se almacenaron en una placa de 12 pocillos separados por trozos de papel absorbente a 4°C, con cuidado de no confundir el lado estampado.

Posteriormente los patrones fueron recubiertos con el sustrato de adhesión. Para ello, se pusieron los cubreobjetos con la cara estampada hacia abajo, sobre 10 μL de una solución que contiene fibronectina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y fibrinógeno-Alexa-488 (Invitrogen) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua destilada y se incubó 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se lavaron los cubreobjetos con PBS 1X dos veces, cuidando de que nunca queden completamente secos. Para verificar que los patrones quedaron correctamente

estampados y cubiertos de fibronectina se observaron los cubreobjetos en un microscopio confocal.

Finalmente se procedió a sembrar las células sobre los micropatrones. Para ello, se confeccionó una cámara húmeda en una placa petri de 14 cm invertida, poniendo en la tapa papel absorbente húmedo y sobre él un trozo de parafilm que se presionó sobre una placa de 24 pocillos para marcar el dibujo de los pocillos en él. Se colocaron los cubreobjetos sobre el parafilm con los micropatrones de fibronectina mirando hacia arriba y con una gota de DMEM sin suero sobre ellos, para posteriormente tapar la cámara húmeda con el fondo de la placa invertido e incubar en la estufa de cultivo mientras se procedió con la preparación de las células. Se tripsinizaron las células NIH3T3 que estaban a un 50% de confluencia y se resuspendieron en DMEM sin suero. Luego se aspiró el medio que estaba sobre los patrones y se sembraron 10.000 células por cubreobjetos en un volumen de 100 μ L en forma de gotas. Se incubó en la estufa de cultivo por 10 minutos y luego se removieron las células que no se adhirieron en ese tiempo aspirando el medio y lavando suavemente con DMEM sin suero una vez. Finalmente se agregaron 100 μ L de DMEM sin suero a cada cubreobjetos y se incubó por 4 horas en la estufa de cultivo, tiempo tras el cual las células fueron procesadas para realizar inmunocitoquímica.

3.6.8. Medición de la actividad de RhoA y Rac1 por FRET

Se co-transfectaron células NIH3T3 con 5 ug del plásmido que contiene el biosensor para medir la actividad de RhoA (Pertz y col., 2006) o Rac1, junto con 3 ug del plásmido para inhibir la expresión de mRic-8A, o 3 ug de un plásmido de relleno como control y se procedió de igual forma a como se describió en la sección 2.3.4, realizando una herida para inducir la migración celular. Las células fueron visualizadas *in vivo* utilizando un microscopio confocal espectral LSM780 (Zeiss) en el Centro de Microscopía Avanzada CMA Bío-Bío de la Universidad de Concepción y el método utilizado para medir la eficiencia FRET fue el de *Sensitized emission*, que consiste en medir la emisión de un aceptor FRET tras la excitación sólo del fluoróforo dador. Para excitar los fluoróforos se usaron secuencialmente láseres de 405 nm (excitación de CFP) y 514 nm (excitación de YFP) y se registraron las emisiones de CFP (464 – 490 nm) e YFP (525 – 595 nm). También se registraron imágenes bajo estos mismos

parámetros de células que sobre-expresan sólo CFP y sólo YFP para ser usadas como control.

3.6.9. Ensayo de adhesión celular

Se sembraron 15.000 células NIH3T3 control o carentes de Ric-8A, que además expresaban GFP, sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina 20 ug/mL dispuestos en una placa de 24 pocillos y se agregaron 200 μ L de DMEM 10% BCS. Las células se incubaron por 30 minutos en la estufa de cultivo tiempo tras el cual se retiró el medio, se lavó suavemente con PBS 1X y se fijaron las células con PFA 4%. Se lavó tres veces con PBS 1X y se procedió a contar el número de células por campo en el microscopio de fluorescencia *Olympus CKX41* acoplado a una cámara *Moticam* (Motic).

3.7. **Técnicas de Biología Molecular**

3.7.1. Inmunoprecipitación desde lisados totales

Se lisaron células NIH3T3 que sobre-expresan Myc-mRic-8A en Buffer de lisis (PBS 1X, 0,5% Igepal, 1X cocktail Inhibidor de Proteasas, 1mM PMSF) y se cuantificaron las proteínas totales en la fase soluble del lisado usando el reactivo *Bio-rad Protein assay* (Biorad). Los ensayos de inmunoprecipitación convencionales se realizaron a partir de 500 ug de proteína total (lo que equivale a una placa de células NIH3T3 crecidas al 60% de confluencia) y en un volumen final de 500 μ L. Se realizó un preaclorado de los lisados incubándolos una hora y media en rotación a 4°C con 20 μ L de resina Proteína A – Agarosa. El lisado preaclorado se incubó con 500 ng de anticuerpo anti c-Myc unido covalentemente a una resina de agarosa (sc-40AC, Santa Cruz Biotechnology) por 1,5 horas a 4°C y con rotación. En paralelo se incubó la misma cantidad de lisado preaclorado con 500 ng de IgG normal de ratón, incubado previamente con 20 μ L de proteína A – Agarosa, como control de inmunoprecipitación. Posteriormente se eliminó el sobrenadante de las incubaciones y las resinas se lavaron 5 veces con buffer de lavado (buffer de lisis sin inhibidores de proteasas). Finalmente, éstas se cargaron en un gel de poliacrilamida al 8% para ser analizadas por SDS-

PAGE o Western Blot, o se trataron para eluir los complejos proteicos. Para la elusión se incubó la resina con 50 μ L de SDS 1% por 1 hora a 37 °C, tiempo tras el cual se separó la resina del eluato y se analizaron ambas fracciones por SDS-PAGE o Western Blot.

3.7.2. Identificación de los interactores de mRic-8A por espectrometría de masas

Se sembraron células NIH3T3 que sobre-expresan Myc-mRic-8A o c-Myc (como control) sobre placas de cultivo cubiertas con fibronectina 5 μ g/mL y se dejaron crecer hasta un 60% de confluencia. Se inmunoprecipitó c-Myc o Myc-mRic-8A siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior, pero utilizando 2 mg de proteína total de lisado por condición y 2 μ g de anticuerpo, en un volumen final de 1 mL. Además, se realizaron réplicas de las inmunoprecipitaciones ya que una se usó para ser analizada por espectrometría de masas y otra se utilizó para ser analizada por SDS-PAGE y teñida con azul de Coomassie para verificar que se observaran bandas correspondientes a las proteínas inmunoprecipitadas.

Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo se lavaron las resinas 4 veces con 500 μ L de buffer de lavado. Posteriormente la resina se resuspendió en 300 μ L de buffer de lavado y se traspasó el contenido a una columna con un filtro de celulosa acetato (*Pierce Spin Cups – Cellulose Acetate Filter*, Thermo). Se centrifugó para eliminar el líquido y se realizó la elusión de los complejos proteicos con 50 μ L de SDS 1% dentro de la columna. Finalmente se centrifugó para recuperar los complejos proteicos eluidos sin rastros de resina. Las muestras fueron enviadas a la plataforma de proteómica del GIGA de la Université de Liège en Bélgica y fueron analizadas por LC/ESI-MS/MS para identificar las proteínas (de ratón) presentes en cada una de las muestras.

Como se trabajó para un análisis por espectrometría de masas el material utilizado era nuevo, las soluciones fueron filtradas y se trabajó en un lugar aislado de partículas de polvo y corrientes de aire para evitar la contaminación de las muestras con proteínas ambientales.

3.8. Análisis y procesamiento de imágenes

Una vez obtenidos los resultados de los diferentes ensayos se procedió a su procesamiento y análisis utilizando diferentes métodos computacionales. Para el procesamiento y análisis de imágenes se utilizó el programa Fiji (Schindelin y col., 2012) ya sea las herramientas básicas del programa, Macros confeccionados durante la realización de esta tesis para ser corridos en este programa, o *plug-ins* disponibles para ser usados en él. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron en Prism 7.0 (GraphPad).

3.8.1. Obtención de la velocidad de cobertura de herida de células MEFs

Para la cuantificación de la velocidad de cobertura se tomaron las fotografías obtenidas del tiempo 0 y tiempo final del ensayo y se dibujó a mano alzada el límite del área libre de células y se midió el área de ésta (en el caso de haber varios espacios se sumó el valor de las áreas independientes) y se calculó la velocidad de cobertura de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de Cobertura} = \frac{A_{iR} - A_{fR}}{t}$$

donde A_{iR} corresponde al área inicial de la herida (en pixel^2) en la condición de sobreexpresión de Ric-8A, A_{fR} al área final de la herida de la misma condición y t el tiempo (en horas) del ensayo. Como los diferentes ensayos se hicieron en distintos tiempos, los valores obtenidos se normalizaron contra el valor de velocidad de cobertura promedio para el control (células transfectadas con GFP) de cada ensayo.

3.8.2. Obtención de la velocidad de cobertura de herida de células NIH3T3

En el caso de las células NIH3T3, además del análisis de los resultados, fue necesario utilizar software para el procesamiento previo del material en bruto obtenido. El procesamiento y análisis realizado se detalla a continuación.

- i. Las imágenes obtenidas fueron guardadas en carpetas correspondientes a la condición a la que corresponden y con nombres de acuerdo con su posición, utilizando el siguiente Macro:

```
#MACRO SAVETIF
dir=getDirectory("Choose the input folder");
#Choose the folder were the RawData is saved
dirOut=getDirectory("Choose the output folder");
#choose one folder to save images of one condition
#Numbers represent the stage position. In this example stages 1 to 24 correspond to 1
plate of WT cells
for(i=1;i<25;i++) {
run("Image Sequence...", "open="+dir+" file=w1Trans_s"+i+"_ sort");
if(i<10) {
saveAs("Tiff", dirOut+"pos0"+i+".tif");
} else {
saveAs("Tiff", dirOut+"pos"+i+".tif");
}
run("Close");
}
```

- ii. Las imágenes contenidas en una carpeta, es decir correspondientes a una herida de una condición, se fusionaron utilizando el *plug-in* “*Grid/Collection Stitching*” disponible en Fiji (Preibisch y col., 2009) para generar un solo video de la herida completa.

- iii. Se midió el área de cada herida a cada tiempo utilizando el siguiente Macro:

```
run("Set Measurements...", "area redirect=None decimal=3");
resetMinAndMax();
run("8-bit");
run("Variance...", "radius=3 stack");
run("Auto Threshold", "method=Yen white stack use_stack_histogram");
#verify the correct threshold method for each set of images
run("Dilate", "stack");
run("Fill Holes", "stack");
run("Invert", "stack");
run("Analyze Particles...", "size=3000-Infinity clear add stack");
```

- iv. Se obtuvo la velocidad de cobertura de la herida para cada condición analizada. Para ello se graficó para cada ensayo el tiempo (en minutos) vs el área de la herida (en μm^2), obteniéndose gráficos como el que se muestra en el ejemplo de la *Figura 4*. De estos gráficos se recuperó el valor de la pendiente de zona lineal de la curva

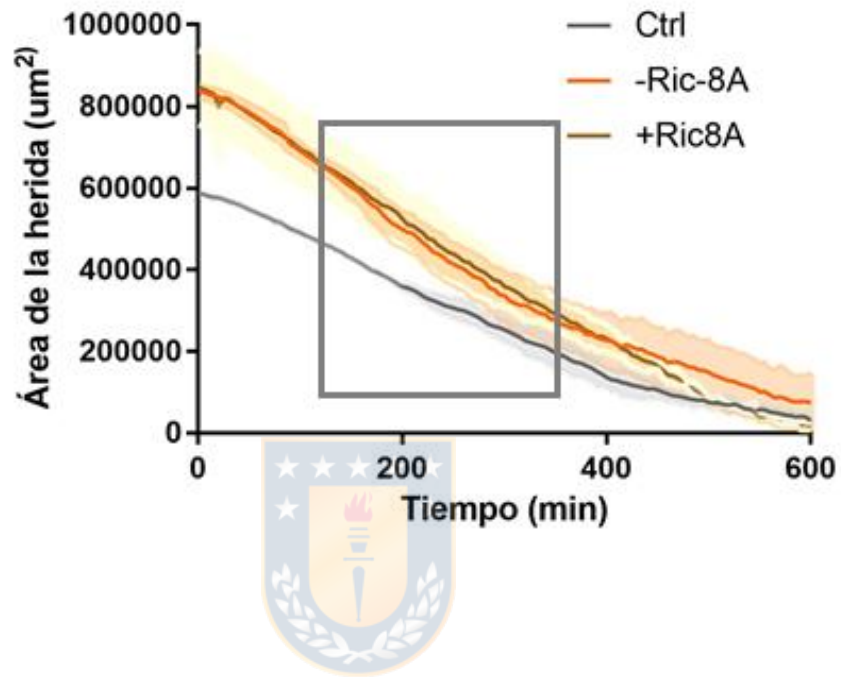


Figura 4. *Obtención de la velocidad de cobertura de herida para células NIH3T3.*

El gráfico muestra el área de la herida a los diferentes tiempos, para las diferentes condiciones analizadas en un ensayo de cierre de herida con células NIH3T3 (ensayo 20170720). Las líneas oscuras representan el promedio entre dos heridas analizadas para cada condición y las zonas claras la desviación estándar. El recuadro gris indica el rango de velocidad utilizado en los estudios, rango que corresponde a la migración celular con una velocidad constante.

obtenida, valor que corresponde a la velocidad de cobertura en $\mu\text{m}^2/\text{min}$. Y para poder comparar los resultados con los realizados en células MEFs, los valores obtenidos se normalizaron contra los valores de velocidad de cobertura de las células control de cada ensayo.

3.8.3. Análisis de la migración de células independientes

Para estos análisis se utilizaron las mismas imágenes obtenidas de los ensayos de cierre de herida con células NIH3T3. Se confeccionaron videos correspondientes a un solo lado de la herida y tomando imágenes cada 25 minutos, de tal modo que los videos tienen sólo 35 puntos de tiempo. Estos videos fueron utilizados para hacer el seguimiento de la mayor cantidad de células fluorescentes que no se dividieran (no se observaron diferencias en el número de células en división entre las diferentes condiciones analizadas) y que al tiempo 0 se encontraran en el borde de la herida. Para este seguimiento se utilizó el *plug-in Manual Tracking with Trackmate* (Tinevez y col., 2017). A través del uso de este *plug-in* se obtiene un archivo de extensión “.xml” que contiene la información de la posición de cada célula (x,y,z) en cada tiempo, pero para el análisis de los datos obtenidos al usar *Trackmate* fue necesario desarrollar un programa informático para ser utilizado en Matlab (*The MathWorks Inc.*). A través del uso del programa expuesto más abajo se pudo obtener los valores de distancia neta recorrida, distancia total, distancia máxima, velocidad promedio, velocidad máxima y direccionalidad para cada célula.

```
% Track_Analysis
%este programa esta diseñado para el analisis de las mediciones realizadas con Trackmate en
FIJI
%se deben crear los archivos compatibles con matlab, a través de la función "export tracks to
XML file" en la seccion "Select an action" de trackmate (no sirve el archivo .xml generado
automaticamente por trackmate)
%para poder correr el programa se debe instalar previamente el archivo
"importtrackmatetracks.m" y seguir las instrucciones dadas en
https://imagej.net/Analyzing_TrackMate_results_with_MATLAB

%tambien se debe instalar el MSD analyzer siguiendo las instrucciones de
http://tinevez.github.io/msdanalyzer/

% Seleccionar archivo input de tracks
[archivo,ruta]=uigetfile('*.*xml','Seleccionar un archivo de tracks');

%Importar datos de trackmate file
[tracks,metadata] = importTrackMateTracks (archivo, true, true);
N = size (tracks, 1);

%Inicar MSD Analyzer
```

```

ma = msdalyzer(2, metadata.spaceUnits, metadata.timeUnits);

% Añadir tracks al MSD Analyzer
ma = ma.addAll (tracks);
figure ('Name', 'Tracks')
ma.plotTracks % Grafico de Tracks

% Calculo del Mean Square Displacement de cada track
ma = ma.computeMSD;
ma.msd;

% grafico del MSD promedio
figure ('Name', 'Mean MSD')
ma.plotMeanMSD(gca, true)
mmsd = ma.getMeanMSD;
t = mmsd(:,1);
x = mmsd(:,2);
dx = mmsd(:,3) ./ sqrt(mmsd(:,4));
errorbar(t, x, dx, 'k')

%Calculo del coeficiente de difusion de la curva MSD promedio
[fo, gof] = ma.fitMeanMSD;
plot(fo)
ma.labelPlotMSD;
legend off

% Calculo del coeficiente de difusion promedio de todas las curvas MSD
ma = ma.fitMSD;

% Calculo del coeficiente de difusion de las rectas R2 > 0.8
good_enough_fit = ma.lfit.r2fit > 0.8;
Dmean = mean(ma.lfit.a(good_enough_fit)) / 2 / ma.n_dim;
Dstd = std(ma.lfit.a(good_enough_fit)) / 2 / ma.n_dim;
fprintf('Estimacion del coeficiente de difusion a partir de la regresion lineal de las curvas
de MSD:\n')
fprintf('D = %.3g +- %.3g (mean +- std, N = %d)\n', Dmean, Dstd, sum(good_enough_fit));

%calculo para cada track
d_tot = zeros(N,1);
Mean_Vel = zeros(N,1);
Max_vel = zeros(N,1);
d_Euc = zeros(N,1);
D_max = zeros(N,1);

for i=1:N %crear matriz con coordenadas x y otra con coordenadas y
    X = tracks {i,1}(:,2);
    Y = tracks {i,1}(:,3);

    % Calculo de la distancia total recorrida
    d = hypot(diff(X), diff(Y));
    d_tot(i,1) = sum(d);
    % calculo de velocidades
    Vel = (d ./ metadata.frameInterval).*60;
    Mean_Vel(i,1) = mean(Vel);
    Max_vel(i,1) = max(Vel);

    % calculo de la distancia neta recorrida
    Xeuc(1,1) = tracks {i,1}(1,2);
    Xeuc(2,1) = tracks {i,1}(end,2);
    Yeuc(1,1) = tracks {i,1}(1,3);
    Yeuc(2,1) = tracks {i,1}(end,3);
    d_Euc(i,1) = hypot(diff(Xeuc), diff(Yeuc));

    % calculo de la distancia maxima recorrida
    Dmax = zeros(length(tracks{i,1})-1,1);
    for j=1:length(tracks{i,1})
        DmaxX(1,1) = X(1,1);
        DmaxX(2,1) = X(j,1);
        DmaxY(1,1) = Y(1,1);
        DmaxY(2,1) = Y(j,1);
        Dmax(j,1) = hypot(diff(DmaxX), diff(DmaxY));
    end
end

```

```

end
D_max(i,1) = max(Dmax);

clear d
clear X
clear Y
clear Xeuc
clear Yeuc
clear DmaxX
clear DmaxY
clear Dmax
end

RESULTS = [d_Euc, d_tot, d_Euc./d_tot, D_max, Mean_Vel, Max_vel];

warning('off', 'MATLAB:table:RowsAddedExistingVars');
Results = table(d_Euc, d_tot, d_Euc ./ d_tot, D_max, Mean_Vel, Max_vel, 'VariableNames',
{'Distancia_neta' 'Distancia_total' 'Direccionalidad' 'Distancia_maxima' 'Velocidad_promedio'
'Velocidad_maxima'});
Results.Distancia_neta(21) = mean(d_Euc);
Results.Distancia_total(21) = mean(d_tot);
Results.Direccionalidad(21) = mean(d_Euc ./ d_tot);
Results.Distancia_maxima(21) = mean(D_max);
Results.Velocidad_promedio(21) = mean(Mean_Vel);
Results.Velocidad_maxima(21) = mean(Max_vel);
Results.Distancia_neta(22) = std(d_Euc);
Results.Distancia_total(22) = std(d_tot);
Results.Direccionalidad(22) = std(d_Euc ./ d_tot);
Results.Distancia_maxima(22) = std(D_max);
Results.Velocidad_promedio(22) = std(Mean_Vel);
Results.Velocidad_maxima(22) = std(Max_vel);

clear i
clear j
clear N
warning('on', 'MATLAB:table:RowsAddedExistingVars');

fprintf('\n')
fprintf('Los resultados del análisis se resumen en la siguiente tabla:\n')
fprintf('Las ultimas dos filas corresponden al promedio y desviacion estandar\n')
fprintf('\n')

disp(Results)

```

3.8.4. Cuantificación de los haces de actina en células NIH3T3

Se analizaron las imágenes obtenidas por microscopía TIRF de las células NIH3T3 que sobre-expresan LifeAct-GFP y se midió la longitud y número de los haces de actina en el borde de la protrusión al tiempo 0 y al tiempo final del ensayo. Para la cuantificación del largo de los haces de actina se promedió el tamaño medido de todos los haces de todas las células correspondientes a una condición y para la cuantificación del número de haces de actina polimerizados o desensamblados por minutos se promedió el valor obtenido según la siguiente fórmula:

$$\text{Haces de Actina/minuto} = \frac{|H_f - H_i|}{t}$$

donde H_f es el número de haces de actina contabilizados en el tiempo 0, H_i el número de haces de actina en el tiempo final y t el tiempo del ensayo en minutos.

3.8.5. Deconvolución de imágenes

Se tomaron fotografías de los ensayos de inmunocitoquímica en un microscopio confocal invertido Leica TCS SP8 MP de la U932 del *Institut Curie-CNRS* usando un objetivo HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL. Se enfocó la imagen deseada y se tomaron por lo menos tres fotografías por encima y otras tres por debajo del punto enfocado, con una distancia de 0.1 μm entre ellas y usando el promedio de tres escaneos por línea para generarlas. Luego las imágenes fueron exportadas directamente desde el programa *Las X* (Leica Microsystems) al software *Huygens Essential* (Scientific Volume Imaging) para realizar la deconvolución de las imágenes usando el modo *Wizard* del programa. Las imágenes deconvolucionadas fueron exportadas nuevamente al programa *Las X* para ser guardadas y procesadas.

3.8.6. Cuantificación de la actividad de RhoA y Rac1 por FRET

Una vez obtenidas las imágenes se utilizó el *plug-in* PixFRET (Feige y col., 2005) para el cálculo de la eficiencia FRET siguiendo las instrucciones de los creadores disponibles en https://imagej.net/_images/4/4f/PixFRET_userguide.pdf. En resumen, se debió confeccionar tres *stacks* de imágenes para calcular los valores de *Bleed-through* del canal dador y del aceptor y para calcular la eficiencia FRET. El *stack* FRET debe contener tres canales: canal FRET (excitación del dador, detección del aceptor), canal Dador (excitación y detección del dador) y canal Aceptor (excitación y detección del aceptor). Y los *stacks* control deben contener imágenes que expresen sólo el dador o sólo el aceptor y tener dos canales, uno en la configuración FRET y el otro en la configuración Dador o Aceptor según corresponda. Estos *stacks* se abrieron en Fiji y se abrió el *plug-in* PixFRET y se siguieron las instrucciones del cuadro de diálogo hasta obtener las imágenes con la representación de los valores de la eficiencia FRET de cada célula evaluada.

3.8.7. Análisis de la co-localización de proteínas

Para analizar la co-localización de proteínas se abrieron en Fiji las dos imágenes de una misma célula mostrando la fluorescencia detectada para cada una de las proteínas analizadas. Luego, se utilizó el *plug-in* JACoP (Bolte & Cordelières, 2006) para obtener los indicadores de co-localización: coeficiente de Pearson, coeficiente de sobreposición y los coeficientes M1 y M2. Esto se hizo además con imágenes de cada una de las diferentes regiones celulares analizadas.



4. RESULTADOS

Objetivo 1: Caracterizar la función de Ric-8A en la migración celular.

El efecto de la pérdida de función de Ric-8A sobre la migración celular había sido observado sólo en células de la cresta neural craneal (un tejido embrionario transitorio) de *Xenopus*. Además, el silenciamiento de esta proteína altera diferentes vías de señalización en distintos tipos celulares y se desconoce si existe un único mecanismo molecular por el que Ric-8A ejerce su función en la migración celular en diferentes organismos. Por ello, como punto de partida de este estudio se procedió a caracterizar el efecto del silenciamiento y de la sobre-expresión de Ric-8A en células de mamíferos, con el fin de analizar si el comportamiento observado anteriormente se replica y conocer los diferentes procesos celulares que se ven afectados al variar la expresión de esta proteína. Como modelo de estudio se seleccionaron fibroblastos embrionarios de ratón debido a su alta capacidad migratoria y al gran tamaño de las protrusiones que forman, lo que facilitó la visualización de este tipo de estructuras durante su migración. Específicamente se utilizaron células MEF y NIH3T3, líneas celulares de origen murino, por lo que fue necesario obtener la secuencia codificante de Ric-8A desde cerebro de ratón para clonarla en un plásmido de expresión eucarionte, para poder realizar los ensayos de sobre-expresión de esta proteína. De igual forma, fue necesario el diseño de estrategias para silenciar mRic-8A, para lo que se usaron tanto shRNAs como el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9.

4.1 Construcción de los plásmidos de sobre-expresión y silenciamiento de mRic-8A

4.1.1 Clonamiento de mRic-8A desde cerebro de ratón

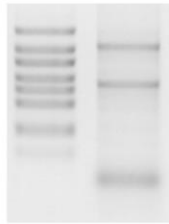
El tejido utilizado para extraer el ARNm de mRic-8A fue cuerpo estriado de cerebro de ratón, debido a que en este tejido también se expresa el parálogo Ric-8B, cuya expresión es más restringida que la de Ric-8A; ambos ADN fueron clonados de forma paralela en el vector de expresión eucarionte pCS2+6Myc. Se purificó el ARN total de

este tejido (*Figura 5a*) y luego se hizo RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para obtener el ADN copia de ambos parálogos (*Figura 5b*). Una vez obtenido éste, mRic-8A fue ligado en el vector pCR-Blunt-II-TOPO utilizando los sitios romos generados en la PCR y la topoisomerasa que incluye el mismo vector. Posteriormente, se obtuvo mRic-8A desde este plásmido de paso mediante digestión con EcoRI y XbaI y se ligó en el vector de expresión eucarionte pCS2+6Myc, con el propósito de poder expresar la proteína en fusión a seis repeticiones del epítipo c-Myc para facilitar el reconocimiento de la proteína y para la realización de los posteriores ensayos de inmunoprecipitación (*Figura 5 c-e*). Una vez obtenido el plásmido recombinante pCS2+6Myc/mRic-8A, este fue transfectado en células NIH3T3 para verificar que la proteína 6Myc-mRic-8A se expresa correctamente mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo contra Ric-8A (*Figura 5f*, primer carril). Los resultados corroboran la sobreexpresión de Ric-8A, proteína que se presenta como una banda inmunopositiva intensa con un tamaño aparente de 90 kDa. Además se observó la banda correspondiente a la proteína endógena de los 72 kDa (la tercera banda de menor tamaño corresponde a α tubulina que se utiliza como control de carga).

4.1.2 Silenciamiento de mRic-8A utilizando dos shRNAs

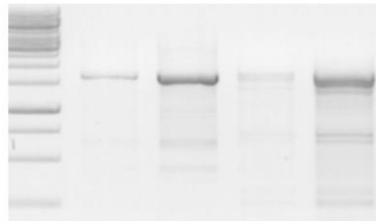
De igual forma, para llevar a cabo los ensayos de pérdida de función fue necesario silenciar la expresión de mRic-8A. En primera instancia se diseñaron dos shRNAs: shmRic8A(322-342) que hibrida con el tercer exón de mRic-8A y shmRic8A(704-723) que es complementario con la región terminal de este mismo exón. Los shRNAs se clonaron en el vector pSingle-tTS-shRNA, el que permite la expresión inducible, en respuesta a doxiciclina, de los shRNAs en células eucariontes. Se evaluó la efectividad de los shRNAs transfectando células NIH3T3 con los plásmidos construidos e induciendo la expresión de los shRNAs con doxiciclina, encontrándose que ninguno de los shRNAs evaluados disminuye la expresión de mRic-8A de forma eficiente (*Figura 5f*). Al comparar las células transfectadas con el plásmido que contiene el shmRic8A(322-342) con las células transfectadas con el plásmido que codifica para un shRNA control, encontramos que no existe una disminución en el nivel de expresión de mRic-8A. Por el contrario, en estas células los niveles de expresión de mRic-8A son un 30% superior que en las células control. En cambio, las células tratadas con el

A) ARN Total



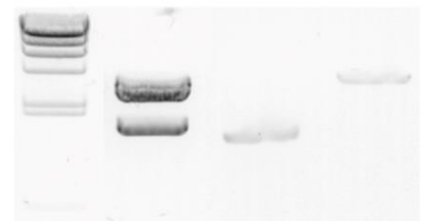
St ARN

B) ADNc de mRic-8A y mRic-8B



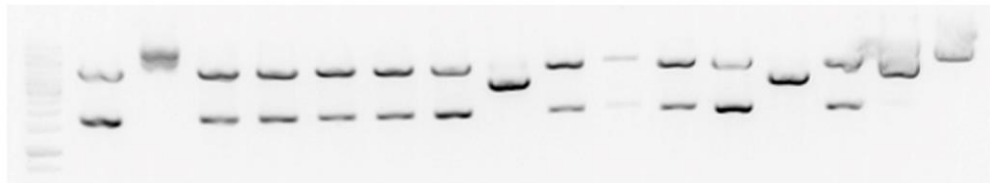
St 1uL 5uL 1uL 5uL
mRic-8A mRic-8B

C) Purificación de mRic-8A y pCS2+6Myc



St Dig Ric-8A Vector
TOPO

D) Identificación de colonias positivas con EcoRI y XbaI



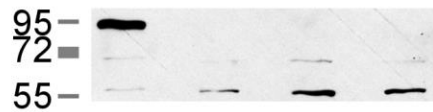
ST 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 VR SD

E) Identificación de colonias positivas con HindIII



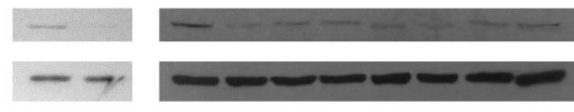
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 ST VR SD

F) Sobre-expresión y silenciamiento de mRic-8A



11,7 1 1,3 ,97
Myc sh sh sh
Ric8A Ctrl 322 704

G) Deleción de mRic-8A usando tres sgRNAs



1 ,23 1 ,33 ,39 ,49 ,22 ,24 ,53 ,54
Wt s1 - s1 s2 s3 s1 s2 s3 s1
pD1321 X330 X458 X459

Figura 5. **Clonamiento, sobre-expresión y silenciamiento de mRic-8A.**

A) ARN total. Se extrajo el ARN total de una muestra de cuerpo estriado de ratón y se analizó la integridad de éste en un gel de agarosa. (Carril 1: St Riboruler, Carril 2: 530ng de ARN total). **B) ADNc de mRic-8A y mRic-8B.** Se hizo ADN copia a partir del ARN total extraído, utilizando partidores específicos para mRic-8A y mRic-8B. Luego se hizo PCR para amplificar tanto mRic-8A como mRic-8B a partir de los ADN copia obtenidos, los que se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa. (Carril 1: St Generuler 1kb Fermentas, Carril 2 y 3: PCR mRic-8A, Carril 4 y 5: PCR mRic-8B). **C) Purificación de mRic-8A y pCS2+6Myc.** Los productos de PCR obtenidos fueron clonados en el vector pCR-Blunt-II-TOPO y luego este vector fue digerido con las enzimas EcoRI y XbaI para liberar mRic-8A. También se linealizó con las mismas enzimas el vector pCS2+6Myc. Ambos productos digeridos fueron purificados desde gel de agarosa y cuantificados para posteriormente ser ligados. (Carril 1: St λ /HindIII, Carril 2: Digestión de pCR-Blunt-II-TOPO/mRic-8A con EcoRI y XbaI, Carril 3: Cuantificación de mRic-8A, Carril 4: Cuantificación de pCS2+6Myc). **D) Identificación de colonias positivas con EcoRI y XbaI.** Se analizó el ADN plasmidial de 14 colonias transformadas con el producto de la ligación pCS2+6Myc + mRic-8A, con las enzimas EcoRI y XbaI para liberar mRic-8A. El patrón de digestión esperado son dos fragmentos de 4339 pb y 1609 pb. Las colonias se identificaron con números del 1 al 14; todas las colonias excepto la 2, 8 y 13 presentan el patrón de digestión esperado. (St: Generuler 1kb Fermentas, VR: vector religado, SD: ADN plasmidial sin digerir). **E) Identificación de colonias positivas con HindIII.** De forma similar a la anterior se analizó el ADN plasmidial de las mismas colonias, pero utilizando la enzima HindIII que presenta un sitio de corte en el vector y otro sitio de corte en mRic-8A. El patrón de digestión esperado son dos fragmentos de 4488pb y 1452 pb. Todas las colonias excepto la 2, 8 y 14 presentan el patrón de digestión esperado. (St: Generuler 1kb Fermentas, VR: vector religado, SD: ADN plasmidial sin digerir). **F) Sobre-expresión y silenciamiento de mRic-8A.** Se transfectó el plásmido pCS2+6Myc/mRic-8A construido en células NIH3T3 y se evaluó la sobre-expresión de mRic-8A mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo contra Ric-8A y otro contra α -Tubulina como control de carga. Además se transfectaron las células con el plásmido pSingle-tTS-shRNA conteniendo un shRNA control o shRNAs contra mRic-8A: shmRic8A(322-342) o shmRic8A(704-723). Se observan las bandas correspondientes a la sobre-expresión de 6Myc-mRic8A (banda a la altura de 95kDa), a mRic-8A endógeno (a la altura de 72 kDa) que no fue eficientemente silenciado en comparación con el control y α Tubulina en 55 kDa. Los números indican el nivel de expresión de mRic-8A con respecto a Tubulina y normalizada contra el carril control. **G) Deleción de mRic-8A usando tres sgRNAs.** Se diseñaron tres sgRNAs contra mRic-8A para proceder a su deleción utilizando el sistema CRISPR/Cas9. Se transfectaron células NIH3T3 con distintos plásmidos (pD1321-Apuro, pX330, pX458 y pX459) conteniendo los diferentes sgRNAs contra mRic-8A (s1, s2 y s3), usando como control pmaxEGFP (WT) o el plásmido pX458 vacío (-). Se verificó la disminución de la expresión de mRic-8A mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo contra Ric-8A (panel superior) y contra α Tubulina (panel inferior) como control de carga. Los números indican el nivel de expresión de mRic-8A con respecto a Tubulina y normalizada contra el carril control.

shmRic8A(704-723) expresan un 27% menos de mRic-8A en comparación con las células control.

4.1.3 Deleción de mRic-8A utilizando el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9

Dado que el silenciamiento de mRic-8A a nivel de ARNm no fue efectivo, se utilizó el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. Para ello se diseñaron tres ARN guías (sgRNA) dirigidos contra el exón 1, 2 y 3 de mRic-8A, respectivamente. Estos tres ARN guías, denominados sg1, sg2 y sg3, se clonaron en tres vectores de expresión eucarionte: pX330 que permite la expresión del sgRNA y la endonucleasa Cas9, pX458 que permite la expresión del sgRNA, Cas9 y GFP como marcador y pX459 que permite la expresión del sgRNA, Cas9 y además otorga resistencia a puromicina, permitiendo la selección de clones estables. Además, se obtuvo de forma comercial el plásmido pD1321-Apuro/sgmRic8A1, el que expresa el sg1, Cas9 y resistencia a puromicina; este último es el plásmido con el que se trabajó en la mayoría de los experimentos de pérdida de función realizados en esta tesis. Se evaluó la efectividad de los sgRNAs transfectando los diferentes plásmidos en células NIH3T3 y analizando el nivel de expresión de mRic-8A mediante Western blot (*Figura 5g*), encontrándose que los tres sgRNA disminuyen en más de un 50% la expresión de mRic-8A. A pesar de que dos de los plásmidos utilizados permiten la selección de clones mediante el uso de antibióticos, en esta tesis se trabajó transfectando las células de forma transitoria, por lo que al no lograrse un 100% de eficiencia de transfección tampoco se logrará una inhibición completa de la expresión de Ric-8A utilizando este sistema. La estandarización del proceso de transfección determinó que es necesario esperar 48 horas tras la transfección para lograr una inhibición de más del 80% de la expresión de mRic-8A, y es por ello por lo que se trabajó utilizando estas condiciones durante todo el transcurso de este trabajo.

4.2 Análisis del efecto de la sobre-expresión y del silenciamiento de Ric-8A en la migración celular

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio usando embriones de *Xenopus*

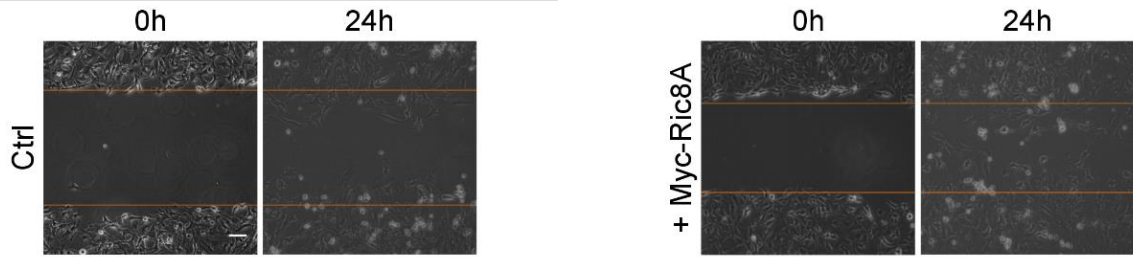
tropicalis y *Xenopus laevis* evidenciaron que es requerida la expresión de Ric-8A para que se lleve a cabo de forma correcta el desarrollo embrionario. Los embriones morfantes para Ric-8A presentan problemas en la gastrulación y deficiencia en la migración de las crestas neurales craneales, ya sea en el embrión durante su desarrollo o al ser cultivadas como explantes sobre una matriz de fibronectina (Fuentealba y col., 2013). Estos resultados indican que Ric-8A es necesario para el proceso de migración celular en células de la cresta neural craneal de *Xenopus*. La evidencia del requerimiento de Ric-8A para un correcto proceso migratorio en otros tipos celulares es escaso (Ruisu y col., 2017; Wang y col., 2011) por lo que como primera tarea nos propusimos investigar si es que esta función de Ric-8A es compartida en otros modelos y tipos celulares.

4.2.1 Efecto de la sobre-expresión de mRic-8A en el cierre de herida de células MEF

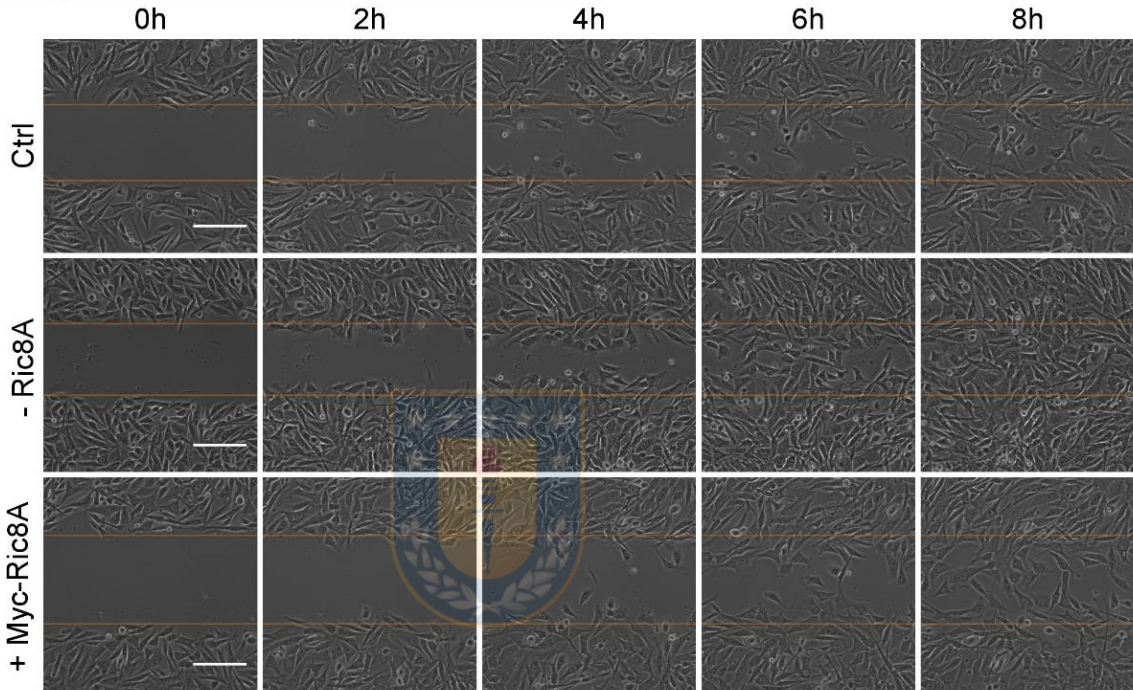
Para evaluar si la alteración de los niveles de expresión de mRic-8A afecta de forma positiva o negativa la motilidad de células MEF (fibroblastos embrionarios de ratón) se utilizó un ensayo de cierre de herida, el que consiste en inducir la migración de una monocapa celular a través de la remoción de parte de ella. Este ensayo es una manera simple y efectiva de evaluar el proceso de migración de las células en 2 dimensiones, además de permitir la cuantificación del proceso a través de la medición de la velocidad y direccionalidad del movimiento, entre otros parámetros (Jonkman y col., 2014; Liang y col., 2007).

Se transfectaron células MEF con plásmidos que expresan GFP (como control) o 6Myc-mRic-8A y se cultivaron para obtener una monocapa, sobre la que se indujo la migración realizando una herida. Al comparar las imágenes tomadas al realizar la herida y luego de 16 a 24 horas, se observa que las células que sobre-expresan mRic-8A ocupan mayor espacio de la herida que anteriormente se presentaba libre de células en comparación con las células control (*Figura 6a*). Se midió la velocidad de cobertura de la herida, la que corresponde al cociente entre la diferencia del área de la herida (a tiempo 0 y al finalizar el ensayo) y el tiempo total ensayo, encontrándose que **la sobre-expresión de Myc-Ric-8A induce un aumento en la velocidad de**

A) Ensayo de cierre de herida en células MEF



B) Ensayo de cierre de herida en células NIH3T3



C) Cuantificación de los ensayos de cierre de herida

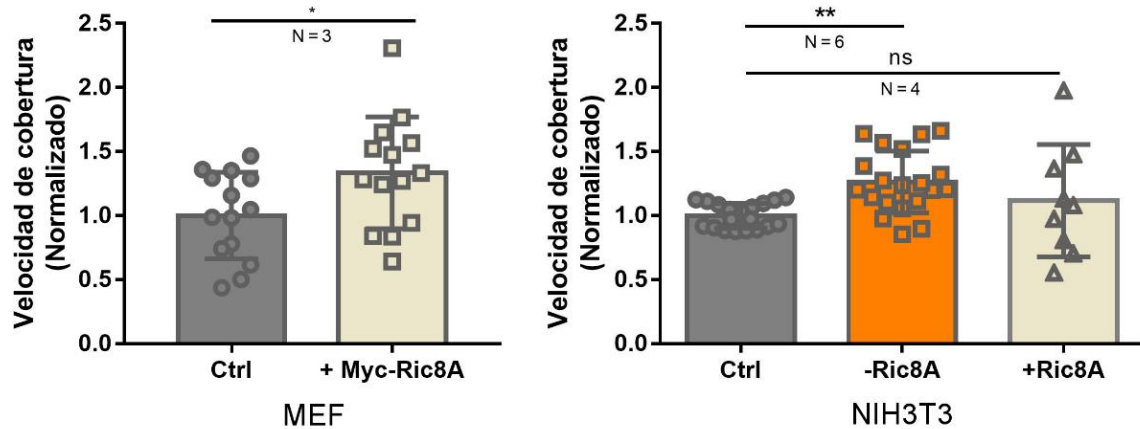


Figura 6. Análisis del efecto de los niveles de expresión de mRic-8A en el cierre de herida.

A) Ensayo de cierre de herida en células MEF. La sobre-expresión de Myc-mRic8A (+ Myc-Ric8A), induce un aumento en la velocidad de cobertura de la herida en células MEF en comparación al control (Ctrl). Se muestra una foto representativa de una región al inicio del experimento y 24 horas después de realizada la herida. Las líneas naranjas indican la posición de la herida a tiempo 0. Barra = 100um.

B) Ensayo de cierre de herida en células NIH3T3. El silenciamiento de mRic8A (- Ric8A) en células NIH3T3 crecidas sobre fibronectina (20 ug/mL) induce un aumento en la velocidad de cobertura de la herida en comparación al control (Ctrl). Además, la sobre - expresión de Myc-mRic8A en estas células (+ Myc-Ric8A) muestra una tendencia similar. Se muestran fotos representativas de una región de cada condición al inicio del experimento y cada 2 horas después de realizada la herida. Las líneas naranjas indican la posición de la herida a tiempo 0. Barra = 100um.

C) Cuantificación. Cuantificación de los ensayos mostrados en A) para células MEF (t-student, N = 3, p = 0.03) y en B) para células NIH3T3 (ANOVA 1 vía, N = 6, p = 0.008).



cobertura de la herida, siendo ésta un 33% más rápida en comparación con el control (Tabla 2, Figura 6c).

4.2.2 Efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de mRic-8A en la migración de células NIH3T3

En los ensayos de cierre de herida realizados anteriormente se evaluó la velocidad de cobertura de la herida considerando solamente el punto inicial y final del ensayo. Sin embargo, una vez que las células se encuentran suficientemente cerca, además de las señales quimio-atrayentes, entran en juego también señales de repulsión que pueden alterar la medición de la velocidad. Para precisar la determinación de la velocidad de cobertura de la herida, se hicieron nuevos ensayos tomando fotografías cada 5 minutos desde que se realiza la herida y utilizando células NIH3T3. En este caso se analizó el comportamiento migratorio de las células que sobre-expresan Myc-mRic8A y el de células cuyo genoma fue editado con el sistema CRISPR/Cas9 para impedir la expresión de mRic-8A.

Como se observa en la *Figura 6b*, las células carentes de mRic-8A cubren la herida a las 6 horas de ensayo, a diferencia de las células que sobre-expresan mRic-8A y las células control que lo hacen dos horas después. Sin embargo, esta observación no implica que la velocidad de migración sea mayor en ausencia de Ric-8A, debido a que

	Células MEF		Células NIH3T3		
	Control	+MycRic-8A	Control	-Ric-8A	+Ric-8A
Velocidad Cobertura	21962 (pixel ² /hora)	29052 (pixel ² /hora)	1138.92 (um ² /min)	1364.27 (um ² /min)	1137 (um ² /min)
Velocidad cobertura (Normalizado)	1	1.333	0.998	1.261	1.116
Desviación estándar (Normalizado)	0.339	0.437	0.097	0.243	0.438
Número de repeticiones (N)	3	3	8	6	4

Tabla 2. Ensayo de Cierre de herida

La alteración de los niveles de expresión de mRic-8A induce un aumento en la velocidad de cobertura de herida. La tabla muestra los resultados obtenidos en el ensayo de cierre de herida realizado a células MEF y NIH3T3 que sobre-expresan GFP (control), que sobre-expresan mRic-8A o que carecen de mRic-8A. Se muestran los resultados de la velocidad de cobertura de la herida (en pixel²/hora en el caso de las MEF y um²/minuto en el caso de células NIH3T3) y los valores normalizados contra el control respectivo de cada experimento.

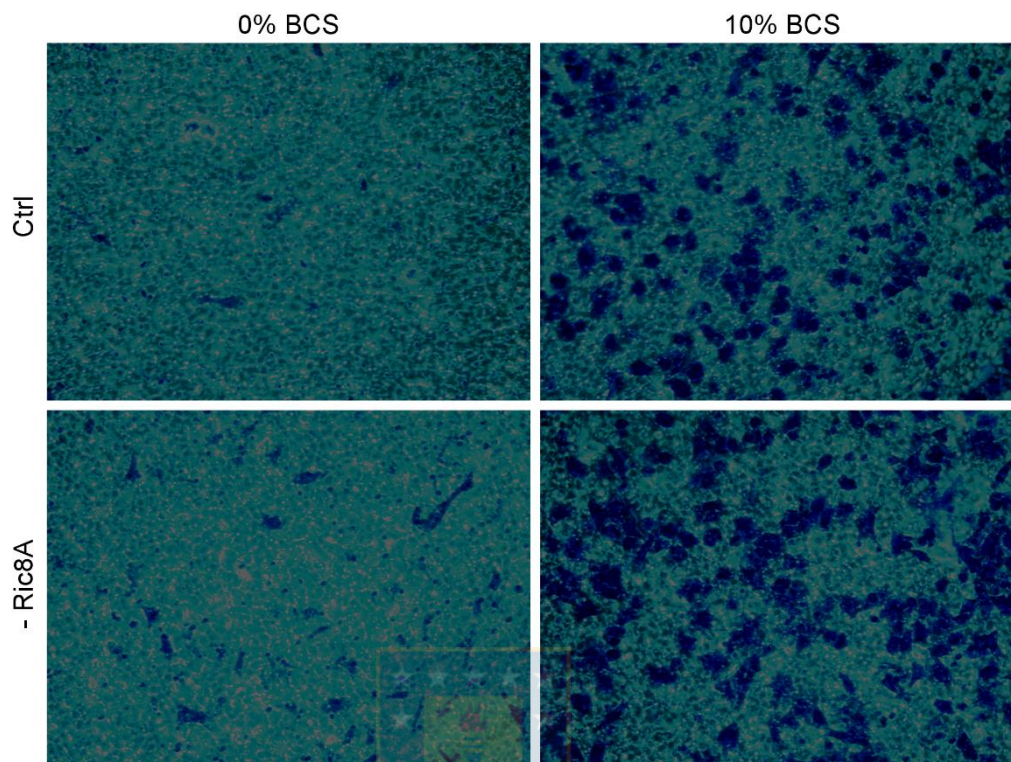
las heridas difieren en tamaño en las diferentes condiciones. Debido a ello, se procedió a cuantificar la velocidad de cobertura de la herida midiendo parámetros de migración similares al caso de las células MEF.

Para calcular la velocidad de cierre de la herida, se midió el área de la región libre de células a todos los tiempos medidos y se graficó contra el tiempo transcurrido del ensayo. De este gráfico realizado para cada condición se obtiene una curva con una fase de velocidad de cierre de herida lineal cuya pendiente luego comienza a disminuir, indicando que en ese momento ambas caras de la herida se acercaron lo suficiente para que las señales de repulsión entren en acción (*Figura 4*). De estos gráficos se identificó el intervalo lineal de la curva, el que corresponde a la migración celular sin intervención de estas señales repulsivas y se recuperó la pendiente que corresponde a la velocidad de cobertura reportada (*Figura 6c, Tabla 2*). De forma similar a lo observado en células MEF, se observa una tendencia al aumento en la velocidad de cobertura de las células que sobre-expresan mRic-8A; sin embargo, este efecto es leve y no es estadísticamente significativo tras realizar un análisis ANOVA de una vía. Al analizar la velocidad de cobertura de la herida de las células carentes de Ric-8A se observa que estas células presentan una velocidad de cobertura un 24% mayor que las células control, lo que muestra que **la inhibición de la expresión de mRic-8A en las células NIH3T3 también induce un aumento en la velocidad de cobertura de la herida.**

La ejecución de los ensayos de cierre de herida toma alrededor de 8 horas, tiempo suficiente para que otros factores, tales como la deposición de matriz extracelular, entren en juego y afecten la velocidad de la migración. Además, el contexto de migración evaluado corresponde a un ambiente en dos dimensiones. Para complementar los resultados obtenidos se llevaron a cabo ensayos de migración en cámara de Boyden, ensayos que se realizan en periodos de tiempo mucho menores y en un contexto tridimensional.

Se cuantificó el número de células NIH3T3 silvestres y carentes de Ric-8A que cruzan desde la cámara superior a través de los poros hacia la cámara inferior que contiene medio con suero como señal quimioatrayente, verificándose que **el silenciamiento de la expresión de mRic-8A induce un aumento en la migración de las células NIH3T3.** Como muestra la cuantificación del ensayo (*Figura 7*), tras dos

A) Análisis de la migración celular por ensayo de Transwell



B) Cuantificación del ensayo de Transwell

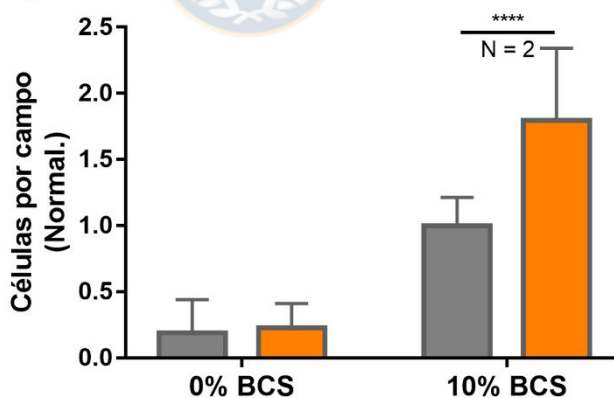


Figura 7 *Análisis de la migración celular por ensayo en cámara de Boyden.*

A) Análisis de la migración celular por ensayo de *Transwell*. Se muestran fotografías representativas de células NIH3T3 control (Ctrl) y carentes de Ric-8A (-Ric8A) migratorias tras 135 minutos de ensayo, estimuladas o no con 10% de suero bovino. **B) Cuantificación.** La cuantificación del ensayo de *transwell* muestra que la ausencia de Ric-8A induce un aumento en el número de células migratorias en respuesta a suero. (ANOVA de 2 vías, N = 2, $p < 0.0001$).

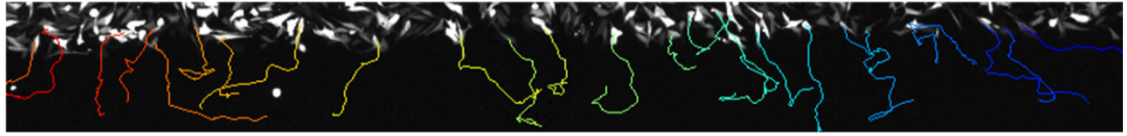
horas de migración, el número de células carentes de Ric-8A que cruzan la cámara de Boyden es un 79,5% superior que las células control (ANOVA de dos vías, $N = 2$, $p < 0.0001$). En experimentos realizados en ausencia de una señal quimioatrayente (donde tanto la cámara superior e inferior contienen medio sin suero) no se observaron diferencias significativas en el número de células carentes de Ric-8A y células control que atraviesan la cámara de Boyden, lo que sugiere que Ric-8A está involucrado en la regulación de la migración celular en respuesta a un quimioatrayente presente en el suero.

4.2.3 Efecto del silenciamiento de mRic-8A sobre la migración de células NIH3T3 individuales

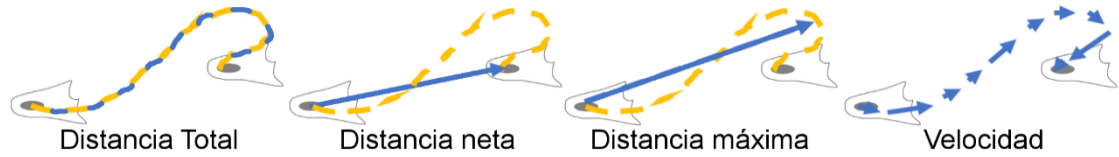
Para evaluar parámetros migratorios en células individuales se tomaron videos de los experimentos de cierre de herida y se registró la trayectoria recorrida por células individuales en las diferentes condiciones (*Figura 8a*). A través del seguimiento de la posición del núcleo en el tiempo se obtuvieron parámetros de distancia y de velocidad (*Figura 8b*): la distancia total, que corresponde a la longitud del trayecto realizado por la célula, la distancia neta que es la distancia entre el punto final e inicial de la trayectoria, la distancia máxima correspondiente a la separación entre el punto inicial y el más lejano alcanzado durante la trayectoria y las velocidades promedio y máxima, que corresponden a la media de las velocidades de desplazamiento nuclear medidas en cada intervalo de tiempo y la máxima registrada durante la trayectoria, respectivamente. Además, se estimó la direccionalidad de la migración midiendo la relación entre la distancia neta y la distancia total, la que mientras más cercana a 1 se encuentra indica un movimiento más lineal.

Los resultados obtenidos (*Figura 8c, Tabla 3*) muestran que aquellas células que carecen de mRic-8A tienen trayectorias más largas y llegan a distanciarse más de su punto de partida que las células control. De forma concordante, se encontró que las velocidades de desplazamiento, tanto promedio como la máxima alcanzada, son mayores en ausencia de Ric-8A. A pesar de las diferencias observadas en los parámetros de velocidad y distancia recorrida por estas células, la razón entre la distancia neta y total no se vio alterada respecto al control, lo que indica que la ausencia de Ric-8A no resulta en una alteración de la direccionalidad de la migración.

A) Seguimiento de la migración de células independientes



B) Esquema de los parámetros analizados



C) Análisis de la migración de células

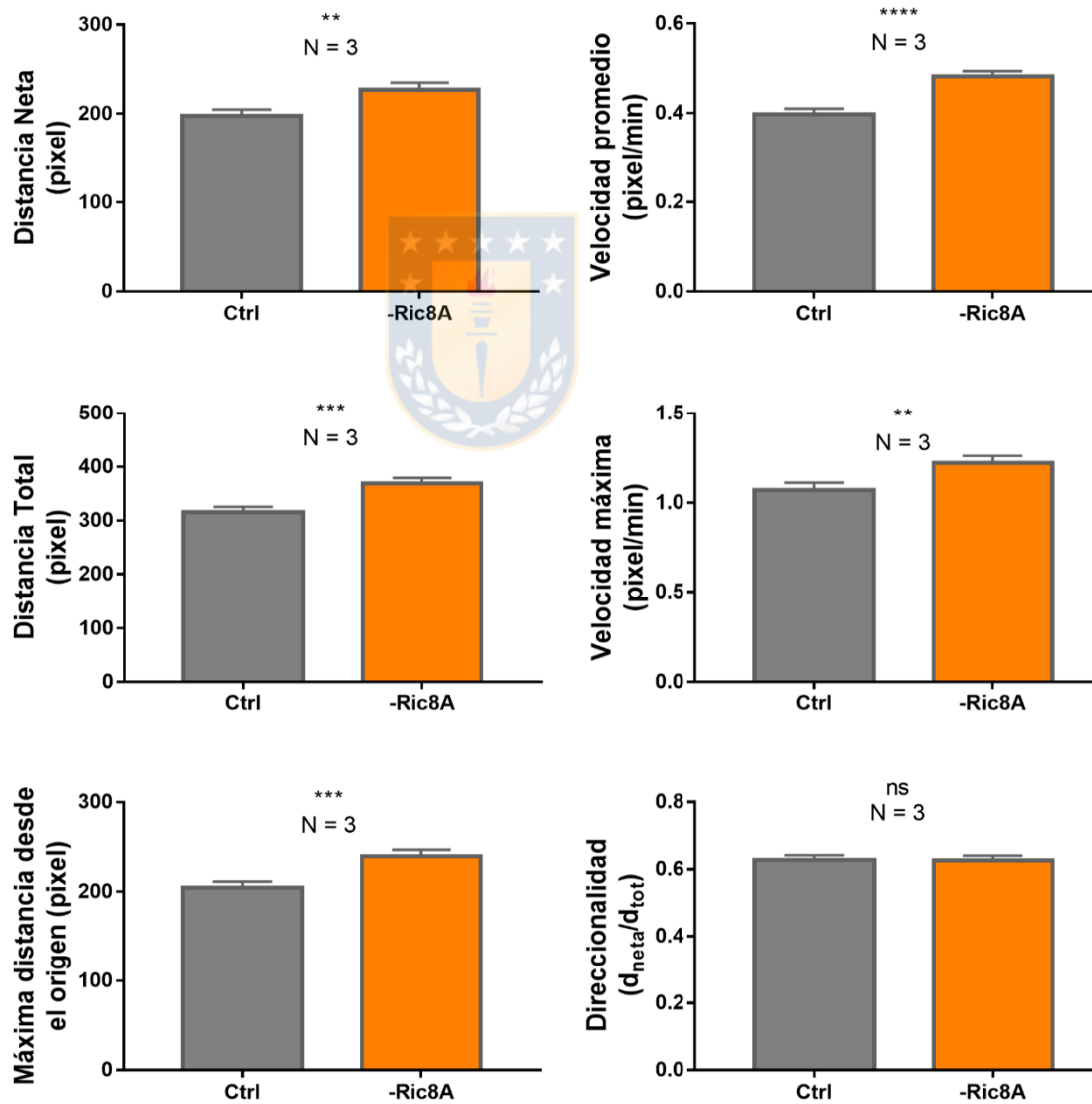


Figura 8. Análisis del efecto del cambio de los niveles de expresión de *mRic-8A* en la migración de células individuales.

A) Seguimiento de la migración de células independientes. Se siguió la trayectoria recorrida por las células durante el ensayo de cierre de herida, utilizando el *plug-in* de ImageJ "Trackmate". **B) Esquema de los parámetros analizados.** Una vez obtenidas las trayectorias de las células individuales, se midieron diferentes parámetros de migración: Distancia Total (recorrida por la célula), Distancia Neta (distancia entre la posición final y el punto de origen), Distancia máxima (distancia entre el punto más alejado de la trayectoria y el punto de origen), Velocidad promedio (el promedio de las velocidades medidas entre cada cuadro del video), Velocidad máxima (mayor velocidad medida en la trayectoria). **C) Cuantificación de los parámetros de migración de células individuales.** En células NIH3T3 el silenciamiento de mRic-8A induce un aumento en la distancia neta recorrida, en la distancia total de la trayectoria y en la distancia máxima alcanzada por la célula. Además, provoca un aumento de la velocidad promedio de migración y de la velocidad máxima de migración medida (t-Student, N = 3, p < 0.05). Sin embargo, el índice de direccionalidad, que corresponde al cociente entre la distancia neta y la distancia total, no se ve alterado.



	Ctrl	-Ric-8A	P (t-Student)
D_{tot} (pixel)	315.5	369.5	0.0003
D_{net} (pixel)	197.7	227.2	0.005
D_{max} (pixel)	204.5	239.4	0.0009
V_{mean} (pixel/min)	0.3973	0.4818	<0.0001
V_{max} (pixel/min)	1.071	1.223	0.0091
Direccionalidad	0.6278	0.6266	0.9524

Tabla 3. La alteración de los niveles de expresión de mRic-8A induce una variación en los parámetros migratorios de células NIH3T3

La tabla muestra los resultados obtenidos del análisis de los parámetros migratorios de células individuales.

Los análisis llevados a cabo en este punto buscaban determinar el efecto que tiene la alteración de los niveles de expresión de Ric-8A en el comportamiento migratorio de células fibroblásticas de ratón. A través de la manipulación de los niveles proteicos de la proteína en células MEF y NIH3T3 se encontró que tanto el aumento como la disminución de la expresión de mRic-8A producen el aumento de la velocidad de migración de estas células. Ello indica que la variación de los niveles de expresión de mRic-8A produce la desregulación del proceso migratorio, lo que sugiere que **Ric-8A forma parte de la maquinaria molecular que regula el proceso de migración celular.**

4.3 Estudio del efecto de la sobre-expresión y del silenciamiento de Ric-8A sobre la formación de estructuras migratorias

Estudios anteriores muestran que el silenciamiento de Ric-8A provoca la alteración de la estructura del citoesqueleto de actina en células de *Xenopus* y de ratón (Fuentealba y col., 2013; Ruisu y col., 2017; Toro-Tapia y col., 2018). Sin embargo, también en estos estudios se muestra que el silenciamiento de Ric-8A provoca un defecto migratorio en estas células lo que se contradice con los resultados obtenidos anteriormente en esta tesis. Se evaluó si en células NIH3T3 la alteración de la

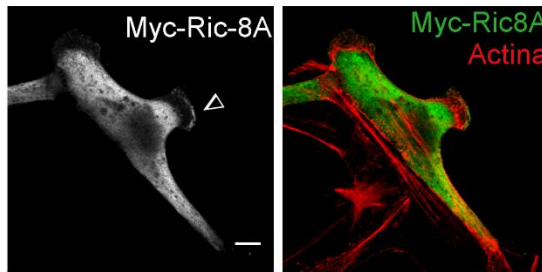
expresión de Ric-8A afecta la organización del citoesqueleto, ya sea modulando la formación de las estructuras requeridas para la migración celular, como por ejemplo lamelipodios y filopodios, o alterando su dinámica.

4.3.1 Análisis de la localización subcelular de Ric-8A en diferentes tipos celulares

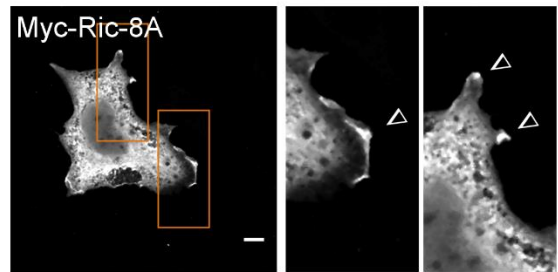
Para investigar cuál es el rol de Ric-8A en la migración celular y si saber si se expresa en diferentes tipos de células migratorias, primeramente se analizó dónde se localiza esta proteína en distintas líneas celulares mientras estas están migrando. En primera instancia se analizó la proteína sobre-expresada, ya que en el momento de realizar los experimentos no se contaba con un anticuerpo que reconociera la proteína endógena. Para ello se llevó a cabo inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo contra el epítipo c-Myc, de células de distinto linaje: MDCK (*Figura 9a*) correspondientes a una línea celular renal canina con características epiteliales, NSC34 (*Figura 9 b,d*) que es un modelo murino de motoneuronas y fibroblastos NIH3T3 (*Figura 9c*). En todos los casos analizados se observa que **Myc-Ric8-A se distribuye de forma homogénea en toda la célula con excepción de las protrusiones y estructuras migratorias, lugares donde esta proteína tiende a concentrarse**, localización que concuerda con las diversas funciones celulares descritas para la proteína, incluido su rol modulador de la migración.

Para verificar la localización sub-celular de Ric-8A durante la migración en un contexto dinámico, se transfectaron células NIH3T3 con GFP-Ric-8A y se tomaron fotografías cada 30 segundos con un microscopio confocal para confeccionar un video (*Figura 9e*) y visualizar la distribución de esta proteína durante la migración. En este análisis se obtuvieron observaciones similares, ya que se aprecia a GFP-Ric-8A distribuido en toda la célula, pero concentrado en el borde de la protrusión en el sentido de la migración. Es más, se observa cómo **GFP-Ric-8A se encuentra concentrado en los ruffles** o vuelos de membrana que se forman como vestigio de la dinámica de la membrana, lo que ocurre como resultado de la constante extensión y retracción celular que ocurre en esta región.

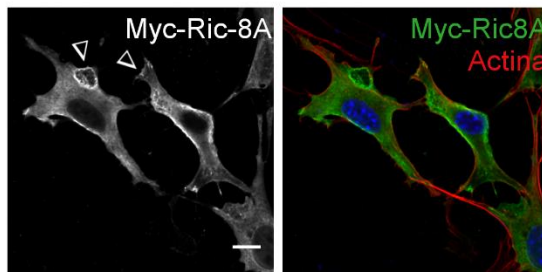
A) Células MDCK



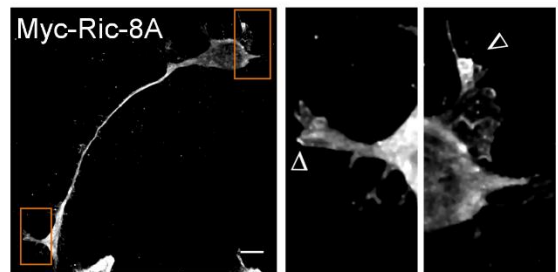
B) Células NSC34 sin diferenciar



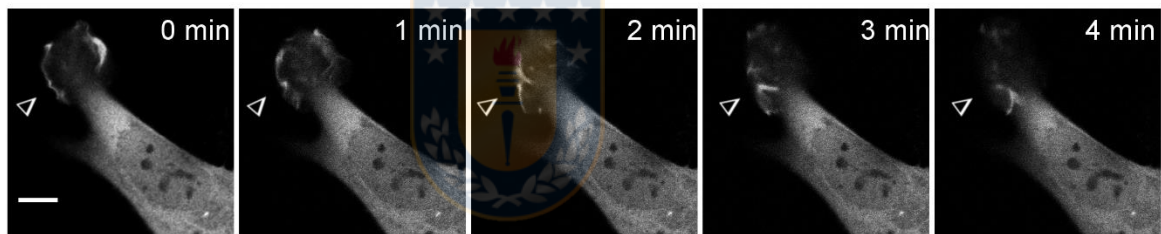
C) Células NIH3T3



D) Células NSC34 diferenciadas



E) GFP-Ric8A en células NIH3T3



F) GFP-Ric8A en células IIA1.6

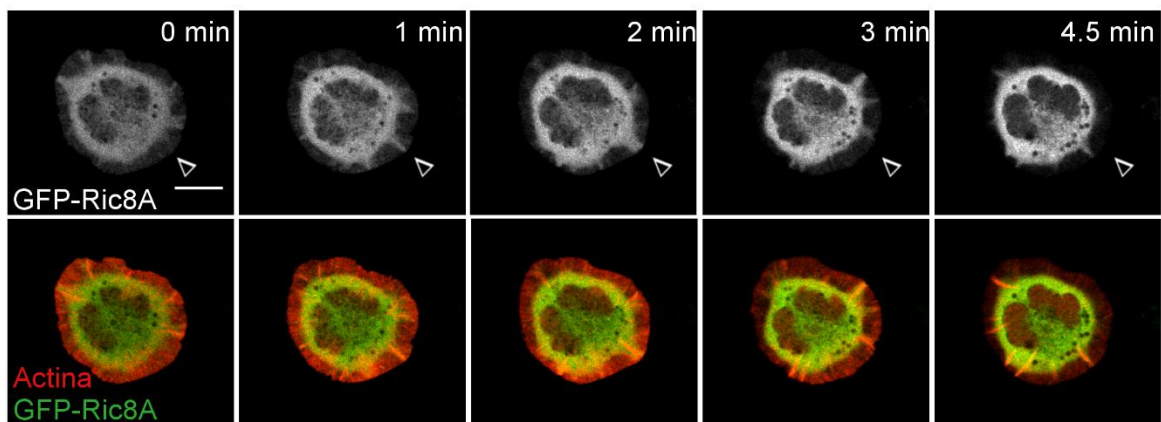


Figura 9. Análisis de la localización subcelular de Ric-8A sobre-expresado en diferentes líneas celulares.

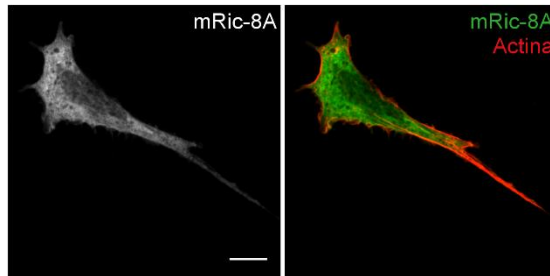
A) Inmunocitoquímica contra Myc-Ric-8A en células MDCK. Se observa que Myc-Ric-8A se concentra en el borde del lamelipodio (cabezas de flecha), lo que se verifica por la estructura de actina entrecruzada en esta región. **B) Inmunocitoquímica contra Myc-Ric-8A en células NSC34 sin diferenciar.** Se observa una localización similar que la observada en células MDCK. Los paneles laterales muestran ampliaciones de las regiones indicadas con los recuadros naranjos. Las cabezas de flecha muestran Ric-8A concentrado en las protrusiones. **C) Inmunocitoquímica contra Myc-Ric-8A en células NIH3T3.** La localización de Myc-Ric-8A concuerda con lo observado en otros tipos celulares. Las cabezas de flecha muestran Ric-8A concentrada en *dorsal ruffles* y protrusiones. **D) Inmunocitoquímica contra Myc-Ric-8A en células NSC34 diferenciadas.** Se observa que Myc-Ric-8A se concentra en las regiones donde hay extensión de la membrana (cabezas de flecha), ya sea en el cuerpo celular o en la protrusión. Los paneles laterales muestran ampliaciones de las regiones indicadas con los recuadros naranjos. **E) Microfotografías de una célula NIH3T3 que sobre-expresa GFP-Ric-8A.** Las imágenes mostradas fueron tomadas cada 1 minuto. Se observa que GFP-Ric-8A se localiza en las protrusiones celulares y que se moviliza en conjunto con los *ruffles* durante la migración. Las cabezas de flecha muestran un punto fijo para divisar la localización dinámica de Ric-8A. **F) Inmunofluorescencia de GFP-Ric-8A y actina en un modelo de sinapsis inmune.** Se utilizaron células IIA1.6 que sobre-expresan GFP-Ric-8A sembradas sobre una placa de vidrio cubierta con antígeno (IgG) para estimular la formación de la sinapsis inmune. Se observa que Ric-8A se localiza en la protrusión en formación, co-localizando con actina. Las cabezas de flecha muestran un punto fijo para divisar la localización dinámica de Ric-8A. Para todos los casos se muestra Ric-8A en blanco o verde, F-actina en rojo y ADN en azul. Barra = 10 μm .



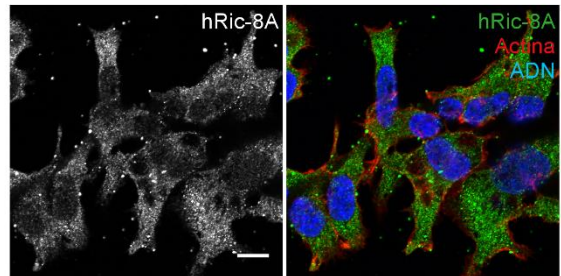
Existen otros eventos celulares diferentes a la migración, que dependen de la remodelación del citoesqueleto y que para este fin utilizan mecanismos moleculares similares a los involucrados en la formación del lamelipodio y filopodio. Un ejemplo de ello es la formación de la sinapsis inmune de linfocitos T y B, consistente en la extracción del antígeno desde una célula presentadora a través de mecanismos dependientes de fibras de actina-miosina (Obino & Lennon-Duménil, 2014). Con el fin de evaluar si Ric-8A también se relaciona con estos procesos dependientes de la remodelación del citoesqueleto se estudió la localización de Ric-8A durante la formación de la sinapsis inmune. Para ello se utilizaron células IIA1.6 (también llamadas A20), que corresponden a linfocitos B de ratón, las que fueron transfectadas con GFP-Ric-8A y sembradas sobre una placa de vidrio cubierto con antígeno (IgG) para estimular la formación de la sinapsis inmune, la que se siguió mediante microscopía confocal capturando fotografías cada 30 segundos (*Figura 9f*). De forma similar a lo que ocurre durante la migración celular, **se observa a GFP-Ric-8A concentrada en algunas regiones de la sinapsis inmune mostrando una distribución dinámica en ella**, distribución que se encuentra en estrecha relación con la localización de la actina.

Cuando se dispuso de un anticuerpo que es efectivo reconociendo a la proteína Ric-8A humana y murina se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para analizar la localización de Ric-8A endógeno en células MEF, HEK293T y NIH3T3 en migración, encontrándose que Ric-8A endógena no presenta la localización anteriormente observada de Myc-Ric-8A en estas células (*Figura 10a-c*). Al revisar el protocolo de estos experimentos nos percatamos de que en los tres casos las células habían sido sembradas sobre vidrio, sin haber sido tratado previamente con alguna matriz extracelular. Es por ello que supusimos que tal vez la localización de Ric-8A anteriormente observada pudiera estar siendo inducida por sobre-expresión de la proteína, pero que en condiciones endógenas se requiera de alguna señalización dependiente de la matriz extracelular. Para probar esta hipótesis se realizó el mismo experimento, pero esta vez sembrando las células NIH3T3 sobre Fibronectina (*Figura 10d*) encontrándose que **las células presentan protrusiones más estructuradas y con mRic-8A concentrado en sus bordes, localización que es inducida por la matriz extracelular**.

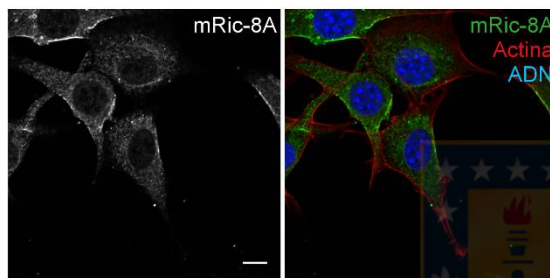
A) Células MEF



B) Células HEK293T



C) Células NIH3T3 crecidas sobre vidrio



D) Células NIH3T3 crecidas sobre Fibronectina

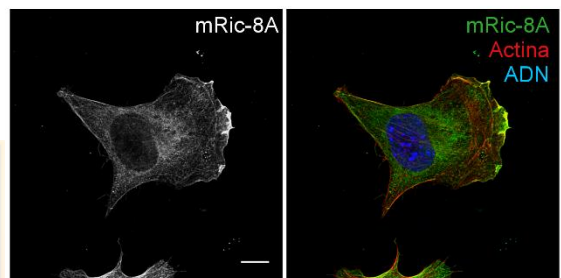


Figura 10. Localización subcelular de Ric-8A endógeno en distintas líneas celulares.

A) Localización de Ric-8A en MEF. La inmunocitoquímica contra mRic-8A muestra que en células MEF ($p53^{-/-}$) ésta se distribuye de forma homogénea en toda la célula. **B) Localización de Ric-8A en células HEK293T.** En células HEK293T, hRic-8A endógeno se localiza en todo el cuerpo celular presentando un patrón punteado. **C) Localización de Ric-8A en células NIH3T3 sembradas sobre vidrio.** En células NIH3T3 crecidas sobre cubreobjetos de vidrio tratados con ácido mRic-8A se concentra en la membrana plasmática pero no en las protrusiones. **D) Localización de Ric-8A en células NIH3T3 sembradas sobre Fibronectina.** En células NIH3T3, el tratamiento de los cubreobjetos con Fibronectina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induce la localización de mRic-8A en el lamelipodio. Para todos los casos se muestra Ric-8A endógeno en gris o verde, actina en rojo y el ADN en azul. Barra = 10 μm .

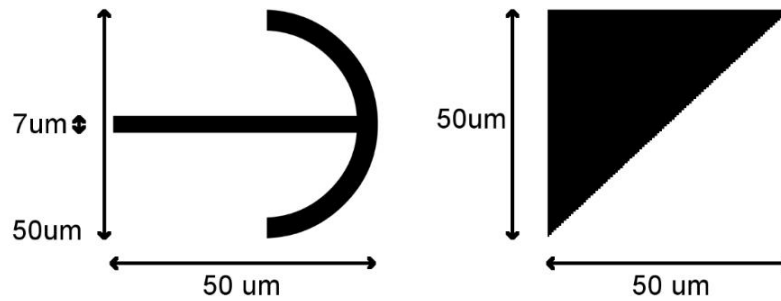
Para evaluar en más detalle si señales externas inducen una localización diferencial de la proteína en la célula se utilizaron micro-patrones de fibronectina. Éstos consisten en cubreobjetos cubiertos con PEG que son montados en una máscara que contiene agujeros con la forma deseada por donde pasa luz UV de alta energía que destruye el PEG en esta región para generar una superficie adhesiva. Luego, estos cubreobjetos son cubiertos con fibronectina, la que se une solamente a las regiones libres de PEG, generándose micro-patrones de fibronectina que se usan para inducir una determinada morfología celular (*Figura 11a*). En este caso se utilizaron dos formas de micro-patrones distintas: 1) la forma de ballesta induce la polarización celular y la formación de un gran lamelipodio y 2) el triángulo induce la formación de fibras de estrés en los bordes pero no se generan protrusiones ni polaridad (They, 2010). A través de estos experimentos se confirmó la localización de mRic-8A en el borde de la protrusión, ya que se observa a esta proteína distribuida en toda la célula, pero ausente en la región de la lamela y presente en todo el borde del gran lamelipodio formado en el patrón con forma de ballesta. En el caso de la forma triangular se observa a Ric-8A distribuido en la célula de forma homogénea pero concentrado en la periferia celular; más aún, si se analiza la tinción con faloidina (para observar las fibras de actina) se observa que mRic-8A se ubica en la misma región que las fibras de estrés. El análisis con micro-patrones de fibronectina mostró que **Ric-8A se localiza en el borde de la protrusión y que su localización es dependiente de la morfología celular.**

En conjunto, estos resultados muestran que Ric-8A se localiza en los bordes de las protrusiones en diferentes tipos celulares y en respuesta a diferentes estímulos, ya sea la morfología celular o el sustrato de adhesión, lo que respalda su rol regulatorio de la migración celular. Además, la distribución preferencial de Ric-8A en regiones discretas de la sinapsis inmune sugiere que su función podría abarcar otros procesos celulares en los que también se requiera de la remodelación del citoesqueleto.

4.3.2 Estudio del efecto de la alteración de los niveles de expresión de Ric-8A sobre la estructura del citoesqueleto de actina

Las protrusiones de las células migratorias son estructuras celulares donde ocurre una activa reestructuración del citoesqueleto y de la membrana plasmática.

A) Esquema de los patrones de fibronectina utilizados



B) Localización de mRic-8A en células crecidas en patrones de Fibronectina

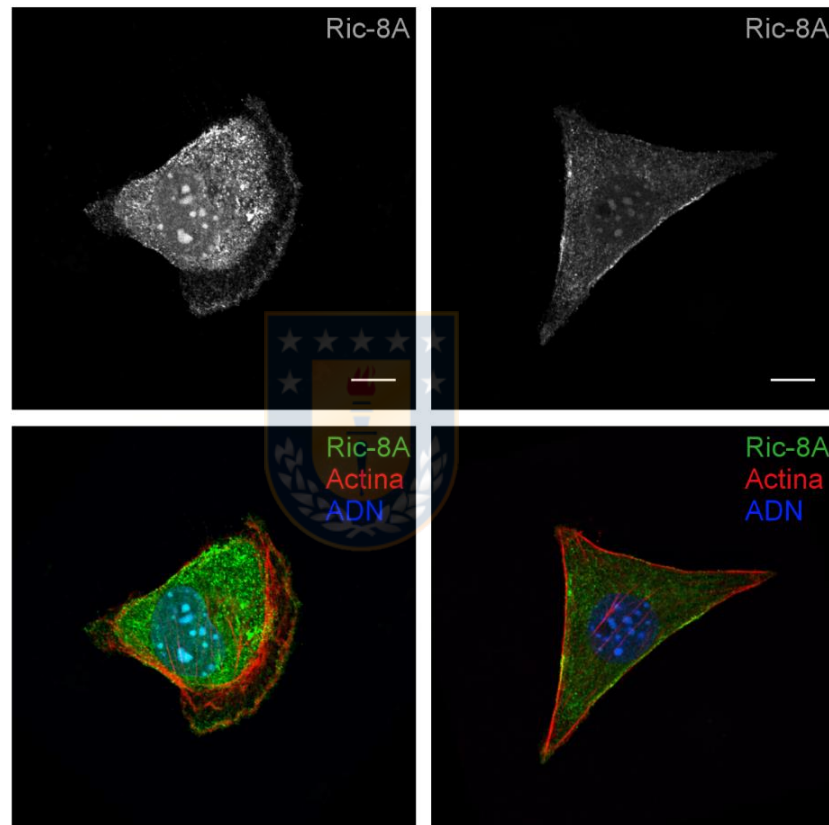


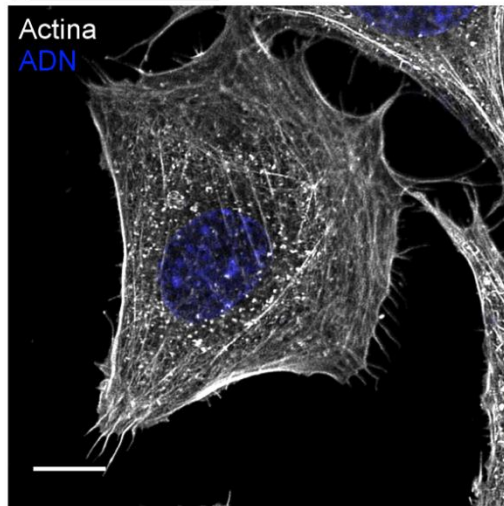
Figura 11. Localización subcelular de mRic-8A en respuesta a la morfología celular.

A) Esquema de los micro-patrones utilizados. Se utilizaron patrones de Fibronectina para inducir una determinada morfología celular. Se utilizaron formas de ballesta (*crossbow*) para polarizar la célula y generar un gran lamelipodio y de triángulo para generar gran tensión celular sin polaridad. **B) Localización de mRic-8A en células NIH3T3 crecidas sobre micro-patrones de fibronectina.** La inmunocitoquímica contra mRic-8A muestra que ésta se concentra en el borde del lamelipodio en la célula polarizada, mientras que se concentra en la membrana celular en dos de los tres lados de la célula con morfología triangular. mRic-8A en gris (A) y verde (B), F-actina en rojo y ADN en azul. Barra = 10 µm.

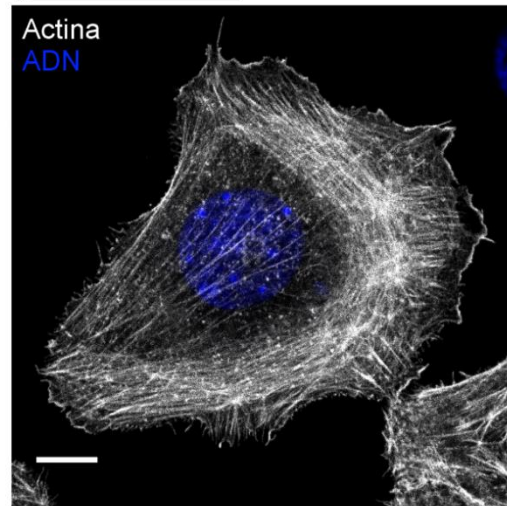
Anteriormente se observó que mRic-8A se localiza en los bordes de las protrusiones en las células en migración, localización que comparten algunas proteínas de asociación a actina y componentes de las vías de señalización reguladoras de la migración (Schaks y col., 2019). La localización subcelular de Ric-8A observada sugiere que esta proteína regula el ensamble o estabilización de las protrusiones, ya sea lamelipodios o filopodios. Como primer paso se procedió a analizar las estructuras de actina a través de ensayos de inmunofluorescencia utilizando tinción con faloidina para visualizar las fibras de actina en células NIH3T3 control, carentes de Ric-8A o que sobre-expresan Myc-Ric-8A (*Figura 12*). Se observa la presencia de lamelipodios en todas las condiciones evaluadas, no apreciándose a simple vista diferencias estructurales entre ellas. Los lamelipodios se ubican en dirección de la migración y se componen de fibras de actina entrecruzadas. Además, se aprecia que desde el extremo de los lamelipodios sobresalen varios filopodios de distinto tamaño y que en algunas células de la condición “-Ric-8A” el número de éstos es menor. Es por ello que se procedió a cuantificar el número de filopodios presentes en cada célula en las diferentes condiciones (*Figura 12d*), no encontrándose diferencias significativas (Control = 7, D.est = 5,5; -Ric-8A = 4,4, D. est = 4,3; +Ric-8A = 8,5, D. est = 9,23).

Al no observarse diferencias en la estructuración de las protrusiones, sospechamos que tal vez la desregulación en la migración observada ante la alteración de los niveles de Ric-8A se deba a problemas en la dinámica de estas estructuras, como una alteración en la velocidad de polimerización de los filamentos de actina o la vida media de las estructuras formadas, característica esencial para su apropiado funcionamiento. Para evaluar esta posibilidad, se sembraron células NIH3T3 silvestres y carentes de Ric-8A sobre fibronectina, pero además estas células fueron transfectadas con *LifeActin* con el fin de poder visualizar *in vivo* el comportamiento de la actina en el plano en contacto con el sustrato de adhesión a través de la utilización de microscopía TIRF. Se hicieron videos tomando fotografías cada 1 segundo y se analizaron 6 células por condición (*Figura 13*), encontrándose que en todas las condiciones analizadas las células migran y presentan protrusiones. También fue posible observar otro tipo de estructuras del citoesqueleto de actina como fibras de estrés y adhesiones focales. A través de estos estudios se observaron diferencias en

A) NIH3T3 control



B) NIH3T3 - Ric-8A



C) NIH3T3 + Ric-8A



D) Cuantificación

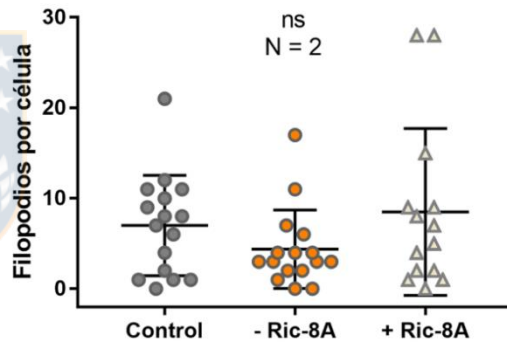
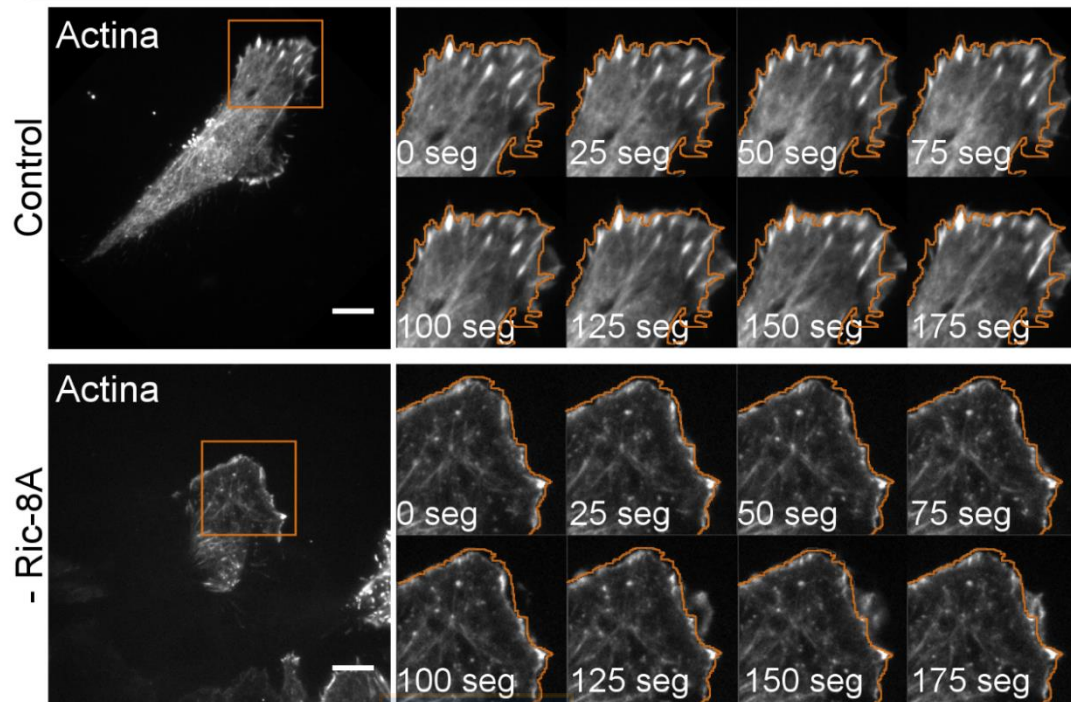


Figura 12. **Análisis de la estructura del citoesqueleto de actina en células NIH3T3 en presencia y ausencia de mRic-8A.**

A) Inmunfluorescencia de células NIH3T3 control. Las células fueron fijadas 90 minutos después de ser sembradas sobre placas cubiertas con Fibronectina 20 ug/ml. Se observa el lamelipodio compuesto por fibras de actina entrecruzada, los filopodios emulando vellos que se generan desde el lamelipodio, el cortex rodeando toda la célula y las fibras de estrés. **B) Inmunfluorescencia de células NIH3T3 carentes de Ric-8A (- Ric-8A)** tratadas en las mismas condiciones especificadas para las células control. Se muestra una imagen representativa donde se observa la presencia de las diferentes estructuras del citoesqueleto de actina. **C) Inmunfluorescencia de células NIH3T3 que sobre-expresan Ric-8A (+ Ric-8A)** tratadas de igual manera que las antes descritas. **D) Cuantificación del número de filopodios.** Se cuantificó el número de filopodios presentes en las células control, en las carentes de Ric-8A y en las que sobre-expresan Ric-8A, encontrándose que no existe una diferencia significativa entre las distintas condiciones evaluadas. (ANOVA de dos vías, N = 2, p > 0.1). Para todos los casos se muestra actina en gris y ADN en azul. Barra = 10 µm.

A) Análisis dinámico del citoesqueleto de Actina



B) Cuantificación de los haces de Actina

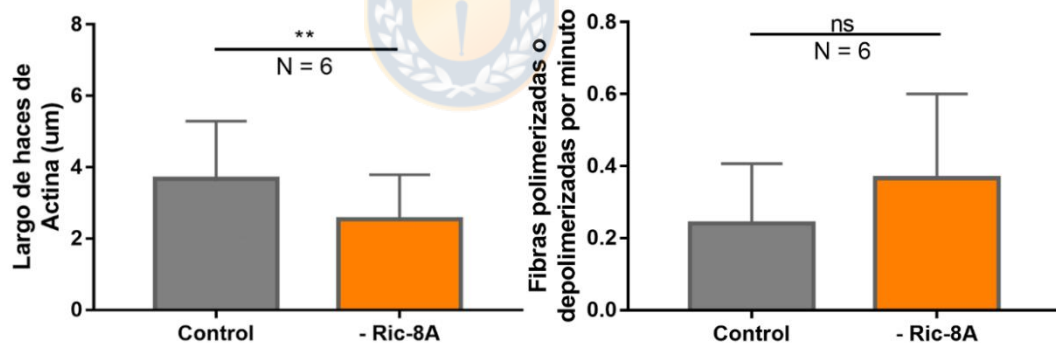


Figura 13. **Observación del citoesqueleto de actina in vivo en diferentes condiciones de expresión de mRic-8A.**

A) Timelapse usando LifeActin y microscopía TIRF. Se sembraron sobre placas cubiertas con Fibronectina 20 ug/mL células NIH3T3 silvestres (Control) o carentes de Ric-8A (- Ric-8A) transfectadas con LifeActin-GFP. Usando microscopía TIRF se tomaron fotos cada 1 segundo del plano de adhesión de las células al sustrato. Se muestran fotos representativas de una célula analizada en cada condición y una serie de fotografías cada 25 segundos de la región correspondiente a la protrusión (demarcada en el recuadro naranja). Se aprecia que las células carentes de Ric-8A presentan menor número de haces de actina en la protrusión. Se muestra la actina en gris y la línea naranja muestra la superficie celular en el tiempo 0. Barra = 10 μ m. **B) Cuantificación de los haces de actina.** La cuantificación de los videos anteriormente mostrados indica una disminución significativa del tamaño de los haces de actina en las células carentes de mRic-8A. (t-test, $n = 6$, $p < 0.05$)

los haces de actina formados en las regiones protrusivas de las células en las distintas condiciones, estructuras donde ocurre una activa polimerización y que son responsables de ejercer la fuerza para extender la membrana hacia el frente y extender la protrusión. A partir de los videos, se procedió a cuantificar el número de haces de actina que se forman o desensamblan por minuto en cada célula encontrándose que en ausencia de Ric-8A $0,37 \pm 0.09$ haces se forman o desensamblan por minuto, en comparación con los $0,24 \pm 0.07$ haces/minuto formados o desensamblados en las células control. A pesar de que la diferencia observada no es estadísticamente significativa se observa que los haces de actina tienden a ser más dinámicos en ausencia de Ric-8A. **Además, se apreció que los haces de actina formados en el borde de la protrusión son de un tamaño considerablemente menor en las células carentes de Ric-8A**, disminuyendo de 3,685 μm en el caso de las células control, a 2,539 μm en las células editadas por el sistema CRISPR/Cas9 para silenciar a Ric-8A.

Ya que se observó un efecto del silenciamiento de Ric-8A sobre el tamaño de los haces de actina formados en la protrusión y que las vías de señalización de RhoGTPasas regulan la formación de estas estructuras, se procedió a evaluar si Ric-8A modula estas vías. Para ello, se evaluó si el silenciamiento de Ric-8A altera la actividad de estas GTPasas. Para ello se utilizaron dos biosensores moleculares que usan el fenómeno de transferencia de energía por resonancia de Foester (FRET) para medir la actividad de RhoA y Rac1. Los biosensores son plásmidos que codifican para una proteína de fusión que contiene las proteínas fluorescentes YFP y CFP. Ambas proteínas se encuentran separadas por el dominio de unión de un efector de cada proteína G pequeña por lo que sólo en presencia de las GTPasas en su conformación activa el biosensor adquiere la conformación que permite que ocurra el fenómeno FRET. Al excitar sólo a CFP se transmite la energía a YFP por lo que en la célula se observa la fluorescencia de YFP de forma proporcional a la actividad de la proteína activa en evaluación. Esta forma de medir la eficiencia FRET corresponde al método de *Sensitized emission* y para llevar a cabo las mediciones se utilizó el *plug-in* para ImageJ “PixFRET” (Feige y col., 2005). Se indujo la migración de las células sembrándolas sobre fibronectina a una confluencia baja para que no existiera contacto entre células y se utilizó un microscopio confocal para medir la intensidad de

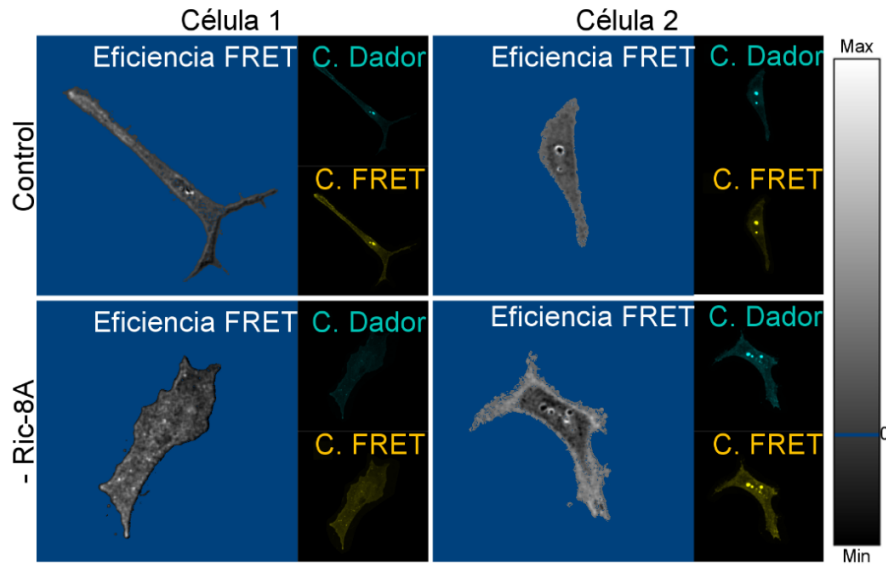
fluorescencia de los canales dador (CFP) y FRET (YFP) excitando sólo a CFP en ambos casos.

En el caso de Rac1, no se observaron diferencias en la localización o nivel de eficiencia FRET entre las condiciones control y sin Ric-8A (*Figura 14a*). Sin embargo, en la condición control se esperaba observar mayor cantidad de Rac1 activa en las protrusiones que en el resto de la célula, ya que ha sido ampliamente descrita su función inductora de la formación del lamelipodio (Kraynov y col., 2000; Sadok & Marshall, 2014). El hecho de que la eficiencia FRET obtenida en la condición control (y también en la condición –Ric-8A) sea homogénea en toda la célula es una señal de que la sonda no fue efectiva en medir la actividad de la proteína en las condiciones experimentales utilizadas, ya que se ha observado anteriormente una actividad diferencial de Rac1 durante la migración por este método (Faix & Weber, 2013; Filić y col., 2012; Jihoon Kim y col., 2019; Kraynov y col., 2000) .

En el caso de la GTPasa RhoA si se detectaron regiones de la célula con una evidente mayor actividad de la proteína y esta corresponde a las regiones de las protrusiones donde ocurre una activa remodelación del citoesqueleto, por lo que corresponde a la observación que se espera obtener (*Figura 14b*). Sin embargo, al comparar las células control con las carentes de Ric-8A no se observan diferencias en la intensidad de la eficiencia FRET obtenida, ni las regiones de la célula donde se localiza la actividad de RhoA, por lo que **se sugiere que la inhibición de la expresión de mRic-8A no altera la señalización de la GTPasa pequeña RhoA.**

En conjunto, estos resultados indican que Ric-8A se localiza en los bordes de las protrusiones, pero que la alteración de los niveles de expresión de mRic-8A no afecta la estructura de ellas, sino que más bien desregula la dinámica de sus componentes. Se requiere realizar otro tipo de ensayos celulares para determinar si este efecto se debe a la alteración de la velocidad de polimerización de la actina en el lamelipodio u otros procesos como la tasa ensamble / desensamble de adhesiones focales y la vía de señalización implicada en ello.

A) Medición de la actividad de Rac1



B) Medición de la actividad de RhoA

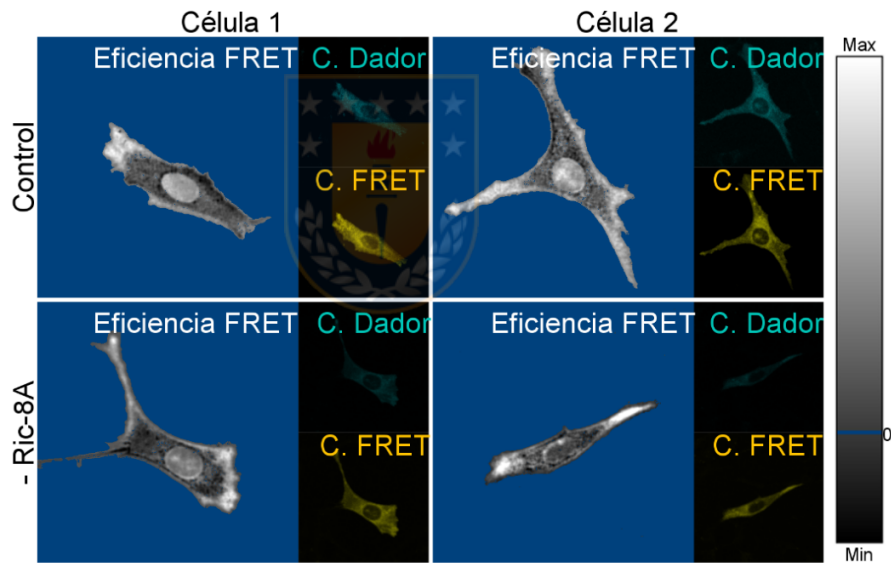


Figura 14. **Evaluación de la actividad de Rac1 y RhoA mediante FRET.**

A) Medición de la actividad de Rac1. Se analizó la eficiencia FRET (razón entre la intensidad de la señal del canal FRET y el canal dador) en células NIH3T3 control y carentes de Ric-8A, transfectadas con un biosensor FRET para medir la actividad de Rac1. En los paneles laterales se muestran las imágenes obtenidas en el canal dador (emisión de CFP al excitar CFP) y el canal FRET (emisión de YFP al excitar CFP). Se muestran dos células analizadas y la barra lateral muestra el código de colores de la eficiencia FRET. Se observa que no se pudo detectar la actividad de Rac1 ya que no se presentan regiones de la célula con mayor eficiencia FRET que otras. **B) Medición de la actividad de RhoA.** Se muestra lo mismo que en A) pero usando células NIH3T3 transfectadas con un biosensor FRET para medir la actividad de RhoA. Se detectó la actividad de RhoA en las regiones protrusivas de las células, sin embargo, no se observan diferencias entre las células carentes de Ric-8A y las células control.

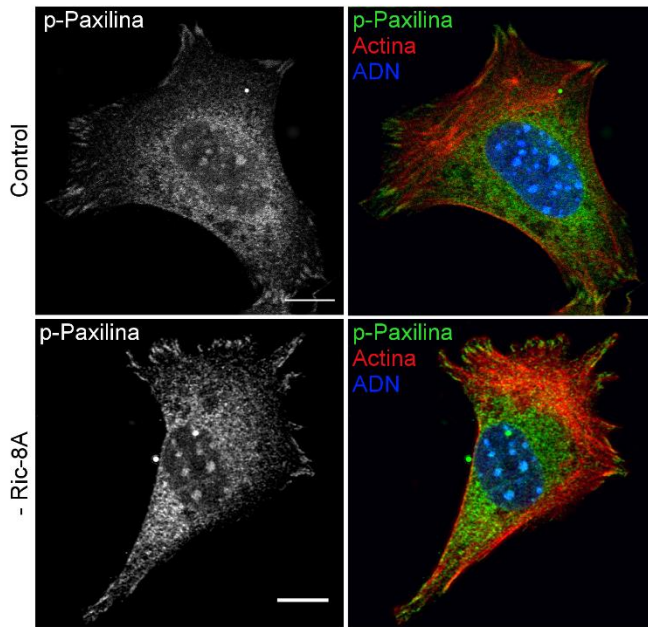
4.4 Estudio del efecto de la sobre-expresión y silenciamiento de Ric-8A en la adhesión celular

La migración celular depende de varios eventos celulares relacionados con la remodelación del citoesqueleto para poder llevarse a cabo de forma efectiva. Uno de estos eventos es la adhesión celular, proceso mediante el cual se establece la conexión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular sobre la que se ejercen las fuerzas mecánicas generadas por la contracción de las fibras de Acto-miosina para permitir el avance de la célula. Dado que la ausencia de mRic-8A desregula el proceso migratorio y que en *Xenopus* el silenciamiento de xlRic-8A induce una disminución en el número de adhesiones focales en las células de la cresta neural (Fuentealba y col., 2013; Toro-Tapia y col., 2018) se evaluó si la alteración de los niveles de expresión de mRic-8A afecta la adhesión celular en células NIH3T3.

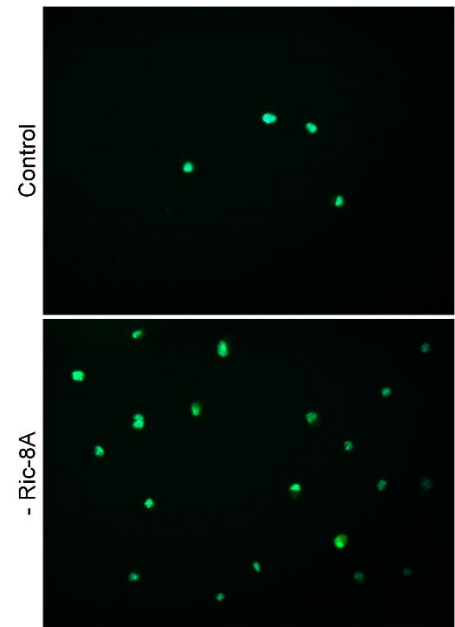
Como ya existe evidencia de la alteración del número de adhesiones focales a causa de la alteración de la expresión de Ric-8A en *Xenopus*, se comenzó realizando ensayos de inmunocitoquímica contra paxilina fosforilada (p-Pax), un componente de las adhesiones focales maduras, en células NIH3T3 silvestres y donde la expresión de mRic-8A ha sido silenciada (*Figura 15a*). A diferencia de lo observado en *Xenopus*, se observan adhesiones focales maduras en las dos condiciones evaluadas. Al considerar su fenotipo, éstas presentan una forma alargada y se orientan de forma paralela a la dirección de la protrusión tanto en la condición control como en las células sin Ric-8A. De forma complementaria, se cuantificó el número de adhesiones presentes en el borde de las células contándose en promedio $20,27 \pm 3,6$ adhesiones focales por célula en el caso de las células control y $25,41 \pm 3,2$ en las células donde Ric-8A ha sido silenciada (*Figura 15c*). Aunque la diferencia observadas no es estadísticamente significativa (t-test, N = 2, p = 0.3247), los resultados muestran una tendencia al aumento de las adhesiones celulares en ausencia de Ric-8A.

Para evaluar si Ric-8A está implicado en la capacidad de adhesión de estas células al sustrato se realizó un ensayo simple de adhesión: se sembraron células NIH3T3 control y carentes de Ric-8A sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina y se incubaron por 30 minutos, tras lo cual se realizaron lavados suaves y se fijaron las células para contabilizar cuántas de ellas se encontraban adheridas al sustrato. Al

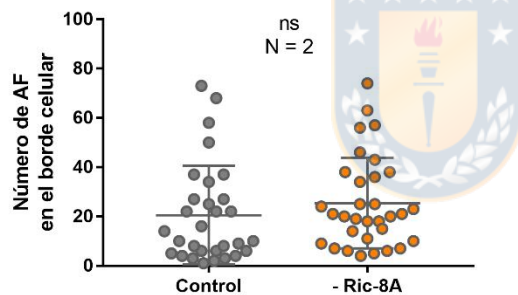
A) Análisis morfológico de las adhesiones focales



B) Análisis cuantitativo de la adhesión celular



C) Cuantificación del número de adhesiones focales



D) Cuantificación de la adhesión celular

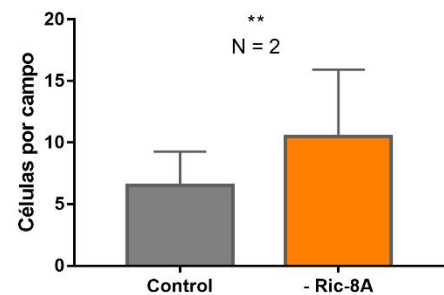
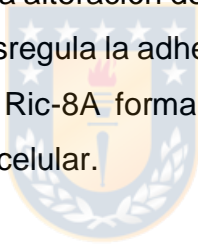


Figura 15. Evaluación del efecto de la expresión de mRic-8A en la adhesión celular.

A) Análisis morfológico de las adhesiones focales. Se evaluó la presencia y la estructura de adhesiones focales en células NIH3T3 control y carentes de Ric-8A por inmunocitoquímica contra Paxilina fosforilada (p-Paxilina). Las células fueron sembradas sobre Fibronectina y fijadas 120 minutos después. Se observa la presencia de adhesiones focales en las protrusiones celulares en ambas condiciones evaluadas. Se muestra p-Paxilina en gris o verde, actina en rojo y ADN en azul. Barra = 10 μ m. **B) Análisis de la adhesión celular.** Se analizó el efecto de la expresión de mRic-8A sobre la adhesión celular sembrando células NIH3T3 control o carentes de mRic-8A sobre Fibronectina. Se esperó 30 minutos y se fijaron las células con PFA 4% y se montaron sobre medio de montaje con DAPI para marcar los núcleos. Se muestran imágenes representativas tomadas con un microscopio de fluorescencia mostrando las células adheridas a la placa. **C) La cuantificación del número de adhesiones focales (AF)** en el borde celular muestra que no hay diferencias entre las condiciones evaluadas. (t-test, N = 2). **D) La cuantificación de la adhesión celular** muestra que en ausencia de mRic-8A hay un mayor número de células adheridas a las placas cubiertas con Fibronectina tras 30 minutos de ser sembradas. Se evaluaron al menos 10 células por experimento. (t-test, $p < 0.05$, N = 2).

cuantificar el número de células presentes por campo visual (*Figura 15d*) se obtuvo que existe un aumento del 37,9% ($\pm 11,9$) de células adheridas al sustrato en el caso del silenciamiento de Ric-8A en comparación con las células silvestres ($6,52 \pm 0,55$ células por campo visual en la condición control vs $10,5 \pm 1,21$ células carentes de Ric-8A por campo), resultados que muestran que **la inhibición de la expresión de mRic-8A en células NIH3T3 induce un aumento en el número de células adheridas a fibronectina tras 30 minutos de adhesión** (*Figura 15b*)

En resumen, los resultados obtenidos en este objetivo muestran que la alteración de los niveles de expresión de mRic-8A desregulan el proceso migratorio, alterando la velocidad de la migración. Además, se encontró que esta proteína presenta una localización peculiar durante la migración que es dependiente de la morfología celular y de las señales extracelulares, concentrándose en el borde de las protrusiones. De forma concordante con su localización, también se describió que la disminución de la expresión de mRic-8A provoca la alteración de la estructuración dinámica de los haces de actina en el lamelipodio y desregula la adhesión celular. En conjunto, los resultados de este objetivo sugieren que Ric-8A forma parte de la maquinaria molecular que regula el proceso de migración celular.



Objetivo 2: Identificar proteínas interactoras de Ric-8A involucradas en la regulación de la remodelación del citoesqueleto de actina.

A través del cumplimiento del objetivo anterior se pudo comprobar que Ric-8A es una proteína que controla la migración celular posiblemente a través de la regulación de las vías de señalización que modulan la organización del citoesqueleto. Sin embargo, pese a que nuestro grupo de investigación ha reportado algunos mecanismos, aun no se conocen todas las vías de señalización mediante la cual Ric-8A cumple su función, o si esta proteína interacciona con proteínas del citoesqueleto o sus reguladores. En base a ello, se propuso como segundo objetivo de este trabajo identificar proteínas interactoras de Ric-8A cuya función se relacione con el proceso migratorio celular o su regulación.

4.5 Análisis masivo de los interactores de mRic-8A por espectrometría de masas

Para conocer qué proteínas interactúan ya sea directa o indirectamente con Ric-8A se diseñó un experimento que consiste en inmunoprecipitar mRic-8A desde células NIH3T3 en migración y analizar por espectrometría de masas los complejos proteicos inmunoprecipitados para conocer la identidad de las proteínas presentes en ellos. Para llevar a cabo la inmunoprecipitación se utilizó un anticuerpo covalentemente unido a la resina ya que para el análisis por espectrometría de masas se debe disminuir al mínimo la cantidad de anticuerpo presente en el eluato. Es por ello que se debió utilizar el anticuerpo contra el epítipo c-Myc, ya que no contamos con un anticuerpo contra Ric-8A unido covalentemente a la resina.

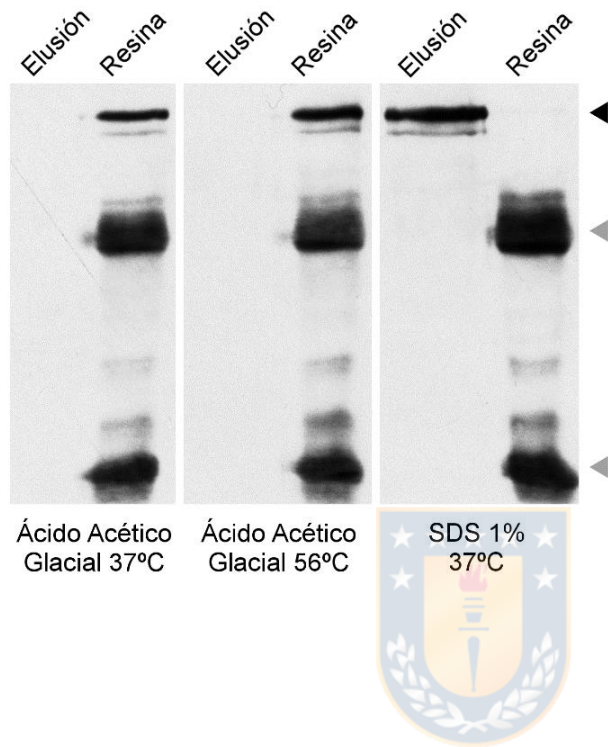
Con el fin de estandarizar las condiciones de elusión de los complejos proteicos inmunoprecipitados se inmunoprecipitó Myc-Ric-8A desde células NIH3T3 utilizando un anticuerpo contra c-Myc unido covalentemente a la resina de agarosa y se probaron tres condiciones de elusión diferentes: incubación de la resina con ácido acético glacial a 37°C por 10 minutos, incubación de la resina con ácido acético glacial a 56°C por 10 minutos, e incubación de la resina con SDS 1% a 37°C por 1 hora. Para evaluar la

eficacia del buffer de elusión se cargaron en un gel de agarosa tanto el eluato como la resina remanente de cada condición y se analizó por *Western blot* contra c-Myc si es que en el eluato había presencia de Myc-Ric-8A y de anticuerpo. Tras el análisis se encontró que la elusión con SDS 1% es la única condición en que se logró romper la interacción proteína – anticuerpo, de tal forma que Myc-Ric-8A se obtiene en el eluato dejando un remanente mínimo en la resina (*Figura 16a*).

Para la identificación masiva de los interactores de mRic-8A se utilizó la técnica LC/ESI-MS/MS, la que consiste a grandes rasgos en separar las proteínas fragmentadas presentes en las muestras por HPLC, ionizarlas e identificar los péptidos generados a través de dos pasos por el espectrómetro de masas. Para poder identificar una proteína por esta técnica ésta debe estar presente en una cantidad tal que sea visible al teñirla con azul de Coomassie (alrededor de 100 ng), por lo que también fue necesario estandarizar cuánta proteína se debía utilizar para realizar la inmunoprecipitación y que tras la elusión pudieran observarse diferentes bandas en el eluato. Se realizó la inmunoprecipitación de Myc-mRic-8A a partir de 2mg de proteína total de lisado celular y tras la elusión se cargó en un gel de poliacrilamida la totalidad del eluato y de la resina obtenida. Se realizó SDS-PAGE y se tiñó con azul de Coomassie, verificándose que en el carril correspondiente al eluato se observan muchas bandas de diversos tamaños, que corresponden a los componentes de los complejos proteicos inmunoprecipitados y en el carril de la resina se observan sólo las bandas correspondientes a las cadenas pesada y liviana del anticuerpo (*Figura 16b*).

Las condiciones de inmunoprecipitación estandarizadas fueron utilizadas para realizar la inmunoprecipitación de Myc-mRic-8A (y de c-Myc como control) desde células NIH3T3 crecidas sobre fibronectina y al 60% de confluencia, con el objetivo de minimizar los contactos célula – célula y favorecer los contactos célula – matriz extracelular y que, consecuentemente, las células presentaran mayor número de protrusiones. Los complejos eluidos fueron analizados en la plataforma de proteómica del GIGA de la Université de Liège, Bélgica y tras el análisis se informó la identidad de los péptidos identificados en cada una de las muestras. En la *Tabla 4* se presentan las proteínas identificadas exclusivamente en la muestra Myc-mRic-8A y no en el control c-Myc y en la *Tabla 5* aquellas proteínas que fueron identificadas en ambas muestras

A) Estandarización de la elusión



B) Análisis del inmunoprecipitado

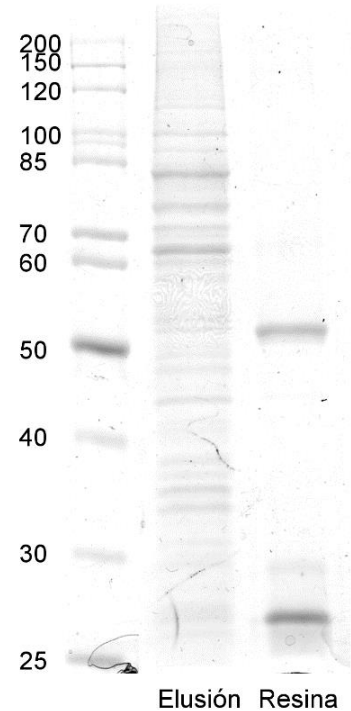


Figura 16. *Estandarización de la inmunoprecipitación de Myc-mRic-8A.*

A) Estandarización de la elusión. Inmunodetección de Myc-mRic-8A para verificar la separación de los complejos proteicos inmunoprecipitados (Elusión) del anticuerpo utilizado para la cromatografía de afinidad (Resina). Se probaron diferentes condiciones de elusión encontrándose que sólo la incubación del inmunoprecipitado con SDS 1% a 37°C por 1 hora permitía obtener a Myc-mRic-8A (señalado con la flecha negra) en el eluido dejando a las cadenas pesada y liviana del anticuerpo (señaladas con las flechas grises) en la resina. **B) Análisis del inmunoprecipitado.** Se analizó por SDS-PAGE las proteínas eluidas y la resina tras la inmunoprecipitación de Myc-mRic-8A para corroborar que las proteínas presentes en la muestra son detectables por tinción con azul de Coomassie, condición requerida para llevar a cabo la identificación de interactores por espectrometría de masas.

Código Acceso	Descripción	Sum PEP Score	Cobertura	N° Péptidos
Q3TIR3	Synembryn-A	649,96	77,74	62
P21278	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11	79,83	31,48	10
P21279	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	78,45	34,54	10
Q9DC51	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	35,34	23,45	7
P27601	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	33,56	23,87	8
P08752	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	31,30	19,72	6
Q61414	Keratin, type I cytoskeletal 15	23,01	9,51	5
P62137	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	17,18	10,61	3
Q60809	CCR4-NOT transcription complex subunit 7	15,43	7,72	2
Q8BWD8	Cyclin-dependent kinase 19	14,15	6,99	4
Q9WVR4	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	12,78	4,75	3
Q9R112	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	11,29	5,78	2
P11983	T-complex protein 1 subunit alpha	10,96	4,68	2
Q9JIF0	Protein arginine N-methyltransferase 1	10,39	8,63	3
O08664	B-cell CLL/lymphoma 7 protein family member C	9,64	10,14	2
Q9CQI7	U2 small nuclear ribonucleoprotein B''	8,36	11,56	2
P27661	Histone H2AX	6,32	22,38	2
Q99J72	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3	6,20	5,13	2
P27600	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12	5,87	7,39	3
Q8BHD7	Polypyrimidine tract-binding protein 3	5,55	3,25	2
O35343	Importin subunit alpha-3	4,92	3,26	2
Q99LI9	Polyribonucleotide 5'-hydroxyl-kinase Clp1	4,77	4,24	2
P07724	Serum albumin	4,55	3,78	2
Q8CIE2	Zinc finger MIZ domain-containing protein 2	4,36	2,93	3

Tabla 4. Proteínas interactoras de Ric-8A identificadas por espectrometría de masas. Se listan las proteínas identificadas tras la inmunoprecipitación de Myc-mRic-8A a partir de células NIH3T3 en migración. Éstas corresponden a las proteínas presentes en la muestra y no encontradas en el control (inmunoprecipitación de c-Myc). Se muestran el código de acceso, la descripción, el Score del grupo de péptidos, el porcentaje de cobertura de la secuencia y el número de péptidos encontrados.

Código Acceso	Descripción	Sum PEP Score	Cobertura	N° Péptidos	Area c-Myc	Area Myc-Ric-8A	Razón
Q6NZC7	SEC23-interacting protein	225,83	30,46	26,00	1000000000	2100000000	2,10
P68368	Tubulin alpha-4A chain	65,59	27,23	8,00	1400000000	2900000000	2,07
Q9JKB3	Y-box-binding protein 3	47,94	21,61	6,00	6000000000	12000000000	2,00
Q9JKY0	CCR4-NOT transcription complex subunit 9	27,81	23,08	6,00	4600000000	18000000000	3,91
Q8BH59	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	23,61	6,79	4,00	2400000000	5300000000	2,21
Q64282	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	22,17	10,37	4,00	6900000000	14000000000	2,03
O35740	Cbp/p300-interacting transactivator 2	14,84	17,47	2,00	1600000000	5100000000	3,19
Q60716	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	11,86	5,40	2,00	6900000000	23000000000	3,33
Q9D824	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1	10,41	4,30	2,00	4200000000	11000000000	2,62
P01633	Ig kappa chain V19-17	10,25	12,08	2,00	1200000000	37000000000	3,08
Q8BWW4	La-related protein 4	9,89	3,48	2,00	4700000000	9500000000	2,02
Q6P5E4	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	9,73	2,13	2,00	1300000000	38000000000	2,92
Q61838	Pregnancy zone protein	8,46	1,94	3,00	1900000000	63000000000	3,32
Q9D338	39S ribosomal protein L19, mitochondrial	6,86	8,22	2,00	2400000000	59000000000	2,46

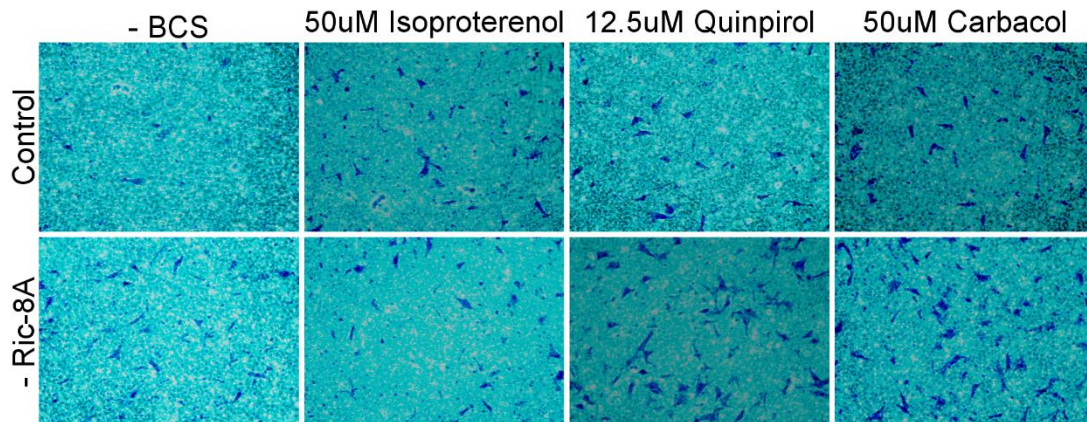
Tabla 5. Interactores de Myc-mRic-8A mayormente representados en la muestra. Se listan las proteínas identificadas tras la inmunoprecipitación de Myc-mRic-8A con el doble de abundancia en la muestra de Myc-mRic-8A que en el control c-Myc. Se muestran los parámetros descritos en la Tabla 4, además del valor del área bajo la curva en el espectro en la muestra y en el control y la razón entre ellas.

pero que presentan un área bajo la curva en el espectro del doble del tamaño del *peak* correspondiente en el espectro de la muestra control. El área bajo la curva del espectro obtenido es proporcional a la cantidad de proteína identificada en la muestra (Domon, 2006) por lo que la *Tabla 5* muestra las proteínas que se identificaron con al menos el doble de intensidad de señal en el inmunoprecipitado de Ric-8A comparado con el control. En las tablas se muestra la identidad de las proteínas y su respectivo código de acceso: el *Score* asignado a cada grupo (que recoge los diferentes péptidos identificados para la misma proteína), la cobertura indica el porcentaje de la secuencia total de la proteína que fue identificado en la muestra y el N° de péptidos cuantos péptidos correspondientes a esa proteína, iguales o diferentes, fueron leídos. Además, en la *Tabla 5* se muestra el área bajo la curva y la razón de ésta entre la muestra Myc-mRic-8A y el control c-Myc.

Entre las proteínas identificadas como componente de los complejos co-inmunoprecipitados junto con mRic-8A se encuentran diferentes subunidades G α de proteínas GTPasas heterotriméricas, proteínas que han sido anteriormente descritas como interactores de Ric-8A. Ejemplo de ellas son G α 13 (P27601) y Gai2 (P08752), proteínas que han sido relacionadas previamente con la regulación de GTPasas pequeñas y la migración celular (Lin y col., 2009; Shen y col., 2012, 2015; Ward y col., 2015; Wiege y col., 2012; Yao y col., 2010).

La hipótesis de este trabajo plantea que Ric-8A regula la migración celular a través de la modulación de las vías de señalización de proteínas G heterotriméricas y este resultado, que muestra la presencia de G α 13 y Gai2 en el estudio de identificación de interactores de Ric-8A en células NIH3T3 en migración, apoya esta hipótesis. Para complementar este resultado, se realizaron ensayos de migración en cámara de Boyden utilizando como agente quimiotáctico ligandos para diferentes GPCRs: Isoproterenol (agonista de los receptores β -adrenérgicos acoplados a Gs), Quinpirol (activa a receptores dopaminérgicos D2 y D3 acoplados a Gi) y Carbacol (agonista de receptores Muscarínicos M1, M2, M3 acoplados a Gq y M2 y M4 acoplados a Gi/o). Al cuantificar el número de células que cruzan hacia la cámara inferior tras dos horas de incubación en presencia del agente quimiotáctico (*Figura 17*) se observa que los tres ligandos inducen la migración de las células NIH3T3. Al analizar el efecto de los ligandos sobre la migración de las células NIH3T3 se destaca el efecto de Quinpirol y

A) Análisis de la migración en respuesta a la activación de GPCRs



B) Cuantificación del ensayo de migración por Transwell

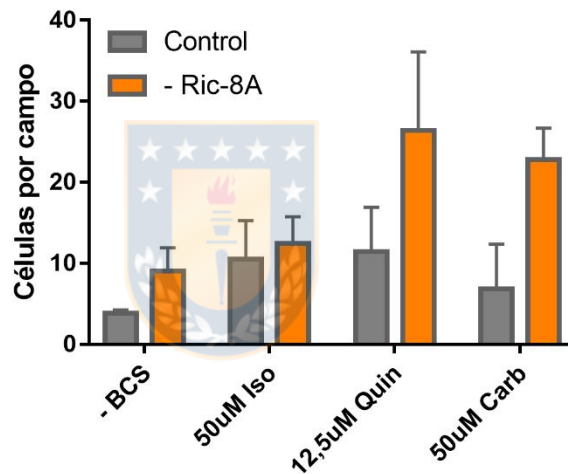


Figura 17. *Análisis de la migración celular en respuesta a la activación de receptores acoplados a proteínas G.*

A) Ensayo en cámara de Boyden en respuesta a agonistas de GPCRs. Fotografías representativas de ensayos de migración por Transwell de células NIH3T3 control o carentes de Ric-8A sin estimular (-BCS) o estimuladas con 50 μ M Isoproterenol (agonista de receptores β -adrenérgicos, acoplados a proteína Gs), 12.5 μ M Quinpirol (agonista de los receptores de dopamina D2 y D3 acoplados a proteína Gi), o 50 μ M Carbacol (agonista de los receptores muscarínicos M 1-5, acoplados a Gq y Gi). **B) Cuantificación.** El ensayo anteriormente mostrado fue realizado sólo una vez sin embargo, el promedio de las 5 réplicas realizadas indica que las células carentes de Ric-8A son sensibles a la activación de los receptores Muscarínicos y de Dopamina, a diferencia de las células control. N = 1.

carbacol; en presencia de éstos las células carentes de Ric-8A presentan mayor capacidad migratoria que las células control, ya que se contabilizan más del doble de células que logran cruzar a la cámara inferior. En el caso de Isoproterenol, es esperable no ver efectos ante la ausencia de Ric-8A, ya que esta proteína no interacciona con G α s. Este resultado indica que en ausencia de Ric-8A las células son incapaces de responder de forma correcta a este estímulo migratorio. Como ambos ligandos activan a receptores acoplados a proteínas G α i, estos resultados sugieren que **Ric-8A regula la migración celular a través de la vía de señalización de G α i**. Sin embargo, se debe tener en consideración que por limitaciones prácticas este ensayo fue realizado sólo una vez y además es necesario realizar estudios complementarios para determinar la vía de señalización en que participa Ric-8A para regular la migración.

Entre los interactores de Ric-8A identificados también se encontraron proteínas cuya interacción con Ric-8A no ha sido previamente reportada, como ciertas quinasas y fosfatasas, hecho que indica que la actividad de Ric-8A puede estar siendo regulada por fosforilación. También se encontraron proteínas interactoras que sugieren que Ric-8A participa en otras funciones en este modelo celular. Ejemplos de ello es que se observó interacción con la proteína interactora de Sec23 (código de acceso Q6NZC7) y con importina α 3 (código de acceso O35343), ambas proteínas cuya función se relaciona con el transporte intracelular, lo que sugiere la participación de Ric-8A en eventos de transporte. Se encontró también interacción con la subunidad α de T-complex protein 1 (TriC), complejo requerido para el plegamiento y distribución de tubulina (Tian & Cowan, 2013).

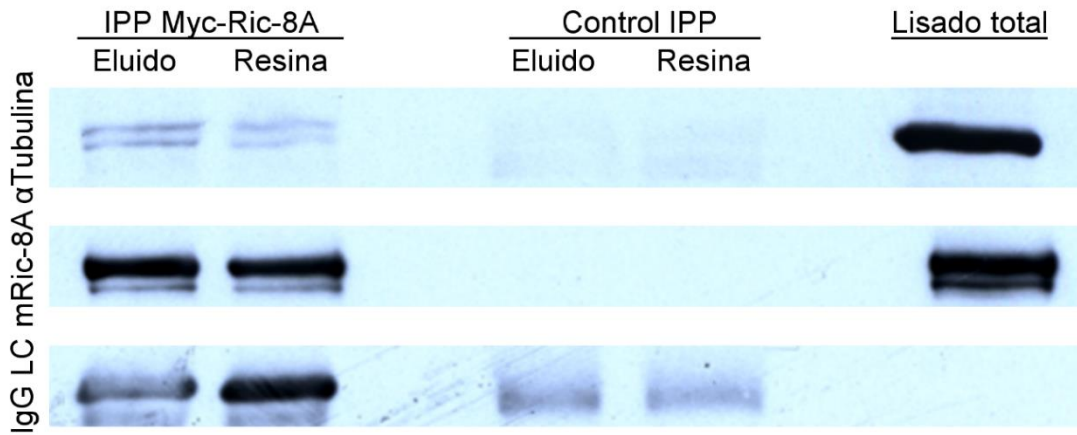
Otra de las proteínas reportadas como interactores de Ric-8A en este trabajo, es destacable la presencia de tubulina- α 4A. Tubulina es el principal componente de los microtúbulos, por lo que su identificación como un interactor de mRic-8A indica que **Ric-8A interacciona con los microtúbulos**, ya sea de forma directa o a través de proteínas de andamiaje. Este resultado establece una evidente relación entre Ric-8A y el citoesqueleto.

4.6 Análisis de la interacción de mRic-8A con otras proteínas por co-inmunoprecipitación

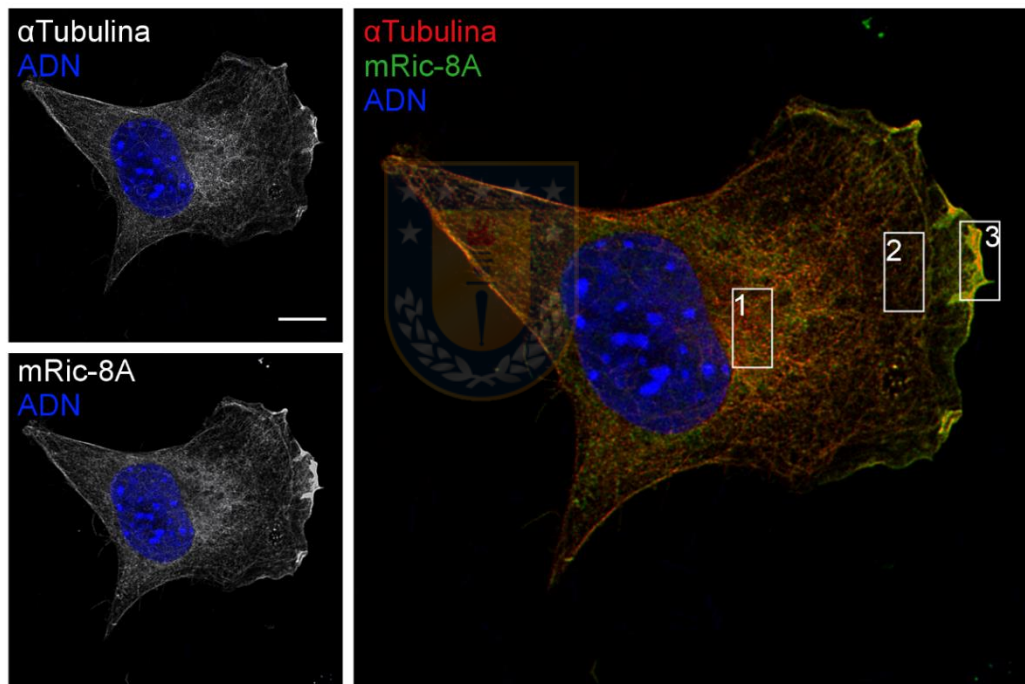
En el apartado anterior se identificó a α -Tubulina como un interactador de mRic-8A, interacción que fue descrita a través de un análisis de espectrometría de masas. Para complementar el resultado obtenido, se verificó la interacción de mRic-8A con α -Tubulina mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación convencional (*Figura 18a*), para esto se inmunoprecipitó Myc-mRic-8A desde células NIH3T3 crecidas sobre Fibronectina utilizando un anticuerpo contra c-Myc (o con IgG normal como control) y las resinas unidas a los complejos co-inmunoprecipitados fueron analizadas de dos formas: la resina fue cargada directamente en un gel para realizar SDS-PAGE y *Western Blot*, o fue incubada con SDS 1% para eluir los complejos proteicos antes de analizar el eluato de la misma manera. Esto se realizó con el fin de verificar que el proceso de elusión no afectara el resultado. En ambas condiciones ensayadas se observa el mismo resultado, **comprobándose la interacción de mRic-8A con α -tubulina**, ya que se observa la presencia de Tubulina en el carril de la inmunoprecipitación de Ric-8A y no en el control de IgG normal, indicando que la interacción es producto de la presencia de Ric-8A en el complejo y no corresponde a una unión inespecífica de la proteína a la resina o al anticuerpo.

Anteriormente en este trabajo se mostró que Ric-8A se concentra en los bordes de las protrusiones, lo que sugiere que ella participa en la generación del lamelipodio. Para evaluar si tubulina comparte esta localización con Ric-8A se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica para analizar la co-localización de ambas proteínas y evaluar en qué región de la célula se localiza la interacción (*Figura 18 b-c*). Las fotos corresponden a imágenes deconvolucionadas, las que entregan una mejor resolución de la imagen al disminuir el ruido, de células NIH3T3 silvestres crecidas sobre fibronectina a las que se les realizó inmunocitoquímica para visualizar mRic-8A (endógeno) y α -tubulina. En el caso de mRic-8A se observa que éste se localiza en diferentes regiones de la célula, con una distribución que se asemeja a la distribución de los microtúbulos. Además, el marcaje se hace más denso en la región donde se localiza el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y se concentra en el borde de la protrusión, como ya fue ampliamente descrito durante el desarrollo del objetivo

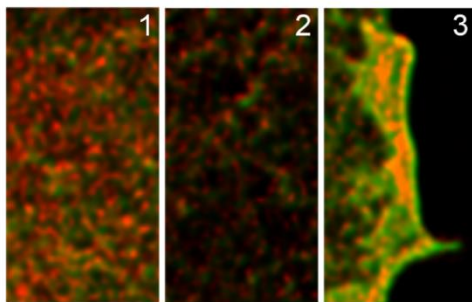
A) Análisis de la interacción de α Tubulina y mRic-8A por co-inmunoprecipitación



B) Inmunocitoquímica contra α Tubulina y mRic-8A en células NIH3T3



C) Análisis de la co-localización de α Tubulina y mRic-8A



Región	Célula	1	2	3	
C. Pearson		0,817	0,3	0,453	0,849
C. Sobreposición		0,904	0,955	0,905	0,944
C. M1		0,602	0,53	0,64	0,711
C. M2		0,788	0,662	0,539	0,95

Figura 18. **Análisis de la interacción de Ric-8A con α tubulina.**

A) CO-IPP de mRic-8A y α tubulina. Se inmunoprecipitó Myc-mRic-8A desde células NIH3T3 usando un anticuerpo contra el epítipo c-Myc (IPP Myc-Ric-8A) y una mezcla de anticuerpos de ratón no inmunizado como control (Control IPP). Se analizaron las proteínas co-inmunoprecipitadas por *Western blot* contra α -tubulina (panel superior) y Ric-8A (panel medio). Se muestra también la cadena liviana de la IgG como control de carga de la IPP (panel inferior). El análisis se hizo eluyendo los complejos inmunoprecipitados (Eluido) y cargando la resina sin el proceso de elusión (Resina). Se observa la co-inmunoprecipitación de α -tubulina con mRic-8A ya que la banda correspondiente a tubulina se presenta sólo en la inmunoprecipitación y no en el control. **B) Inmunofluorescencia de α -tubulina y mRic-8A en células NIH3T3.** Se estudió la localización de α tubulina (panel superior) y mRic-8A (panel inferior) por inmunocitoquímica en células NIH3T3 silvestres crecidas sobre fibronectina, utilizando anticuerpos contra las proteínas endógenas. En el panel de la derecha se muestra la sobreposición de ambas imágenes (α -tubulina en rojo y mRic-8A en verde, correspondencia en amarillo) donde se observan diferentes grados de correspondencia entre ambas marcas en distintas regiones celulares, las que se identifican con los números 1, 2 y 3. ADN se muestra en azul. Barra = 10 μ m. **C) Colocalización de α tubulina y mRic-8A.** Se cuantificó la co-localización de las marcas de α -tubulina (rojo) y mRic-8A (verde) en la célula completa y en las regiones demarcadas en B), utilizando el plugin JACoP de ImageJ. Se observa que en la región 3 correspondiente a la zona protrusiva de la membrana existe un alto grado de co-localización, presentándose un coeficiente de Pearson cercano a 1 y un coeficiente de Mander M2 que indica que el 95% del total de Ric-8A en esta región se sobrepone con α -tubulina.



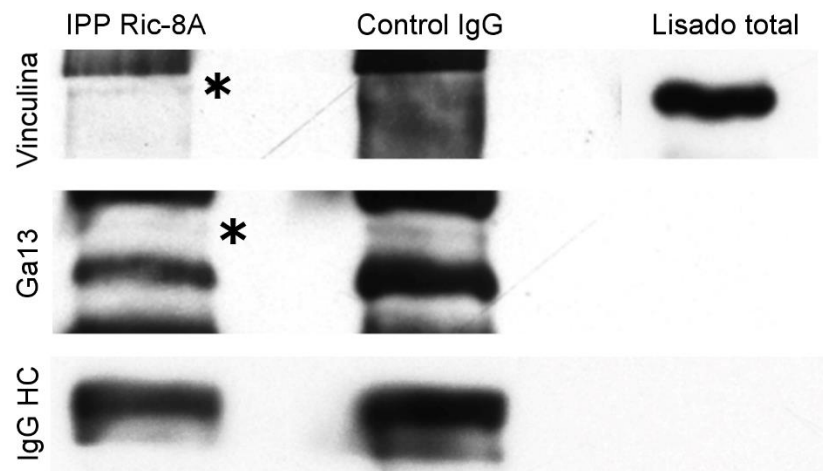
anterior. Por su parte, como es esperado, α -tubulina muestra su distribución típica formando los microtúbulos, percibiéndose los filamentos ocupando las diferentes regiones celulares. Al superponer ambos marcajes (mRic-8A en verde, α -tubulina en rojo y la superposición en amarillo) se visualizan las regiones celulares donde ambas proteínas comparten el espacio. Para poder realizar un análisis más detallado de la distribución de ambas proteínas, se analizaron imágenes con mayor resolución de tres regiones diferentes de la célula: la zona cercana al núcleo donde se observa una mayor intensidad de marcaje para mRic-8A y donde debería estar localizado el retículo endoplásmico (nombrada región 1 en la *Figura 18c*), la región entre el núcleo y el lamelipodio (región 2) y el borde del lamelipodio (región 3). Si se observa de forma detallada, mRic-8A se presenta como una marca punteada que se distribuye asociada a α -tubulina pero no en su totalidad, encontrándose tanto sobrepuesta con α -tubulina como de forma independiente en todas las regiones analizadas, pero existe un mayor grado de sobre-posición en la región 3 en comparación con las otras regiones. Para poder cuantificar el grado de co-localización entre ambas proteínas en esta imagen se calculó el coeficiente de Pearson para definir la relación existente entre ambas señales. El coeficiente de Pearson va desde -1 a 1, donde el valor de -1 indica una relación inversamente proporcional perfecta, 0 indica que no hay relación y +1 indica una relación directamente proporcional (revisado en Dunn y col., 2011). En el caso de la célula completa, ambos marcajes presentan un coeficiente de Pearson de 0,817 indicando un alto grado de co-localización; un valor similar fue obtenido en la región del lamelipodio. Sin embargo, en las regiones 1 y 2 el valor de este coeficiente es más bajo, lo que implica un menor grado de relación entre ambos marcajes. El coeficiente de sobre-posicionamiento es un indicador de co-ocurrencia e indica la proporción de pixeles que presentan ambos marcajes, independiente de su intensidad. Por su parte, el coeficiente M1 (fracción de canal verde) indica de forma más precisa la fracción de Ric-8A que se sobre-posiciona con α -tubulina y de igual forma, M2 (fracción de canal rojo) indica la porción de α -tubulina que se sobrepone con mRic-8A (Dunn y col., 2011; Manders y col., 1993). Estos indicadores muestran que existe co-localización de mRic-8A y α -tubulina, siendo ésta mayor en el borde del lamelipodio, donde el 95% de la α -tubulina presente en esta región ocupa el mismo territorio que el 71% de mRic-8A en la misma zona.

A partir de estos resultados, podemos concluir que **existe una co-localización parcial de mRic-8A con α -tubulina en algunas regiones de la célula y existe un alto grado de co-localización entre ambas proteínas en el borde del lamelipodio** ya que todos los valores obtenidos de coeficientes de relación muestran que existe cierto grado de correlación entre ambos marcajes en todas las regiones analizadas.

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que Ric-8A de *Xenopus* regula la formación de las adhesiones focales durante la migración de las células de la cresta neural a través de un mecanismo que involucra a G α 13 (Toro-Tapia y col., 2018). En nuestro análisis masivo de búsqueda de interactores de mRic-8A encontramos a G α 13, pero ningún componente de las adhesiones focales. Como se explicó anteriormente, el ensayo de co-inmunoprecipitación se realiza a partir de un lisado total, no discriminando las diferentes estructuras celulares; y el análisis de espectrometría de masas sólo muestra a los interactores con mejor puntaje y presentados en alto nivel en la muestra por lo que, si una interacción es transitoria o corresponde a una pequeña estructura subcelular, como es el caso de las adhesiones focales, puede que el análisis masivo no la haya identificado. Es por ello que para saber si mRic-8A interactúa con vinculina, un componente de las adhesiones focales, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación convencional en células NIH3T3 siguiendo el diseño experimental utilizado anteriormente. En este estudio (*Figura 19a-b*) se encontró que **vinculina co-inmunoprecipita con Myc-mRic-8A indicando que ambas proteínas forman parte del mismo complejo**. Si se analiza la cantidad de Vinculina presente en el lisado total y la banda correspondiente a la interacción de ésta con Ric-8A se puede percibir la gran diferencia de tamaño entre ambas, lo que puede ser a causa de una interacción débil o muy transitoria. En el mismo ensayo también se analizó la interacción de mRic-8A con G α 13 (interacción descrita en el análisis de espectrometría de masas y en literatura). Sin embargo, no fue posible visualizar la proteína ni siquiera en el lisado total.

Dada la pobre intensidad de la banda observada en la interacción de vinculina con mRic-8A, se repitió el experimento de co-inmunoprecipitación, pero realizando algunos cambios para tratar de mejorar la limpieza del ensayo. Un primer cambio fue que, en vez de utilizar IgG normal como control, se inmunoprecipitó el epítipo c-Myc con el fin de sustraer la posibilidad de que la marca sea producto de una interacción inespecífica

A) Ensayo de co-inmunoprecipitación



B) Análisis de Co-IPP desde los complejos eluidos

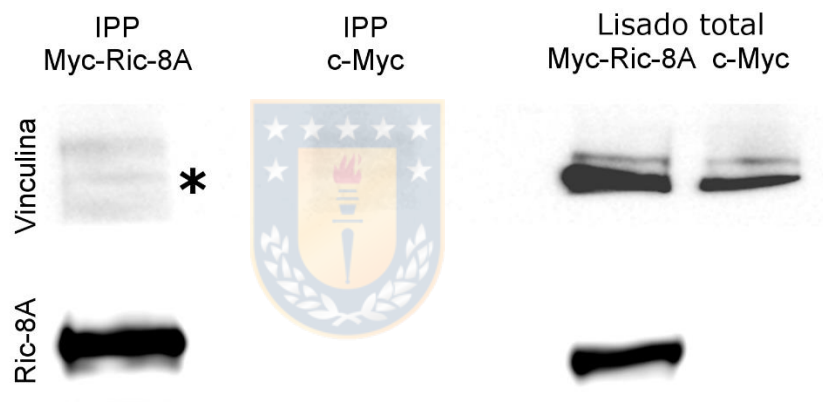


Figura 19. Análisis de la interacción de Ric-8A con vinculina y Ga13 mediante co-inmunoprecipitación.

A) Interacción de mRic-8A con Ga13 y Vinculina. Se inmunoprecipitó Myc-Ric-8A desde células NIH3T3, utilizando un anticuerpo contra el epítipo c-Myc (IPP Ric-8A) y como control una mezcla de anticuerpos de ratón no inmunizado (Control IgG). Las resinas conteniendo los complejos proteicos co-inmunoprecipitados fueron cargadas en un gel de poliacrilamida para ser analizadas por *Western blot* utilizando anticuerpos contra Vinculina y Ga13 para estudiar la interacción. Se observa que Vinculina se expresa en esta línea celular (Lisado total) y que co-inmunoprecipita con Ric-8A, a diferencia de Ga13 que se detecta en el carril correspondiente a la co-inmunoprecipitación con Ric-8A pero existe interacción inespecífica también con el control. **B) Co-IPP de mRic-8A y Vinculina.** Para verificar la interacción de Vinculina con Ric-8A se repitió el experimento anterior (IPP Myc-Ric-8A), pero esta vez se utilizó como control la inmunoprecipitación del epítipo c-Myc (IPP c-Myc), además de que se eluyeron los complejos proteicos co-inmunoprecipitados de la resina antes de analizarlos. Se observa nuevamente la interacción de Vinculina con Ric-8A. En el panel inferior se muestra el control de expresión e inmunoprecipitación de Ric-8A. El asterisco muestra la banda correspondiente a la proteína analizada en cada caso

con el epítoto. Y el segundo cambio fue que los complejos proteicos inmunoprecipitados se eluyeron de la resina antes del análisis por *Western blot*, con el fin de eliminar la contaminación por proteínas unidas inespecíficamente a la resina o al anticuerpo (*Figura 19b*). Una vez hechos estos cambios pudimos observar nuevamente a vinculina co-inmunoprecipitando con mRic-8A, confirmándose de esta forma la interacción.

En el primer objetivo de este trabajo se encontró que el fenotipo provocado por la alteración de los niveles de expresión de Ric-8A es consistente con la ejecución de su función en migración a través de la formación de complejos proteicos. De forma concordante, en la segunda parte de este trabajo se encontraron diversos interactores de mRic-8A. Estos resultados permiten concluir que Ric-8A forma complejos proteicos con diferentes proteínas, entre ellas diferentes proteínas G α como por ejemplo Gai2 y G α 13, además de α -tubulina y vinculina. Estos resultados sugieren que Ric-8A regula la migración celular a través de distintos mecanismos moleculares, a través de su acción sobre las vías de señalización de proteínas G heterotriméricas y también de su interacción con tubulina.



5. DISCUSIÓN

5.1. Ric-8A regula la velocidad de migración celular a través de la modulación de las vías de señalización de proteínas G heterotriméricas.

El objetivo de esta tesis es caracterizar la función de Ric-8A en la remodelación del citoesqueleto y el rol de diferentes subunidades G α durante la migración. Es por ello que se analizó el efecto del silenciamiento y de la sobre-expresión de esta proteína en la motilidad celular. Para ello se utilizaron distintos modelos de estudio de la migración como son el ensayo de cierre de herida y la cámara de Boyden, encontrándose en todos los casos que tanto el aumento como la disminución en la expresión de mRic-8A tiene un efecto positivo sobre la migración celular.

El ensayo de cierre de herida es una forma sencilla, barata y efectiva de analizar la migración celular ya sea de células que se mueven en forma de una sola hoja de células adheridas entre sí fuertemente a través de interacciones célula – célula (migración colectiva), como también de células que poseen menor interacción entre los componentes de la monocapa, como es el caso de los fibroblastos embrionarios de ratón utilizados en este estudio. Las principales ventajas de este ensayo son que simula en cierta medida la migración de células *in vivo* – por ejemplo, el proceso de migración por el cual se regenera el endotelio vascular dañado – y también que considera la influencia de la matriz extracelular en el proceso migratorio. Sin embargo, también se presentan desventajas al momento de compararlo con el proceso fisiológico de la migración, ya que a diferencia de lo que ocurre en un tejido, este ensayo no considera el efecto de señales quimio-atrayentes ni el ambiente tridimensional (Liang y col., 2007). Es por esto que en este trabajo se complementaron los ensayos de cierre de herida con ensayos de migración en cámara de Boyden. La cámara de Boyden representa un modelo de migración en la que las células se contactan con la matriz extracelular mediante toda su superficie, asimilándose en cierto modo al ambiente fisiológico de migración de los fibroblastos. A pesar de las diferentes estrategias locomotrices que puede adoptar una célula en un ambiente bi y tridimensional, los principios básicos de generación y transmisión de fuerza son requeridos en todos ellos y éstos están relacionados con la dinámica del citoesqueleto de actina (Trepata y col., 2012; Yamada & Sixt, 2019).

Mediante el ensayo de cierre de herida se encontró que un aumento en los niveles de expresión de Ric-8A provoca un incremento en la velocidad de migración tanto en células iMEF como NIH3T3. Considerando la evidencia previa existente que indica que Ric-8A es necesaria para la migración de las células de la cresta neural y linfocitos B (Boullaran y col., 2015; Fuentealba y col., 2013) y que células MEF carentes de Ric-8A presentan una menor migración en ensayos de haptotaxis (migración direccional en respuesta a un gradiente de adhesión) (Ruisu y col., 2017; Shellard & Mayor, 2020), estos resultados son concordantes, demostrando además que el efecto de Ric-8A sobre la migración no es exclusivo de un determinado tipo celular. Sin embargo, al analizar el fenotipo migratorio de células carentes de Ric-8A se observó que éste es similar al comportamiento migratorio de células que tienen elevados niveles de la proteína, induciendo de igual manera un aumento en la velocidad de migración. Este fenotipo no había sido reportado y es, de hecho, opuesto al efecto reportado de la inhibición de Ric-8A sobre la migración. Al analizar las condiciones de los ensayos previamente reportados por otros grupos de investigación (Ruisu y col., 2017; Wang y col., 2011) se observa que los fenotipos son dependientes de la matriz de adhesión utilizada en los ensayos y que de hecho la estructura del citoesqueleto es distinta también al cambiar la matriz extracelular, hechos que pueden explicar la diferencia observada en nuestros resultados. Los estudios del efecto de la variación de los niveles de Ric-8A en la migración utilizando un modelo de migración 3D mostraron de igual modo un aumento en la velocidad de migración de los fibroblastos. El hecho de observar los mismos resultados en modelos migratorios bi y tridimensionales sugieren que Ric-8A participa en la regulación de la migración celular, modulando la dinámica del citoesqueleto durante la migración celular.

Los resultados observados de aumento en la velocidad de migración debido a la variación de los niveles de expresión de Ric-8A son además concordantes con el aumento en la velocidad de migración y distancia recorrida medidos a partir de las trayectorias celulares. El análisis de la motilidad de células únicas permitió descartar que exista un aumento en la proliferación celular al inhibir Ric-8A, además de evidenciar que el aumento en la velocidad de migración se observa también a escala unicelular.

Al analizar el efecto de la sobre-expresión e inhibición de la expresión de una proteína es esperable que ambos estudios produzcan efectos opuestos; sin embargo, existe la posibilidad de que ambos estudios generen fenotipos similares, como es el caso del efecto observado de la expresión de Ric-8A en la migración de las células NIH3T3. Una de las justificaciones de este efecto es que se requiera un adecuado balance de la cantidad de proteína en cuestión presente en la célula para regular o ejercer un proceso fisiológico. Esto se observa, por ejemplo, cuando la función analizada depende de la formación de complejos celulares y al alterarse la expresión de sólo uno de sus componentes se genera un desbalance estequiométrico de la unidad funcional (Prelich, 2012). Como se describió antes, Ric-8A tiene un plegamiento tipo armadillo (Figuroa y col., 2009; Srivastava & Artemyev, 2019; B. Zeng y col., 2019), el que es característico de proteínas que interactúan con múltiples pares. Estas observaciones nos permiten especular que Ric-8A regula la migración celular a través de la formación de complejos proteicos.

Otra explicación posible de los resultados observados en ambas condiciones de expresión de Ric-8A, es que esta proteína participe en la conversación cruzada de vías de señalización con efectos opuestos, creando de esta forma un balance entre las señales inductoras e inhibitorias de la migración. Ric-8A es un GEF de las proteínas Gq, G_{12/13} y Gi, vías de señalización que han sido previamente reportadas como moduladoras de la motilidad celular, mostrando efectos variables dependiendo del modelo celular y ligando estudiado. La vía de señalización de proteínas G heterotriméricas más ampliamente reportada como regulador directo de las RhoGTPasas, y por tanto de la motilidad celular, es iniciada por la activación de G α _{12/13} (Buhl y col., 1995; Cervantes-Villagrana y col., 2019; Le Page y col., 2003; Lin y col., 2009; Tan y col., 2006; Wang y col., 2017; Yagi y col., 2011). Otro ejemplo es que la activación de la subunidad G α _{i2} en respuesta al ligando SP1, SDF-1 y a los agonistas del GPCR CXCR3 (CXCL9, CXCL10 y CXCL11), induce un aumento de la migración de linfocitos T, células de cáncer mamario, células endoteliales linfáticas (hLEC), además de otras (Cervantes-Villagrana y col., 2019; Sosa y col., 2010; Thompson y col., 2007; Yoon y col., 2008). También la activación de G α _q tiene un efecto favorable en la motilidad celular, efecto que ha sido reportado, por ejemplo, en células de musculatura lisa vascular, células endoteliales y cancerosas, entre otras

(Cattaneo y col., 2008; Jihee Kim y col., 2006; H. Zeng y col., 2002). De forma contraria, también se ha reportado que estas subunidades $G\alpha$ tienen un efecto inhibitorio en la migración, como es el caso de la subunidad $G\alpha i3$ (a través de la activación de CXCR3) en la migración de linfocitos T y de $G\alpha q$ en la motilidad de queratinocitos a través de una conversación cruzada con la vía de señalización río abajo del receptor P2Y2 y en otros tipos celulares, actuando directamente sobre RhoGEFs (Cervantes-Villagrana y col., 2019; Taboubi y col., 2007; Thompson y col., 2007).

Ric-8A es un potenciador de las vías de señalización de proteínas Gq , $G_{12/13}$ y G_i , todas ellas moduladoras de la migración celular. Al alterar los niveles de expresión de Ric-8A es esperable que se vea afectado el estado de activación de todas las rutas ya mencionadas, siendo esperable que se vean perturbadas tanto las vías inductoras como inhibitorias de la migración celular. Un desbalance de esta naturaleza no necesariamente se produce por la acción propia de Ric-8A sobre cada una de estas vías de forma independiente, sino que también afecta la conversación cruzada entre todas ellas. La regulación cruzada y antagónica entre las vías moduladoras de la migración es requerida para permitir un correcto proceso migratorio, por lo que la mantención del balance de la actividad de las proteínas Gq , $G_{12/13}$ y G_i es indispensable para mantener la correcta modulación de la motilidad celular (Cervantes-Villagrana y col., 2019).

Los resultados de los ensayos en cámara de Boyden utilizando diferentes ligandos de GPCR muestran que los efectos del silenciamiento de Ric-8A inhiben la migración inducida por GPCR acoplados a proteínas Gq y G_i . Por su parte, el análisis por espectrometría de masas identificó como interactores de Ric-8A en células NIH3T3 en migración a subunidades $G\alpha$ de la familia $G_{i/o}$, $G_{12/13}$ y $G_{q/11}$. Todas estas observaciones permiten plantear que Ric-8A regula la migración de células NIH3T3 a través de la modulación de la conversación cruzada entre las vías de señalización de proteínas Gq , $G_{12/13}$ y G_i , teniendo como función mantener un balance entre la actividad de las señales inductoras e inhibitorias de la migración, balance que puede diferir en distintos tipos celulares a través de la expresión diferencial de las subunidades $G\alpha$, lo que explica los distintos fenotipos migratorios observados en diferentes tipos celulares deficientes en Ric-8A.

5.2. En el modelo estudiado, Ric-8A no regula la direccionalidad del movimiento

La migración es un proceso celular que depende de la coordinación de diferentes eventos celulares. Desde un punto de vista progresivo, lo primero que debe ocurrir es que la célula capte una señal que induzca la motilidad. La percepción de la señal desencadena una serie de eventos moleculares que determinan la polarización de la célula para permitir que se formen protrusiones hacia el frente y se generen nuevas adhesiones con el sustrato, mientras que la retracción de la zona posterior por la contracción de las fibras de estrés permitirá el desplazamiento (Abercrombie y col., 1971; Lauffenburger & Horwitz, 1996; Ridley, 2003; Trepap y col., 2012). Las señales que inducen y dirigen el movimiento son de diversa naturaleza, actuando en conjunto distintos tipos de ellas; a la vez, ellas generan un microambiente complejo que la célula debe resolver para direccionar su movimiento. Las señales más comunes que inducen la migración direccional son gradientes químicos (quimiotaxia), quimioquinas (haptotaxia), campos eléctricos (galvanotaxia) y rigidez del sustrato (durotaxia) (Shellard & Mayor, 2020). Esto implica que diversas vías de señalización se activan (e inhiben) de forma simultánea y coordinada en diferentes regiones de la célula para permitir la polarización, adhesión y contracción celular. El caso del ensayo del cierre de herida es un ejemplo que permite comprender la acción de todas estas señales en conjunto. La ausencia de células en una sola cara induce un cambio en la localización y funcionalidad de los canales iónicos y bombas que producen una diferencia de potencial que es una señal del tipo galvanotáctica (Q. Liu & Song, 2014; Shellard & Mayor, 2020). A su vez, la ausencia de células provoca una diferencia en la rigidez de las células en el borde director (Sunyer y col., 2016), lo que a su vez provoca una diferencia en las propiedades de la matriz extracelular (duro- y haptotaxia) (Sawicka y col., 2015; Shellard & Mayor, 2020). Finalmente, las células del frente de migración opuesto liberan señales químicas que atraen a las células hacia ellas para inducir el cierre de la herida (quimiotaxia) (Theveneau y col., 2013). Todas estas señales pueden ser detectadas por distintos mecanismos, pero todas confluyen en las vías reguladoras de la remodelación del citoesqueleto, específicamente modulando la actividad de GTPasas pequeñas para inducir la migración (Shellard & Mayor, 2020).

El análisis de la migración de célula NIH3T3 individuales mostró que la velocidad de migración es mayor en las células carentes de Ric-8A comparadas con las células

silvestres; sin embargo, no se observaron diferencias en la direccionalidad del movimiento. Estos resultados sugieren que Ric-8A no es requerido para detectar la señal que induce la migración en este modelo de migración celular. Esta observación es respaldada por la observación de que las células carentes de Ric-8A migraron eficientemente hacia los agentes quimiotácticos usados en el ensayo en la cámara de Boyden, ya sea al usar como quimioattractantes los factores de crecimiento presentes en el suero fetal bovino o al utilizar distintos agonistas de GPCRs.

Dado que la direccionalidad del movimiento (y consecuentemente la detección de las señales inductoras de la motilidad) no se vio afectado, es posible concluir que Ric-8A regula vías de señalización corriente abajo de la detección de la señal migratoria, modulando otros eventos requeridos para que una célula pueda migrar como la polaridad, adhesión, contracción u otros procesos dependientes de la remodelación del citoesqueleto. Estas observaciones sugieren que el efecto de Ric-8A en la migración es de tipo celular autónomo.

5.3. Ric-8A regula la migración en respuesta a la interacción de la célula con el medio

Las funciones celulares dependen de la composición y estado funcional de las proteínas involucradas en el proceso en cuestión y una de las formas en que se regula la actividad proteica es variando su localización subcelular. La localización subcelular determina el ambiente en el que la proteína opera, lo que influye en la funcionalidad proteica a través del control del acceso y disponibilidad de sus pares interactores. Es por ello que un aspecto importante a estudiar al analizar la función de una proteína es revisar su localización subcelular. Al analizar la localización de Ric-8A en distintos tipos celulares, se encontró que ésta se distribuye de forma homogénea en el citoplasma, pero que se concentra en algunas regiones protrusivas de las células en migración. La localización observada se condice con una función en la motilidad celular ya que ésta depende en gran medida de la capacidad de la célula para generar lamelipodios, regiones donde la membrana plasmática es empujada por estructuras dinámicas de actina que llevan a la célula a protruir en dirección de la señal de migración (Huttenlocher & Horwitz, 2011; Rottner & Schaks, 2019; Watanabe & Mitchison, 2002). Muchas proteínas relacionadas con la motilidad celular presentan localización en el

borde del lamelipodio, incluyendo el complejo Arp2/3 y sus reguladores, así como otras proteínas involucradas en la formación de filopodios y lamelipodios como profilina, mDia y las proteínas de la familia Ena/VASP (Bear y col., 2000; Rottner & Schaks, 2019; J. V. Small, Stradal, y col., 2002; Suraneni y col., 2012).

Como se mencionó, el borde de las protrusiones es un ambiente altamente dinámico donde ocurren varios procesos moleculares, los que en respuesta a múltiples señales tanto del medio interno como externo terminan por dirigir el establecimiento de la dirección y de la motilidad durante la migración celular. Muchos de los componentes que se localizan en el borde del lamelipodio no sólo cumplen funciones de adhesión o protrusión, sino que están relacionados con la generación, captación y transmisión de las señales que guían la migración. Ejemplo de ello son las Integrinas, proteínas que además de establecer la conexión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, señalizan a través de cambios en la conformación de su dominio extracelular, señales que inducen la migración, retracción, protrusión, esparcimiento y sobrevivencia celular, a través de la cascada de señalización conocida como *outside-in*. Aun cuando no se ha establecido que exista interacción directa de Ric-8A con integrinas, se sabe que la vía de señalización Ric-8A - G α 13 es requerida para la activación de la cascada de integrinas (Toro-Tapia y col., 2018). La subunidad G α 13 interacciona con el dominio citosólico de integrinas a través de su dominio *Switch 1*, actuando probablemente como un competidor para p115RhoGEF, regulando de esta forma la activación de RhoA (Gong y col., 2010; Huttenlocher & Horwitz, 2011). También se ha descrito en otros modelos celulares que G α 13 junto con Ric-8A median la señalización *outside-in* de integrinas, a través de la transmisión de la señal hacia las proteínas quinasas de la familia Src, FAK y Akt, importantes componentes de la cascada de señalización corriente debajo de integrinas. Específicamente se observó que la ausencia de Ric-8A o de G α 13 impide la activación y transmisión de la señal de integrinas hacia componentes que se encuentran río abajo en la cascada de señalización (Gong y col., 2010; Ruisu y col., 2017; Toro-Tapia y col., 2018). Otra vía de señalización importante en migración en la que se ha descrito a Ric-8A como un componente requerido, es la cascada de señalización migratoria iniciada por el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). Esta señalización iniciada por la unión del ligando con su receptor de tipo tirosina-quinasa (RTK), no GPCR, requiere de Ric-

8A para establecer la conversación cruzada hacia G α 13, permitiendo el reciclaje de los vuelos dorsales (*dorsal ruffle turn-over*) y consecuentemente la migración (Wang y col., 2011).

Los antecedentes descritos permiten explicar la localización diferencial de Ric-8A observada en células crecidas sobre Fibronectina en comparación con las células crecidas sin sustrato de adhesión, lo que concuerda con la función de Ric-8A en conjunto con G α 13 como regulador de la transmisión de la señalización *outside-in* de Integrinas y también como componentes de la señalización de activada por otro tipo de estímulos migratorios. Ante la activación de cascadas de señalización en el borde de la protrusión que inducen la migración, Ric-8A se localiza y concentra en esta región de la célula para colaborar en la transmisión de las cascadas de señalización hacia los blancos moleculares cuya actividad permite tanto la protrusión de la membrana como la motilidad celular.

Como ha sido descrito antes en este trabajo, la migración celular ocurre en respuesta no solo a señales químicas del medio extracelular (quimiotaxia) sino que también en respuesta a estímulos de quimioquinas (haptotaxia), campos eléctricos (galvanotaxia), rigidez del sustrato (durotaxia) y las propiedades mecánicas del medio. La percepción mecánica (*mechanosensing*) consisten en la capacidad de una célula de reconocer cambios en los aspectos mecánicos en su medio, tales como fuerza, estrés, rigidez, topología y adhesividad. Este reconocimiento puede ser también mediado por receptores de membrana capaces de transmitir las señales mecánicas desde el medio extracelular hacia el interior, por ejemplo los receptores de linfocitos T al unirse a una célula presentadora de antígenos a través de pMHC o Integrinas (Yunfeng Chen y col., 2017; Shellard & Mayor, 2020). A través del uso de micropatrones (de fibronectina en este caso particular) es posible manipular la forma de las células, lo que provoca que éstas adapten la arquitectura del citoesqueleto de actina y los microtúbulos a la geometría del ambiente. En este trabajo se utilizaron dos formas de micropatrones para producir morfologías celulares diferenciales. En la forma triangular los bordes lisos son altamente tensos dada la generación de fibras de estrés y en los vértices se forman cúmulos de adhesiones focales desde donde la membrana comienza a protruir. En cambio, en la forma de ballesta se induce una fuerte polarización celular que determina la generación de un gran lamelipodio con una activa

remodelación del citoesqueleto de actina para protruir la membrana y una disposición nuclear y del aparato de Golgi perpendicular al frente de migración (Thery, 2010). Ric-8A presentó una localización diferencial en células crecidas en ambas formas de micropatrones, encontrándose en los bordes tensos ricos en fibras de estrés en el caso del triángulo y en el borde del lamelipodio en las células crecidas sobre la forma de ballesta. De esta forma, se demuestra que Ric-8A presenta una localización diferencial en respuesta a las diferentes morfologías celulares, lo que sugiere que Ric-8A participa también en la detección o transmisión de señales mecánicas del medio.

5.4. La expresión de Ric-8A no afecta la estructura del citoesqueleto de actina, pero altera su dinamismo.

La migración celular, salvo pocas excepciones, depende del ensamble y desensamble dinámico de filamentos de actina, los que se organizan en diferentes dominios celulares y se asocian a las estructuras adhesivas como adhesiones o complejos focales para contactarse con el sustrato de adhesión (Blanchoin y col., 2014; Huttenlocher & Horwitz, 2011; Lauffenburger & Horwitz, 1996; Schaks y col., 2019; Trepap y col., 2012). La formación dinámica de filamentos de actina en el borde director ejerce la fuerza contra la membrana para extenderla y generar la protrusión (J. V. Small, Stradal, y col., 2002). Las protrusiones pueden ser de diferente clase: lamelipodios con redes entrecruzadas de actina, filopodios compuestos de fibras paralelas de actina y los vuelos o *ruffles* de composición y estructura equivalente al lamelipodio, pero en un plano tridimensional (Faix y col., 2009; Faix & Weber, 2013; J. V. Small, Stradal, y col., 2002). A pesar de las diferentes estructuras características de cada tipo de protrusión, los mecanismos que inician su formación son los mismos y se basan en establecer un ciclo coordinado de polimerización y despolimerización de los haces de actina, fenómeno conocido también como “*Actin treadmilling*” (Miyoshi & Watanabe, 2013; Ridley, 2003; Rottner & Schaks, 2019; Schaks y col., 2019).

La presencia de un citoesqueleto de actina altamente dinámico, tanto a nivel de formación de complejos de adhesión como de generación de protrusiones y retracción, se relaciona con el proceso de migración celular (Pegoraro y col., 2017; Ridley, 2003). Se ha establecido que en células que presentan mayor velocidad de migración, la región de la célula que presenta una activa dinámica del citoesqueleto (áreas de

protrusión y áreas de retracción) es mayor (Kowalewski y col., 2015). En el mismo estudio de análisis estadístico del comportamiento de las células migratorias, se concluyó que las células pasan durante su ciclo de vida por etapas de alta velocidad de migración, que se relaciona con la disminución del área que ocupa la célula, y etapas de velocidad de migración menores, en los que la célula aumenta su tamaño. Para poder mantener el volumen celular, la célula debe alternar estos estados migratorios en los que el área de protrusión y de retracción de la célula varían (Etienne-Manneville, 2004b; Kowalewski y col., 2015). De estas observaciones se puede concluir que, en un cultivo celular no sincronizado se observan células en diferentes estados migratorios, lo que explica los diferentes grados del fenotipo defectuoso observados en este trabajo.

En los estudios realizados durante este trabajo de tesis se encontró que la ausencia de Ric-8A altera la cantidad de haces de actina presentes en la protrusión, lo que es indicativo de una alteración de la dinámica de actina en esta región de la célula. Los filamentos de actina se elongan rápidamente en función de la concentración de monómeros de actina que están disponibles (Blanchoin y col., 2014; Wegner & Engel, 1975), por lo que una disminución en la cantidad de actina globular presente en el borde de la célula puede alterar la formación y estructuración de los haces de actina. Además, para controlar la generación de las protrusiones, diferentes proteínas de unión a actina inducen la elongación de los filamentos existentes (por ejemplo, las proteínas profilina, formina y el complejo Ena/VASP) desde los extremos barbados, por lo que la desregulación de la actividad y localización de estas proteínas también causa defectos en la formación de haces de actina (Blanchoin y col., 2014; Kowalewski y col., 2015; Machesky y col., 1999; Rottner & Schaks, 2019; Svitkina & Borisy, 1999; Wegner & Engel, 1975).

Otro tipo de proteínas de unión a actina que regulan la generación de protrusiones son las proteínas con actividad de *capping*, las que se unen a los extremos barbados de los filamentos de actina, impidiendo su elongación (Weeds & Maciver, 1993); de esta forma se favorece la acción de, por ejemplo, proteínas entrecruzadoras de los haces paralelos (como por ejemplo fimbrina) para formar los filopodios (Faix y col., 2009), o la del complejo Arp2/3 y sus proteínas reguladoras para generar la red entrecruzada del lamelipodio (Small, Stradal, y col., 2002; Svitkina & Borisy, 1999).

Como los filamentos de actina son estructuras dinámicas que se elongan y acortan de forma activa, si se inhibe su elongación a través de la acción de las proteínas *capping*, predomina el efecto de acortamiento de los filamentos observándose defectos en su estructura. El acortamiento de los haces de actina ocurre por dos principales mecanismos, siendo el principal y más caracterizado el desensamble de los filamentos y haces de actina gracias a la acción de las proteínas ADF/cofilina. Estas proteínas se unen a los haces de actina, de preferencia en las regiones ricas en actina-ADP y genera la fragmentación de éstos (Blanchoin y col., 2014; Schaks y col., 2019; Suraneni y col., 2012) . El otro mecanismo consiste en la despolimerización de los filamentos desde su extremos puntudos, fenómeno que puede o no estar asociado con la acción de proteínas fragmentadoras, como cofilina (Miyoshi & Watanabe, 2013). La acción de las proteínas con actividad fragmentadora y despolimerizante, a consecuencia de su acción sobre los filamentos de actina, producen un aumento en la concentración global de actina monomérica observable, lo que en microscopía se visualiza como un aumento en la fluorescencia en el borde celular. En los estudios realizados en este trabajo, en las células en las que se observaron defectos en la dinámica de actina debido a la ausencia de Ric-8A, también se observó fluorescencia (LifeAct) en el borde de la célula, lo que sugiere que la adecuada disponibilidad de actina monomérica (G-actina) depende de la función de Ric-8A.

A pesar de los defectos observados sobre la dinámica del citoesqueleto de actina en respuesta a la ausencia de Ric-8A, en esta investigación no se observaron alteraciones en las estructuras del citoesqueleto requeridas para la migración; las células carentes de Ric-8A presentan lamelipodios, filopodios y fibras de estrés, al igual que las células control y no existen diferencias aparentes en la estructura de éstas. Este resultado fue llamativo, debido a que en otros trabajos se han reportado defectos de estas estructuras en ausencia de Ric-8A. Han sido reportadas severas alteraciones en el citoesqueleto de actina en células MEFs Ric-8A^{-/-} y células madre embrionarias de ratón (mESC) *knock-out* para Ric-8A, ya que éstas no forman fibras de estrés al ser cultivadas sobre laminina, fibronectina o gelatina (Ruisu y col., 2017). Fenotipos similares se han observado en células de la cresta neural de *Xenopus*, las que no generan protrusiones estables al silenciar Ric-8A (Fuentealba y col., 2013; Toro-Tapia y col., 2018). A pesar de que las células NIH3T3 y las células MEF son

fibroblastos embrionarios de ratón, ellas se comportan de forma diferencial en distintos sustratos de adhesión (Ruisu y col., 2017). Además, pudimos comprobar que las células NIH3T3 presentan características migratorias diferentes a las células MEF, lo que se concluye desde los ensayos de cierre de herida, donde los experimentos con células MEF requerían de alrededor de 24 horas para que la herida se cerrara completamente, mientras que las células NIH3T3 cierran la herida en alrededor de 8 horas. Estas diferencias pueden deberse a la naturaleza inmortalizada de las células NIH3T3, las que además son una línea hipertriploide pudiendo presentar desbalance de las vías de señalización involucradas en la migración celular debido a la expresión diferencial de los componentes de esas vías (Jainchill y col., 1969; Leibiger y col., 2013)

Los resultados observados mostraron que la ausencia de Ric-8A provoca defectos en la dinámica del citoesqueleto de actina, lo que se evidencia a través de la disminución del número y tamaño de los haces de actina presentes en las células, además de un aparente aumento de actina globular presente en el borde director. En base a los antecedentes descritos, nuestros resultados sugieren que Ric-8A participa en el proceso de ensamble y desensamble de las fibras de actina, a través de la regulación de la actividad de proteínas de unión a actina que coordinan este proceso, o a través de la regulación directa de la disponibilidad de monómeros de actina en el borde director, para regular de esta forma la velocidad de polimerización de los haces en el frente celular.

Como se mencionó anteriormente, la remodelación dinámica del citoesqueleto de actina es un proceso altamente regulado, ya que debe responder de forma instantánea y localizada tanto a señales del medio externo celular, como a las condiciones y necesidades internas celulares; y uno de los reguladores claves de este proceso son las GTPasas pequeñas de la familia Rho. Rac1, RhoA y Cdc42 son proteínas que ciclan entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo resultante de la hidrólisis del nucleótido GDP, estados en los que interaccionan con diferentes efectores para producir una respuesta celular. Clásicamente se ha atribuido la participación de Rac1 a la generación del lamelipodio, a Cdc42 la formación de filopodios y establecimiento de la direccionalidad y a RhoA el ensamble de las adhesiones y la contracción celular. Sin embargo, el desarrollo de herramientas que permiten visualizar *in vivo* la

localización de la actividad de estas GTPasas han permitido mostrar que las tres GTPasas se encuentran activas en la protrusión celular, aparentemente de forma coordinada, generando ciclos de retroalimentación negativa entre ellas (Jihoon Kim y col., 2019; Kraynov y col., 2000; Pertz y col., 2006; Raftopoulou & Hall, 2004). Las Rho GTPasas regulan vías de señalización que afectan a los filamentos de actina: RhoA regula la fosforilación de la cadena liviana de la miosina para inducir el entrecruzamiento de las fibras de actina y miosina (Ishizaki y col., 1997; Kawano y col., 1999; Kimura y col., 1996; Leung y col., 1995) además de actuar sobre cofilina y mDia regulando la estabilidad de los haces de actina (Maekawa, 1999; Raftopoulou & Hall, 2004; Watanabe y col., 1999); Rac1 actúa también activando a cofilina (Arber y col., 1998), además del complejo Arp2/3 a través de la activación de los complejos Scar/Wave (Eden y col., 2002) y en conjunto con Cdc42 que también induce la activación del complejo Arp2/3 a través de las proteínas WASp, que en conjunto favorecen la polimerización de actina y la formación de las protrusiones (Edwards y col., 1999; Nobes & Hall, 1995, 1999). Una alteración en la actividad de estos interruptores celulares genera la desregulación del proceso migratorio celular, presentándose, entre otros fenotipos, defectos en las protrusiones y en la dinámica del citoesqueleto de actina (Kraynov y col., 2000; Machacek y col., 2009; Nobes & Hall, 1999; Pertz y col., 2006; Rottner & Schaks, 2019; Schaks y col., 2019). En este contexto, se ha descrito que la ganancia y pérdida de la función de Ric-8A en células de la cresta neural de *Xenopus* genera defectos en la formación y estabilidad de las protrusiones, además de producir cambios en la localización de las proteínas Rac1 y RhoA activas (Leal y col., 2018; Toro-Tapia y col., 2018). Es por ello que, para evaluar los efectos del silenciamiento de Ric-8A sobre esta maquinaria celular, se utilizaron biosensores consistentes en la proteína Rac1 o RhoA fusionada a dos proteínas fluorescentes, de forma que sólo en presencia del estado activo de la GTPasa ocurre la transferencia de energía (FRET) entre ambas proteínas fluorescentes. De esta forma, al generar un mapa que muestra la eficiencia FRET en diferentes regiones de la célula, es posible visualizar las áreas donde existe actividad de las GTPasas medidas (Jihoon Kim y col., 2019). Nuestros experimentos mostraron que no fue posible realizar mediciones de la actividad de Rac1 utilizando el biosensor ya que no se observó actividad de esta proteína en condiciones control. Sin embargo, se detectó

actividad de RhoA en el frente de la célula, a pesar de que no se observaron diferencias significativas de la actividad de RhoA en ausencia de Ric-8A. Si la actividad de estas GTPasas pequeñas dependiera de la función de Ric-8A en este tipo celular (NIH3T3), la ausencia de ésta posiblemente generaría defectos más severos en el citoesqueleto de actina y también en los microtúbulos, como se ha observado en otros modelos celulares (Leal y col., 2018); sin embargo, es necesario realizar otro tipo de estudios moleculares, como por ejemplo medir la cantidad de RhoGTPasas activas en estas células por inmunoprecipitación, para descartar esta función de Ric-8A.

Otro proceso requerido para la migración celular que se relaciona con la remodelación del citoesqueleto de actina es la adhesión celular. Mediante este proceso se establece la unión del citoesqueleto con la matriz extracelular y los puntos de adhesión (adhesiones focales) son los puntos donde se ejerce la tensión mecánica para producir el desplazamiento de la célula. Trabajos anteriores han mostrado la relevancia de Ric-8A para el establecimiento de las adhesiones celulares, habiéndose observado que el silenciamiento de esta proteína induce una disminución en el número de adhesiones focales en las células de la cresta neural y en MEFs, resultados que no pudieron ser replicados en esta investigación, a pesar de observarse la interacción de Ric-8A con Vinculina, uno de los componentes del adhesoma (Fuentealba y col., 2013; Ruisu y col., 2017; Toro-Tapia y col., 2018). La deficiencia de las adhesiones focales al alterar la vía de señalización Ric-8A - Gα13 en células de la cresta neural de *Xenopus* se relaciona con una disminución en la adhesión de la célula al sustrato (Toro-Tapia y col., 2018); sin embargo en este trabajo y en otros en los que se evalúa la adhesión de fibroblastos embrionarios de ratón en ausencia de Ric-8A no se disminuyen las propiedades adhesivas de las células (Ruisu y col., 2017). Incluso, en nuestra investigación se observó un aumento en la adhesión de células NIH3T3 a fibronectina tras 30 minutos de ser sembradas sobre el sustrato. Las diferencias observadas con respecto al trabajo de Ruisu y col., 2017 en células MEFs pueden deberse a la naturaleza inmortalizada de las células NIH3T3 como se discutió antes, o a los diferentes tiempos de incubación utilizados en el análisis (30 minutos en nuestro caso y 1 hora en el trabajo citado). Ahora, con respecto a las diferencias observadas entre células de mamíferos y los resultados observados en *Xenopus*, podrían atribuirse a las diferencias de los parálogos expresados en ambos organismos; en mamíferos

existen dos parálogos de Ric-8, Ric-8A que es el objeto de este estudio y Ric-8B. Ambos parálogos regulan diferentes subunidades de proteínas G heterotriméricas, por lo que participan en diferentes vías de señalización (Tall y col., 2003). En *Xenopus* sólo se ha encontrado expresado un parálogo que por identidad de secuencia se denomina el parálogo “A”, sin embargo, esta proteína interacciona con todas las subunidades G α pudiendo regular todas las vías de señalización asociadas a proteínas G heterotriméricas. En cambio, Ric-8A en mamíferos interacciona sólo con Gai, G α q, G α o y G α 12/13, siendo la interacción con Gas exclusiva de Ric-8B (PuiYee Chan y col., 2011; Hinrichs y col., 2012; Klattenhoff y col., 2003; Maldonado-Agurto y col., 2011; Romo y col., 2008; Tall y col., 2003; Tall & Gilman, 2005). Esto justifica que en *Xenopus* el fenotipo migratorio sea más severo que en ratón (MEFs y NIH3T3) ya que al silenciar Ric-8A se desregulan todas las vías de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas.

5.5. Ric-8A interacciona con proteínas relacionadas con la regulación del citoesqueleto

Ric-8A es una proteína que desde su caracterización ha sido relacionada con diversas funciones celulares y consecuentemente se han descrito varios interactores que permiten la regulación de diversos procesos. En diversos trabajos se ha descrito la interacción de las proteínas Ric-8 con diferentes subunidades G α , determinándose que en mamíferos Ric-8A interacciona y es un GEF para las subunidades Gai, G α o, G α q y G α 12/13 (PuiYee Chan y col., 2011; Hinrichs y col., 2012; Klattenhoff y col., 2003; Romo y col., 2008; Tall y col., 2003; Tall & Gilman, 2005). Además, Ric-8A tiene un plegamiento de tipo armadillo (Figueroa y col., 2009; Srivastava y col., 2019; Srivastava & Artemyev, 2019; B. Zeng y col., 2019) el que es típico de proteínas adaptadoras con capacidad de unión a múltiples interactores.

A través de una búsqueda masiva de interactores de Ric-8A en células NIH3T3 en migración se comprobó la interacción de Ric-8A con diferentes subunidades G α en el modelo celular en estudio. La identificación de estos interactores de Ric-8A en este modelo celular apoya la hipótesis de que Ric-8A modula la migración celular a través de la regulación de las vías de señalización de proteínas G heterotriméricas, pudiendo señalar hasta la remodelación del citoesqueleto para permitir la generación de

protrusiones y la correcta migración, ya que estas proteínas han sido anteriormente relacionadas con la regulación de GTPasas pequeñas y la migración celular. Gα12/13 modula los movimientos epibólicos durante la gastrulación en embriones de pez cebra, a través de la interacción con PDZRhoGEF, un GEF para la GTPasa pequeña RhoA y de esta forma regula la formación de fibras de estrés (Buhl y col., 1995; Le Page y col., 2003; Lin y col., 2009). Gα13 también interacciona con el dominio citoplasmático de integrinas y regula la señalización *outside-in* de integrinas a través de la interacción con p115RhoGEF (Gong y col., 2010; Shen y col., 2012, 2015). En el caso de Gαi, ésta interacciona con la quinasa Src y es capaz de activar a Rac1 para inducir la protrusión en un modelo de cáncer ovárico (Ward y col., 2015) y se ha determinado que la presencia de esta proteína es requerida para la correcta migración de diferentes tipos celulares (Leyme y col., 2015; Polizio y col., 2011; Wiege y col., 2012; Yao y col., 2010). Por su parte, la subunidad Gαq ha sido descrita regulando de forma negativa la formación de protrusiones y la migración de queratinocitos y otras células de mamíferos, a través de la activación del receptor acoplado a Gαq P2Y2 (Cervantes-Villagrana y col., 2019; Mizuno y col., 2005; Taboubi y col., 2007). Pero esta misma proteína también regula de forma positiva la migración de células de tejido vascular (Jihee Kim y col., 2006; H. Zeng y col., 2002). Estos diversos estudios demuestran que diferentes vías de señalización de proteínas G heterotriméricas no solo regulan, sino que son requeridas para la migración celular.

Todas las subunidades Gα tienen participación en la motilidad celular, pero cada una de estas subunidades regula este proceso de forma diferencial dependiendo las condiciones evaluadas. Para conocer cuál de las vías de señalización de proteínas G heterotriméricas se altera al inhibir la función de Ric-8A se realizó un ensayo de migración en cámara de Boyden usando como agente quimioatrayente diferentes ligandos de receptores acoplados a proteínas G, observándose la alteración de la respuesta migratoria a los ligandos que activan la proteína Gαi y Gαq. Como se mencionó anteriormente, ambas proteínas regulan la migración en diferentes modelos celulares, existiendo reportes incluso de una retroalimentación negativa entre ambas vías de señalización para modular la respuesta migratoria (Jihee Kim y col., 2006), lo que sugiere que Ric-8A podría actuar como un agente entrecruzador de estas vías de señalización para regular la intensidad de la respuesta migratoria celular.

Al analizar otros interactores de Ric-8A identificados en este estudio, se encontraron proteínas que sugieren vías alternativas mediante las cuales Ric-8A participa en la estructuración del citoesqueleto. La presencia de quinasas y fosfatasa entre los interactores muestran que Ric-8A podría ser regulado mediante fosforilación para ejercer su función. En apoyo a esta idea, existen reportes que muestran que la actividad de Ric-8A es regulada por fosforilación (Papaserghi-Scott y col., 2018; Xing y col., 2013; Yan y col., 2015; Yang y col., 2007; W. Yu y col., 2019). PP1 es una serina – treonina fosfatasa con múltiples blancos y su función se ha relacionado, entre muchos otros procesos celulares, con la motilidad celular. Uno de los sustratos de esta fosfatasa es la quinasa de adhesiones focales FAK, cuya fosforilación en el residuo Ser722 inhibe su actividad. La forma fosforilada de FAK aumenta en las células sembradas sobre fibronectina y durante la migración, por lo que se sugiere que el nivel de fosforilación de esta proteína es regulada por GSK3 β y PP1 (Bianchi y col., 2005). Otro reporte más reciente muestra que la fosfatasa PP1 es requerida para la regulación de la dinámica de las protrusiones, aunque la deficiencia de su actividad no tiene efecto sobre la direccionalidad de la migración (Chen y col., 2020). En este estudio también se mostró que esta fosfatasa regula el balance entre la migración colectiva y de célula única en las células del borde de ovario de *Drosophila*, a través de la regulación de la cantidad de complejos cadherina – catenina presentes en los contactos célula – célula. Este mismo proceso también es regulado por G α 13 a través de su interacción con E-cadherina para liberar a β -catenina de la unión celular (Gong y col., 2014; Lin y col., 2009; Meigs y col., 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que Ric-8A regula la dinámica de las protrusiones de células NIH3T3, sin tener efecto la alteración de la expresión de esta proteína sobre la direccionalidad de la migración, resultados similares a lo observado al inhibir la PP1c en células del borde de *Drosophila*. El hecho de haber reconocido a PP1c como una proteína interactora de Ric-8A durante la migración celular sugiere que Ric-8A podría participar también en los procesos migratorios en los que se involucra la actividad de esta fosfatasa.

5.6. Ric-8A interacciona con α -tubulina

Entre los interactores de Ric-8A identificados en células NIH3T3 en migración se destaca la presencia de la proteína α -Tubulina, interacción que fue corroborada

mediante la detección con un anticuerpo específico de esta proteína en los complejos proteicos co-inmunoprecipitados con Ric-8A. A pesar de que Ric-8 ha sido relacionada anteriormente con el citoesqueleto de Tubulina, específicamente con el proceso de regulación del posicionamiento del huso mitótico (David y col., 2005; Tall & Gilman, 2005; Woodard y col., 2010) no se había descrito anteriormente la interacción de ambas proteínas.

La α -tubulina es una de las dos subunidades, que junto con β -tubulina conforman los microtúbulos. Estructuralmente los microtúbulos son polímeros de α - y β - tubulina de 25 nm de calibre y entre 1 a 100 μ m de largo (Wade & Hyman, 1997). Una propiedad de estas estructuras es que presentan el fenómeno denominado inestabilidad dinámica, consistente en el intercambio estocástico entre un estado de crecimiento y acortamiento. Esta propiedad es fundamental para muchas de las funciones del citoesqueleto de microtúbulos, una de ellas, la adaptación a los cambios morfológicos de la célula (Etienne-Manneville, 2013; Ganguly y col., 2012; Goodson & Jonasson, 2018; Gundersen & Bulinski, 1988; Hawkins y col., 2010).

La función de los microtúbulos en la migración celular, específicamente en la formación del lamelipodio, varía según el tipo celular, pasando de no estar presentes en los lamelipodios de células pequeñas como los queratinocitos a ser las estructuras que ejercen la fuerza para extender la protrusión en el cono de crecimiento neuronal (Etienne-Manneville, 2013; Fygenson y col., 1997; Ganguly y col., 2012; Mogilner & Oster, 2003). En el caso de los fibroblastos, la generación del lamelipodio depende de la función tanto de los filamentos de actina como de los microtúbulos, llegando a penetrar el lamelipodio algunos microtúbulos, llamados pioneros (Akhshi y col., 2014; Arnette y col., 2016; Etienne-Manneville, 2013; Schaks y col., 2019). La función de los microtúbulos en migración, típicamente se ha descrito mediante dos probables mecanismos. Primero, se postula que la estabilización de la estructura de los microtúbulos fortalece al lamelipodio. Ello se basa en los aspectos estructurales de los microtúbulos, los que en comparación con los filamentos de actina que se doblan al alcanzar una longitud de 20 nm, son más rígidos y resisten sin alterar su trayecto (*in vitro*) por hasta 5 micras. Esta propiedad explica que los microtúbulos sean más eficientes al empujar la membrana plasmática en dirección de la migración (Etienne-Manneville, 2013; Gittes y col., 1993; Goodson & Jonasson, 2018; Hawkins y col.,

2010). Otra alternativa propuesta es que la interacción del citoesqueleto de actina con los microtúbulos en el lamelipodio permite que la fuerza ejercida en el lamelipodio para generar la protrusión sea distribuida hacia los microtúbulos, más resistentes, desde los filamentos de actina (Rodríguez y col., 2003). El segundo mecanismo propuesto de la participación de los microtúbulos en la generación de la protrusión se basa en la función de transporte dependiente de estas estructuras. El transporte hacia el borde director de la migración de componentes celulares es necesario para permitir la elongación de la protrusión. Entre estos se encuentran componentes estructurales, como vesículas que proveen membrana para generar la protrusión, y subunidades no polimerizadas de actina y Tubulina para permitir el crecimiento de los filamentos. También son transportados componentes regulatorios como GTPasas pequeñas y sus proteínas regulatorias hacia el lamelipodio para brindar los componentes que dirigirán la motilidad (Etienne-Manneville, 2013).

Cualquiera de los dos mecanismos descritos de la función de los microtúbulos en el lamelipodio depende de la generación de microtúbulos dentro de la protrusión y de la dinámica de ellos. Los microtúbulos se forman por la nucleación de dímeros de α - y β - tubulina en el extremo “más” de las estructuras crecientes. Este proceso ocurre *in vitro* sólo a alta concentración de heterodímeros de tubulina, por lo que se cree que son necesarias proteínas accesorias para permitir este proceso *in vivo* (Goodson & Jonasson, 2018). En los resultados obtenidos en este trabajo se observó la co-localización de Ric-8A con α -tubulina en el borde de la protrusión, en regiones ricas en ambas proteínas, sin presentar la estructuración tubular típica de los microtúbulos. Estos resultados, junto con la interacción observada de Ric-8A con tubulina, pueden explicarse mediante la interacción de Ric-8A con los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, interacción que podría tener como función localizar los dímeros en el borde de la protrusión y aumentar la concentración local de estas subunidades para permitir la polimerización dinámica de los microtúbulos en el frente de migración. En un trabajo publicado en 2016 (N. Yu y col., 2016) se generó el primer protocolo que permite la purificación eficiente de dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina recombinante desde células de mamíferos. Este protocolo se basa en la expresión equimolar de α - y β - tubulina en células HEK293T y su posterior purificación por cromatografía de afinidad. A través de la práctica de este protocolo se pudieron identificar muchas proteínas de unión a

tubulina monomérica o dimérica (TAPs, por las siglas en inglés de Proteínas Asociadas a Tubulina). A través de la revisión de los datos crudos obtenidos en aquel trabajo, se encontraron como interactores de tubulina mono- o di-mérica a Ric-8A y algunos de los interactores identificados en esta tesis. Entre las proteínas interactoras de los dímeros de tubulina se encontraron diferentes subunidades alfa de proteínas G heterotriméricas, entre ellas Gas, Gai, Gaq y Gα13, por lo que un mecanismo probable es que, a través de la regulación de la actividad de estas GTPasas por parte de Ric-8A, se regule la disponibilidad de los dímeros de tubulina en el frente de migración.

Otra explicación a la interacción de Ric-8A con los heterodímeros de tubulina sugerida es que Ric-8A actúe como chaperona de estas proteínas. El plegamiento de α - y β - tubulina es dependiente de la acción de varias chaperonas específicas de tubulina, conocidas como TBCA – E y la chaperonina citosólica CCT, conocida también como el complejo TriC o T-complex protein-1. Tras la interacción, dependiente de la hidrólisis de ATP, de los monómeros de tubulina con el complejo TriC para permitir el inicio del plegamiento, se forma el macro-complejo TBCD/ α -tubulina/TBCD/ β -tubulina. Este macro-complejo libera a los heterodímeros tras la hidrólisis de GTP por parte de β -tubulina, la que una vez libre debe intercambiar el GDP por GTP para conformar el heterodímero funcional que puede ser incorporado a los microtúbulos presentes (Tian & Cowan, 2013). La subunidad α de T-complex protein 1 (TriC) es uno de los interactores de Ric-8A que se identificaron mediante el análisis por espectrometría de masas en esta tesis y como un interactor de los dímeros de α/β -tubulina recombinantes purificados desde células de mamíferos (N. Yu y col., 2016). Ric-8A, además de ser un GEF para las proteínas G α con las que interacciona, es una chaperona que estabiliza la forma libre de nucleótido de estas proteínas y es requerida para que ellas lleguen a su localización funcional en la membrana plasmática (Puiyee Chan y col., 2013; Gabay y col., 2011; Hinrichs y col., 2012; Papasergi-Scott y col., 2018; Srivastava & Artemyev, 2019; Toro-Tapia y col., 2018). Considerando que tubulina es una proteína de unión a GTP y que una de las funciones de Ric-8A se asocia a la facilitación del plegamiento de sus proteínas interactoras, proponemos que Ric-8A podría actuar como una chaperona de tubulina, ayudando a su correcto plegamiento y localización, la que en el caso de las células migratorias incluye al lamelipodio, para

aumentar la concentración efectiva de tubulina en las regiones de crecimiento de microtúbulos, permitiendo así su polimerización.

5.7. Modelo propuesto: Ric-8A se comporta como un integrador de señales que regula el balance y la conversación cruzada entre las vías de señalización que modulan la migración

La migración celular es un proceso complejo que depende de la correcta y coordinada integración de diferentes vías de señalización. Los componentes de las diferentes cascadas señalizadoras dirigen los cambios estructurales y químicos que determinan la respuesta motil celular ante una o varias señales. Como se ha descrito a lo largo de este trabajo, se han descrito distintas vías de señalización como moduladores de la migración, las que incluso se han reportado generando respuestas opuestas en distintos tipos celulares o condiciones experimentales analizadas. Las diferentes respuestas celulares y la diversidad de vías implicadas en este proceso celular es un indicativo de que es necesaria una correcta coordinación de estas vías y la mantención del balance entre la transmisión de señales pro- y anti- migratorias para poder generar una respuesta motriz adecuada.

Los resultados de este trabajo describen que Ric-8A interacciona con distintas moléculas señalizadoras y afecta diferentes procesos celulares que deben ocurrir para modular la motilidad celular. Además, observamos que tanto la ganancia como la pérdida de función de Ric-8A tienden a producir el mismo fenotipo migratorio. En base a estos resultados proponemos que Ric-8A actúa como una molécula integradora de señales requeridas para generar una respuesta migratoria balanceada y adecuada al ambiente en el que ocurre la señal. Para describir la función de Ric-8A en la migración celular se plantea el siguiente modelo (*Figura 20*):

Para poder generar una respuesta migratoria balanceada, Ric-8A regula simultáneamente distintas vías de señalización activadas durante la migración. En migración, Ric-8A mantiene activas las vías de señalización de G α i, G α q y G α 13, las que regulan de forma directa (línea continua) o indirecta (línea entrecortada) otras moléculas señalizadoras para inducir o inhibir la migración, manteniendo de esta forma una conversación cruzada entre las vías antagonistas y mantener un balance adecuado entre ellas. La actividad de Ric-8A sobre estas proteínas y otras es regulada

MIGRACIÓN

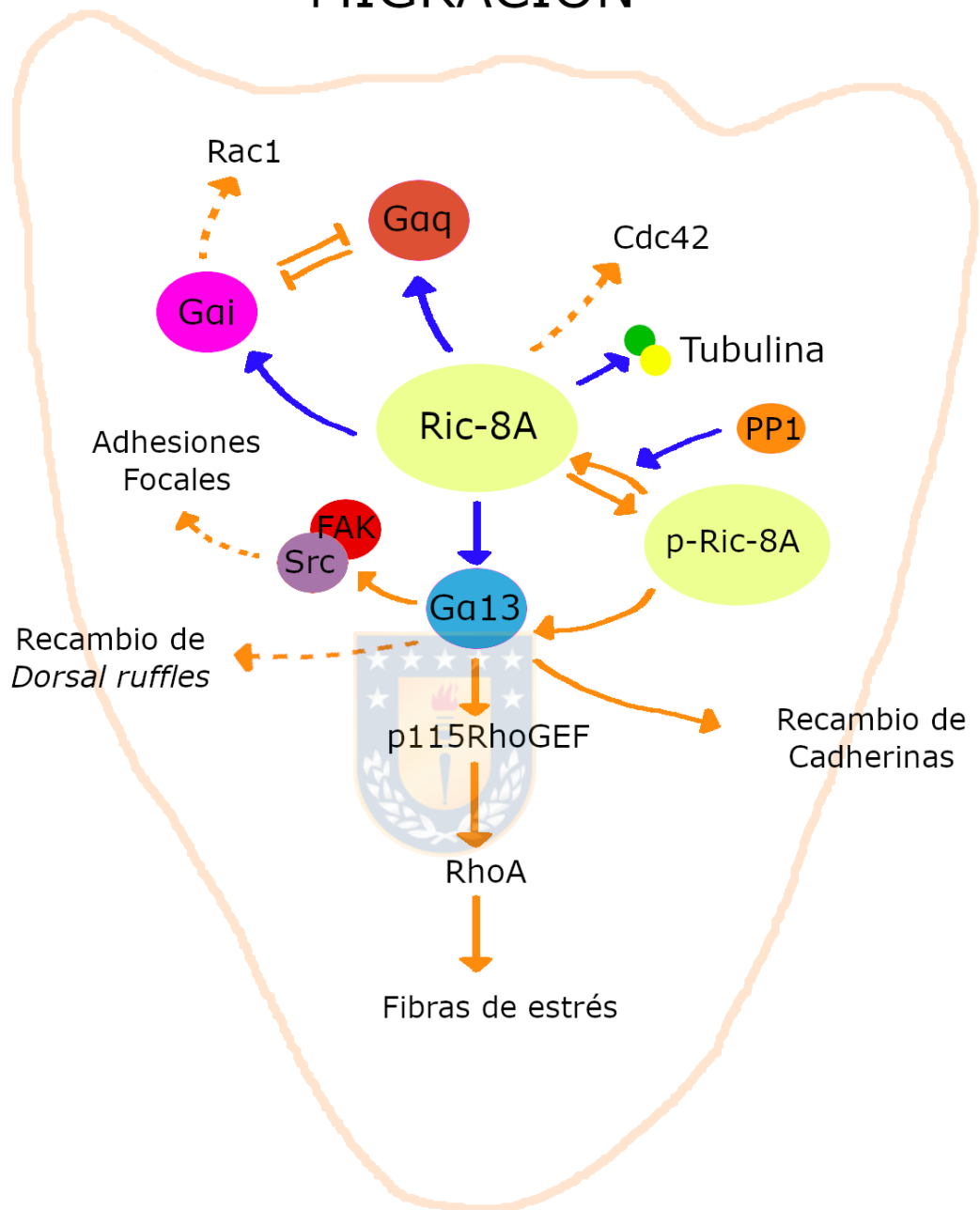
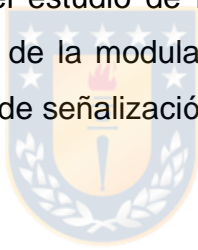


Figura 20. Ric-8A modula la migración celular a través de la regulación integrada de distintas vías de señalización.

El esquema muestra las interacciones proteicas descritas en esta tesis (líneas azules) y relaciones moleculares directas (líneas continuas) o indirectas (líneas entrecortadas) reportadas en literatura (líneas naranjas). Ric-8A activa diferentes cascadas de señalización que funcionan de forma simultánea para regular de forma sinérgica y/o antagónica para regular diferentes procesos celulares que permiten la correcta migración.

por fosforilación por parte de distintas proteínas quinasas y por la defosforilación por parte de la fosfatasa PP1. Además, Ric-8A se une a los dímeros de α/β -tubulina actuando como chaperona o a través de otras proteínas para localizarla en el borde de la protrusión y permitir la dinámica del citoesqueleto de Tubulina en esta región. A través de la acción en estas múltiples vías, Ric-8A es capaz de regular tanto la dinámica del citoesqueleto de actina como el de tubulina y otros factores, como por ejemplo la adhesión célula – célula a través de Cadherinas, procesos que al actuar de forma conjunta y coordinada permiten la correcta migración celular.

El modelo propuesto ubica a Ric-8A en el centro regulatorio de diversas vías de señalización, convirtiéndolo en un factor clave para el correcto desarrollo de los procesos celulares, cuya desregulación, ya sea por un aumento de su actividad o por la delección de ésta, puede provocar un desbalance en la red de señalización desencadenando alteraciones en el citoesqueleto y en la migración. Es por ello que se hace interesante ahondar en el estudio de Ric-8A como un integrador de señales celulares, y evaluar la eficacia de la modulación de su actividad en la activación e intensidad de señal de las vías de señalización por ella reguladas.



ABREVIATURAS

+TIPs: proteína rastreadora de extremo positivo de microtúbulos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ADP: Adenosín di-fosfato

AF: Adhesión Focal

AMPc: Adenosín mono-fosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenosín tri-fosfato

BCS: Suero bovino de ternero

BSA: Albúmina de suero bovino

DMEM: Medio mínimo de Eagle modificado

DMax: Distancia máxima

DNet: Distancia neta

DTot: Distancia total

DTT: Di-tio-treitol

FBS: Suero bovino fetal

FRET: Transferencia de energía de Förster

GDI: Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina

GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

GTP γ S: Guanosín-tri-fosfato- γ S

GTPasa: Proteína guanosina tri-fosfatasa

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

IF: Inmunofluorescencia

IP o IPP: Inmunoprecipitación

MAPs: Proteínas asociadas a microtúbulos

MTOC: Centro organizador de microtúbulos

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa



PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEG: Poli-etilen-glicol
PFA: Para-formaldehído
PLL-g-PEG: Poli-L-Lisina asociada a Poli-etilen-glicol
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RGS: Regulador de la señalización de proteínas G
RPM: Revoluciones por minuto
RTK: Receptor tirosina-quinasa
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
SDS: Sodio-dodecil-sulfato
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante
sgRNA: ARN guía
shRNA: ARN de horquilla corta
TAPs: Proteínas asociadas a Tubulina
TENS: Solución para lisis alcalina
TIRF: Fluorescencia de reflexión interna total
Vmax: Velocidad máxima
Vmean: Velocidad promedio
Wb: Inmunodetección por Western Blot



BIBLIOGRAFÍA

- Abercrombie, M., Heaysman, J. E., & Pegrum, S. M. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Experimental Cell Research*, 67(2), 359–367.
- Akhshi, T. K., Wernike, D., & Piekny, A. (2014). Microtubules and actin crosstalk in cell migration and division. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 71(1), 1–23.
<https://doi.org/10.1002/cm.21150>
- Alberts, B. (2015). *Molecular biology of the cell* (Sixth edition). Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., & Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*, 393(6687), 805–809. <https://doi.org/10.1038/31729>
- Arnette, C., Frye, K., & Kaverina, I. (2016). Microtubule and Actin Interplay Drive Intracellular c-Src Trafficking. *PloS One*, 11(2), e0148996.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148996>
- Azioune, A., Carpi, N., Tseng, Q., Théry, M., & Piel, M. (2010). Protein Micropatterns. En *Methods in Cell Biology* (Vol. 97, pp. 133–146). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)97008-8](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)97008-8)
- Bear, J. E., Loureiro, J. J., Libova, I., Fässler, R., Wehland, J., & Gertler, F. B. (2000). Negative Regulation of Fibroblast Motility by Ena/VASP Proteins. *Cell*, 101(7), 717–728. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80884-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80884-3)

- Bershadsky, A., Chausovsky, A., Becker, E., Lyubimova, A., & Geiger, B. (1996).
Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction.
Current Biology: CB, 6(10), 1279–1289.
- Bianchi, M., De Lucchini, S., Marin, O., Turner, D. L., Hanks, S. K., & Villa-Moruzzi, E.
(2005). Regulation of FAK Ser-722 phosphorylation and kinase activity by GSK3 and
PP1 during cell spreading and migration. *The Biochemical Journal*, 391(Pt 2), 359–
370. <https://doi.org/10.1042/BJ20050282>
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics,
architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*, 94(1), 235–263.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>
- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in
light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(Pt 3), 213–232.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Bouchet, B. P., Gough, R. E., Ammon, Y.-C., van de Willige, D., Post, H., Jacquemet, G.,
Altelaar, A. M., Heck, A. J., Goult, B. T., & Akhmanova, A. (2016). Talin-KANK1
interaction controls the recruitment of cortical microtubule stabilizing complexes to
focal adhesions. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.18124>
- Boullaran, C., Hwang, I.-Y., Kamenyeva, O., Park, C., Harrison, K., Huang, Z., & Kehrl, J. H.
(2015). B Lymphocyte-Specific Loss of Ric-8A Results in a Gα Protein Deficit and
Severe Humoral Immunodeficiency. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*,
195(5), 2090–2102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500523>
- Breitsprecher, D., Koestler, S. A., Chizhov, I., Nemethova, M., Mueller, J., Goode, B. L.,
Small, J. V., Rottner, K., & Faix, J. (2011). Cofilin cooperates with fascin to

- disassemble filopodial actin filaments. *Journal of Cell Science*, 124(19), 3305–3318.
<https://doi.org/10.1242/jcs.086934>
- Bronner-Fraser, M. (1995). Origins and developmental potential of the neural crest.
Experimental Cell Research, 218(2), 405–417. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1173>
- Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., & Johnson, G. L. (1995). G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly.
The Journal of Biological Chemistry, 270(42), 24631–24634.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.24631>
- Burrige, K. (2017). Focal adhesions: A personal perspective on a half century of progress.
The FEBS Journal, 284(20), 3355–3361. <https://doi.org/10.1111/febs.14195>
- Cashman, N. R., Durham, H. D., Blusztajn, J. K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I. T., Dahrouge, S., & Antel, J. P. (1992). Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 194(3), 209–221.
<https://doi.org/10.1002/aja.1001940306>
- Cattaneo, M. G., Chini, B., & Vicentini, L. M. (2008). Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 153(4), 728–736. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707609>
- Cervantes-Villagrana, R. D., Adame-García, S. R., García-Jiménez, I., Color-Aparicio, V. M., Beltrán-Navarro, Y. M., König, G. M., Kostenis, E., Reyes-Cruz, G., Gutkind, J. S., & Vázquez-Prado, J. (2019). Gβγ signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by Gαq and Gα13 proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(2), 531–546. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006254>

- Chan, PuiYee, Gabay, M., Wright, F. A., & Tall, G. G. (2011). Ric-8B is a GTP-dependent G protein alpha's guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19932–19942. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.163675>
- Chan, Puiyee, Thomas, C. J., Sprang, S. R., & Tall, G. G. (2013). Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein α subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), 3794–3799. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220943110>
- Chen, Kotian, N., Aranjuez, G., Chen, L., Messer, C. L., Burtscher, A., Sawant, K., Ramel, D., Wang, X., & McDonald, J. A. (2020). Protein phosphatase 1 activity controls a balance between collective and single cell modes of migration. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.52979>
- Chen, Yunfeng, Ju, L., Rushdi, M., Ge, C., & Zhu, C. (2017). Receptor-mediated cell mechanosensing. *Molecular Biology of the Cell*, 28(23), 3134–3155. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-04-0228>
- Cotton, M., & Claing, A. (2009). G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cellular Signalling*, 21(7), 1045–1053. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.02.008>
- David, N. B., Martin, C. A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., & Bellaïche, Y. (2005). Drosophila Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nature Cell Biology*, 7(11), 1083–1090. <https://doi.org/10.1038/ncb1319>
- Domon, B. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 312(5771), 212–217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>

- Dorsam, R. T., & Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 7(2), 79–94. <https://doi.org/10.1038/nrc2069>
- Dubois, F., Alpha, K., & Turner, C. E. (2017). Paxillin regulates cell polarization and anterograde vesicle trafficking during cell migration. *Molecular Biology of the Cell*, 28(26), 3815–3831. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-08-0488>
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*. 300(4), C723–C742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>: 10.1152/ajpcell.00462.2010
- Dupin, E., Creuzet, S., & Le Douarin, N. M. (2006). The contribution of the neural crest to the vertebrate body. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 589, 96–119. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46954-6_6
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., & Kirschner, M. W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, 418(6899), 790–793. <https://doi.org/10.1038/nature00859>
- Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M., & Gill, G. N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biology*, 1(5), 253–259. <https://doi.org/10.1038/12963>
- Efimov, A., Schiefermeier, N., Grigoriev, I., Brown, M. C., Turner, C. E., Small, J. V., & Kaverina, I. (2008). Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites. *Journal of Cell Science*, 121(2), 196–204. <https://doi.org/10.1242/jcs.012666>
- Etienne-Manneville, S. (2004a). Cdc42—The centre of polarity. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 8), 1291–1300. <https://doi.org/10.1242/jcs.01115>

- Etienne-Manneville, S. (2004b). Actin and microtubules in cell motility: Which one is in control? *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 5(7), 470–477.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00196.x>
- Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 471–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155711>
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell*, 106(4), 489–498.
- Euteneuer, U., & Schliwa, M. (1984). Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature*, 310(5972), 58–61.
- Faix, J., Breitsprecher, D., Stradal, T. E. B., & Rottner, K. (2009). Filopodia: Complex models for simple rods. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(8–9), 1656–1664. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.02.012>
- Faix, J., & Weber, I. (2013). A dual role model for active Rac1 in cell migration. *Small GTPases*, 4(2), 110–115. <https://doi.org/10.4161/sgtp.23476>
- Feige, J. N., Sage, D., Wahli, W., Desvergne, B., & Gelman, L. (2005). PixFRET, an ImageJ plug-in for FRET calculation that can accommodate variations in spectral bleed-throughs. *Microscopy Research and Technique*, 68(1), 51–58.
<https://doi.org/10.1002/jemt.20215>
- Figueroa, M., Hinrichs, M. V., Bunster, M., Babbitt, P., Martinez-Oyanedel, J., & Olate, J. (2009). Biophysical studies support a predicted superhelical structure with armadillo repeats for Ric-8. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 18(6), 1139–1145. <https://doi.org/10.1002/pro.124>

- Filić, V., Marinović, M., Faix, J., & Weber, I. (2012). A dual role for Rac1 GTPases in the regulation of cell motility. *Journal of Cell Science*, *125*(Pt 2), 387–398.
<https://doi.org/10.1242/jcs.089680>
- Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Beyer, A., Henriquez, J. P., Caprile, T., Mayor, R., Marcellini, S., Hinrichs, M. V., Olate, J., & Torrejón, M. (2013). Ric-8A, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. *Developmental Biology*, *378*(2), 74–82.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.005>
- Fygenson, D. K., Marko, J. F., & Libchaber, A. (1997). Mechanics of Microtubule-Based Membrane Extension. *Physical Review Letters*, *79*(22), 4497–4500.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.79.4497>
- Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F. A., Chan, P., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., & Tall, G. G. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein α subunit membrane association. *Science Signaling*, *4*(200), ra79. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002223>
- Ganguly, A., Yang, H., Sharma, R., Patel, K. D., & Cabral, F. (2012). The role of microtubules and their dynamics in cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(52), 43359–43369. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.423905>
- Gilman, A. G. (1987). G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annual Review of Biochemistry*, *56*, 615–649. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.003151>
- Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., & Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *The Journal of Cell Biology*, *120*(4), 923–934. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.4.923>

- Gong, H., Gao, X., Feng, S., Siddiqui, M. R., Garcia, A., Bonini, M. G., Komarova, Y., Vogel, S. M., Mehta, D., & Malik, A. B. (2014). Evidence of a common mechanism of disassembly of adherens junctions through $\alpha 13$ targeting of VE-cadherin. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(3), 579–591.
<https://doi.org/10.1084/jem.20131190>
- Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S. C.-T., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Kozasa, T., & Du, X. (2010). G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIb beta3 and mediates integrin “outside-in” signaling. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5963), 340–343. <https://doi.org/10.1126/science.1174779>
- Goodson, H. V., & Jonasson, E. M. (2018). Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(6).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022608>
- Gu, Z., Noss, E. H., Hsu, V. W., & Brenner, M. B. (2011). Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *The Journal of Cell Biology*, *193*(1), 61–70. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007003>
- Gundersen, G. G., & Bulinski, J. C. (1988). Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(16), 5946–5950. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.16.5946>
- Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J.-B., Schneider-Maunoury, S., Shkumatava, A., Teboul, L., Kent, J., Joly, J.-S., & Concordet, J.-P. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*, *17*(1), 148.
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>

- Hammond, J. W., Huang, C.-F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G., & Verhey, K. J. (2010). Posttranslational Modifications of Tubulin and the Polarized Transport of Kinesin-1 in Neurons. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(4), 572–583. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-01-0044>
- Hawkins, T., Mirigian, M., Selcuk Yasar, M., & Ross, J. L. (2010). Mechanics of microtubules. *Journal of Biomechanics*, *43*(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.005>
- Hewavitharana, T., & Wedegaertner, P. B. (2012). Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cellular Signalling*, *24*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.08.014>
- Hinrichs, M. V., Torrejón, M., Montecino, M., & Olate, J. (2012). Ric-8: Different cellular roles for a heterotrimeric G-protein GEF. *Journal of Cellular Biochemistry*, *113*(9), 2797–2805. <https://doi.org/10.1002/jcb.24162>
- Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D. H. J., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Koper, E. J., Paul, N. R., Warwood, S., Knight, D., Humphries, J. D., & Humphries, M. J. (2015). Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nature Cell Biology*, *17*(12), 1577–1587. <https://doi.org/10.1038/ncb3257>
- Hu, Y.-L., Lu, S., Szeto, K. W., Sun, J., Wang, Y., Lasheras, J. C., & Chien, S. (2014). FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Scientific Reports*, *4*, 6024. <https://doi.org/10.1038/srep06024>
- Huttenlocher, A., & Horwitz, A. R. (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(9), a005074. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005074>

- Ishizaki, T., Naito, M., Fujisawa, K., Maekawa, M., Watanabe, N., Saito, Y., & Narumiya, S. (1997). P160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Letters*, *404*(2–3), 118–124. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00107-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00107-5)
- Jainchill, J. L., Aaronson, S. A., & Todaro, G. J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: Assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *Journal of Virology*, *4*(5), 549–553. <https://doi.org/10.1128/JVI.4.5.549-553.1969>
- Jolly, A. L., Kim, H., Srinivasan, D., Lakonishok, M., Larson, A. G., & Gelfand, V. I. (2010). Kinesin-1 heavy chain mediates microtubule sliding to drive changes in cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(27), 12151–12156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004736107>
- Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion and Migration*, *8*(5), 440–451. <https://doi.org/10.4161/cam.36224>
- Kage, F., Winterhoff, M., Dimchev, V., Mueller, J., Thalheim, T., Freise, A., Brühmann, S., Kollasser, J., Block, J., Dimchev, G., Geyer, M., Schnittler, H.-J., Brakebusch, C., Stradal, T. E. B., Carlier, M.-F., Sixt, M., Käs, J., Faix, J., & Rottner, K. (2017). FMNL formins boost lamellipodial force generation. *Nature Communications*, *8*, 14832. <https://doi.org/10.1038/ncomms14832>
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F., & Waterman, C. M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, *468*(7323), 580–584. <https://doi.org/10.1038/nature09621>

- Kaverina, I., Rottner, K., & Small, J. V. (1998). Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *The Journal of Cell Biology*, *142*(1), 181–190.
- Kaverina, Irina, Krylyshkina, O., & Small, J. V. (1999). Microtubule Targeting of Substrate Contacts Promotes Their Relaxation and Dissociation. *The Journal of Cell Biology*, *146*(5), 1033–1044. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.1033>
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M., & Kaibuchi, K. (1999). Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *The Journal of Cell Biology*, *147*(5), 1023–1038. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.5.1023>
- Keller, H. U., Naef, A., & Zimmermann, A. (1984). Effects of colchicine, vinblastine and nocodazole on polarity, motility, chemotaxis and cAMP levels of human polymorphonuclear leukocytes. *Experimental Cell Research*, *153*(1), 173–185.
- Kelly, P., Moeller, B. J., Juneja, J., Booden, M. A., Der, C. J., Daaka, Y., Dewhirst, M. W., Fields, T. A., & Casey, P. J. (2006). The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(21), 8173–8178. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510254103>
- Kelly, P., Stemmler, L. N., Madden, J. F., Fields, T. A., Daaka, Y., & Casey, P. J. (2006). A role for the G12 family of heterotrimeric G proteins in prostate cancer invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(36), 26483–26490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604376200>
- Kim, Jihee, Keys, J. R., & Eckhart, A. D. (2006). Vascular smooth muscle migration and proliferation in response to lysophosphatidic acid (LPA) is mediated by LPA receptors

coupling to Gq. *Cellular Signalling*, 18(10), 1695–1701.

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.01.009>

Kim, Jihoon, Lee, S., Jung, K., Oh, W. C., Kim, N., Son, S., Jo, Y., Kwon, H.-B., & Do Heo, W. (2019). Intensiometric biosensors visualize the activity of multiple small GTPases in vivo. *Nature Communications*, 10(1), 211. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08217-3>

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science (New York, N.Y.)*, 273(5272), 245–248. <https://doi.org/10.1126/science.273.5272.245>

Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., & Herzog, V. (2004). Cell migration: Mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *European Journal of Cell Biology*, 83(11–12), 717–724. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00421>

Klattenhoff, C., Montecino, M., Soto, X., Guzmán, L., Romo, X., García, M. A., Mellstrom, B., Naranjo, J. R., Hinrichs, M. V., & Olate, J. (2003). Human brain synembryn interacts with G α and Gq α and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *Journal of Cellular Physiology*, 195(2), 151–157. <https://doi.org/10.1002/jcp.10300>

Komarova, Y., De Groot, C. O., Grigoriev, I., Gouveia, S. M., Munteanu, E. L., Schober, J. M., Honnappa, S., Buey, R. M., Hoogenraad, C. C., Dogterom, M., Borisy, G. G., Steinmetz, M. O., & Akhmanova, A. (2009). Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *The Journal of Cell Biology*, 184(5), 691–706. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807179>

- Kowalewski, J. M., Shafqat-Abbasi, H., Jafari-Mamaghani, M., Endrias Ganebo, B., Gong, X., Strömlad, S., & Lock, J. G. (2015). Disentangling Membrane Dynamics and Cell Migration; Differential Influences of F-actin and Cell-Matrix Adhesions. *PloS One*, *10*(8), e0135204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135204>
- Kraynov, V. S., Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S., & Hahn, K. M. (2000). Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5490), 333–337.
- Kroboth, K., Newton, I. P., Kita, K., Dikovskaya, D., Zumbunn, J., Waterman-Storer, C. M., & Näthke, I. S. (2007). Lack of Adenomatous Polyposis Coli Protein Correlates with a Decrease in Cell Migration and Overall Changes in Microtubule Stability. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(3), 910–918. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-03-0179>
- Lansbergen, G., & Akhmanova, A. (2006). Microtubule plus end: A hub of cellular activities. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *7*(5), 499–507. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00400.x>
- Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell*, *84*(3), 359–369.
- Le Page, S. L., Bi, Y., & Williams, J. A. (2003). CCK-A receptor activates RhoA through G alpha 12/13 in NIH3T3 cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *285*(5), C1197-1206. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00083.2003>
- Leal, J. I., Villaseca, S., Beyer, A., Toro-Tapia, G., & Torrejón, M. (2018). Ric-8A, a GEF for heterotrimeric G-proteins, controls cranial neural crest cell polarity during migration. *Mechanisms of Development*. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.07.004>

- Lefkowitz, R. J. (2007). Seven transmembrane receptors: Something old, something new. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 190(1), 9–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2007.01693.x>
- Leibiger, C., Kosyakova, N., Mkrtchyan, H., Gleib, M., Trifonov, V., & Liehr, T. (2013). First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 61(4), 306–312. <https://doi.org/10.1369/0022155413476868>
- Leung, T., Manser, E., Tan, L., & Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29051–29054. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29051>
- Leyme, A., Marivin, A., Perez-Gutierrez, L., Nguyen, L. T., & Garcia-Marcos, M. (2015). Integrins activate trimeric G proteins via the nonreceptor protein GIV/Girdin. *The Journal of Cell Biology*, 210(7), 1165–1184. <https://doi.org/10.1083/jcb.201506041>
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Liao, G., Nagasaki, T., & Gundersen, G. G. (1995). Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: Implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 11), 3473–3483.
- Lin, F., Chen, S., Sepich, D. S., Panizzi, J. R., Clendenon, S. G., Marrs, J. A., Hamm, H. E., & Solnica-Krezel, L. (2009). α 12/13 regulate epiboly by inhibiting E-cadherin

- activity and modulating the actin cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*, 184(6), 909–921. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805148>
- Liu, L., He, B., Liu, W. M., Zhou, D., Cox, J. V., & Zhang, X. A. (2007). Tetraspanin CD151 Promotes Cell Migration by Regulating Integrin Trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31631–31642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701165200>
- Liu, Q., & Song, B. (2014). Electric field regulated signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 55, 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.09.014>
- Ma, S., Kwon, H. J., & Huang, Z. (2012). Ric-8a, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, regulates bergmann glia-basement membrane adhesion during cerebellar foliation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(43), 14979–14993. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1282-12.2012>
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G. L., Hahn, K. M., & Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*, 461(7260), 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature08242>
- Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E., & Pollard, T. D. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3739–3744. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3739>
- Maekawa, M. (1999). Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, 285(5429), 895–898. <https://doi.org/10.1126/science.285.5429.895>

- Maldonado-Agurto, R., Toro, G., Fuentealba, J., Arriagada, C., Campos, T., Albistur, M., Henriquez, J. P., Olate, J., Hinrichs, M. V., & Torrejón, M. (2011). Cloning and spatiotemporal expression of RIC-8 in *Xenopus* embryogenesis. *Gene Expression Patterns: GEP*, *11*(7), 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2011.06.001>
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., & Aten, J. A. (1993). *Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images*. *169*(3), 375–382.
- Massagué, J., Batlle, E., & Gomis, R. R. (2017). Understanding the molecular mechanisms driving metastasis. *Molecular Oncology*, *11*(1), 3–4. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12024>
- Mayor, R., & Theveneau, E. (2013). The neural crest. *Development (Cambridge, England)*, *140*(11), 2247–2251. <https://doi.org/10.1242/dev.091751>
- Meigs, T. E., Fedor-Chaikin, M., Kaplan, D. D., Brackenbury, R., & Casey, P. J. (2002). α 12 and α 13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(27), 24594–24600. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201984200>
- Miller, K. G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J. A., Johnson, C. D., & Rand, J. B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(22), 12593–12598.
- Miller, K. G., & Rand, J. B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *156*(4), 1649–1660.

- Miyoshi, T., & Watanabe, N. (2013). Can filament treadmilling alone account for the F-actin turnover in lamellipodia?: Treadmilling and Alternative Mechanisms Regulating F-actin Turnover. *Cytoskeleton*, 70(4), 179–190. <https://doi.org/10.1002/cm.21098>
- Mizuno, N., Kokubu, H., Sato, M., Nishimura, A., Yamauchi, J., Kurose, H., & Itoh, H. (2005). G protein-coupled receptor signaling through Gq and JNK negatively regulates neural progenitor cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(35), 12365–12370. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506101102>
- Mogilner, A., & Oster, G. (2003). Polymer motors: Pushing out the front and pulling up the back. *Current Biology: CB*, 13(18), R721-733. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.08.050>
- Nobes, & Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1), 53–62.
- Nobes, & Hall, A. (1999). Rho GTPases Control Polarity, Protrusion, and Adhesion during Cell Movement. *The Journal of Cell Biology*, 144(6), 1235–1244. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.6.1235>
- Obino, D., & Lennon-Duménil, A.-M. (2014). A critical role for cell polarity in antigen extraction, processing, and presentation by B lymphocytes. *Advances in Immunology*, 123, 51–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800266-7.00001-7>
- Offermanns, S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 83(2), 101–130.

- Oka, Y., Saraiva, L. R., Kwan, Y. Y., & Korsching, S. I. (2009). The fifth class of Galpha proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(5), 1484–1489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809420106>
- Palazzo, A. F., Joseph, H. L., Chen, Y. J., Dujardin, D. L., Alberts, A. S., Pfister, K. K., Vallee, R. B., & Gundersen, G. G. (2001). Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Current Biology: CB*, *11*(19), 1536–1541.
- Papasergi-Scott, M. M., Stoveken, H. M., MacConnachie, L., Chan, P.-Y., Gabay, M., Wong, D., Freeman, R. S., Beg, A. A., & Tall, G. G. (2018). Dual phosphorylation of Ric-8A enhances its ability to mediate G protein α subunit folding and to stimulate guanine nucleotide exchange. *Science Signaling*, *11*(532).
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aap8113>
- Pegoraro, A. F., Janmey, P., & Weitz, D. A. (2017). Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(11), a022038.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022038>
- Pellegrin, S., & Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *Journal of Cell Science*, *120*(Pt 20), 3491–3499. <https://doi.org/10.1242/jcs.018473>
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L., & Hahn, K. M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*, *440*(7087), 1069–1072.
<https://doi.org/10.1038/nature04665>
- Pletjushkina, O. J., Belkin, A. M., Ivanova, O. J., Oliver, T., Vasiliev, J. M., & Jacobson, K. (1998). Maturation of cell-substratum focal adhesions induced by depolymerization of microtubules is mediated by increased cortical tension. *Cell Adhesion and Communication*, *5*(2), 121–135.

- Polizio, A. H., Chinchilla, P., Chen, X., Manning, D. R., & Riobo, N. A. (2011). Sonic Hedgehog activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-independent manner through coupling of smoothed to Gi proteins. *Science Signaling*, 4(200), pt7.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2002396>
- Preibisch, S., Saalfeld, S., & Tomancak, P. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(11), 1463–1465. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp184>
- Prelich, G. (2012). Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. *Genetics*, 190(3), 841–854. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.136911>
- Raftopoulou, M., & Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology*, 265(1), 23–32.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Reed, N. A., Cai, D., Blasius, T. L., Jih, G. T., Meyhofer, E., Gaertig, J., & Verhey, K. J. (2006). Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Current Biology*, 16(21), 2166–2172. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.014>
- Ridley, A. J. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*, 302(5651), 1704–1709. <https://doi.org/10.1126/science.1092053>
- Rinnerthaler, G. (1988). Contact formation during fibroblast locomotion: Involvement of membrane ruffles and microtubules. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 747–760. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.747>
- Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M., & Waterman-Storer, C. M. (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell

movement and morphogenesis. *Nature Cell Biology*, 5(7), 599–609.

<https://doi.org/10.1038/ncb0703-599>

- Romo, X., Pastén, P., Martínez, S., Soto, X., Lara, P., de Arellano, A. R., Torrejón, M., Montecino, M., Hinrichs, M. V., & Olate, J. (2008). XRic-8 is a GEF for G α and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 214(3), 673–680. <https://doi.org/10.1002/jcp.21257>
- Rottner, K., & Schaks, M. (2019). Assembling actin filaments for protrusion. *Current Opinion in Cell Biology*, 56, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.09.004>
- Ruisu, K., Meier, R., Kask, K., Tõnissoo, T., Velling, T., & Pooga, M. (2017). RIC8A is essential for the organisation of actin cytoskeleton and cell-matrix interaction. *Experimental Cell Research*, 357(2), 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.05.012>
- Sadok, A., & Marshall, C. J. (2014). Rho GTPases: Masters of cell migration. *Small GTPases*, 5, e29710. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29710>
- Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J.-B., Daviet, L., Camonis, J., D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P. (2008). The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *Journal of Cell Biology*, 181(6), 985–998. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709076>
- Sato, M., Blumer, J. B., Simon, V., & Lanier, S. M. (2006). Accessory proteins for G proteins: Partners in signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46, 151–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141115>
- Sawicka, K. M., Seeliger, M., Musaeov, T., Macri, L. K., & Clark, R. A. F. (2015). Fibronectin Interaction and Enhancement of Growth Factors: Importance for Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 4(8), 469–478. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0616>

- Schaks, M., Giannone, G., & Rottner, K. (2019). Actin dynamics in cell migration. *Essays in Biochemistry*, 63(5), 483–495. <https://doi.org/10.1042/EBC20190015>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Shellard, A., & Mayor, R. (2020). All Roads Lead to Directional Cell Migration. *Trends in Cell Biology*, 30(11), 852–868. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.002>
- Shen, B., Delaney, M. K., & Du, X. (2012). Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.08.011>
- Shen, B., Estevez, B., Xu, Z., Kreutz, B., Karginov, A., Bai, Y., Qian, F., Norifumi, U., Mosher, D., & Du, X. (2015). The interaction of $\alpha 13$ with integrin $\beta 1$ mediates cell migration by dynamic regulation of RhoA. *Molecular Biology of the Cell*, 26(20), 3658–3670. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0274>
- Small, J. V., Geiger, B., Kaverina, I., & Bershadsky, A. (2002). How do microtubules guide migrating cells? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(12), 957–964. <https://doi.org/10.1038/nrm971>
- Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E., & Rottner, K. (2002). The lamellipodium: Where motility begins. *Trends in Cell Biology*, 12(3), 112–120. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02237-1](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02237-1)
- Sosa, M. S., Lopez-Haber, C., Yang, C., Wang, H., Lemmon, M. A., Busillo, J. M., Luo, J., Benovic, J. L., Klein-Szanto, A., Yagi, H., Gutkind, J. S., Parsons, R. E., & Kazanietz,

- M. G. (2010). Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Molecular Cell*, 40(6), 877–892.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.029>
- Spiering, D., & Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhesion & Migration*, 5(2), 170–180.
- Srivastava, D., & Artemyev, N. O. (2019). Large-scale conformational rearrangement of the α 5-helix of G α subunits in complex with the guanine nucleotide exchange factor Ric8A. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(47), 17875–17882.
<https://doi.org/10.1074/jbc.AC119.011135>
- Srivastava, D., Gakhar, L., & Artemyev, N. O. (2019). Structural underpinnings of Ric8A function as a G-protein α -subunit chaperone and guanine-nucleotide exchange factor. *Nature Communications*, 10(1), 3084. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11088-x>
- Stehbens, S., & Wittmann, T. (2012). Targeting and transport: How microtubules control focal adhesion dynamics. *The Journal of Cell Biology*, 198(4), 481–489.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201206050>
- Sunyer, R., Conte, V., Escribano, J., Elosegui-Artola, A., Labernadie, A., Valon, L., Navajas, D., García-Aznar, J. M., Muñoz, J. J., Roca-Cusachs, P., & Trepap, X. (2016). Collective cell durotaxis emerges from long-range intercellular force transmission. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6304), 1157–1161.
<https://doi.org/10.1126/science.aaf7119>
- Suraneni, P., Rubinstein, B., Unruh, J. R., Durnin, M., Hanein, D., & Li, R. (2012). The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *Journal of Cell Biology*, 197(2), 239–251.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201112113>

- Svitkina, T. M., & Borisy, G. G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *The Journal of Cell Biology*, *145*(5), 1009–1026.
- Taboubi, S., Milanini, J., Delamarre, E., Parat, F., Garrouste, F., Pommier, G., Takasaki, J., Hubaud, J., Kovacic, H., & Lehmann, M. (2007). $G\alpha(q/11)$ -coupled P2Y₂ nucleotide receptor inhibits human keratinocyte spreading and migration. *The FASEB Journal*, *21*(14), 4047–4058. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7476com>
- Tall, G. G., & Gilman, A. G. (2005). Resistance to inhibitors of cholinesterase 8A catalyzes release of Galphai-GTP and nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) from NuMA/LGN/Galphai-GDP complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(46), 16584–16589. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508306102>
- Tall, G. G., Krumins, A. M., & Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(10), 8356–8362. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211862200>
- Tan, W., Martin, D., & Gutkind, J. S. (2006). The $G\alpha_{13}$ -Rho Signaling Axis Is Required for SDF-1-induced Migration through CXCR4. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(51), 39542–39549. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609062200>
- Tesmer, J. J. G. (2010). The quest to understand heterotrimeric G protein signaling. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(6), 650–652. <https://doi.org/10.1038/nsmb0610-650>
- They, M. (2010). Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of Cell Science*, *123*(24), 4201–4213. <https://doi.org/10.1242/jcs.075150>

- Theveneau, E., Steventon, B., Scarpa, E., Garcia, S., Trepap, X., Streit, A., & Mayor, R. (2013). Chase-and-run between adjacent cell populations promotes directional collective migration. *Nature Cell Biology*, *15*(7), 763–772.
<https://doi.org/10.1038/ncb2772>
- Thompson, B. D., Jin, Y., Wu, K. H., Colvin, R. A., Luster, A. D., Birnbaumer, L., & Wu, M. X. (2007). Inhibition of G α _{i2} activation by G α _{i3} in CXCR3-mediated signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(13), 9547–9555.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M610931200>
- Tian, G., & Cowan, N. J. (2013). Tubulin-specific chaperones: Components of a molecular machine that assembles the α/β heterodimer. *Methods in Cell Biology*, *115*, 155–171.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407757-7.00011-6>
- Tinevez, J.-Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G. M., Reynolds, G. D., Laplantine, E., Bednarek, S. Y., Shorte, S. L., & Eliceiri, K. W. (2017). TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods (San Diego, Calif.)*, *115*, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.09.016>
- Toro-Tapia, G., Villaseca, S., Leal, J. I., Beyer, A., Fuentealba, J., & Torrejón, M. (2017). *Xenopus* as a model organism to study heterotrimeric G-protein pathway during collective cell migration of neural crest. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, *55*(1–2).
<https://doi.org/10.1002/dvg.23008>
- Toro-Tapia, Villaseca, S., Beyer, A., Roycroft, A., Marcellini, S., Mayor, R., & Torrejón, M. (2018). The Ric-8A/G α ₁₃/FAK signaling cascade controls focal adhesion formation during neural crest cell migration. *Development (Cambridge, England)*.
<https://doi.org/10.1242/dev.164269>

- Trepat, X., Chen, Z., & Jacobson, K. (2012). Cell migration. *Comprehensive Physiology*, 2(4), 2369–2392. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110012>
- Tsuji, T., Ishizaki, T., Okamoto, M., Higashida, C., Kimura, K., Furuyashiki, T., Arakawa, Y., Birge, R. B., Nakamoto, T., Hirai, H., & Narumiya, S. (2002). ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 157(5), 819–830. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112107>
- Wade, R. H., & Hyman, A. A. (1997). Microtubule structure and dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(1), 12–17. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(97\)80146-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(97)80146-9)
- Wang, L., Guo, D., Xing, B., Zhang, J. J., Shu, H.-B., Guo, L., & Huang, X.-Y. (2011). Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A (Ric-8A) is critical for growth factor receptor-induced actin cytoskeletal reorganization. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 31055–31061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253427>
- Wang, L., Wang, D., Xing, B., Tan, Y.-C., Huang, J., Liu, B., Syrovatkina, V., Espenel, C., Kreitzer, G., Guo, L., Zhang, J. J., & Huang, X.-Y. (2017). G-Protein G α 13 Functions with Abl Kinase to Regulate Actin Cytoskeletal Reorganization. *Journal of Molecular Biology*, 429(24), 3836–3849. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.10.020>
- Ward, J. D., Ha, J. H., Jayaraman, M., & Dhanasekaran, D. N. (2015). LPA-mediated migration of ovarian cancer cells involves translocalization of G α i2 to invadopodia and association with Src and β -pix. *Cancer Letters*, 356(2 Pt B), 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.030>
- Warner, H., Wilson, B. J., & Caswell, P. T. (2018). Control of adhesion and protrusion in cell migration by Rho GTPases. *Current Opinion in Cell Biology*, 56, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.09.003>

- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nature Cell Biology*, *1*(3), 136–143. <https://doi.org/10.1038/11056>
- Watanabe, N., & Mitchison, T. J. (2002). Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science (New York, N.Y.)*, *295*(5557), 1083–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1067470>
- Wedegaertner, P. B., Wilson, P. T., & Bourne, H. R. (1995). Lipid modifications of trimeric G proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(2), 503–506.
- Weeds, A., & Maciver, S. (1993). F-actin capping proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, *5*(1), 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(05\)80009-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(05)80009-2)
- Wegner, A., & Engel, J. (1975). Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophysical Chemistry*, *3*(3), 215–225. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(75\)80013-5](https://doi.org/10.1016/0301-4622(75)80013-5)
- Wiege, K., Le, D. D., Syed, S. N., Ali, S. R., Novakovic, A., Beer-Hammer, S., Piekorz, R. P., Schmidt, R. E., Nürnberg, B., & Gessner, J. E. (2012). Defective macrophage migration in Gai2- but not Gai3-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *189*(2), 980–987. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200891>
- Wloga, D., Joachimiak, E., & Fabczak, H. (2017). Tubulin Post-Translational Modifications and Microtubule Dynamics. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102207>
- Woodard, G. E., Huang, N.-N., Cho, H., Miki, T., Tall, G. G., & Kehrl, J. H. (2010). Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(14), 3519–3530. <https://doi.org/10.1128/MCB.00394-10>

- Xing, B., Wang, L., Guo, D., Huang, J., Espenel, C., Kreitzer, G., Zhang, J. J., Guo, L., & Huang, X.-Y. (2013). Atypical protein kinase C λ is critical for growth factor receptor-induced dorsal ruffle turnover and cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 32827–32836. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489427>
- Yagi, H., Tan, W., Dillenburg-Pilla, P., Armando, S., Amornphimoltham, P., Simaan, M., Weigert, R., Molinolo, A. A., Bouvier, M., & Gutkind, J. S. (2011). A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Science Signaling*, 4(191), ra60. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002221>
- Yamada, K. M., & Sixt, M. (2019). Mechanisms of 3D cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(12), 738–752. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0172-9>
- Yan, M., Ha, J. H., & Dhanasekaran, D. N. (2015). G α 13 Stimulates the Tyrosine Phosphorylation of Ric-8A. *Journal of Molecular Signaling*, 10, 3. <https://doi.org/10.5334/1750-2187-10-3>
- Yang, F., Camp, D. G., Gritsenko, M. A., Luo, Q., Kelly, R. T., Clauss, T. R. W., Brinkley, W. R., Smith, R. D., & Stenoiien, D. L. (2007). Identification of a novel mitotic phosphorylation motif associated with protein localization to the mitotic apparatus. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 22), 4060–4070. <https://doi.org/10.1242/jcs.014795>
- Yao, J., Liang, L., Huang, S., Ding, J., Tan, N., Zhao, Y., Yan, M., Ge, C., Zhang, Z., Chen, T., Wan, D., Yao, M., Li, J., Gu, J., & He, X. (2010). MicroRNA-30d promotes tumor invasion and metastasis by targeting Galphai2 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(3), 846–856. <https://doi.org/10.1002/hep.23443>
- Yoon, C. M., Hong, B. S., Moon, H. G., Lim, S., Suh, P.-G., Kim, Y.-K., Chae, C.-B., & Gho, Y. S. (2008). Sphingosine-1-phosphate promotes lymphangiogenesis by stimulating

- S1P1/Gi/PLC/Ca²⁺ signaling pathways. *Blood*, 112(4), 1129–1138.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-125203>
- Yu, N., Signorile, L., Basu, S., Ottema, S., Lebbink, J. H. G., Leslie, K., Smal, I., Dekkers, D., Demmers, J., & Galjart, N. (2016). Isolation of Functional Tubulin Dimers and of Tubulin-Associated Proteins from Mammalian Cells. *Current Biology: CB*, 26(13), 1728–1736. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.069>
- Yu, W., Yu, M., Papasergi-Scott, M. M., & Tall, G. G. (2019). Production of Phosphorylated Ric-8A proteins using protein kinase CK2. *Protein Expression and Purification*, 154, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.10.002>
- Zaidel-Bar, R., & Geiger, B. (2010). The switchable integrin adhesome. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 9), 1385–1388. <https://doi.org/10.1242/jcs.066183>
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., & Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology*, 9(8), 858–867.
<https://doi.org/10.1038/ncb0807-858>
- Zeng, B., Mou, T.-C., Doukov, T. I., Steiner, A., Yu, W., Papasergi-Scott, M., Tall, G. G., Hagn, F., & Sprang, S. R. (2019). Structure, Function, and Dynamics of the G α Binding Domain of Ric-8A. *Structure (London, England: 1993)*, 27(7), 1137-1147.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2019.04.013>
- Zeng, H., Zhao, D., & Mukhopadhyay, D. (2002). KDR Stimulates Endothelial Cell Migration through Heterotrimeric G Protein Gq/11-mediated Activation of a Small GTPase RhoA. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46791–46798.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M206133200>
- Zerangue, N., & Jan, L. Y. (1998). G-protein signaling: Fine-tuning signaling kinetics. *Current Biology: CB*, 8(9), R313-316. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70196-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70196-4)

Zhang, Y., Luo, Y., Lyu, R., Chen, J., Liu, R., Li, D., Liu, M., & Zhou, J. (2016). Proto-Oncogenic Src Phosphorylates EB1 to Regulate the Microtubule-Focal Adhesion Crosstalk and Stimulate Cell Migration. *Theranostics*, 6(12), 2129–2140.
<https://doi.org/10.7150/thno.16356>

