



Función de la fosfatasa de fosfolípidos 3 (LPP3) en las etapas tempranas de la vía secretora

Enric Gutiérrez Martínez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

FUNCIÓN DE LA FOSFATASA DE FOSFOLÍPIDOS 3 (LPP3) EN LAS ETAPAS TEMPRANAS DE LA VÍA SECRETORA

Enric Gutiérrez Martínez

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, INMUNOLOGÍA Y NEUROCIENCIAS

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**FUNCIÓN DE LA FOSFATASA DE FOSFOLÍPIDOS 3 (LPP3) EN LAS ETAPAS
TEMPRANAS DE LA VÍA SECRETORA**

Memoria presentada por Enric Gutiérrez Martínez para optar al grado de doctor por la
Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Gustavo Egea
Guri, en el Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias
de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Dr. Gustavo Egea Guri

Enric Gutiérrez Martínez

*Dedicado a mis padres
y a mi hermano*

En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.

Lee Smolin (Físico teórico y cosmólogo).

AGRADECIMIENTOS

Después de todos estos años en el laboratorio llega el momento del final. Los que me conocéis sabéis que no soy dado a los discursos, sin embargo, ¿qué otra cosa puedo decir a parte de daros las gracias a todos los que me habéis acompañado durante todo este tiempo? Creo que he aprendido cosas de la mayoría de vosotros, y en cualquier caso todos habéis sido parte de mi día a día durante los últimos años. Este agradecimiento, por tanto, va más allá de las palabras que escribo, es una muestra de afecto sincera, y también es el reconocimiento del recuerdo que guardaré de todos vosotros.

Gracias a mi director de tesis Gustavo Egea por darme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio, y por la guía que ha supuesto durante toda mi tesis.

Gracias a Elisabet Sarri por tener siempre tiempo para discutir de cualquier cosa conmigo, y por transmitirme sus consejos y experiencia.

Gracias a Inés Fernández-Ulibarri, la persona que me enseñó a manejarme en el laboratorio en mis inicios.

Gracias a Maite Muñoz, por su colaboración durante estos años y también por el trabajo que haces en el laboratorio para todos nosotros.

Gracias tanto a mis compañeros actuales de laboratorio actuales: Javi, Carla, Adrià, Dasha y Yolanda, como a los que han coincidido conmigo en el algún momento durante estos años: Frank, Susana, Juanma, Laia, Roser, Sergi.... ¡Os deseo lo mejor a todos!

Gracias a mis compañeros actuales y pasados del grupo de Jordi Alberch, con quienes he compartido tantos buenos ratos y de los que guardo el mejor recuerdo: Mar, Marta, Marta Cherubini, Shiraz, Xavito, Laura, Albert, Empar, Raquel, Cristina, Noelia, Ana Martins, Ana López, Dani, Vero, Mónica, Miriam, Gerardo, Andy, Paola, Olga, Rafa.... ¡Seguro que me dejo alguno, pero es que más de 5 años dan para mucho, ja, ja!

Gracias a la gente del servicio de microscopía confocal por su asistencia técnica: Maria Calvo, Ana Bosch, Anna Lladó, Elisenda, Kasha.

Gracias también a los otros grupos del departamento, especialmente a Francesc Tebar por estar siempre dispuestos a colaborar con nosotros.

Gracias al grupo de la Dra. Silvia Corvera y a los miembros de su laboratorio, en la UMASS Medical School, quienes me acogieron durante 4 meses que fueron una experiencia inolvidable para mí.

Por último, gracias a todos aquéllos (familia y amigos) que me habéis dado ánimos y habéis estado a mi lado en los buenos y malos ratos de este viaje. Sin vosotros no habría sido posible esta tesis.

¡Un abrazo a todos!

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	7
(I) COMPARTIMENTOS DE LA VÍA SECRETORA.....	9
1. El Retículo Endoplasmático (RE).....	9
2. Los sitios de salida del RE (ERES) y el compartimento intermedio entre el RE y Golgi (ERGIC).....	10
3. El aparato de Golgi.....	13
(II) TRANSPORTE ENTRE EL RE Y EL COMPLEJO DE GOLGI.....	18
1. Transporte anterógrado: vesículas COPII.....	19
2. Transporte retrógrado: Vesículas COPI.....	20
2.1. Etapas finales en la fisión de las vesículas COPI.....	22
3. Transporte retrógrado independiente de COPI y dependiente de Rab6.....	24
(III) DINÁMICA Y COMPOSICIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES.....	26
1. Características y clasificación de los principales lípidos de las membranas.....	26
2. Curvatura de membrana. Conceptos generales.....	29
2.1. Cooperación de lípidos y proteínas en la generación de curvatura de membrana.....	31
(IV) EL DIACILGLICEROL EN LA VÍA SECRETORA.....	37
1. Características generales de las moléculas de diacilglicerol.....	37
2. Vías de síntesis del diacilglicerol en el Golgi.....	38
2.1. Papel de la fosfolipasa D y las fosfatasas del ácido fosfatídico en el Golgi	39
2.2. Papel de las esfingomielina sintetasas en el Golgi.....	41
2.3. Papel de la proteína cinasa C en el Golgi.....	43
3. Vías de síntesis de DAG en el transporte de RE a Golgi.....	45
(V) LA VÍA ENDOCÍTICA.....	46
1. Mecanismos moleculares de la endocitosis dependiente de clatrina.....	47
2. El diacilglicerol en la vía endocítica.....	48
2.1. Papel de la fosfolipasa C en la endocitosis.....	48
2.2. Papel de la fosfolipasa D y de las fosfatasas del ácido fosfatídico en la endocitosis.....	49
2.3. Papel de la proteína cinasa C en la endocitosis.....	50
(VI) LAS FOSFATASAS DE FOSFOLÍPIDOS (LPPs).....	52
1. Clasificación, estructura y localización.....	52

ÍNDICE

2. Funciones y actividad de las LPPs.....	54
3. Funciones de la LPP3 en el desarrollo.....	56
ANTECEDENTES, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	59
(I): Papel de la LPP3 en la vía secretora.....	61
(II): Papel del DAG en la endocitosis dependiente de clatrina.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
(I) MATERIALES.....	67
1. Anticuerpos.....	67
2. Plásmidos	69
3. small interfering RNA (siRNA).....	71
4. cebadores (“primers”).....	72
5. Drogas y ligandos	73
(II) MÉTODOS.....	75
1. Cultivos celulares.....	75
2. Silenciamiento por transfección de siRNAs	75
3. Transfecciones de plásmidos	76
4. Producción e infección lentiviral	76
4.1. Producción de los shRNA LPP3 lentivirus	77
4.2. Infección de células swiss3T3 con las partículas lentivirales.....	77
5. Inmunofluorescencia	77
5.1. Fijación con PFA y permeabilización con saponina.....	77
5.2. Fijación con PFA a 37°C y permeabilización con saponina.....	78
5.3. Fijación con metanol	78
6. Microscopía en células fijadas y procesamiento de imágenes	78
7. Experimentos de microscopía confocal en células vivas.....	80
8. Experimentos de FRAP e iFRAP.....	81
9. Experimentos de microscopía TIRF.....	83
10. Microscopía electrónica.....	83
11. Experimentos de transporte.....	84

ÍNDICE

11.1. Adquisición de la Resistencia a EndoH del VSV-G	84
11.2. Transporte desde el ERGIC al Golgi de la proteína ssDsRed.....	85
11.3. Transporte de la STxB silvestre	85
11.4. Transporte de la STxB-KDEL	86
11.5. Transporte de la transferrina y el EGF.....	86
12. Extractos celulares y western blotting	87
13. PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR).....	87
13.1. Extracción de RNA	87
13.2. Obtención de cDNA por PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR).....	88
13.3. PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) y análisis de resultados.....	88
14. Determinación de lípidos mediante marcaje radioactivo.....	88
15. Análisis estadístico.....	89
RESULTADOS.....	91
(I) La LPP3 en la vía secretora.....	93
1. Localización subcelular de la LPP3.....	95
2. Parte de la LPP3 cicla de forma constitutiva entre el RE y el Golgi.....	98
3. La inhibición de la actividad PAP regula la formación de túbulos asociados a las membranas del compartimento intermedio.....	104
4. Silenciamiento de la LPP3 y efectos sobre la tubulación del compartimento intermedio.....	105
5. La LPP3 no está implicada en el transporte anterógrado entre el RE y el Golgi.....	110
6. La LPP3 participa en el transporte retrógrado del Golgi al RE.....	114
7. La sobreexpresión de un mutante catalíticamente inactivo de LPP3 reproduce los efectos del silenciamiento de LPP3 sobre el tráfico Rab6-dependiente.....	120
8. El silenciamiento de la LPP3 produce alteraciones en la ultraestructura del Golgi.....	124
9. Relación entre el DAG y la tubulación del Golgi y alteraciones en la homeostasis del DAG en células silenciadas para LPP3.....	126
ÍNDICE DE PELÍCULAS.....	133
(II) El DAG en la endocitosis dependiente de clatrina.....	135
1. Efectos del propanolol en la internalización de transferrina y EGF.....	137

ÍNDICE

2. Efectos de la síntesis de DAG dependiente de PA en el sorting de EGF y transferrina desde el compartimento de endosomas tempranos.....	139
3. Los efectos morfológicos inducidos por el propanolol son en parte dependientes de la integridad del citoesqueleto de microtúbulos.....	141
4. Reversión de los efectos del propanolol modificando las vías de síntesis de PA y DAG.....	143
5. Relación entre los efectos del propanolol y el citoesqueleto de actina.....	144
6. Continuación del proyecto a través del estudio del silenciamiento de las diferentes LPPs.....	146
DISCUSIÓN.....	149
(I) La LPP3 en el tráfico de la vía secretora.....	151
1. Localización subcelular de la LPP3.....	151
2. Papel de la LPP3 en la síntesis de DAG y en la síntesis de novo de fosfolípidos y lípidos neutros.....	152
3. Papel de la LPP3 en la formación de intermediarios de transporte.....	154
4. Papel de la LPP3 en la regulación del transporte retrógrado.....	156
5. Papel de la LPP3 en la regulación del transporte anterógrado.....	158
(II) El DAG en la endocitosis dependiente de clatrina.....	160
1. Efectos del propanolol en la internalización de transferrina y EGF.....	160
2. Efectos de la síntesis de DAG dependiente de PA en el sorting de EGF y transferrina desde el compartimento de endosomas tempranos.....	161
3. Papel del PA y el DAG en el tráfico de la transferrina.....	162
4. Continuación del proyecto.....	163
CONCLUSIONES.....	165
BIBLIOGRAFÍA.....	169
ANEXO.....	193

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A

AA (ácido araquidónico)

Arf (ADP-ribosylation factor)

ArfGAP (ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein)

ArfGEF (ADP-ribosylation factor guanine nucleotide exchange factors)

B

BARS (brefeleidin A ADP-ribosylated substrate)

BFA (brefeldina A)

C

Cer (Ceramida)

C1P (ceramida-1-fosfato)

CGN (Red del cis-Golgi)

D

DAG (Diacilglicerol)

DGK (diacilglicerol cinasa)

DOG (dioctanoyl-sn-glycerol)

E

EGF (epidermal growth factor)

EGFR (Receptor de EGF)

ERGIC (compartimento intermedio entre el Retículo Endoplasmático y el Golgi)

ERES (sitios de salida del Retículo Endoplasmático)

G

GAP (GTPase-activating protein)

GalCer (Galactosilceramida)

GDP (Guanosín Difosfato)

GEF (Guanine nucleotide exchange factors)

GFP (green fluorescent protein)

GlcCer (Glicosilceramida)

GPI-PLC (PLC específica de glicosilfosfatidilinositol)

GSL (glicoesfingolípidos)

GTP (Guanosín trifosfato)

I

IP₃ (Inositol-3-fosfato)

K

KDELr (KDEL receptor)

L

LEF (Lymphoid enhancer-binding factor)

LPA (ácido lisofosfatídico)

LPAAT (acetil transferasas de lisofosfolípidos)

ABREVIATURAS

LPC (lisofosfatidilcolina)

LPP (fosfatasas de fosfolípidos)

LPS (lipid packing sensor)

M

MHCI (major histocompatibility complex class I)

O

OSBP (oxysterol binding protein)

P

PA (ácido fosfatídico)

PAP2 (fosfolipasas del ácido fosfatídico 2)

PC (fosfatidilcolina)

PE (fosfatidiletanolamina)

PI (fosfatidilinositol)

PI4K (fosfatidilinositol-4-cinasa)

PI4P (fosfatidilinositol-4-fosfato)

PI(4,5)P2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato)

PI-PLC (Fosfolipasa C específica para fosfoinosítidos)

PIP2 (fosfatidilinositol bifosfato)

PKC (proteína cinasa C)

PKD (proteína cinasa D)

PLA (fosfolipasa A)

PLC (fosfolipasa C)

PLD (fosfolipasa D)

PMA (12-miristato 13-acetato)

PS (fosfatidilserina)

PTK (proteína con actividad tirosina-cinasa)

R

RE (Retículo Endoplasmático)

REt (Retículo Endoplasmático transicional)

S

SM (esfingomielina)

SMS (esfingomielina sintasa)

SPC (esfingosilfosforilcolina)

Sph (esfingosina)

S1P (esfingosina-1-fosfato)

ssDsRed (signal-sequence-tagged dsRed)

STxB (subunidad B de la Shiga toxin)

T

TCF (Transcription factor)

ABREVIATURAS

TGN (Red del trans-Golgi)

TfR (Receptor de transferrina)

V

VEGF (vascular endothelial growth factor)

VSV-G (Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular)

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

(I) COMPARTIMENTOS DE LA VÍA SECRETORA

La ruta secretora es la vía que sigue el cargo después de sintetizarse en el retículo endoplasmático (RE) para transportarse a su destino final (que incluye los compartimentos intracelulares, la membrana plasmática o el medio extracelular). Existen dos tipos de secreción dentro de la vía biosintética: la secreción constitutiva y la secreción regulada. La secreción constitutiva es un proceso de transporte continuo que utilizan todos los tipos celulares para liberar constantemente las proteínas y los lípidos recién sintetizados (Kelly, 1985; Ponnambalam y Baldwin, 2003). Por el contrario, en la secreción regulada, el transporte final tiene lugar como respuesta a algún tipo de estímulo (iones de calcio, hormonas o factores de crecimiento) (Blazquez y Shennan, 2000). La secreción regulada sólo se da en determinados tipos celulares como, por ejemplo, neuronas y células (neuro)endocrinas. En este tipo de secreción, el cargo se almacena en vesículas especializadas o gránulos de secreción como es el caso de la insulina en las células del páncreas endocrino.

El objetivo de este primer apartado es describir las características principales de los diferentes compartimentos que participan en las etapas tempranas de la vía secretora, lo que nos servirá de introducción al siguiente apartado, en el que abordaremos con mayor detalle los mecanismos moleculares implicados en las vías de transporte entre el RE y el Golgi.

1. El Retículo Endoplasmático (RE)

El retículo endoplasmático (RE) es el primer orgánulo de la vía secretora. Todas las células eucariotas presentan RE, siendo el orgánulo intracelular que ocupa un mayor volumen (aproximadamente el 10% del volumen intracelular) y que presenta una mayor superficie de membrana (aproximadamente, las membranas del RE contienen la mitad de los lípidos de membrana de las células animales). El RE constituye una red interconectada de sistema endomembranoso formada por túbulos y sáculos aplanados comunicados entre sí, de forma que delimita un único espacio interno (el lumen del RE). A nivel morfológico, una de las características más llamativas del RE es su naturaleza extremadamente dinámica, lo que produce una remodelación constante de su estructura sin perder en ningún momento la continuidad de sus membranas. En las

INTRODUCCIÓN

células animales, los túbulos de RE se generan por interacción con proteínas motoras del citoesqueleto de microtúbulos, y se elongan siguiendo el camino marcado por los microtúbulos hasta fusionarse con una región de RE adyacente (English et al., 2009; Lee y Chen, 1988; Terasaki et al., 1986; Waterman-Storer y Salmon, 1998). Este proceso de fusión homotípica da lugar a la característica apariencia de red que podemos observar por microscopía de fluorescencia, en la cual tres túbulos convergen en un nudo (ejemplo de marcaje de RE por inmunofluorescencia en la **figura 1A**).

A nivel funcional, el RE tiene un papel relevante en la síntesis y transporte de lípidos y proteínas. En células de mamíferos, la traducción de proteínas se inicia en el citoplasma, y antes de que se complete la formación de la cadena polipeptídica, ésta se trasloca al RE, donde finaliza su síntesis. Los ribosomas que dirigen el proceso de traducción de las proteínas se encuentran unidos a la membrana del RE, creando regiones de membrana conocidas como RE rugoso. Por otra parte, el RE también presenta regiones de membrana que carecen de ribosomas y que se conocen como RE liso. En ocasiones estas zonas también se conocen como RE transicional, debido a que en ellas se produce la incorporación de lípidos y proteínas en intermediarios de transporte, lo que permite su salida de RE a Golgi. Otra de las funciones relevantes del RE liso es la síntesis de lípidos. De acuerdo con esta función, el RE liso es especialmente abundante en células especializadas con un alto nivel de metabolismo lipídico.

2. Los sitios de salida del RE (ERES) y el compartimento intermedio entre RE y Golgi (ERGIC).

Como hemos mencionado en el apartado anterior, en el RE existen regiones especializadas en las cuales se produce la selección y salida de cargo que sigue la vía secretora. Estas regiones, las cuales forman un dominio de RE libre de ribosomas, se conocen como sitios de salida del RE (ERES) o RE transicional (REt) (Merisko et al., 1986; Palade, 1975). La salida de cargo del RE hacia el Golgi se produce en vesículas que contienen las proteínas de cubierta que forman el COPII (en el siguiente apartado hablaremos con más detalle de esto), por lo tanto, una forma de identificar los ERES es mediante inmunocitoquímica con anticuerpos contra proteínas del COPII (Kuge et al., 1994; Orci et al., 1991; Paccaud et al., 1996; Rossanese et al., 1999; Shaywitz et al., 1995; Shugrue et al., 1999; Tang et al., 1997). A nivel de microscopía de fluorescencia,

INTRODUCCIÓN

los ERES se visualizan como estructuras puntiformes distribuidas por el citoplasma. Estas estructuras presentan escasa movilidad, y se encuentran especialmente concentradas en la zona perinuclear (Bannykh y Balch, 1997; Palade, 1975; Tang et al., 1997) (**figura 1A** y **1B**). Estudios recientes han planteado la hipótesis de que la localización perinuclear de los ERES en estrecha proximidad al Golgi, se debe a que los ERES constituyen regiones expandidas del RE formadas como consecuencia de la llegada de proteínas y membrana desde el Golgi al RE (transporte retrógrado) (Hammond y Glick, 2000).

El siguiente compartimento de la vía secretora es el compartimento intermedio de Golgi y RE (ERGIC). El ERGIC presenta la característica de no encontrarse en todas las células eucariotas, ya que está ausente en levaduras, y se observa como un compartimento túbulo-vesicular de membrana adyacente a los ERES. Al igual que éstos, por microscopía de fluorescencia el ERGIC presenta la apariencia de estructuras vesiculares distribuidas por el citoplasma (**figura 1B**). Por otra parte, el ERGIC muestra varias diferencias respecto los ERES. En primer lugar, en el ERGIC no encontramos componentes del COPII, sino que se encuentra enriquecido en proteínas de la cubierta del COPI, y en proteínas que constitutivamente ciclan entre el RE y el Golgi como el receptor de KDEL o ERGIC-53 (Bannykh et al., 1996; Klumperman et al., 1998; Schweizer et al., 1988). En segundo lugar, a diferencia de los ERES, parte de las estructuras vesiculares del ERGIC presentan una elevada movilidad dependiente del citoesqueleto de microtúbulos.

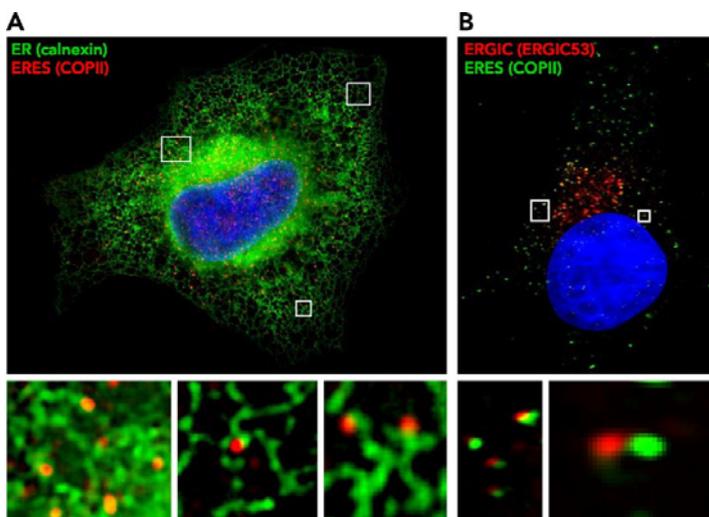


Figura 1. Imágenes por microscopía de fluorescencia de los primeros compartimentos de la vía secretora (RE, ERES y ERGIC). A) Doble marcaje con las proteínas calnexina (RE) y *sec23* (ERES). B) Doble marcaje con COPII (ERES) y ERGIC-53 (ERGIC).

Imagen extraída de (Szul and Szul, 2011)

INTRODUCCIÓN

Estas dos evidencias claramente permiten definir el ERGIC como un compartimento distinto de los ERES. Sin embargo, ¿cuál es la naturaleza exacta del ERGIC? ¿Existe como un compartimento de membrana estable, o representa un compartimento de membrana transitorio, formado por intermediarios de transporte que dirigen el tráfico de membrana y cargo del RE al Golgi?

Existen dos teorías sobre de qué forma el cargo es transportado de RE a Golgi en células eucariotas (Bannykh y Balch, 1997; Beznoussenko y Mironov, 2002; Farquhar, 1985; Glick y Malhotra, 1998; Lippincott-Schwartz et al., 2000; Pelham, 1989; Stephens y Pepperkok, 2001; Storrie y Nilsson, 2002). En el modelo estable el ERGIC está representado como un compartimento de membrana independiente desde el que se produce la selección y distribución de cargo hacia el Golgi (transporte anterógrado), o de nuevo hacia el RE (transporte retrógrado). Según el segundo modelo (modelo de maduración), tras su formación en los ERES, las vesículas COPII forman el ERGIC como consecuencia de un proceso de fusión homotípica. A continuación, las estructuras de membrana que conforman el ERGIC seguirían un movimiento dirigido hacia la zona perinuclear, donde su fusión originaría la cara del cis-Golgi. Por tanto, según este modelo el ERGIC no existiría como un compartimento de membrana estable, sino que su naturaleza sería la de intermediarios de transporte viajando transitoriamente de RE a Golgi (en la **figura 2** se representan los modelos de formación del ERGIC).

Existen datos experimentales que dan soporte a ambos modelos teóricos. La hipótesis de maduración está principalmente apoyada en la visualización *in vivo* del tráfico de determinados cargos como la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (Lippincott-Schwartz et al., 2000; Presley et al., 1997; Scales et al., 1997). Tras abandonar el RE, el VSV-G se concentra en estructuras de tipo vesicular que se dirigen de forma unidireccional hacia el Golgi en un movimiento dependiente del citoesqueleto de microtúbulos. El tamaño de estos intermediarios de transporte (similar al de las estructuras del ERGIC), apoya la visión de que el compartimento intermedio está constituido por estructuras de membrana en tránsito del RE al Golgi. Sin embargo, estudios más recientes en los cuáles se ha observado *in vivo* la dinámica de transporte de cargo (el VSV-G y la proteína soluble ssDsRed) conjuntamente con el marcador de compartimento intermedio ERGIC-53, han demostrado que mientras el cargo sigue un movimiento dirigido hacia el Golgi, la proteína ERGIC-53 no sigue una direccionalidad

INTRODUCCIÓN

concreta, aunque de forma mayoritaria se aleja de la zona perinuclear hacia regiones más periféricas de la célula (Ben-Tekaya et al., 2005). Además de esto, desde una misma estructura vesicular marcada con ERGIC-53 se pueden producir varios ciclos de salida de cargo sin que ello produzca la consumición del ERGIC (Ben-Tekaya et al., 2005). Estos datos, apuntan a la teoría estable, según la cual el ERGIC constituye un compartimento de membrana desde donde el cargo sería seleccionado para dirigirse hacia el Golgi (VSV-G) o hacia el RE (proteínas de reciclaje como el propio ERGIC-53).

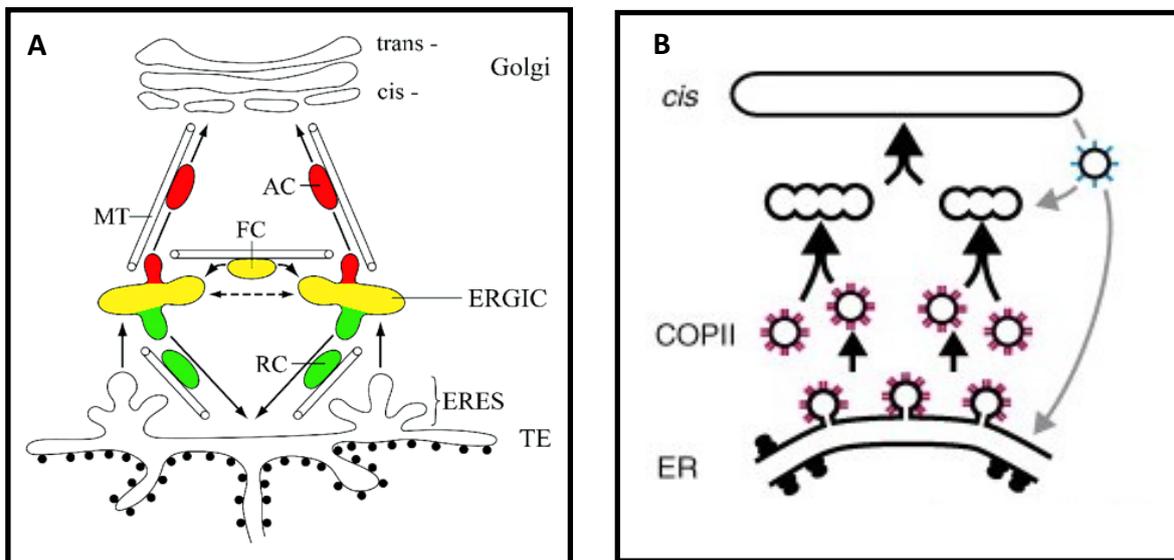


Figura 2. Esquemas de los diferentes modelos de formación del ERGIC. (A) En este esquema el ERGIC se representa como un compartimento de membrana estable al que llega el cargo proveniente de los ERES (en rojo el cargo que sigue la vía secretora, por ejemplo VSV-G, y en verde una proteína residente de compartimento intermedio, por ejemplo ERGIC-53). Desde el ERGIC se produce la salida de intermediarios de transporte hacia el Golgi (cargo secretado) o de nuevo hacia el RE (proteínas residentes de compartimento intermedio). (B) En el modelo de maduración las vesículas COPII abandonan los ERES para fusionarse formando el ERGIC. A continuación el ERGIC prosigue el proceso de maduración dando lugar a la cara del cis-Golgi.

Imagen modificada de (Ben-Tekaya et al., 2005) y de (Nakano y Luini, 2010)

3. El aparato de Golgi

El siguiente compartimento de la vía secretora es el aparato de Golgi. El Golgi supone el orgánulo central desde donde proteínas y lípidos son seleccionados y dirigidos hacia las diferentes zonas de la célula. A pesar de que las diferentes funciones del Golgi se encuentran conservadas en los organismos eucariotas, la estructura del Golgi presenta importantes variaciones entre diferentes organismos. A nivel morfológico, el Golgi

INTRODUCCIÓN

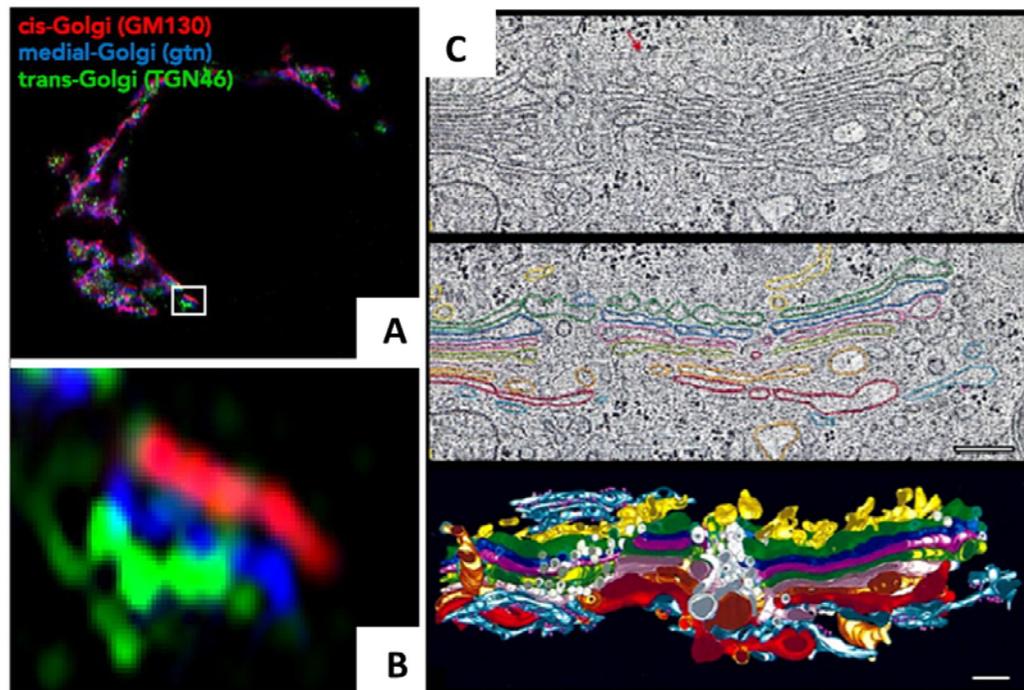


Figura 3. Imágenes por microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica del aparato del Golgi en mamíferos. (A y B) Triple marcaje con las proteínas GM130 (cis-Golgi), galactosiltransferasa (medial-Golgi) y TGN46 (Red trans del Golgi). C) Tomografía electrónica / reconstrucción 3D en la que se representan las 7 cisternas del Golgi.

Imagen modificada de (Szul and Sztul, 2011) y de (Lázaro-Diéguez, 2008)

puede estar constituido por una red túbulo-vesicular (como en algas y protozoos), una serie de cisternas aisladas (como ocurre en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*), o un conjunto de cisternas agrupadas formando los denominados *stacks* de Golgi. A su vez, diferentes organismos presentan una gran variedad en cuanto al número y localización intracelular de los *stacks*. Especies de hongos y la levadura *Pichia pastoris* presentan un único *stack*, mientras que en células animales y vegetales encontramos múltiples *stacks*, ya sea distribuidos por el citoplasma de la célula (como en plantas y en *Drosophila*) o agrupados en una región perinuclear adyacente a los centriolos, donde forman una supraestructura que por microscopía de fluorescencia se observa como una cinta alrededor del núcleo (daSilva et al., 2004; Hawes y Satiat-Jeunemaitre, 2005; He, 2007; He et al., 2004; Henderson et al., 2007; Kondylis y Rabouille, 2009; Ladinsky et al., 1999; Lowe, 2011; Mogelsvang et al., 2003; Pelletier et al., 2002; Preuss et al., 1992; Rambourg et al., 2001; Ramirez y Lowe, 2009; Rios y Bornens, 2003; Rossanese et al., 1999). Otra de las características del Golgi es la polarización de las cisternas que conforman los *stacks*. En el Golgi se puede distinguir una cara cis- cuyas cisternas

INTRODUCCIÓN

reciben el aporte del cargo procedente del RE, una cara trans- en la que tiene lugar la salida del cargo procesado y un conjunto de cisternas intermedias muy compactas que constituyen la parte medial del Golgi (medial-Golgi) (ejemplo en **la figura 3**). Adyacentes a las cisternas del Golgi existen unas redes de estructuras túbulo-vesiculares altamente dinámicas que actúan como una interfase entre el Golgi y otros compartimentos de la vía secretora. De esta forma, se ha caracterizado una red cis-Golgi o cis-Golgi network (CGN) entre el RE y la cara cis-Golgi y una red trans-Golgi o trans-Golgi network (TGN) entre la cara trans-Golgi y la membrana plasmática o compartimentos endosomales. La identidad de las cisternas viene determinada por la presencia de proteínas estructurales y enzimas específicas cuya distribución a lo largo del *stack* se mantiene de forma compartimentalizada. De entre las enzimas de Golgi las hay que catalizan la adición o sustracción de azúcares (enzimas de glicosilación), la adición de grupos sulfato (sulfatación), o la adición de grupos fosfato (fosforilación). Teniendo en cuenta esta organización, el tránsito de las proteínas a través de las cisternas determina la adquisición de diferentes modificaciones post-traduccionales antes de que abandonen el Golgi. Algunas de estas modificaciones post-traduccionales actúan como señales de reconocimiento para la correcta distribución de las proteínas hacia sus compartimentos de destino, incluyendo los lisosomas y la membrana plasmática.

El transporte de cargo a través del Golgi se ha explicado desde dos teorías similares a las expuestas en el apartado anterior, la teoría del transporte vesicular y la teoría de maduración (ver esquema en **la figura 4**). De acuerdo con el modelo de transporte vesicular, el cargo se desplaza a través de las diferentes cisternas de Golgi en vesículas. Por lo tanto, las cisternas constituirían compartimentos de membrana preexistentes y estables a través de los cuales el cargo iría desplazándose, y adquiriendo las correspondientes modificaciones post-traduccionales, desde el cis-Golgi hasta el trans-Golgi. Apoyando esta teoría, a partir de la reconstitución *in vitro* de membranas de Golgi de mamífero, se han conseguido aislar vesículas mediando el transporte de cargo entre diferentes cisternas (Rothman y Wieland, 1996).

En el modelo de maduración, el cargo se desplaza conjuntamente con las cisternas a través de los diferentes compartimentos del *stack*. Según esta hipótesis, la cisterna cis-

INTRODUCCIÓN

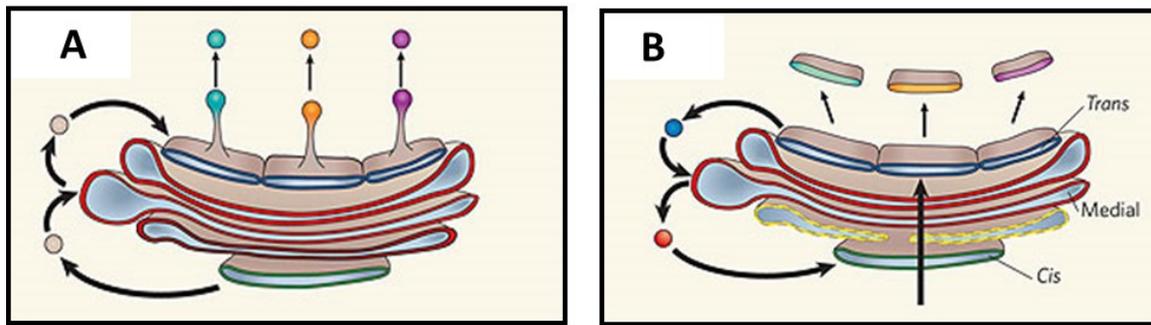


Figura 4. Esquema de los diferentes modelos de formación del Golgi. A) En el modelo vesicular las cisternas del Golgi (del cis-Golgi al trans-Golgi) se mantienen estables y el cargo se transporta de forma anterógrada a través de intermediarios de transporte intra-Golgi. B) En el modelo de maduración, una cisterna del cis-Golgi madura a una cisterna del medial-Golgi y después del trans-Golgi. En este modelo la polaridad de las cisternas (contenido de proteínas, como por ejemplo enzimas de glicosilación, que caracterizan las diferentes cisternas del cis-Golgi al trans-Golgi) se mantiene a través de un tipo de transporte retrógrado que va del trans-Golgi al cis-Golgi.

Imagen extraída de (Malhotra y Mayor, 2006)

Golgi pasaría a convertirse en una cisterna del medial-Golgi y después en una cisterna de trans-Golgi. Al igual que en el modelo vesicular, esta teoría también está basada en observaciones experimentales, como por ejemplo, la distribución a lo largo de los *stacks* de Golgi de las moléculas de procolágeno. Debido al gran tamaño de los trímeros de procolágeno (unos 300nm), y a su rigidez estructural, resulta difícil explicar su inclusión en vesículas de transporte (inferiores a 100nm). De hecho, sólo se han observado moléculas de procolágeno asociadas a las diferentes cisternas (del cis-Golgi al trans-Golgi) y nunca en estructuras vesiculares (Bonfanti et al., 1998). Más recientemente, han surgido nuevas evidencias en apoyo al modelo de maduración (Losev et al., 2006; Matsuura-Tokita et al., 2006). En estos estudios los autores utilizaron técnicas de microscopía confocal *in vivo* para seguir el proceso de maduración del Golgi de *Saccharomyces cerevisiae*, que como hemos apuntado está constituido por un conjunto de cisternas individualizadas esparcidas por el citoplasma. En el modelo de transporte vesicular, una cisterna del cis-Golgi mantendría sus características moleculares de forma estable a lo largo del tiempo. De forma contraria, el modelo de maduración prevé que una cisterna cis, maduraría a una cisterna medial y finalmente a una cisterna trans. Utilizando proteínas características de las diferentes cisternas y acopladas a distintos fluoróforos, se ha observado *in vivo* cómo una misma cisterna varía su composición proteica, es decir, a lo largo del tiempo se van reemplazando los marcadores de cis-Golgi, por marcadores de medial-Golgi y trans-Golgi. ¿Sin embargo,

INTRODUCCIÓN

cuál sería la función de las vesículas que se forman en el Golgi? De acuerdo con el modelo de maduración estas vesículas servirían para mediar el transporte retrógrado de proteínas y lípidos hacia las cisternas precedentes, de forma que la composición molecular (contenido de proteínas estructurales y enzimas) de las diferentes cisternas se conservaría de forma estable a lo largo del tiempo.

INTRODUCCIÓN

(II) TRANSPORTE ENTRE EL RE Y EL COMPLEJO DE GOLGI

El transporte de proteínas y lípidos entre el RE y el Golgi se produce de forma bidireccional, denominando transporte anterógrado al que va de RE a Golgi y transporte retrógrado al que sigue la ruta inversa de Golgi a RE. Llamamos intermediarios de transporte a aquellas estructuras que median el tráfico de proteínas y componentes de membrana entre ambos compartimentos. Estos intermediarios de transporte (vesículas o túbulos) requieren de la acción coordinada de una compleja maquinaria molecular para su formación, su fisión desde el compartimento de membrana de origen, su transporte y finalmente su fusión al compartimento de membrana aceptor. Dentro de las proteínas que forman parte de este proceso se encuentran las proteínas de cubierta o *coats*, cuya función consiste en la deformación de las membranas y en la selección del cargo. En el transporte entre el RE y el Golgi existen dos tipos de proteínas de cubierta: las que componen el COPII y permiten la salida de cargo desde el RE, y el COPI, que media la formación de intermediarios de transporte de Golgi a RE (**figura 5**).

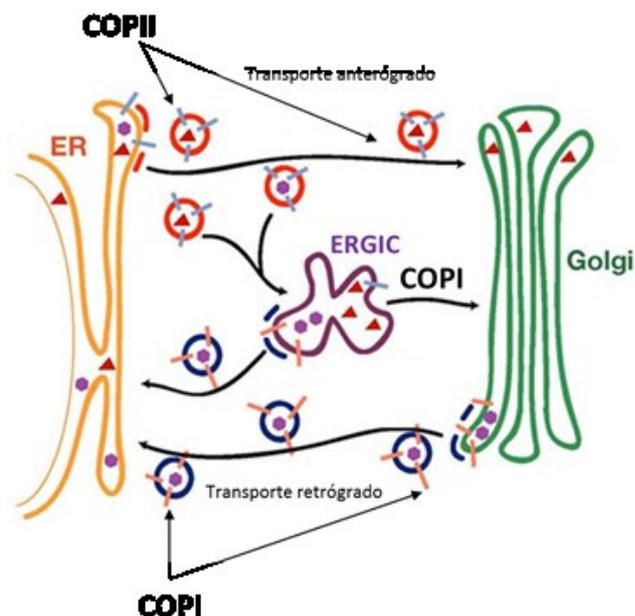


Figura 5. Vías de transporte entre el RE y el Golgi. Aparecen representadas las vesículas COPII (transporte anterógrado) y COPI (transporte retrógrado y anterógrado de ERGIC a Golgi)

Esquema modificado de <http://mcb.berkeley.edu/labs/schekman/>

INTRODUCCIÓN

1. Transporte anterógrado: vesículas COPII

La maquinaria del COPII está compuesta por cinco proteínas citosólicas: Sar1, sec23, sec24, sec13 y sec31. Las proteínas sec23 y sec24 forman heterodímeros para dar lugar a la cara interna de la cubierta, mientras que sec13 y sec31 se conjugan formando heterotetrámeros para constituir la cara externa (Barlowe et al., 1994). El reclutamiento a nivel del RE de Sar1 y estos dos tipos de complejos, se produce de forma secuencial en dominios específicos de membrana, conocidos como sitios de salida del RE (ERES) o RE transicional (tER) (Bannykh et al., 1996; Budnik y Stephens, 2009). Estos dominios ayudan al mantenimiento de una concentración óptima de los componentes del COPII y a su reciclaje, permitiendo un proceso constante de formación de vesículas (Orci et al., 1991). La primera proteína reclutada en los ERES es la GTPasa Sar1, cuya actividad, como sucede con el resto de GTPasas, se encuentra regulada por su unión transitoria a GTP o GDP. De esta forma, cuando se encuentra unida a GDP, Sar1 permanece en el citoplasma en estado inactivo. Por el contrario, cuando se une a GTP, experimenta un cambio conformacional que induce la exposición de su dominio N-terminal anfipático, el cual inserta Sar1 en la membrana del RE (Bielli et al., 2005; Lee and Miller, 2007). Una vez en la membrana, Sar1 actúa en el reclutamiento del siguiente componente del complejo COPII, el heterodímero sec23-24. En este proceso se produce una interacción directa entre Sar1 y sec23 (Bi et al., 2002), y a su vez, sec23 actúa promoviendo la inactivación de Sar1 al acelerar la hidrólisis de GTP a GDP. Sin embargo, la inactivación de Sar1 no llega a finalizarse hasta que el complejo sec13-31, componente de la cara externa de la cubierta, se recluta en el COPII (Antonny et al., 2001; Yoshihisa et al., 1993).

El reclutamiento de cargo en las vesículas COPII, también tiene lugar durante la fase inicial de formación de la cubierta interna. Este proceso está mediado por diferentes mecanismos: 1) por la interacción entre sec24 y secuencias consenso en la cara citoplasmática de las proteínas exportadas (Miller et al., 2002), 2) a través de proteínas que ejercen funciones adaptadoras (Baines y Zhang, 2007), o 3) por un sistema de difusión pasiva (*bulk flow*) (Thor et al., 2009).

Una vez formada la cara interna de la cubierta del COPII, se produce la unión del heterotetrámero sec13-sec31 para constituir la cara externa. El reclutamiento del complejo sec13-31 se produce por una unión directa entre sec31 con sec23 y sar1 (Bi et

INTRODUCCIÓN

al., 2007), y su polimerización da lugar a la extrusión de las membranas del RE hasta producir la fisión de las vesículas. Resulta interesante que a diferencia de otros tipos de vesículas, las COPII no requieren de la acción especializada de GTPasas, como por ejemplo dinamina, para completar el proceso de fisión (Matsuoka et al., 1998). Las vesículas resultantes tienen un tamaño aproximado de 60-70 nm y contienen el cargo que es transportado del RE al compartimento intermedio y al Golgi (esquema de formación del COPII en la **figura 6**).

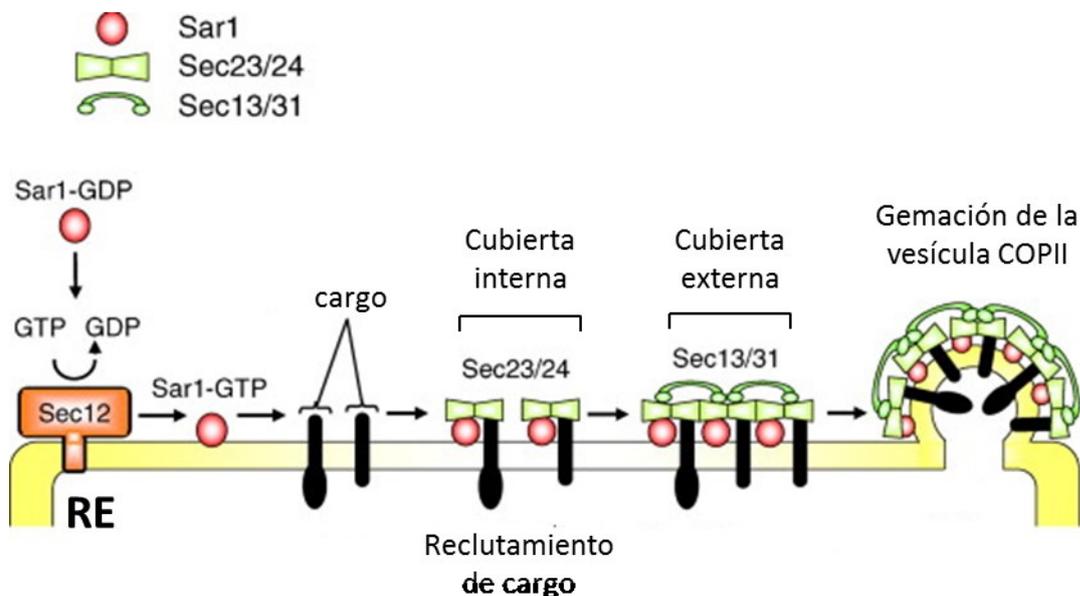


Figura 6. Etapas de formación de las vesículas COPII. Los diferentes componentes de la cubierta interna y externa del COPII aparecen representados

Esquema modificado de (Sato y Nakano, 2007).

2. Transporte retrógrado. Vesículas COPI.

En el modelo más aceptado actualmente, las vesículas de tipo COPI se forman en el compartimento intermedio (ERGIC) y el Golgi, desde donde respectivamente promueven el transporte anterógrado hasta el Golgi y el transporte retrógrado hacia el RE. Las proteínas que constituyen la cubierta del COPI forman un complejo heptamérico compuesto por las subunidades α , β , β' , ϵ , γ , δ y ζ (Eugster et al., 2000; Waters et al., 1991). Los componentes del coatómero se reclutan en las membranas a través de interacción directa con la proteína de la familia de GTPasas Arf, Arf1 (Eugster et al., 2000; Waters et al., 1991). Como en el caso de sar1, Arf1 también cicla entre dos

INTRODUCCIÓN

estados, un estado inactivo cuando se encuentra unido a GDP, y uno activo cuando se une a GTP. Las proteínas que promueven la sustitución de GTP por GDP en los diferentes miembros de Arf son conocidas como ArfGEFs. De entre esta familia de proteínas, la ArfGEF GBF se localiza en los compartimentos en los que se forman las vesículas COPI (cis-Golgi y ERGIC). El reclutamiento de GBF1 en el Golgi es dependiente de su unión a Rab1b (Monetta et al., 2007) y de la formación de PI4P (Dumaresq-Doiron et al., 2010). Una vez que Arf-GDP y su GEF respectiva se encuentran unidos a la membrana, se produce la activación de Arf. En el caso concreto de Arf1, la sustitución de GDP por GTP induce un cambio conformacional que deja expuesta su región anfipática con estructura de hélice en el dominio N-terminal. Este dominio actúa anclando Arf1 en la bicapa lipídica (Antonny et al., 1997a; Franco et al., 1996).

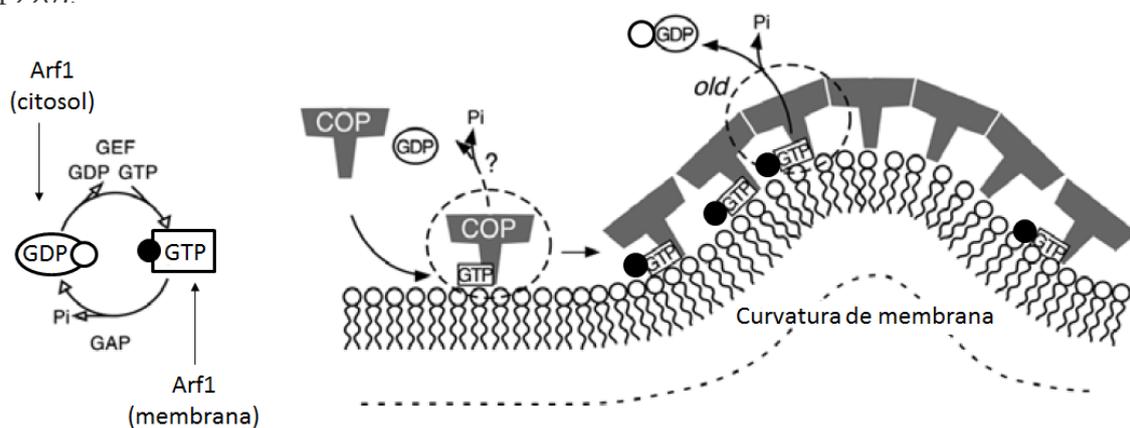


Figura 7. Etapas iniciales de formación del COPI. Vemos cómo la inserción de Arf1-GTP recluta los componentes del coatómero a la membrana. La hidrólisis del GTP de Arf1 produce su liberación de la membrana, lo cual desestabiliza los componentes de la cubierta permitiendo el desensamblaje del coatómero tras la fisión de la vesícula.

Esquema modificado de (Antonny et al., 2005).

La inserción en la membrana de Golgi de Arf-GTP, recluta en bloque los componentes del coatómero (Hara-Kuge et al., 1994; Sun et al., 2007; Zhao et al., 1997), y a continuación se produce la selección del cargo incorporado en las vesículas COPI (esquema de las etapas iniciales formación del COPI en la **figura 7**). Una parte de las proteínas incorporadas en las vesículas COPI, interaccionan con componentes del coatómero a través de secuencias consenso situadas en su cara citosólica (Eugster et al., 2004; Fiedler et al., 1996; Sohn et al., 1996). Alternativamente, algunas proteínas requieren de su unión a proteínas adaptadoras para su transporte en vesículas COPI.

INTRODUCCIÓN

Este es el caso del receptor de KDEL, proteína de seis dominios transmembrana que contiene la secuencia de interacción con el coatómero KKXSXXX en su extremo C-terminal. Por otra parte, la región luminal del receptor de KDEL interacciona con proteínas que presentan la secuencia KDEL en su extremo C-terminal (Lewis and Pelham, 1992). Dicha interacción permite el transporte retrógrado de estas proteínas de Golgi a RE (Majoul et al., 1998; Pelham, 1991), donde un cambio en el pH disociaría el complejo (Wilson et al., 1993), dejando al receptor libre para ser transportado de nuevo al Golgi.

2.1 Etapas finales en la fisión de las vesículas COPI.

Una vez caracterizados los principales componentes moleculares que participan en las etapas iniciales de formación del coatómero, así como los mecanismos que operan en la selección e incorporación de cargo en las vesículas COPI, es momento de detallar los procesos que conducen a la fisión del COPI de las membranas.

En los estadios iniciales de deformación de la membrana que conducen a la generación de una curvatura positiva, la inserción de Arf en la bicapa lipídica ocurre como un proceso energéticamente favorable. Sin embargo, a medida que se produce la elongación de la vesícula va originándose una creciente curvatura negativa en la base o cuello de la vesícula. Esta curvatura negativa resulta desde un punto de vista energético altamente desfavorable para la unión de Arf. Un mecanismo posible para relajar las tensiones energéticas a medida que el proceso avanza, es la difusión lateral de Arf desde el cuello a la punta de la vesícula. Sin embargo, si la interacción de Arf con los componentes del coatómero es demasiado fuerte para permitir esta difusión lateral, la inestabilidad intrínseca a este estado sólo puede relajarse si se produce el cierre del cuello de la vesícula y su consiguiente fisión desde la membrana de origen (Holthuis y Burger, 2003).

Son varias las moléculas cuya cooperación en el proceso de fisión del COPI resulta necesaria, siendo tal vez las más extensamente estudiadas aquéllas que pertenecen a la familia de ArfGAPs (Cukierman et al., 1995), proteínas que hidrolizan el GTP a GDP en las proteínas Arfs. Existen diferentes proteínas con acción GAP sobre diferentes miembros de Arf, todas ellas caracterizadas por la presencia en el dominio catalítico de

INTRODUCCIÓN

un dominio de dedo de zinc, seguido por un residuo conservado de arginina (CX2CX16CX2CX4R) (Cukierman et al., 1995). A nivel del Golgi, ArfGAP1, ArfGAP2 y ArfGAP3, han sido identificadas como componentes necesarios en la formación del COPI. El silenciamiento de las tres isoformas incrementa los niveles de Arf1 unido a membranas, al tiempo que se observa una acumulación del coatómero y componentes del Golgi (como GM130) en el compartimento intermedio (Saitoh et al., 2009).

Aparte de las proteínas ArfGAPs, en los últimos años otros componentes implicados en la maquinaria de fisión de las vesículas COPI han sido identificados. Este es el caso de la proteína BARS (*breveleudin A ADP-ribosylated substrate*), implicada en el proceso final de constricción del cuello de las vesículas (Yang et al., 2005). Actualmente se considera que BARS actuaría conjuntamente con ciertos lípidos para inducir curvatura de membrana y promover la fisión del cuello de las vesículas (Yang et al., 2008; Yang et al., 2006) (esquema completo de las etapas de formación y fisión del COPI en la **figura 8**).

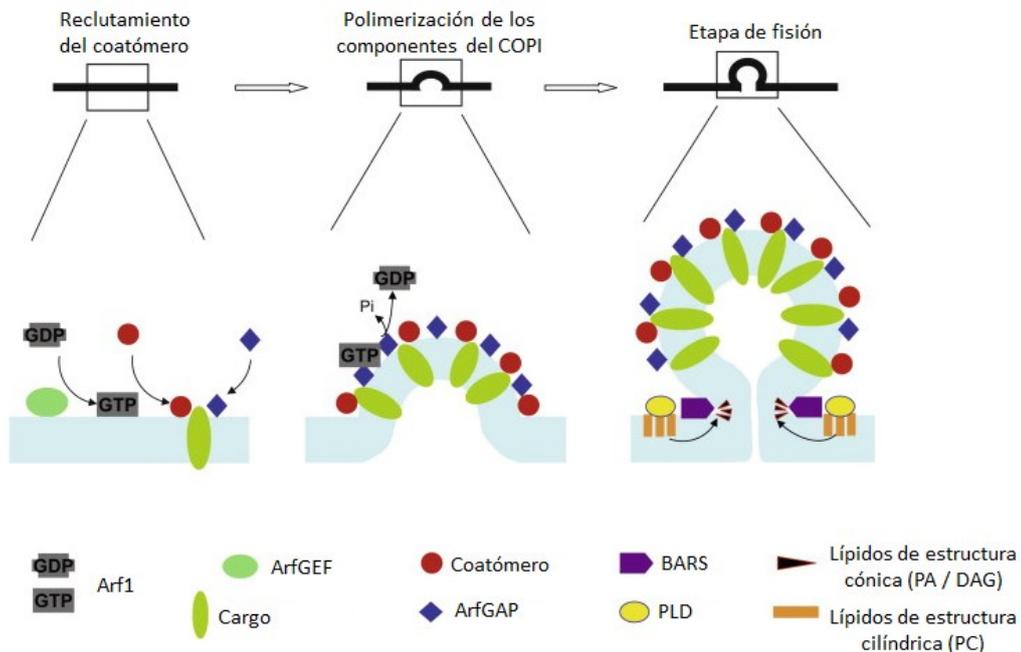


Figura 8. Esquema general de las etapas de formación de las vesículas COPI. El proceso se inicia con el reclutamiento de los componentes del coatómero por la forma unida a GTP de Arf1, a continuación el cargo se recluta en la vesícula nascente por interacción con componentes del coatómero o bien por interacción con proteínas adaptadoras. Finalmente se produce la hidrólisis de Arf1-GTP por ArfGAP y la maquinaria de fisión produce la escisión de la vesícula COPI de la membrana de origen.

Esquema modificado de (Hsu y Yang, 2009).

3. Transporte retrógrado independiente de COPI y dependiente de Rab6

Hasta ahora hemos introducido los principios moleculares del transporte retrógrado dependiente de COPI, sin embargo en los últimos años se ha descrito la existencia de un tipo de transporte retrógrado independiente de COP-I y dependiente de Rab6. Esta vía de transporte fue inicialmente descubierta al comprobar que la inhibición del transporte COPI por microinyección de anticuerpos contra componentes del coatómero, si bien bloqueaba el transporte retrógrado de ERGIC-53 o el receptor de KDEL, no afectaba al tráfico de Golgi a RE de la subunidad B de la Shiga toxin (STxB), ni al reciclaje de enzimas de glicosilación. En el mismo artículo, los autores identificaron que la Rab GTPasa Rab6 es un componente necesario de esta vía de transporte (Girod et al., 1999). Al estudiar *in vivo* la salida de intermediarios de transporte marcados con Rab6 desde el Golgi, se ha observado que éstos siguen un movimiento dependiente de microtúbulos principalmente dirigido hacia la periferia de la célula, donde se produce su entrada en el RE. Dichos intermediarios de transporte no incorporan cargo que sigue la vía de transporte dependiente de COPI, y por el contrario contienen la STxB (White et al., 1999). En el mismo estudio, los autores también observaron estructuras de tipo vesicular marcadas con Rab6 desplazándose en estrecha asociación a los extremos de los túbulos de RE, y que existía una segregación a nivel de RE entre Rab6 y el receptor de KDEL (White et al., 1999). La sobreexpresión de un mutante de Rab6 unido a GDP inhibe el transporte retrógrado de la STxB (Girod et al., 1999; White et al., 1999), mientras que la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa (unida a GTP) produce la redistribución de enzimas de glicosilación de Golgi a RE, causando un efecto de fusión de ambos compartimentos similar al observado tras tratamiento con brefeldina A (Martinez et al., 1997). La dependencia del citoesqueleto de microtúbulos en el movimiento de las vesículas Rab6 también se ha demostrado. La sobreexpresión del dominio carboxi-terminal de Rabkinesina-6, proteína motora que interacciona con Rab6, inhibe el efecto sobre el transporte de la sobreexpresión de Rab6-GTP (Echard et al., 1998). Curiosamente, también se ha descrito una interacción de Rab6 con Bicaudal-D, proteína a través de la cual las vesículas Rab6 se asociarían al complejo dineína-dinactina, necesario para el transporte en la dirección contraria, es decir, de la periferia de la célula al Golgi (Matanis et al., 2002).

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, también se ha demostrado que Rab6 resulta necesario, si bien no esencial, para el transporte de Golgi a membrana plasmática, concretamente hacia regiones enriquecidas en la proteína cortical de unión a Rab6 ELKS (Grigoriev et al., 2007; Grigoriev et al., 2011; Miserey-Lenkei et al., 2010). Una posible explicación a esta diversidad en los efectos de Rab6 sobre el transporte, se ha propuesto recientemente al describir que existe una interacción de Rab6 con la proteína miosina II a nivel del Golgi. Esta interacción permitiría acoplar Rab6 al citoesqueleto de actina a través de miosina II, lo que resultaría necesario en el proceso de fisión de intermediarios de transporte desde el Golgi hacia la membrana plasmática o el RE (Miserey-Lenkei et al., 2010).

(III) DINÁMICA Y COMPOSICIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES

Los lípidos cumplen tres funciones principales: 1) son utilizados como reserva de energía, 2) se organizan para formar las membranas externas e internas de las células, es decir, cumplen un papel estructural y 3) actúan en procesos de señalización intracelular. En la primera parte de este capítulo pretendemos ofrecer una visión general de los principales lípidos de las biomembranas, detallando los aspectos más relevantes en referencia a su topología y su metabolismo. Finalmente, desarrollaremos algunos aspectos relativos a las propiedades biofísicas de los lípidos, y el papel que tienen estas propiedades en la regulación de curvatura de membrana, esencial para la formación de intermediarios de transporte.

1. Clasificación de los principales lípidos de las membranas.

Los principales lípidos presentes en las membranas de las células eucariotas son los glicerofosfolípidos. Este grupo de lípidos, cuya porción hidrofóbica es el diacilglicerol (DAG), pueden presentar uno o varios dobles enlaces *cis* en las cadenas de ácidos grasos que están unidas al carbono sn-1 o sn-2 del glicerol. Además, a esta estructura básica se le puede unir un grupo fosfato en el carbono sn-3 del glicerol (formando ácido fosfatídico; PA) y a este fosfato una molécula (R) que puede ser neutra como la serina o el inositol [formando la fosfatidilserina (PS) o el fosfatidilinositol (PI)] o de carga positiva como la colina o la etanolamina [formando la fosfatidilcolina (PC) o la fosfatidiletanolamina (PE)]. El lípido más común es la PC, que constituye el 50% del contenido total de fosfolípidos en la mayoría de las membranas de eucariotas.

Los esfingolípidos constituyen otra gran clase de lípidos estructurales. Su cuerpo hidrofóbico es la ceramida (Cer). Los principales esfingolípidos en células de mamíferos son la esfingomielina (SM) y los glicoesfingolípidos (GSLs), los cuales contienen mono-, di- u oligosacáridos basados en glicosilceramida (GlcCer) y en ocasiones galactosilceramida (GalCer) (van Meer y Lisman, 2002). Los esfingolípidos se caracterizan por tener cadenas saturadas (o insaturadas en *trans*), de tal forma que presentan una estructura cilíndrica más compacta que las moléculas de PC, dotando a las membranas de menor fluidez (estado de gel).

INTRODUCCIÓN

Finalmente los esteroides constituyen la principal clase de lípidos no polares. Los esteroides son esteroides con 27 o 29 átomos de carbono. Su estructura química deriva del esterano, una molécula de 17 carbonos formada por tres anillos hexagonales y uno pentagonal. En los esteroides, se añade una cadena lateral de 8 o más átomos de carbono en el carbono 17 y un grupo alcohol o hidroxilo (-OH) en el carbono 3. El principal lípido del grupo de los esteroides en mamíferos es el colesterol, mientras que en levaduras es el ergosterol. Los esteroides se encuentran principalmente en regiones de membrana altamente ordenadas y enriquecidas en esfingolípidos (esquema de los principales grupos de lípidos en la **figura 9**).

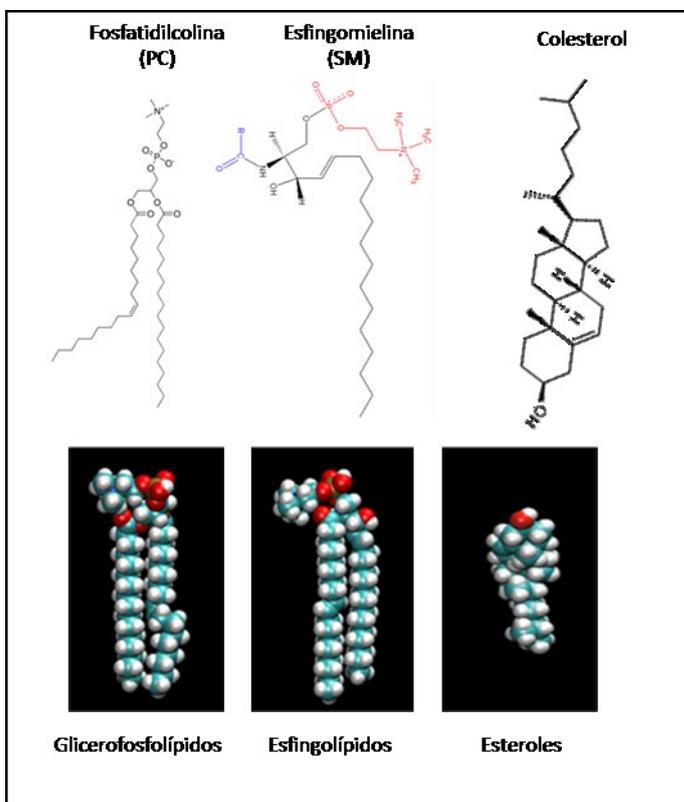


Figura 9. Representación de la estructura química de los principales lípidos presentes en la membrana de las células eucariotas: los glicerofosfolípidos (ejemplo de la fosfatidilcolina, PC), los esfingolípidos (estructura de la esfingomielina, SM) y los esteroides (estructura del colesterol).

Esquema modificado de (van Meer et al., 2008)

Tal y como hemos mencionado al inicio de este apartado, existen lípidos que aparte de llevar a cabo una función estructural también actúan como moléculas señalizadoras. La hidrólisis de glicerofosfolípidos produce los siguientes mensajeros lipídicos: lisofosfatidilcolina (LPC), ácido lisofosfatídico (LPA), ácido fosfatídico (PA) y diacilglicerol (DAG). Por otra parte, a partir de la hidrólisis de esfingolípidos se producen: esfingosina (Sph), esfingosina-1-fosfato (S1P), ceramida-1-fosfato (C1P) y ceramida (Cer). LPC, LPA, Sph y S1P contienen una única cadena alifática, lo que hace que su inserción en la bicapa lipídica sea relativamente lábil. Ejercen su función

INTRODUCCIÓN

señalizadora activando receptores de membrana (Meyer zu Heringdorf y Jakobs, 2007). Por el contrario el PA, el DAG, la C1P y la Cer, permanecen en las membranas y su función señalizadora está principalmente relacionada con el reclutamiento de proteínas citosólicas (**figura 10**).

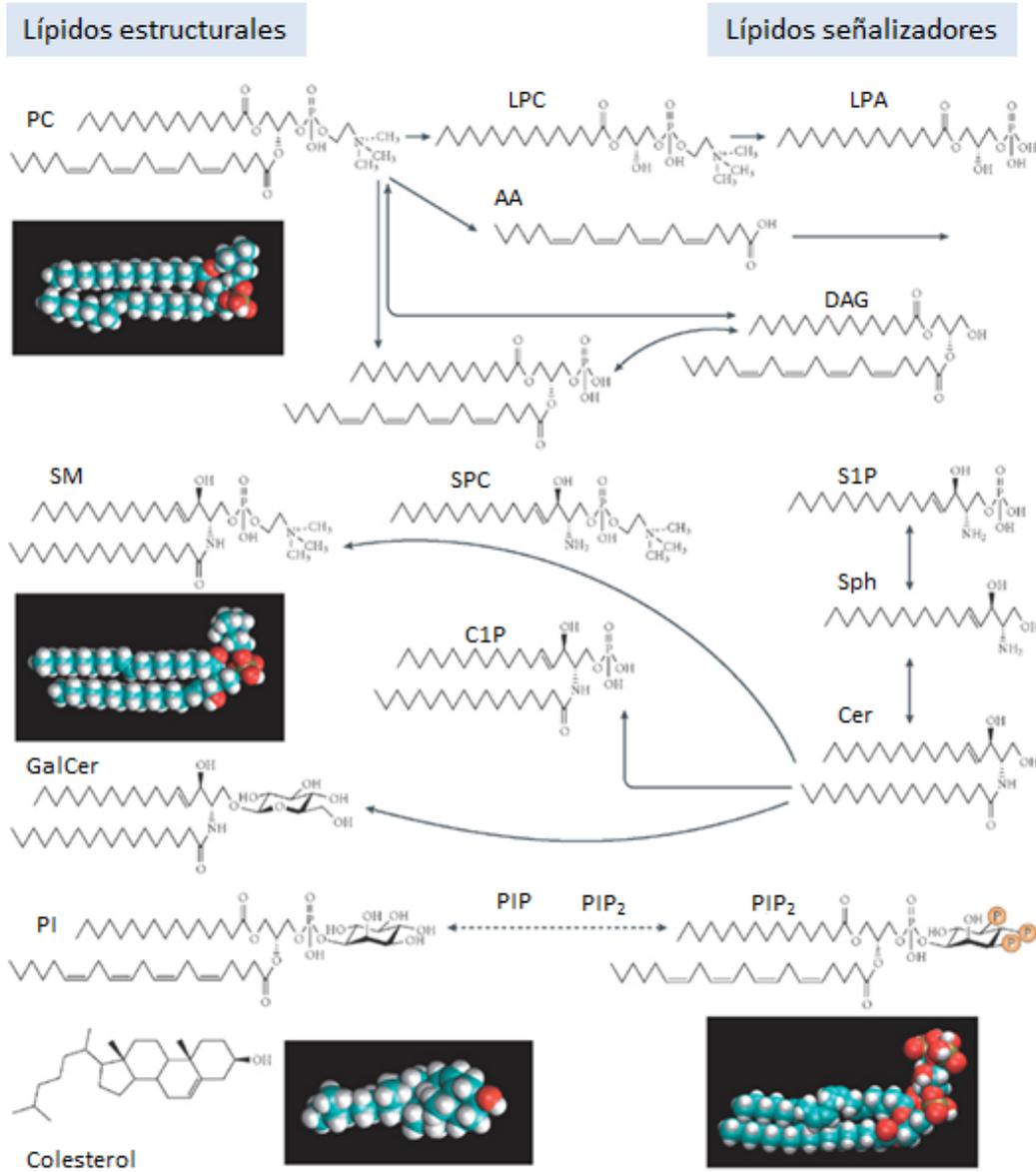


Figura 10. Esquema de los principales lípidos con funciones estructurales y señalizadoras y de sus relaciones metabólicas: PC (fosfatidilcolina), LPC (lisofosfatidilcolina), LPA (ácido lisofosfatídico), AA (ácido araquidónico), SM (esfingomielina), GalCer (galactosilceramida), PI (fosfatidilinositol), PIP₂ (fosfatidilinositol bifosfato), C1P (ceramida-1-fosfato), S1P (esfingosina-1-fosfato), Sph (esfingosina), SPC (esfingosilfosforilcolina), Cer (ceramida), DAG (diacilglicerol).

Esquema modificado de (van Meer et al., 2008)

INTRODUCCIÓN

2. Curvatura de membrana. Conceptos generales

Hecha esta clasificación inicial sobre los principales grupos de lípidos en las células eucariotas, en este apartado expondremos algunos conceptos relativos a las propiedades físicas de los lípidos, y cómo estas propiedades pueden regular la plasticidad de las membranas, por ejemplo generando curvatura.

Para abordar esta cuestión en primer lugar debemos introducir una serie de conceptos relativos a la curvatura de las membranas, empezando por la polaridad (positiva o negativa) de la curvatura. Se considera curvatura positiva cuando la cabeza polar de los lípidos, la que está en contacto con el medio acuoso, se proyecta de forma convexa hacia este medio acuoso, mientras que se considera curvatura negativa cuando la cabeza polar de los lípidos se invagina, es decir, forma una curvatura cóncava, respecto al medio acuoso (McMahon y Gallop, 2005).

En la **figura 11** podemos observar cómo en un corte frontal a través del eje más largo de una vesícula, la hemimembrana citosólica presenta curvatura positiva en la zona más apical, mientras que en el cuello formaría curvatura negativa. En cambio, en un corte transversal realizado sobre el cuello de la vesícula observamos curvatura positiva en la hemimembrana citosólica y curvatura negativa en la hemimembrana luminal.

En la membrana existen unas zonas específicas o microdominios que son susceptibles a deformarse. En estos microdominios actúan proteínas y lípidos de forma conjunta para generar curvatura positiva y/o negativa. A nivel proteico, las proteínas de cubierta o *coats*, como hemos visto en el apartado anterior, resultan necesarias para la formación y fisión de las vesículas. También resulta esencial el papel del citoesqueleto, tanto el de microtúbulos como el de microfilamentos de actina, y de las proteínas motoras asociadas. Experimentos *in vitro* han demostrado que proteínas motoras de los microtúbulos, como la quinesina, se anclan por una parte en las membranas de Golgi y por la otra en los microtúbulos, generando una fuerza de tensión sobre las membranas capaz de producir su deformación en estructuras tubulares (Roux et al., 2005). Por otra parte, el citoesqueleto de actina proporciona un soporte estructural que facilita la deformación de la membrana en las porciones laterales del Golgi, bien a través de la

INTRODUCCIÓN

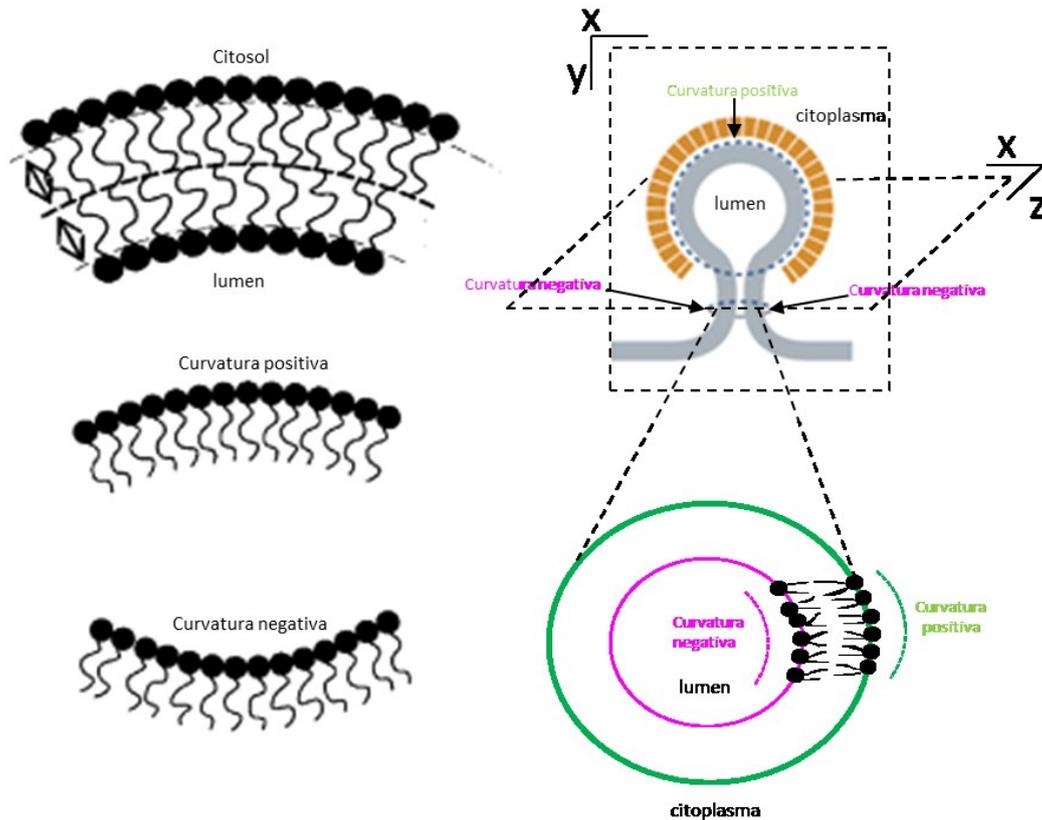


Figura 11. Esquema en el que aparecen representados diferentes ejemplos de curvatura de membranas. A) En la bicapa, la hemimembrana citosólica presenta curvatura positiva, mientras que la hemimembrana luminal presenta curvatura negativa. B) Esquema de las diferentes curvaturas que se observan en una vesícula, negativa en el cuello y positiva en la parte superior. Por otra parte, al observar un corte transversal del cuello de la vesícula la hemimembrana citosólica presenta curvatura positiva, mientras que la hemimembrana luminal presenta curvatura negativa.

Esquema modificado de (Shemesh et al., 2003) y de (Qualmann et al., 2011)

polimerización de actina *de novo* o bien empleando la fuerza generada por los motores de actina (miosinas) (Buss et al., 2002). Al igual que en el caso del citoesqueleto de microtúbulos, existen evidencias experimentales del acoplamiento funcional entre maquinaria de fisión y la polimerización de actina en el TGN (Antonny, 2006; Cao et al., 2005; Carreno et al., 2004; Kerkhoff et al., 2001; Kessels y Qualmann, 2004; Praefcke y McMahon, 2004; Rozelle et al., 2000).

Respecto al papel central de los lípidos, éstos pueden favorecer la formación de curvatura debido a sus propias características estructurales, o bien a través de reclutar proteínas citosólicas capaces de sensor, estabilizar y generar curvatura. En el siguiente apartado desarrollaremos ambos conceptos.

INTRODUCCIÓN

2.1 Cooperación de lípidos y proteínas en la generación de curvatura de membrana.

Como ya hemos apuntado en la introducción, el principal lípido en las células eucariotas es la PC. Debido a su carácter anfipático, las moléculas de PC se organizan de forma espontánea en bicapas lipídicas, con las colas hidrofóbicas en la parte central y la cabeza polar en contacto con el medio acuoso. La presencia de un doble enlace en cis en una de sus cadenas de ácidos grasos, permite que a temperatura ambiente las membranas enriquecidas en PC sean fluidas. A nivel estructural su geometría es cilíndrica, cosa que favorece su disposición en bicapas planas. Por el contrario, la presencia de lípidos con geometría cónica causa alteraciones en el grado de empaquetamiento de los lípidos de las membranas, lo que genera curvatura (Janmey y Kinnunen, 2006; van den Brink-van der Laan et al., 2004). Lípidos como la PE, el PA o el DAG tienen una cabeza polar relativamente pequeña en comparación con la PC, lo que les confiere estructura cónica. La geometría de los lípidos también depende de las características de las cadenas de ácidos grasos. Una cadena oleil (C18:1) ocupa un volumen superior al de una cadena palmitoil (C16:0) debido a la presencia de un doble enlace, lo que genera una especie de pliegue en el centro de la cadena. Por lo tanto, los defectos en el grado de empaquetamiento de los lípidos provienen de dos factores: la ratio entre lípidos con cabezas polares grandes (cilíndricos) y pequeñas (cónicos) y la ratio entre lípidos saturados e insaturados (**figura 12**).

El nivel de empaquetamiento de los lípidos probablemente incrementa de forma gradual a lo largo de la vía secretora (Brugger et al., 2000; Holthuis y Levine, 2005; Klemm et al., 2009). En un extremo, la membrana del RE se caracteriza por presentar un nivel muy bajo de empaquetamiento. Esto es debido a la presencia de elevadas cantidades de fosfolípidos insaturados y a la baja cantidad de colesterol, cuya síntesis está estrechamente regulada (Bretscher y Munro, 1993; Radhakrishnan et al., 2008). En el otro extremo, los lípidos de la membrana plasmática tienen un nivel de empaquetamiento muy superior por la presencia de lípidos saturados y altos niveles de colesterol.

La importancia de la presencia de lípidos que doten de fluidez (bajo nivel de empaquetamiento) a la membrana del RE se ha demostrado experimentalmente. En un

INTRODUCCIÓN

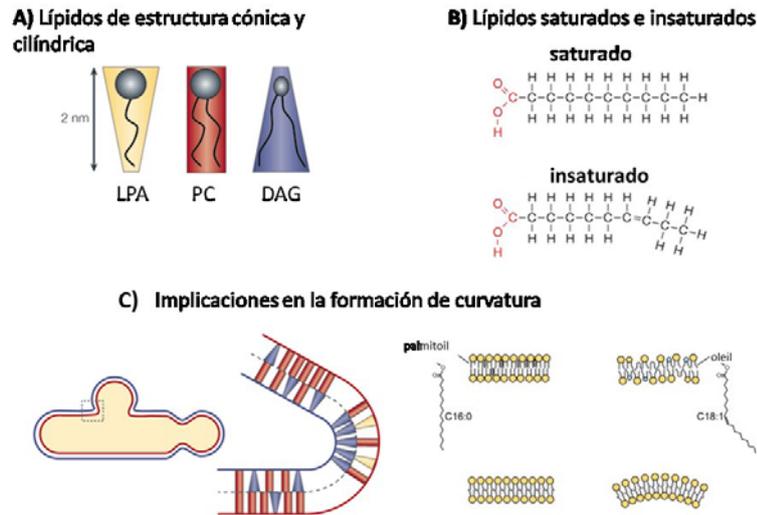


Figura 12. Lípidos y curvatura de membrana. A) Los lípidos pueden presentar diferentes geometrías dependiendo de su estructura molecular (principalmente determinadas por el tamaño de la cabeza polar y la presencia de dobles enlaces en la cadena de ácidos grasos). Lípidos como la fosfatidilcolina (PC) tienen estructura cilíndrica, mientras que lípidos como el diacilglicerol (DAG) o el ácido lisofosfatídico (LPA) tienen estructura cónica. B) Representación del efecto de la presencia de un doble enlace en la geometría de una cadena de ácidos grasos. C) Representación de los efectos de la acumulación de lípidos de estructura cónica y lípidos insaturados en la generación de curvatura de membrana.

Esquema modificado de (Sprong et al., 2001) y (Bigay y Antonny, 2012)

estudio, para revertir el estrés de RE en levaduras con déficit de síntesis de fosfolípidos insaturados, se analizó el efecto de añadir 65 cadenas de ácidos grasos con diferente longitud y grado de saturación (Deguil et al., 2011). Todas las cadenas de ácidos grasos pudieron incorporarse en los fosfolípidos, pero sólo las cadenas de ácidos grasos insaturados reestablecieron el crecimiento normal de las células. El nivel de empaquetamiento de las membranas también puede influir en el reclutamiento de proteínas, como por ejemplo Sar1. Esta proteína, cuya función en la formación del COPII resulta esencial (ver apartado anterior), presenta la secuencia hidrofóbica de inserción en membrana más larga que se haya descrito entre las diferentes proteínas de la familia de las GTPasas (Huang et al., 2001; Lee et al., 2005). Sar1 se inserta de forma más eficiente en membranas enriquecidas en fosfolípidos con ácidos grasos insaturados (especialmente C18:1-C18:1), demostrativo de que su dominio hidrofóbico tiene preferencia por bicapas lipídicas con un bajo nivel de empaquetamiento (Matsuoka et al., 1998).

Otro ejemplo lo encontramos en las proteínas con dominios que actúan como sensores del nivel de curvatura de membrana (dominios LPS, “lipid packing sensor”), como por

INTRODUCCIÓN

ejemplo ArfGAP1. Estudios *in vitro* han demostrado que la actividad de ArfGAP1 incrementa a medida que disminuye el diámetro de los liposomas (Bigay et al., 2003). Esta sensibilidad al nivel de curvatura vendría determinada por el hecho de que la inserción del dominio LPS (con estructura de hélice anfipática), dependería del grado de empaquetamiento de los lípidos que conforman la bicapa. De esta forma, en condiciones en que se producen asimetrías en el nivel de empaquetamiento de los lípidos, como cuando se inicia el proceso de gemación de una vesícula, la curvatura positiva de la hemimembrana externa crearía espacios entre los lípidos que permitirían la inserción del dominio LPS, reclutando ArfGAP1 a la vesícula en formación (Bigay et al., 2005). Por otra parte, la composición lipídica de la membrana también podría regular el reclutamiento de ArfGAP1 en ausencia de una curvatura inicial. Sobre este punto se ha descrito que ArfGAP1 se une con poca afinidad a membranas enriquecidas en fosfolípidos de estructura cilíndrica, mientras que la presencia de lípidos de estructura cónica o lípidos insaturados, permitiría la inserción del dominio LPS entre los espacios generados por la acumulación de estos lípidos (Antonny et al., 1997b). Una vez en la membrana, el dominio LPS podría actuar sinérgicamente con los lípidos de estructura cónica generando curvatura positiva de la hemimembrana externa. Tomando como referencia un plano longitudinal, en una vesícula el punto de máxima curvatura positiva de la hemimembrana externa se encontraría en la punta, mientras que en el cuello observaríamos curvatura negativa. Esta asimetría haría que la actividad catalítica de ArfGAP1 se produjese de forma localizada desde la punta de la vesícula a la base, permitiendo que el proceso de desensamblaje del coatómetro no ocurra hasta que la vesícula haya completado su formación (**figura 13**).

Apoiando este modelo, estudios realizados *in vitro* en vesículas unilamelares de gran tamaño (GUVs) sobre las que se puede generar mecánicamente la formación de túbulos, han demostrado que ArfGAP1 se distribuye en la región de mayor curvatura positiva (el túbulo), quedando excluida del cuerpo de la vesícula (Ambroggio et al., 2010). Respecto a estudios realizados *in vivo*, el silenciamiento de ArfGAP1 induce la acumulación de perfiles vesiculares adheridos a las membranas de Golgi, evidenciando un impedimento en el proceso de fisión de las vesículas COPI (Asp et al., 2009). A parte de ArfGAP1, también contienen dominios LPS la proteína de cis-Golgi GMAP, la

INTRODUCCIÓN

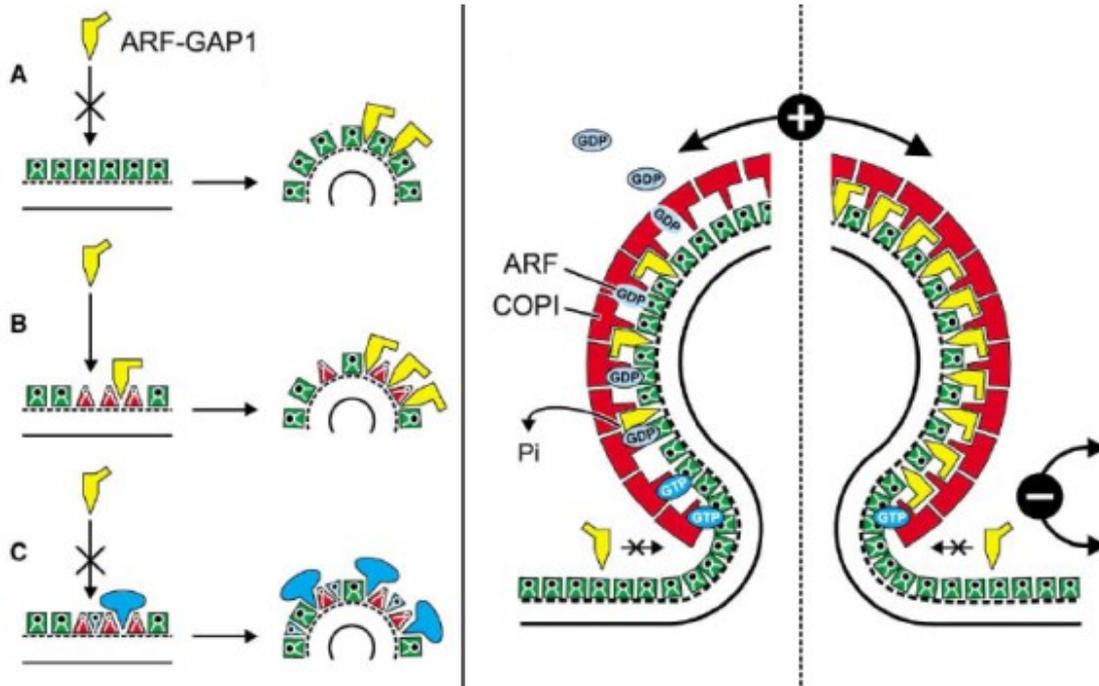


Figura 13. Esquema de la inserción de ArfGAP1 en membranas. A) El dominio LPS se inserta con mayor eficiencia en membranas que presentan un cierto grado de curvatura positiva en comparación con membranas planas. B) El dominio LPS se inserta con mayor eficiencia en membranas con un elevado contenido en lípidos de estructura cónica. A su vez, la inserción del dominio LPS puede actuar sinérgicamente con los lípidos de estructura cónica en la generación de curvatura positiva. C) Lípidos con estructura de cono invertido, como el ácido lisofosfatídico, pueden tener un efecto análogo al dominio LPS en la inducción de curvatura positiva. D) Disposición de ArfGAP1 en las vesículas COPI. La máxima actividad de ArfGAP1 se conseguiría en las regiones de mayor curvatura positiva de la hemimembrana externa, de forma que la hidrólisis de Arf1 se produciría de forma localizada desde la punta de la vesícula (máxima curvatura positiva), al cuello (curvatura negativa).

Esquema modificado de (Holthius y Burger, 2003)

proteína de la envoltura nuclear (Nup133) y la proteína de RE Atg14L/BARKOR (Cardenas et al., 2009; Doucet et al., 2010; Fan et al., 2011; Levi et al., 2008).

En la vía endocítica, las proteínas con dominios BAR cumplen funciones análogas a las proteínas con dominios LPS en la vía secretora. Los dominios BAR forman dímeros a partir de la yuxtaposición de dos hélices alfa (estructura de hélice arrollada, “coiled-coil”), dando lugar a una molécula de superficie cóncava y carga positiva (**figura 14**) (Frost et al., 2009; Peter et al., 2004; Zimmerberg y McLaughlin, 2004). A partir de su dimerización, los dominios BAR actúan reconociendo, estabilizando y generando curvatura en un proceso dependiente de su concentración y su reclutamiento a membranas (Frost et al., 2008; Galic et al., 2012; Peter et al., 2004). En relación a la unión a membranas de estas proteínas, juegan un papel importante las interacciones

INTRODUCCIÓN

electrostáticas entre los fosfolípidos (carga negativa) y los aminoácidos con carga positiva de los dominios BAR (Gallop et al., 2006; Masuda et al., 2006; Peter et al., 2004; Takenawa, 2010). Hemos dicho que a nivel intracelular existe un gradiente de RE a membrana plasmática en cuanto al grado de ordenación (empaquetamiento) de los lípidos. Curiosamente, la carga de las membranas también presenta un gradiente similar. En células eucariotas, las propiedades electrostáticas de las membranas dependen principalmente de las cantidades de fosfatidilserina (PS). En el RE los niveles de PS son muy bajos, mientras que en la membrana plasmática la PS constituye alrededor del 10% de los fosfolípidos.

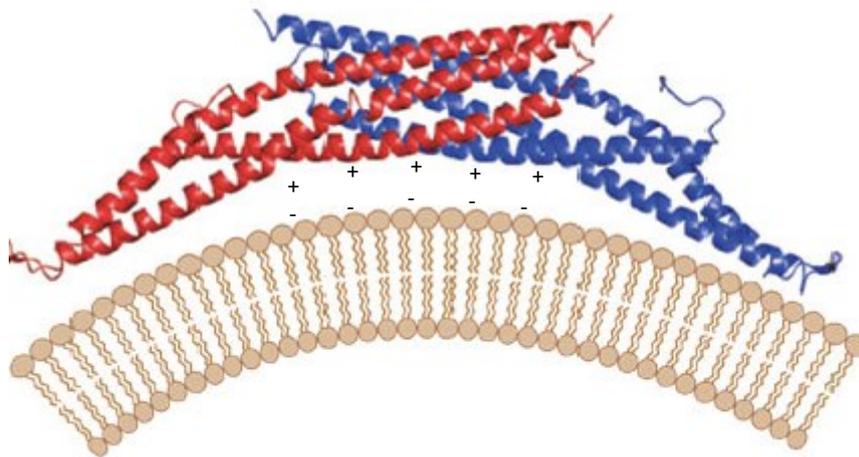


Figura 14. Estructura de los dominios BAR y su interacción con las membranas. Vemos cómo las estructuras de hélice arrollada (“coiled coil”) de dos dominios BAR dimerizan formando una estructura cóncava. La cara interna de esta estructura está enriquecida en aminoácidos de carga positiva, lo que permite que se formen interacciones electrostáticas con la carga negativa de los fosfolípidos de la membrana.

Esquema modificado de (MacMahon y Gallop, 2005)

Además de esta diferente concentración, estudios recientes sugieren que en el RE la PS se encuentra principalmente en la membrana luminal, mientras que en la membrana plasmática se encuentra en la capa citosólica (Fairn et al., 2011; Kay et al., 2012). En la misma línea, se ha publicado que en la membrana plasmática la formación de PIP2 está restringida a la capa citosólica (Di Paolo y De Camilli, 2006). Estos resultados indican que la carga negativa de la membrana del RE en contacto con el citosol debe ser inferior a la que encontramos en la membrana plasmática. Por tanto, resulta lógico pensar que las proteínas con dominios BAR, cuya unión a membranas depende de interacciones

INTRODUCCIÓN

electrostáticas, se produzca preferentemente en regiones de la membrana plasmática y compartimentos endosomales. Reforzando esta hipótesis, al ser sobreexpresados, todos los dominios BAR se asocian a compartimentos endosomales o de membrana plasmática, mientras que ninguno se localiza en el RE (Peter et al., 2004). Esta diferencia resulta especialmente significativa debido a que el diámetro de los túbulos de RE (50 nm) encajaría perfectamente con la superficie cóncava de los dominios BAR (Shibata et al., 2009). Probablemente, el hecho de que no se produzca esta asociación, se deba a las características electrostáticas de las membranas citosólicas de RE (con baja carga negativa) (Fairn et al., 2011; Kay et al., 2012).

En resumen, a lo largo de la vía secretora se produce un gradiente respecto al nivel de empaquetamiento de los lípidos (ER < membrana plasmática) y su carga eléctrica negativa (ER < membrana plasmática). Por una parte, estas diferencias determinan la plasticidad de las membranas, entendida como capacidad para adoptar estructuras con un requerimiento alto de curvatura (por ejemplo vesículas o túbulos). Por otra parte, resultan importantes en el reclutamiento de proteínas citosólicas que actúan sinérgicamente con los lípidos en la deformación de las membranas (proteínas con dominios LPS o BAR).

(IV) EL DIACILGLICEROL EN LA VÍA SECRETORA

1. Características generales de las moléculas de diacilglicerol

El DAG es un lípido neutro constituido por una cabeza polar muy pequeña, únicamente un grupo –OH del glicerol. A este glicerol se le unen dos ácidos grasos de 14 o más carbonos en las posiciones sn-1 y sn-2 de la cadena del glicerol. El ácido graso esterificado de la posición sn-1 generalmente es saturado (sin ningún doble enlace), mientras que el de la posición sn-2 es insaturado ya que presenta uno o varios (cis) dobles enlaces (mono- o poliinsaturado). Esto comporta un plegamiento de la cadena acil que disminuye el empaquetamiento. Los ácidos grasos saturados presentes en las membranas celulares son el ácido palmítico (16:0), el ácido esteárico (18:0) y el ácido araquídico (20:0); los ácidos grasos monoinsaturados son el ácido oléico (18:1) y el ácido erúcido (22:1); y los ácidos grasos npoliinsaturados son el ácido linoleico (18:2), el ácido linolenico (18:3) y el ácido araquidónico (20:4) (**figura 15**).

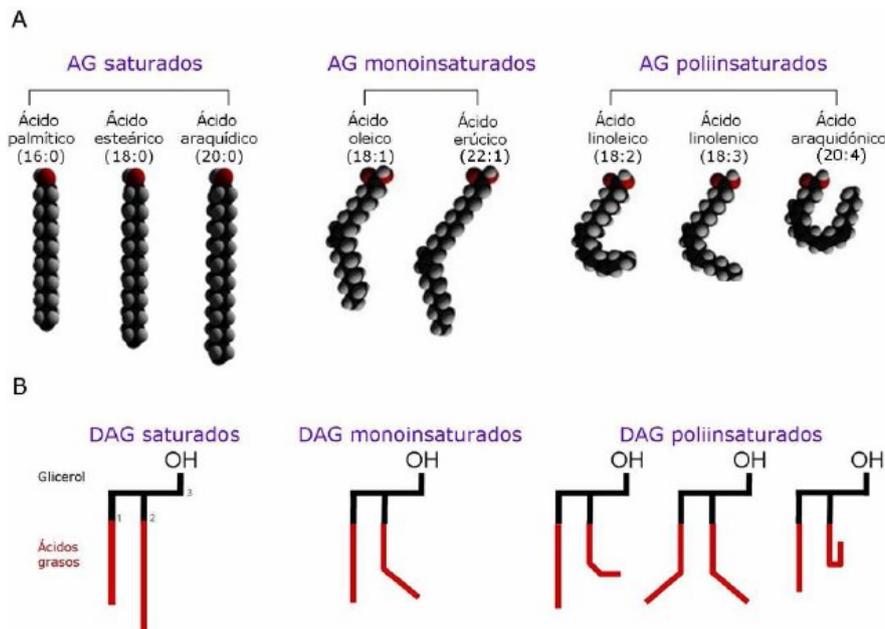


Figura 15. Tipos de AGs y DAGs en las membranas celulares. A. Tipos de ácidos grasos (AGs). La nomenclatura de los AG se indica poniendo primero el número de carbonos que forman la cadena y después el número de insaturaciones que presenta. Por ejemplo, en el caso del ácido palmítico (16:0) tiene 16 carbonos y ninguna insaturación. Los AGs más abundantes en las células son el 16:0, 18:0, 18:1 y el 18:2). B. Tipos de DAGs. Los DAG se forman por combinación de dos de los AG mostrados en el panel A. En rojo se muestra la morfología de los AG que es importante para la topología final de las membranas.

Esquema modificado de (Fernández-Ulibarri, 2008)

INTRODUCCIÓN

Se han identificado más de 50 especies diferentes de DAG en base a la longitud del ácido graso y al grado de saturación, y existen evidencias de la diferente participación de estas especies moleculares en diferentes procesos celulares (Deacon et al., 2002; Pettitt et al., 1997). Hecha esta introducción inicial, en los siguientes puntos abordaremos la importancia de las vías metabólicas implicadas en la síntesis de DAG en las etapas de la vía secretora.

2. Vías de síntesis del diacilglicerol en el Golgi.

Existen cuatro mecanismos para producir DAG en el Golgi: 1) el DAG puede formarse por una acción secuencial de la PLD (que formaría PA a partir de PC) y de las PAP2 (que defosforilarían el PA para formar DAG) (Long et al., 2005; Roberts et al., 1998a; Waggoner et al., 1996). 2) La PI-PLC (Rhee, 2001) hidroliza el PI4P o el PI(4,5)P₂ para generar DAG (Carrasco y Merida, 2004) y 3) La esfingomielina sintasa (SMS) transfiere la colina y el fosfato de la PC a la Cer para generar SM y DAG (Ichikawa y Hirabayashi, 1998) (**figura 16**).

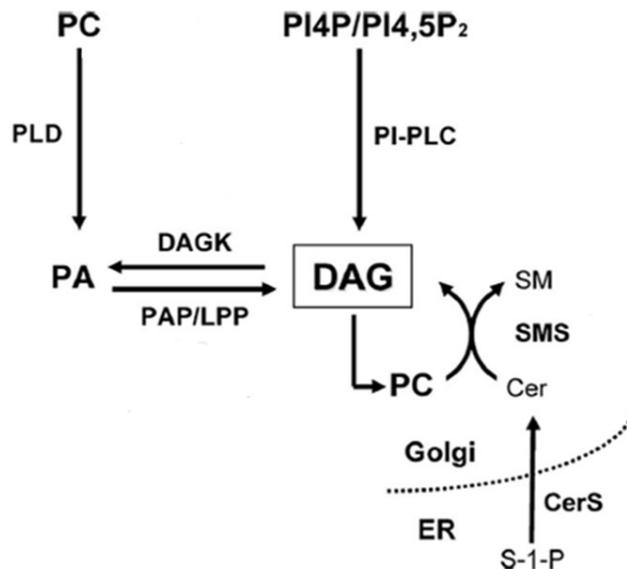


Figura 16. Esquema de las diferentes vías de síntesis y degradación del DAG en el Golgi.

Esquema modificado de (Fernández-Ulibarri et al, 2006)

INTRODUCCIÓN

2.1 Papel de la fosfolipasa D y las fosfatasas del ácido fosfatídico en el Golgi.

En relación al papel de la PLD en la formación de intermediarios de transporte desde el Golgi, se ha publicado que la síntesis de PA a partir de la hidrólisis de PC por la PLD2, actuaría sinérgicamente junto con las proteínas endofilina y BARS en el proceso final de fisión de las vesículas COPI (Yang et al., 2005; Yang et al., 2006). En el mismo estudio demuestran que el silenciamiento de PLD2, causa la acumulación de perfiles vesiculares exhibiendo una fisión incompleta de las membranas de Golgi. Este efecto morfológico se correlaciona con una afectación del transporte retrógrado hacia el RE dependiente de COPI (Yang et al., 2008). Una cuestión objeto de controversia es si el PA producido a partir de la acción de PLD sería en sí mismo un efector del proceso de fisión, o si bien sería necesario como intermediario en la producción de otras especies moleculares como el DAG. En relación a este punto, se ha publicado que la inhibición por propanolol de las proteínas de la familia de las fosfatasas del ácido fosfatídico (PAP2), también conocidas como fosfatasas de fosfolípidos (LPPs), causa una inhibición en el proceso de fisión de las vesículas COPI (Fernandez-Ulibarri et al., 2007) (**figura 17**) (estos resultados se explicarán con mayor profundidad en el apartado de **Antecedentes y Objetivos**).

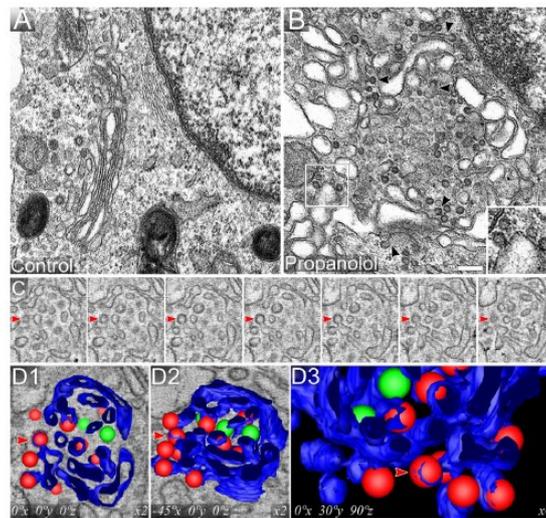


Figura 17. Imagen de microscopía electrónica que muestra los efectos del propanolol sobre la organización estructural del Golgi. En el panel B podemos ver cómo el propanolol induce una desestructuración de la morfología de cisternas aplanadas del Golgi, y especialmente un incremento del número de perfiles vesiculares próximos al Golgi (magnificaciones del panel C). En los paneles inferiores (D1-D3) podemos observar por tomografía que estas vesículas están estrechamente asociadas a las cisternas del Golgi, evidenciando un proceso de fisión incompleto.

Imagen extraída de (Fernández-Ulibarri et al, 2007)

INTRODUCCIÓN

En un estudio posterior, utilizando una concentración de propanolol superior que inhibiría tanto a las proteínas de la familia de las PAP2, como a las proteínas de la familia PAP1, los autores observan una inhibición en el proceso de gemación de vesículas COPI desde las membranas de Golgi, indicando que la generación de DAG a partir de PA puede ser necesaria en las fases iniciales de formación del COPI (es decir, durante el proceso de generación de curvatura positiva) (**figura 18**).

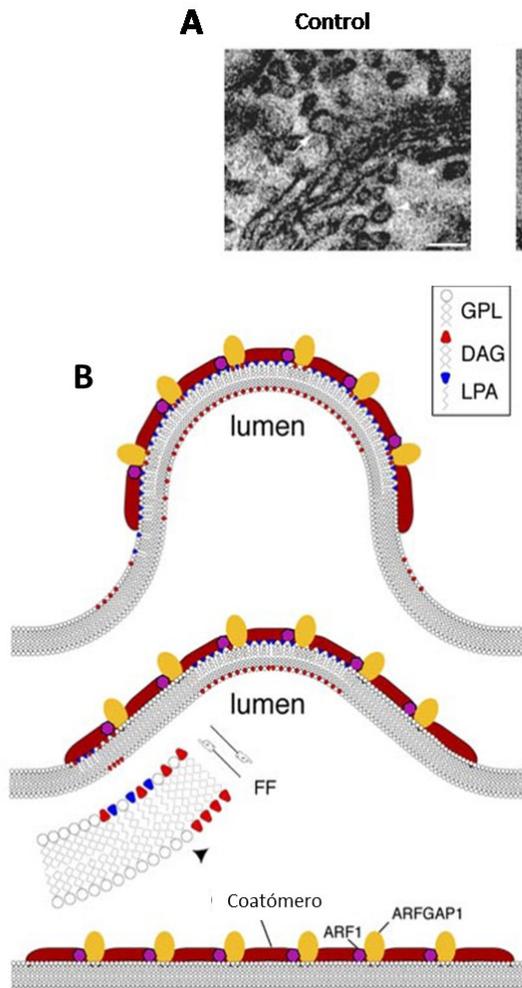


Figura 18. A) Imagen de microscopía electrónica que muestra los efectos sobre la morfología del Golgi de tratar por un corto tiempo las células con propanolol a una concentración que inhibe tanto a las proteínas PAP1 como a las PAP2. Destaca la morfología plana de las cisternas y la ausencia de perfiles vesiculares. También se muestra cómo al retirar el propanolol del medio se produce una vesiculación masiva de las cisternas. B) En el esquema propuesto una acumulación inicial de DAG en la cara luminal de las membranas actuaría sinérgicamente con el LPA para producir curvatura positiva de la hemimembrana citosólica.

Imagen adaptada de (Asp et al, 2007)

Más recientemente se ha publicado un estudio en el cual relacionan actividades opuestas de las enzimas acetil transferasas de lisofosfolípidos (LPAAT) y fosfolipasa A (PLA) en la regulación de la morfología de los intermediarios de transporte formados en el Golgi (Yang et al., 2011). Los autores de dicho estudio proponen que las enzimas LPAATy, y PLD2, actuarían promoviendo el proceso de fisión de las vesículas COPI a través de convertir el ácido lisofosfatídico (LPA) (LPAATy) y la PC (PLD2) en PA. Por otra parte, la PLA actuaría promoviendo la elongación de las vesículas nacientes a partir

INTRODUCCIÓN

de la reacción inversa, es decir originando LPA a partir de PA. Este incremento de LPA, por tanto, favorecería un retraso en el proceso de fisión del COPI, originando túbulos en lugar de vesículas (**figura 19**).

En el mismo estudio proponen que la morfología de los intermediarios de transporte (túbulos o vesículas) puede ser importante para determinar el cargo que incorporan. Según los autores, en las vesículas los componentes del coatómero presentarían una mayor densidad, lo que permitiría una incorporación selectiva de cargo con destino retrógrado, excluyendo el cargo anterógrado. Por otra parte en los túbulos el coatómero se encontraría exclusivamente en la base y la punta, y esta menor densidad permitiría la incorporación de cargo con destino anterógrado. Es decir, que a través de la regulación de los niveles de LPA y PA, se producirían vesículas o túbulos, que incorporarían cargo dirigido hacia el RE (vesículas) o hacia el TGN (túbulos).

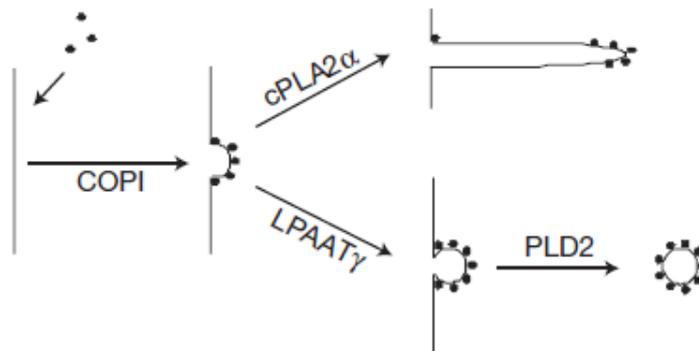


Figura 19. Esquema que muestra los roles opuestos de PLA2 (formación de túbulos) y de LPAAT y PLD2 (formación de vesículas) en la formación de intermediarios de transporte tipo COPI a nivel del Golgi.

Imagen extraída de (Yang et al, 2011)

2.2 Papel de las esfingomielinas sintetasas en el Golgi

Otra de las vías de síntesis de DAG que tiene especial relevancia en la regulación de la morfología del Golgi y en la formación de intermediarios de transporte desde este compartimento, es la que implica a las enzimas de la familia de la esfingomielinas sintetasas (SMS). Se han descrito dos isoenzimas con actividad esfingomielina sintetasa en el Golgi, las SMS1 y 2, y ambas producen DAG y SM a partir de PC y Cer. Al tratar las células con ceramidas de cadena corta, se produce un incremento de DAG en el Golgi en un proceso dependiente de SMS1 y SMS2 (Duran et al., 2012; Villani et al.,

INTRODUCCIÓN

2008). Por otra parte el silenciamiento de SMS1 y 2 disminuye la asociación de PKD en el Golgi y retrasa el transporte de cargo del Golgi a membrana plasmática (Subathra et al., 2011). Más recientemente se ha publicado que si bien la adición de ceramidas de cadena corta incrementa los niveles de DAG y SM en el Golgi, esto conlleva un impedimento en la formación de intermediarios de transporte desde el Golgi sin afectar a la llegada de cargo (Duran et al., 2012). En el mismo artículo demuestran que *in vitro*, la incorporación a vesículas unilamelares de moléculas de SM de cadena corta impide la formación de dominios ordenados de membrana. En base a estos resultados, los autores concluyen que la formación de dominios ordenados de membrana enriquecidos en colesterol y SM de cadena larga es necesaria para la correcta formación de intermediarios de transporte desde el Golgi (**figura 20**).

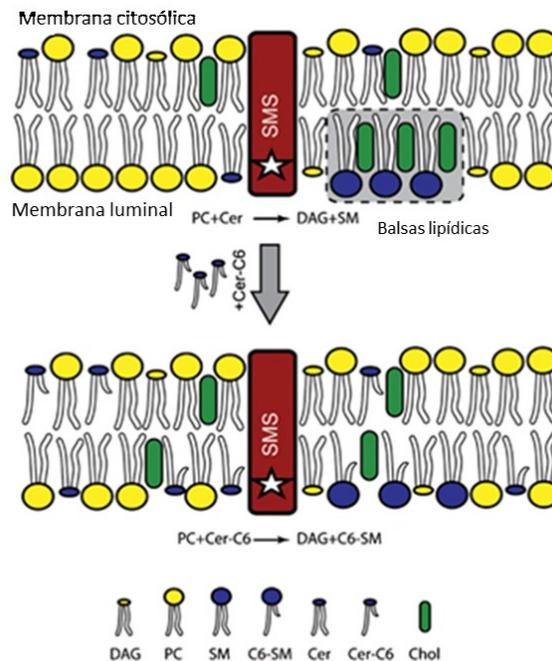


Figura 20. Esquema de la función de las enzimas esfingomielina sintetasas (SMS) en el Golgi. La esfingomielina (SM) producida a partir de ceramida (Cer) y fosfatidilcolina (PC) por las SMS, juntamente con moléculas de colesterol, forman balsas lipídicas en el TGN. Sin embargo, al añadir como sustrato de las SMS ceramidas de cadena corta (Cer-C6), las moléculas resultantes de esfingomielina no permitirían la estructuración de estos dominios de membrana ordenados, alterando la salida de cargo desde el Golgi.

Esquema adaptado de (Duran et al. 2012)

2.3 Papel de la proteína cinasa C en el Golgi.

La formación de DAG también resulta importante debido a que actúa activando a algunos miembros de la familia de proteínas con actividad treonina cinasa PKC (proteína cinasa C). Existen once miembros descritos de esta familia, que se clasifican en tres grupos en función de los cofactores que requieren para su activación: 1) Las PKCs clásicas (α , β , γ) requieren DAG y calcio. Los miembros de esta clase tienen un dominio C1 de unión a DAG y un dominio C2 de unión fosfolípidos dependiente de calcio. 2) las PKCs noveles (δ , ϵ , η y θ), requieren DAG pero no calcio, y al igual que las PKCs clásicas tienen un dominio C1 y un dominio C2 (que en los miembros de esta clase no une calcio). 3) Por último las PKCs atípicas (ι y ζ) no requieren ni de DAG ni de calcio para su activación, y no poseen los dominios C1 y C2.

La mayor información disponible sobre la función de PKC en el Golgi está relacionada con la salida de cargo desde el TGN a la membrana. En particular, se ha descrito que la PKC μ (también llamada PKD) juega un papel importante en este proceso. La inactivación de PKD por agentes químicos, la expresión de un mutante catalíticamente inactivo, o el silenciamiento de PKD, inhiben la salida de cargo del TGN con destino a la membrana basolateral. En estas condiciones el cargo permanece atrapado en estructuras tubulares (Bossard et al., 2007; Liljedahl et al., 2001). De forma contraria, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de PKD causa la vesiculación del Golgi (Bossard et al., 2007). El conjunto de estos resultados es indicativo de que la PKD participa en el proceso de fisión de intermediarios de transporte desde el TGN.

Existen tres isoformas de PKD en mamíferos (PKD1-3), y todas ellas están implicadas en el transporte de proteínas con destino a la membrana basolateral (Yeaman et al., 2004). Estas proteínas forman homo- y heterodímeros y la inactivación o el silenciamiento por siRNAs de cualquiera de los componentes del complejo inhibe la salida de cargo desde el TGN (Bossard et al., 2007).

Desde un punto de vista mecanístico, actualmente se considera que la PKD inicia una cascada de procesos moleculares implicados en la formación y fisión de intermediarios de transporte. PKD se recluta en el TGN a través de su dominio C1a de unión a DAG (Baron and Malhotra, 2002), mientras que a través del dominio C1b interacciona con Arf1 (Pusapati et al., 2010). Una vez en el Golgi, se ha publicado que otro miembro de la

INTRODUCCIÓN

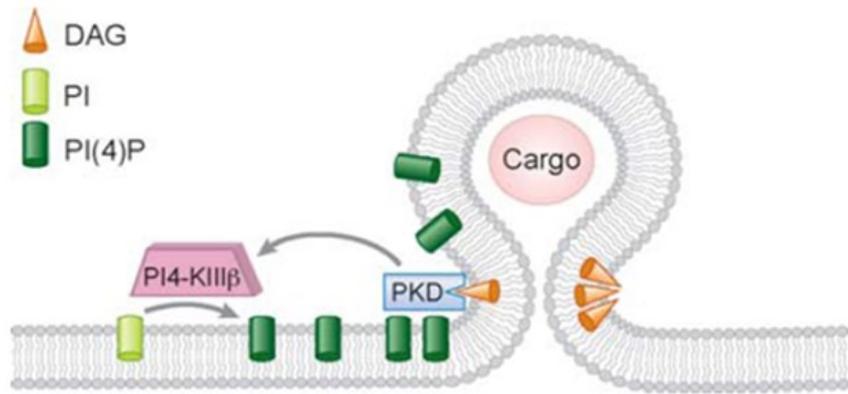


Figura 21. Esquema de la acción de PKD en la formación de vesículas en el TGN. La PKD se recluta al Golgi por interacción de su dominio C1 con DAG. Una vez en membrana puede activar a la enzima PI4-KIIIβ, que formaría PI4P, necesario para el reclutamiento de diferentes proteínas implicadas en la generación de intermediarios de transporte (ver texto). En este esquema, la proteína Nir2 inhibiría la síntesis de PC a partir de la vía de la CDP-colina, lo que incrementaría los niveles de DAG. Este incremento de DAG por una parte favorecería el reclutamiento de PKD, y por otra parte, ayudaría a formar curvatura negativa en el cuello de la vesícula.

Esquema adaptado de (Bard y Malhotra, 2006)

familia de las PKCs, la PKC η , podría fosforilar y activar a PKD (Diaz Anel and Malhotra, 2005). A su vez, PKD activa a la encima PI4KIIIβ que genera PI4P, necesario para el transporte hacia la membrana plasmática en levaduras (Walch-Solimena and Novick, 1999) y mamíferos (Hausser et al., 2005). La formación de PI4P permite la unión a TGN de otras proteínas como OSBP, CERT y FAPP2 (Godi et al., 2004; Levine y Munro, 1998; Levine y Munro, 2002; Nishikawa et al., 1998) implicadas en la transferencia de lípidos entre el RE y el Golgi. A modo de ejemplo, la proteína CERT actúa transfiriendo ceramida del RE al Golgi, que es utilizada como sustrato por las esfingomielinas sintetasas (SMS) en la formación de esfingomielina (SM) y DAG (Hanada et al., 2009). Por otra parte, la unión de PKD a Arf incrementaría la activación de PLD, promoviendo la formación de PA y su consiguiente transformación a LPA por la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) (San et al., 2009). El resultado de este conjunto de procesos metabólicos sería el enriquecimiento de las membranas del TGN en lípidos con capacidad de inducir curvatura positiva (LPA) y negativa (DAG y PA), y por tanto, de generar vesículas o túbulos. Al mismo tiempo, también ayudaría a formar dominios específicos de membrana enriquecidos en SM y colesterol, importantes en la selección y distribución de cargo con destino a la membrana plasmática (Nhek et al., 2010).

3. Vías de síntesis de DAG en el transporte de RE a Golgi.

El papel de los lípidos en la formación de intermediarios de transporte de salida del RE hacia el Golgi ha sido mucho menos estudiado. Sin embargo, existen estudios que apuntan hacia una función relevante de enzimas implicadas en la síntesis y degradación del DAG, en el mantenimiento de la estructura y el transporte desde el RE.

Uno de estos estudios ha demostrado que la proteína diacilglicerol cinasa delta (DGK δ), cuya actividad catalítica produce PA a partir de la fosforilación de DAG, regula la salida de cargo del RE (Nagaya et al., 2002). La sobreexpresión de la DGK δ inhibe el transporte anterógrado de la proteína G del virus de la estomatitis (VSV-G) y causa una redistribución de proteínas residentes de Golgi y de compartimento intermedio al RE, imitando el efecto de la brefeldina A. Curiosamente, en el mismo estudio los autores demuestran que la sobreexpresión de un mutante catalíticamente inactivo de DAGK causa el mismo efecto que la forma silvestre, indicando que o bien la actividad catalítica de DAGK no está implicada en los efectos observados sobre la salida de cargo de RE a Golgi, o bien es necesario que exista un estrecho equilibrio entre los niveles de PA y DAG para un correcto transporte anterógrado. En este caso, tanto la sobre activación de la vía de síntesis de PA a partir de DAG, como su inhibición por la sobreexpresión de un dominante negativo catalíticamente inactivo, conducirían a un bloqueo de la formación de intermediarios de transporte desde el RE.

En otro estudio los autores demuestran que Sar1 activa a la PLD y que esta activación es necesaria para el reclutamiento de los complejos del COPII sec23/sec24 y sec13/31, así como para la formación de túbulos desde los sitios de salida del RE (ERES) (Pathre et al., 2003). Más recientemente se ha publicado que la activación de Sar1 conduce a un incremento en la formación de P³²-[PA] proveniente de alguna enzima diacilglicerol cinasa de RE (Blumental-Perry et al., 2006). De forma global, el conjunto de estos resultados indican que un correcto mantenimiento de la homeostasis lipídica, y más concretamente de un equilibrio entre los niveles de PA y DAG, puede resultar esencial para la formación del COPII y el transporte anterógrado de RE a Golgi.

INTRODUCCIÓN

(V) LA VÍA ENDOCÍTICA

La endocitosis es el proceso a través del cual las células transportan proteínas y lípidos de la membrana plasmática o del medio extracelular hacia compartimentos intracelulares. Desde su internalización, el cargo incorporado en vesículas de endocitosis puede seguir diferentes rutas: seguir la vía de degradación hacia endosomas tardíos y lisosomas, ser enviado al Golgi y desde aquí al RE, o ser reciclado de vuelta a la membrana plasmática. El conjunto de estos mecanismos permite aportar nutrientes a la célula, redistribuir proteínas de la membrana plasmática hacia otros compartimentos, o modular la señalización asociada a la activación de determinados receptores de membrana. Existen diferentes tipos de endocitosis dependiendo de las características del cargo internalizado y de los mecanismos moleculares que participan en cada proceso. Por un lado tenemos procesos como la fagocitosis y la macropinocitosis, caracterizados por mediar la entrada de partículas de gran tamaño hacia el interior de la célula. Por otra parte, llamamos pinocitosis al proceso por el cual el cargo se endocita a través de vesículas de tamaño reducido. Entre los procesos de pinocitosis principalmente podemos establecer dos categorías, la endocitosis dependiente de clatrina y la endocitosis independiente de clatrina (principalmente endocitosis dependiente de caveolina y dependiente de Arf6) (esquema de los diferentes procesos de endocitosis en la **figura 22**). En el siguiente apartado nos centraremos en exponer los mecanismos moleculares que caracterizan la endocitosis dependiente de clatrina.

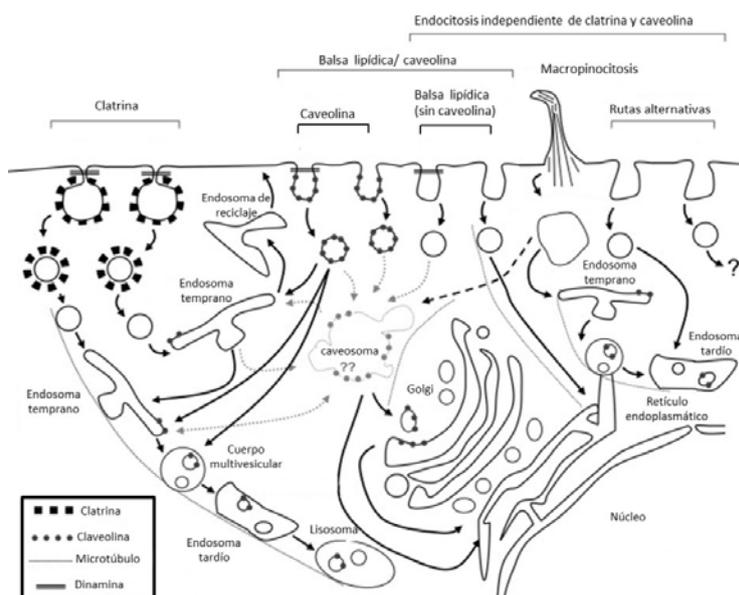


Figura 22. Esquema en el que se muestran las diferentes vías de internalización de cargo, así como las rutas que puede seguir el cargo endocitado a nivel intracelular.

INTRODUCCIÓN

1. Mecanismos moleculares de la endocitosis dependiente de clatrina.

A pesar de que la cubierta de clatrina se puede encontrar en diferentes compartimentos intracelulares, al utilizar el término endocitosis dependiente de clatrina, nos referimos de forma exclusiva al proceso por el cual se internaliza cargo desde la membrana plasmática. Esta vía de entrada la utilizan una gran variedad de cargos y se encuentra presente en todos los tipos de células eucariotas.

El proceso de formación de las vesículas de clatrina se puede dividir en cinco fases: 1) la fase de inicio, 2) la fase de selección de cargo, 3) ensamblaje de la cubierta de clatrina, 4) fisión y 5) desensamblaje de la cubierta (**figura 23**). La cubierta de clatrina está constituida por un trímero de heterodímeros, en el cual cada unidad está formada por una cadena pesada y una ligera formando una estructura denominada *triskelion* (Kirchhausen et al, 2000). De forma aproximada, la endocitosis de vesículas sinápticas requiere de unos 100 *triskelias*. El reclutamiento de la clatrina a las vesículas en formación no se produce de forma directa, sino que depende de su interacción con proteínas adaptadoras y proteínas accesorias. Al igual que sucede con la clatrina, el conjunto de estas proteínas adaptadoras y accesorias se encuentra en el citosol, desde donde se reclutan en la membrana durante el inicio de la formación de las vesículas.

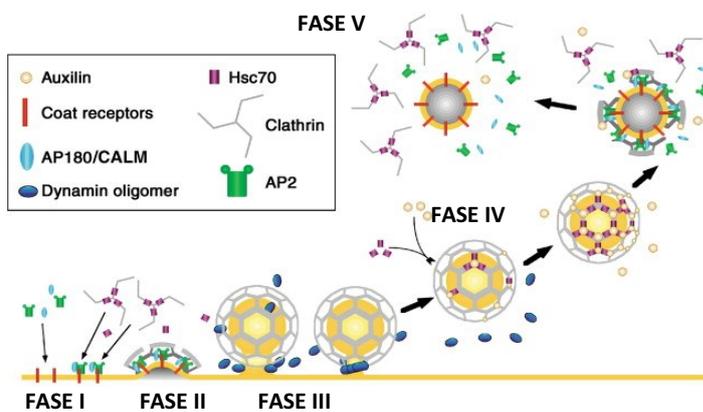


Figura 23. Esquema de las diferentes etapas de formación de las vesículas de clatrina indicando las principales proteínas que intervienen: Fase I (nucleación), Fase II (selección de cargo), Fase III (ensamblaje de la cubierta de clatrina), Fase IV (fisión) y Fase V (desensamblaje de la cubierta).

Esquema modificado de (Cremona et al., 2001).

En el caso de algunos cargos, su endocitosis por clatrina se produce de forma constitutiva (por ejemplo el receptor de transferrina), mientras que en otros casos, su endocitosis se encuentra regulada por un mecanismo de unión a ligando (por ejemplo el receptor de EGF, EGFR) (Hopkins et al, 1985). Una vez el cargo se ha internalizado, éste se distribuye a diferentes compartimentos endosomales desde donde es enviado de nuevo a la membrana, al Golgi, o bien sigue la vía de degradación hacia los lisosomas.

2. El diacilglicerol en la vía endocítica

2.1. Papel de la fosfolipasa C en la endocitosis

En la membrana plasmática, una de las vías de síntesis de DAG tiene lugar por la acción de las enzimas de la familia de las fosfolipasas C (PLC). La PLC hidroliza el PI(4,5)P₂ o el PI4P para producir inositol-3-fosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG).

A pesar del papel ampliamente estudiado de la PLC y de la producción de DAG e IP₃ en la activación de mecanismos de señalización intracelular, mucho menos estudiada ha sido su función en la endocitosis dependiente de clatrina. En este sentido, se ha publicado un artículo en que relacionan la actividad de la enzima de *Trypanosoma brucei* GPI-PLC (PLC específica de glicosilfosfatidilinositol) con la endocitosis de transferrina (Subramanya et al., 2009). En el citado artículo demuestran que la sobreexpresión de la GPI-PLC o la adición de análogos de DAG estimulan la endocitosis de transferrina, vinculando la actividad catalítica de GPI-PLC y la síntesis de DAG con un incremento de la endocitosis constitutiva dependiente de clatrina. En la misma línea, en otro artículo más reciente demuestran que en diferentes especies de tripanosomátidos, existen varias proteínas con actividad tirosina-cinasa (PTKs) que presentan dominios con analogía al dominio C1 de unión a DAG (dominios C1_5). También demuestran que en *Leishmania major*, la estimulación de la endocitosis de transferrina al añadir análogos de DAG, no se produce en presencia de inhibidores de PTKs. A partir de estos resultados, los autores proponen que el DAG podría regular la endocitosis de transferrina a través de la activación de proteínas con actividad tirosina cinasa y dominios C1_5 de unión a DAG (Subramanya y Mensa-Wilmot, 2010).

También se ha publicado que en mamíferos la PLC γ actúa como una GEF de dinamina, y que la sobreexpresión de PLC γ incrementa la endocitosis del EGFR. De acuerdo con los autores de este estudio, la actividad GEF de PLC γ dependería de su unión a dinamina a través de su dominio SH3. También demuestran que células sobreexpresando la PLC γ presentan una mayor activación de la vía de ERK tras estimulación con factores de crecimiento, mientras que el silenciamiento de PLC γ produce el efecto contrario (Choi et al., 2004). A diferencia del estudio anterior, este estudio supone un ejemplo de mecanismo de acción de la PLC en la regulación de la endocitosis por clatrina de manera independiente de su actividad catalítica.

2.2. Papel de la fosfolipasa D y de las fosfatasa del ácido fosfatídico en la endocitosis

Otra vía de síntesis del DAG es la que implica a la fosfolipasa D (PLD), juntamente con proteínas de la familia de las fosfatasa del ácido fosfatídico tipo 2 (PAP2), también conocidas como fosfatasa de fosfolípidos (LPPs). La PLD hidroliza la PC para producir PA, y las enzimas de la familia de las PAP2 hidrolizan el PA para producir DAG. En relación a la PLD y su papel en endocitosis, se ha publicado un trabajo en el cual demuestran que la estimulación de la endocitosis de los receptores μ y δ opioides promovida por la activación de la PLD2, es de hecho un proceso dependiente de la conversión del PA generado por la PLD2 a DAG. Esta conversión estaría mediada por la acción de las proteínas LPP1 y LPP2 (Yang et al., 2010).

Tanto el tratamiento con propanolol, como el silenciamiento de la LPP1 y la LPP2 conllevan una reducción significativa de la endocitosis de los receptores opioides tras estimulación agonista. En el mismo estudio demuestran que la adición de 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol (DOG), un análogo de DAG que penetra en el interior de la célula, es capaz de revertir la inhibición de la endocitosis causada por el propanolol y el silenciamiento de las LPPs. (Yang et al., 2010).

En un trabajo anterior demuestran que la sobreexpresión de la PLD1 y 2 conlleva un incremento en la internalización del receptor de EGF (EGFR) así como una aceleración de su degradación. Por otra parte la sobreexpresión de formas catalíticamente inactivas de ambas PLD, o el tratamiento con alcoholes primarios, causa una inhibición de la degradación del receptor de EGF (Shen et al., 2001).

Un nuevo grado de complejidad en el estudio del papel de la PLD en los procesos de endocitosis, viene derivado de la demostración de que los dominios PX de la PLD1 y 2 actúan como GTPasas de dinamina, desvinculando la actividad catalítica de la PLD de su función en la internalización del EGFR (Lee et al., 2006), y dejando abierta la posibilidad de que la PLD pueda jugar diferentes papeles (dependientes o no de la producción de PA y DAG) en diferentes etapas de la vía endocítica (por ejemplo en la membrana plasmática y en los compartimentos endosomales).

Referente a las rutas de reciclaje, se ha publicado que el silenciamiento de la PLD2 pero no de la PLD1 inhibe el reciclaje de la transferrina aunque no su internalización. Basándose en estos datos los autores proponen que la PLD2 sería responsable de la

INTRODUCCIÓN

producción de PA en células de forma constitutiva, y que la formación de PA sería necesaria para el correcto reciclaje de la transferrina, no así para su internalización (Padron et al., 2006).

El reciclaje de moléculas endocitadas por vía independiente de clatrina y dependiente de Arf6, como es el caso del MHCI, también ha sido abordado desde la perspectiva de la implicación de la PLD y la formación de PA y DAG. En un estudio demuestran que el tratamiento con 1-butanol inhibe el reciclaje del MHCI a membrana plasmática, dando lugar a un compartimento endosomal extensamente tubulado (Jovanovic et al., 2006). En el mismo artículo demuestran que la sobreexpresión de un mutante de Arf6 incapaz de activar la PLD, produciría un fenotipo similar al observado con el tratamiento con alcoholes primarios, indicando que sería una inhibición de la producción de PA la causa del bloqueo en el reciclaje del MHCI. Finalmente observan que el tratamiento con propanolol (en este caso utilizado como un mecanismo para incrementar los niveles de PA) revierte el fenotipo de endosomas tubulados, sin embargo no revierte la inhibición del reciclaje del MHCI, indicando que el DAG podría estar implicado en la fusión de dichas vesículas a la membrana plasmática.

2.3. Papel de la proteína cinasa C en la endocitosis

A nivel de la vía endocítica, diferentes miembros de la familia de las PKCs cumplen funciones relevantes. Un papel esencial en el que han sido implicadas es la regulación de la señalización y degradación de diferentes receptores de membrana. A modo de ejemplo, se ha descrito que la activación de PKC por calcio y PMA actúa fosforilando el EGFR en la treonina 654 (Morrison et al., 1993), lo que reduce la actividad tirosina cinasa del receptor (Lund et al., 1990), al tiempo que determina su tráfico intracelular. En referencia a esto último, se ha propuesto que la fosforilación en Thr654 favorece que el EGFR se dirija hacia el compartimento de reciclaje, en lugar de hacia la vía de degradación lisosomal (Bao et al., 2000).

En otro estudio más reciente, se ha demostrado que la activación de PKC δ inhibe la degradación del EGFR al bloquear su transporte desde los endosomas tempranos. Este bloqueo del transporte ocurriría por la formación de una cubierta de F-actina en asociación a la membrana endosomal, en un mecanismo dependiente de la activación de PKC y regulado por calmodulina (Llado et al., 2008).

INTRODUCCIÓN

A parte de regular la internalización de receptores de membrana, las PKCs también se han relacionado con la endocitosis de proteínas transportadoras y canales de la membrana plasmática. A modo de ejemplo tenemos el transportador de dopamina (DAT), cuya redistribución de la membrana plasmática al compartimento endosomal se produce por una activación aguda de PKC (Blakely y Bauman, 2000; Loder y Melikian, 2003; Zahniser y Doolen, 2001). En otro estudio se ha publicado que la activación de PKC también regularía la ubiquitinación de DAT, lo que aceleraría su transporte hacia la vía de degradación lisosomal (Miranda et al., 2005). Esta ubiquitinación también resultaría importante para la interacción de DAT con proteínas adaptadoras de las vesículas de clatrina (Sorkina et al., 2006).

Por último, estudios más recientes han demostrado que la activación de ciertas formas de PKC también puede controlar la distribución de algunas proteínas de membrana. En este sentido, se ha demostrado que el tratamiento prolongado con ésteres de forbol (30-60min), produce la translocación de las isoformas PKC α y PKC β II a un compartimento de membrana perinuclear distinto del complejo de Golgi (Becker y Hannun, 2003) y próximo al centrosoma, conocido como pericentron (Becker y Hannun, 2003; Becker y Hannun, 2004; Idkowiak-Baldys et al., 2006). Actualmente se considera que este compartimento es el resultado de una relocalización de lípidos y componentes de la membrana plasmática (por ejemplo CD59, caveolina o el receptor GM1) al compartimento de endosomas de reciclaje (Idkowiak-Baldys et al., 2006). A nivel funcional, la activación prolongada de PKC α y PKC β II y la consiguiente formación del pericentron produce una inhibición del reciclaje de la transferrina hacia la membrana plasmática (Becker y Hannun, 2003).

(VI) LAS FOSFATASAS DE FOSFOLÍPIDOS (LPPs)

1. Clasificación, estructura y localización.

La familia de las fosfatasas del ácido fosfatídico tipo 2 (PAP2), también llamadas fosfatasas de fosfolípidos (LPPs), está constituida por 3 miembros: LPP1 (también llamada PAP2A), LPP2 (PAP2C) y LPP3 (PAP2B). A nivel estructural, las proteínas de esta familia tienen aproximadamente un peso molecular de 35 kDa, contienen seis dominios transmembrana con estructura de hélice alfa, y sus extremos carboxi- y amino-terminal se orientan, al igual que el dominio catalítico, hacia la membrana luminal (en compartimentos intracelulares) o el medio extracelular (en la membrana plasmática). En los *loops* que conectan los segmentos transmembrana 3-4 y 5-6 (ambos orientados hacia la región luminal) se encuentran tres dominios conservados que resultan importantes para la actividad catalítica de estas enzimas (Barila et al., 1996; Hooks et al., 1998; Kai et al., 1996; Leung et al., 1998; Roberts et al., 1998b; Zhao et al., 2005). Adicionalmente, todos los miembros de esta familia son N-glicosilados en el segundo *loop* luminal (esquema de la estructura las LPPs en la **figura 24**). A pesar de esto, en relación a sus modificaciones post-traduccionales, existen diferencias significativas entre las tres isoenzimas, e incluso, entre un mismo miembro de la familia expresado en diferentes tipos celulares (Barila et al., 1996; Kai et al., 1997; Sciorra y Morris, 1999).

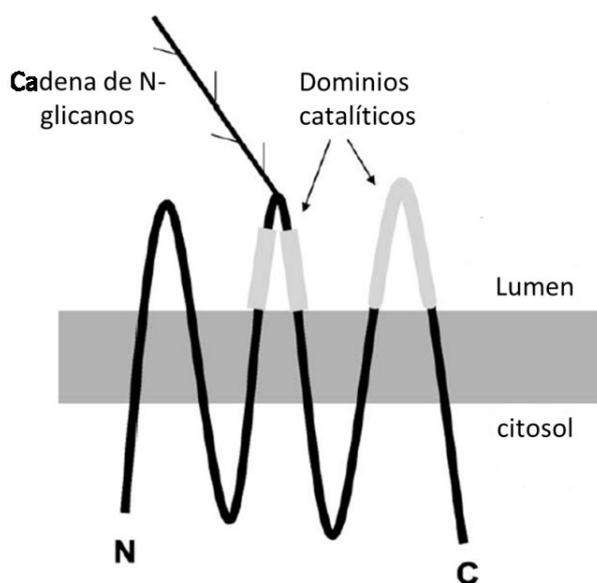


Figura 24. Estructura de las proteínas de la familia de las fosfatasas de fosfolípidos (LPPs). Las tres isoenzimas (LPP1, LPP2 y LPP3), presentan 6 dominios transmembrana con el sitio catalítico en la región luminal o extracelular. Estas proteínas también se N-glicosilan en regiones conservadas del tercero de los loops que conectan los segmentos transmembrana.

Esquema adaptado de (Sciorra y Morris, 2002)

INTRODUCCIÓN

En referencia a su localización, la falta de buenos anticuerpos contra las diferentes isoformas de esta familia (con la excepción de LPP3), ha hecho que la mayor parte de la información que tenemos al respecto provenga de su sobreexpresión en diversas líneas celulares. La proteína LPP1 unida a GFP se localiza de forma exclusiva en la membrana plasmática de fibroblastos (Jasinska et al., 1999). En células HEK293T tanto la LPP2 como la LPP3 al ser sobreexpresadas se localizan en una región perinuclear y en la membrana plasmática. Por otra parte, en fibroblastos de rata se ha descrito que la LPP2 colocaliza con el marcador de endosomas tempranos EEA-1 (Morris et al., 2006), mientras que en células COS-7, la LPP3 colocaliza mayoritariamente con el marcador de RE BiP (Sciorra y Morris, 2002). Respecto a la localización de la proteína endógena, se ha descrito que en células CHO tanto la LPP2 como la LPP3 se encuentran en estructuras puntiformes citoplasmáticas, sin embargo, mientras la estimulación con ésteres de forbol (PMA) induce una redistribución del marcaje de LPP3 hacia un compartimento perinuclear, no afecta a la localización del marcaje de LPP2 (Long et al., 2005). Curiosamente, no sólo la localización subcelular de LPP3 puede variar en respuesta a estímulos externos, también se ha descrito que la LPP3 es la única isoenzima de la familia cuyos niveles de expresión se encuentran regulados por factores de crecimiento. En este sentido se ha publicado que en células HeLa una estimulación prolongada con EGF, incrementa significativamente (más de tres veces) los niveles de expresión de LPP3 (Kai et al., 1997).

En otro estudio, se ha descrito que en fibroblastos de ratón (células swiss3T3), la LPP3 endógena se encuentra en la membrana plasmática y en una región perinuclear (Sciorra y Morris, 1999). En el mismo artículo, demuestran que la LPP3 se halla enriquecida en regiones de membrana resistentes a detergentes no iónicos (balsas lipídicas). Por otra parte, mediante experimentos de pulso y caza tras marcaje con metionina radioactiva, demuestran la existencia de dos formas de LPP3 estables, una que presenta glicanos maduros y otra que corresponde a formas inmaduras (no glicosiladas) de la proteína. En referencia a esto último, es interesante que existan diferencias significativas en la proporción de las formas glicosiladas y no glicosiladas dependiendo del tipo celular. A modo de ejemplo, en COS-7 la LPP3 sobreexpresada se encuentra mayoritariamente en su forma no-glicosilada, lo cual concuerda con su distribución principalmente de RE en esta línea celular (Sciorra y Morris, 2002). Más recientemente se ha publicado que en

INTRODUCCIÓN

células endoteliales la localización de la LPP3 endógena varía en relación al grado de confluencia (Humtsoe et al., 2010). Cuando en cultivo las células alcanzan el 100% de confluencia, la LPP3 se encuentra asociada a la membrana plasmática colocalizando con p120-catenina, sin embargo, en niveles bajos de confluencia, la LPP3 se encuentra en compartimentos intracelulares. Estos resultados indican que la LPP3 presenta diferentes patrones de distribución en función del tipo celular y de factores extrínsecos, como por ejemplo el nivel de confluencia o la estimulación con ésteres de forbol. En base a esto, se ha propuesto que el transporte de LPP3 a lo largo de la vía secretora puede estar regulado por una serie de mecanismos moleculares, apuntando a la posibilidad de que la LPP3 pueda ejercer diferentes funciones dependiendo de su localización intracelular.

2. Funciones y actividad de las LPPs

Las proteínas de la familia de las LPPs muestran actividad catalítica sobre diversos fosfolípidos: el ácido fosfatídico (PA), el ácido lisofosfatídico (LPA), la ceramida-1-fosfato (C1P) y la esfingosina-1-fosfato (S1P), con diferentes afinidades (PA ~ LPA > C1P > S1P) (Long et al., 2005; Roberts et al., 1998b; Waggoner et al., 1996). Debido al papel de estos lípidos como activadores de numerosos procesos celulares, la mayor parte de estudios sobre las LPPs se han centrado en esclarecer su función en la regulación de diferentes mecanismos de señalización intracelular (Brindley y Pilquill, 2009; Pyne et al., 2009). A modo de ejemplo, el LPA y la SP1 se unen a receptores de membrana acoplados a proteínas G (Rivera y Chun, 2008; Tigyi y Parrill, 2003), desencadenando respuestas de crecimiento, proliferación, diferenciación, motilidad y supervivencia celular. El conjunto de estos mecanismos resulta esencial en procesos como la cicatrización de heridas, la angiogénesis o el crecimiento de tumores (Brindley, 2004; Mills y Moolenaar, 2003; Moolenaar, 2002; Moolenaar et al., 2004; Pyne et al., 2004).

Se ha demostrado que la sobreexpresión de LPP1 incrementa la defosforilación de PA, LPA y C1P cuando se encuentran en el medio extracelular (Jasinska et al., 1999). En el mismo estudio, los autores demuestran que la sobreexpresión de LPP1 en fibroblastos atenúa la activación en respuesta a LPA de ERK y la PLD, al tiempo que disminuye la liberación de Ca^{+2} y la división celular. La sobreexpresión de LPP3 disminuye el crecimiento, la supervivencia, y la tumorigénesis de células de cáncer de ovario, e

INTRODUCCIÓN

impide la formación de colonias a partir de células parentales (Tanyi et al., 2003a). Significativamente, el efecto de inhibición sobre la formación de colonias mediado por la sobreexpresión de LPP3, puede revertirse al añadir exógenamente un análogo de LPA resistente a la acción catalítica de las LPPs. También se ha demostrado que en la mayoría de cánceres de ovario se produce una disminución de la sobreexpresión de LPP1 (Tanyi et al., 2003b). De forma similar a los efectos descritos para LPP3, se ha demostrado que en células de cáncer de ovario la sobreexpresión de LPP1 incrementa la hidrólisis de LPA, disminuye la proliferación celular y la formación de colonias, y estimula la apoptosis de estas células. En el citado estudio, los autores proponen que el incremento de LPA que se observa en el medio extracelular en contacto con células de cáncer de ovario, se produce como resultado de una reducción de la actividad catalítica LPP y un incremento de la producción de LPA por autotaxinas (ATX).

Otro lípido sustrato de la actividad catalítica de las LPPs con especial relevancia en procesos de señalización intracelular es la esfingosina-1-fosfato (S1P). Al igual que su análogo, el LPA, actúa a través de la unión a una familia de receptores acoplados a proteínas G, produciendo su consiguiente activación. Respecto a su relevancia a nivel fisiológico, se ha publicado que la señalización por S1P regula procesos de diferenciación celular, migración y proliferación y promueve la angiogénesis (Ahn y Schroeder, 2010; Huang et al., 2009; Moriue et al., 2008).

Al estudiar los niveles de diferentes lípidos en células HEK293T sobreexpresando LPP3 y LPP2, se ha comprobado que la LPP3, pero no la LPP2, disminuye los niveles totales de S1P (Pyne et al., 2004). En la misma línea, estudios utilizando el análogo de esfingosina FTY720 (que puede ser fosforilado por la esfingosina cinasa-2 para formar FTY720-P), han demostrado que la LPP3, pero no la LPP2 ni la LPP1, puede defosforilar *in vitro* FTY720-P (Mechtcheriakova et al., 2007). Por otra parte, también se ha publicado que la actividad catalítica de LPP1 sobre la S1P extracelular estimula la internalización de esfingosina por células endoteliales de pulmón humanas (Zhao et al., 2007). Esto promueve un incremento de los niveles intracelulares de S1P a partir de la acción de la esfingosina cinasa-1 (Zhao et al., 2007), y una activación de los procesos de señalización dependientes de S1P.

Finalmente, debemos hablar de la relación entre las LPPs y la formación de DAG. Uno de los efectos de la estimulación agonista de los receptores acoplados a proteínas G o

INTRODUCCIÓN

los receptores con actividad tirosina cinasa es una estimulación de la actividad catalítica de la PLD. La PLD puede producir PA a partir de PC, y el PA puede a su vez ser defosforilado por las LPPs para producir DAG. Se ha demostrado que células MEFs *knockout* para el gen que codifica la LPP3 tienen menos DAG y un incremento de PA (Escalante-Alcalde et al., 2003). Por otra parte células HEK293T que sobreexpresan LPP2 presentan niveles superiores de DAG (Long et al., 2005), mientras que la estimulación de PLD en células HEK293T sobreexpresando LPP3, produce un incremento significativo de los niveles de DAG respecto a células transfectadas con LPP1 y no transfectadas (Sciorra y Morris, 1999). En referencia a la relación secuencial entre la estimulación de PLD y la actividad catalítica de LPP3, también resulta interesante que la LPP3 se encuentre en dominios de membrana enriquecidos en caveolina-1 y PLD2 (Sigal et al., 2005).

El conjunto de estos resultados hacen evidente el papel de las enzimas LPPs en la regulación de procesos de señalización intracelular. Sin embargo, no todas las acciones de las LPPs dependen de la modificación de los niveles de diferentes lípidos tanto en compartimentos intracelulares como en el medio extracelular, y esto es lo que veremos en el siguiente apartado estudiando el ejemplo de la LPP3.

3. Funciones de la LPP3 en el desarrollo.

Tal vez los estudios con una mayor relevancia sobre la función de LPP3 son los que se han realizado en ratones LPP3^{-/-}. La completa delección del gen que codifica para la LPP3 hace inviable el desarrollo de los embriones de ratón. Estos animales no forman estructuras vasculares en la placenta corioalantoidea y el saco vitelino, y muestran una duplicación de las estructuras del eje dorsal, similar a la que se observa en condiciones de sobreactivación de la vía de señalización de Wnt (Escalante-Alcalde et al., 2003). La señalización por Wnt está regulada por β -catenina y su interacción con p120-catenina y VE-cadherinas en la membrana plasmática. La fosforilación de β -catenina reduce su afinidad por cadherinas, haciendo que pierda su localización de membrana y se redistribuya al citosol. Una vez en el citosol, β -catenina puede ser ubiquitinada y seguir la vía de degradación lisosomal, o bien puede translocarse al núcleo, donde a partir de su interacción con el factor de transcripción TCF/LEF (T cell factor (TCF)/lymphoid enhancer binding factor (LEF)), activa la transcripción de diversos genes regulados por

INTRODUCCIÓN

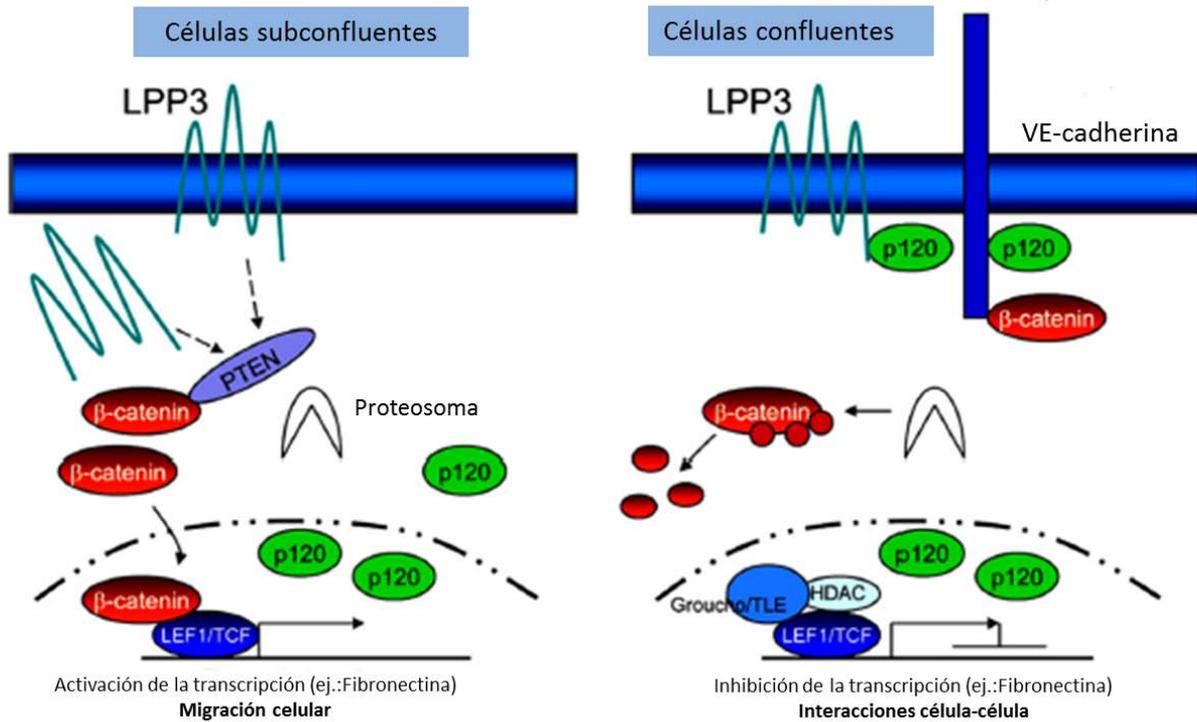


Figura 25. Modelo propuesto para la función de LPP3 en células endoteliales. En condiciones de subconfluencia la LPP3 pierde su localización en la membrana plasmática. Al encontrarse en zonas internas de la célula (no especificadas en el artículo), interactúa con β -catenina protegiéndola de su degradación, y por tanto incrementando la transcripción de genes como el que codifica para la síntesis de fibronectina, implicados en la migración celular. En condiciones de confluencia, LPP3 se encuentra de forma mayoritaria en la membrana plasmática, formando parte de un complejo con VE-cadherina en las uniones adherentes entre células. En este estado, LPP3 no podría estabilizar a β -catenina, que sería degradada. En consecuencia, se inhibiría la transcripción de genes cuya expresión está regulada por β -catenina.

Esquema adaptado de (Humtsoe et al., 2010).

Wnt, incluyendo los que codifican para fibronectina, ciclina D y LEF-1 (Bazzoni y Dejana, 2004; Grosheva et al., 2001) (esquema en la **figura 25**). Se ha publicado que la transcripción mediada por β -catenina y TCF/LEF está sobreactivada en células madre embrionarias de ratones LPP3^{-/-}, lo que indica que la LPP3 actúa regulando negativamente (inhibiendo) la vía de señalización dependiente de Wnt (Escalante-Alcalde et al., 2003). Curiosamente, en células HEK (las cuales no presentan actividad de LPP3 endógena), la transfección con la forma silvestre de LPP3 o un mutante catalíticamente inactivo, es capaz de inhibir la transcripción dependiente de TCF/LEF. En embriones LPP3^{-/-} de ratón, la inyección del mRNA de las formas silvestre y catalíticamente inactiva de LPP3 también inhibe el efecto de duplicación de las estructuras dorsales (Escalante-Alcalde et al., 2003). Por tanto, estos resultados indican

INTRODUCCIÓN

que a nivel de su función en el desarrollo, y en la regulación de la vía de señalización por Wnt, la actividad catalítica de LPP3 no resultaría determinante. Sin embargo, de forma sorprendente considerando estos resultados, recientes investigaciones han demostrado que en células endoteliales subconfluentes, la sobreexpresión de LPP3 incrementa la expresión de fibronectina dependiente de TCF/LEF, y también inhibe la degradación de β -catenina (Humtsoe et al., 2010). En el mismo estudio demuestran que el silenciamiento de LPP3 reduce los niveles de VE-cadherina, p120-catenina y fibronectina, e inhibe la migración de células endoteliales sobre una matriz de colágeno. Por último, la función de LPP3 en la formación de estructuras vasculares también puede estar de alguna forma regulada por su asociación a integrinas (Humtsoe et al., 2005). En este sentido se ha publicado que la proteína LPP3 humana contiene una secuencia RGD a través de la cual es capaz de interactuar con las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ (Jia et al., 2003; Kai et al., 1996). El uso de anticuerpos contra LPP3 inhibe la formación de capilares sanguíneos en respuesta a VEGF y bFGF. Estos factores de crecimiento estimulan la vasculogénesis, en parte, a través de un proceso dependiente de la adhesión de integrinas a la matriz extracelular (Wary y Humtsoe, 2005). Sin embargo, la relevancia del dominio RGD en la función de LPP3 es controvertida, ya que tanto en ratones como en ratas esta secuencia no se encuentra conservada (el motivo es RGE) (Humtsoe et al., 2003). En cualquier caso, el mecanismo a través del cual LPP3 podría regular la función de las integrinas es un tema que permanece sin resolver.

En este apartado, que supone el final de la introducción, hemos descrito las funciones de las proteínas LPPs tanto desde la perspectiva de su actividad catalítica, como en relación a procesos de señalización intracelular. Sin embargo, como hemos visto en los apartados anteriores, la composición lipídica de las membranas resulta esencial en la regulación del transporte intracelular, y poco se sabe sobre el papel de los distintos miembros de la familia de las LPPs en este aspecto. El esclarecimiento de esta cuestión, tal y como se explica más detalladamente en el siguiente apartado **Antecedentes y Objetivos**, constituirá la parte central de este trabajo

***ANTECEDENTES Y
OBJETIVOS***

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES (I): La LPP3 en la vía secretora

En nuestro laboratorio hemos estudiado la función del DAG en la regulación del transporte en las etapas tempranas de la vía secretora. Recientemente hemos publicado un artículo en el que demostramos la importancia de las vías de síntesis de fosfolípidos en la regulación de los niveles de DAG, y que la alteración de estas vías produce cambios en la morfología del Golgi y en el transporte desde este compartimento (Sarri et al, 2011). En un estudio anterior demostramos que el tratamiento con propanolol, inhibidor de la vía de síntesis de DAG dependiente de la actividad de las PAP2, reduce los niveles de DAG en el Golgi y causa un bloqueo del transporte retrógrado de Golgi a RE (Fernandez-Ulibarri et al., 2007). También hemos demostrado que al tratar las células con propanolol ArfGAP1 pierde su asociación con las membranas de Golgi y que a nivel ultraestructural, se observa un incremento del número de vesículas mostrando una fisión incompleta desde las cisternas. Ambos resultados, por tanto, apuntan a que el DAG es necesario para la fisión de los intermediarios de transporte formados en el Golgi. Reforzando esta hipótesis, se ha demostrado que el silenciamiento de PLD2, fosfolipasa que produce PA a partir de PC, causa unos efectos funcionales y morfológicos similares a los caracterizados con el propanolol (Yang et al, 2008). Se ha descrito que la síntesis de PA a partir de esta vía sería importante para el reclutamiento de BARS, molécula implicada en la maquinaria de fisión de las vesículas COPI (Yang et al, 2005; 2006 y 2008). Sin embargo, en base a nuestros resultados, también resulta posible que la formación de PA sirva como sustrato de alguna de las enzimas de la familia PAP2 para producir DAG. De la familia de las PAP2, se ha descrito que la isoenzima PPAP2B (LPP3) se encuentra parcialmente localizada en el Golgi, así como en la membrana plasmática y en dominios de membrana resistentes a detergentes no iónicos donde colocaliza con PLD2 (Sciorra y Morris, 1999). A partir de estos antecedentes nos planteamos que la LPP3 podría participar en la síntesis de DAG a nivel del Golgi, siendo importante para el mantenimiento de su estructura y funcionalidad.

Objetivo 1:

Determinar la localización subcelular de LPP3 en los diferentes compartimentos de la vía secretora

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Objetivo 2:

Caracterizar los mecanismos que regulan su localización y transporte a lo largo de la vía secretora.

Objetivo 3:

Determinar su contribución en la formación de DAG tanto a nivel del Golgi como en la homeostasis lipídica en general.

Objetivo 4:

Determinar su contribución en la formación de intermediarios de transporte en las etapas tempranas de la vía secretora.

ANTECEDENTES (II): El DAG en la endocitosis dependiente de clatrina

Respecto al papel del DAG en endocitosis, una de las vías de síntesis de DAG más extensamente estudiada ha sido la que implica la activación de la PLD. Recientemente se ha publicado que la estimulación de la endocitosis de los receptores μ y δ opioides promovida por la activación de la PLD2 es de hecho un proceso dependiente de la conversión del PA a DAG por acción de la PLD2. Dicha conversión estaría mediada por la acción de las proteínas LPP1 y LPP2 de la familia PAP2 (Yang et al, 2010). Sin embargo, no se ha publicado ningún estudio en el cual se defina con exactitud el papel del DAG procedente de la actividad de las PAP2 en la morfología y funcionalidad de los diferentes compartimentos que conforman la vía endocítica. Por ello, En este segundo apartado, nuestros objetivos son:

Objetivo 5:

Determinar si la actividad PAP2 participa en las primeras etapas de la endocitosis clatrina dependiente, y en caso afirmativo saber si hay especificidad de cargo dependiendo de si se trata de endocitosis constitutiva o regulada.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Objetivo 6:

Determinar si la actividad PAP2 regula de algún modo la morfología y funcionalidad del compartimento endosomal.

***MATERIALES
Y MÉTODOS***

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Anticuerpos

<u>Anticuerpo</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Utilización</u>	<u>Marcaje</u>
Beta-COPI	Sigma (St.Louis, MO, USA)	Immunofluorescencia	ERGIC y cis-Golg
EEA-1	BD Bioscience (San José, CA, USA)	Immunofluorescencia	Endosomas tempranos
FLAG	Sigma (St.Louis, MO, USA)	Immunoblot	-
GFP	Molecular Probes (Paisley, UK)	Immunoblot	-
GM130	Sigma (St.Louis, MO)	Immunofluorescencia	cis-Golg
Golgina 97	Molecular Probes (Paisley, UK)	Immunofluorescencia	Trans- Golgi/TGN
LPP3	Susan Pyne (University of Strathclyde, UK)	Immunofluorescencia / Immunoblot	ERES / ERGIC / Golgi
Myc	Sigma (St.Louis, MO)	Immunofluorescencia / Immunoblot	-
Rabenosina 5	Silvia Corvera (UMASS, MA, USA)	Immunofluorescencia	Endosoma temprano / Endosomas de reciclaje

MATERIALES Y MÉTODOS

<u>Anticuerpo</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Utilización</u>	<u>Marcaje</u>
Receptor de EGF	Santa Cruz (Dallas, Texas, USA)	Immunoblot	-
Receptor de transferrina	Molecular Probes (Paisley, UK)	Immunofluorescencia	Endosoma temprano / Endosomas de reciclaje
Receptor de KDEL	Calbiochem (Darmstadt, Germany)	Immunofluorescencia	ERGIC / cis-Golgi
Sec 31A	BD Bioscience (San José, CA, USA)	Immunofluorescencia	ERES
α -Tubulina	Sigma (St. Louis, MO)	Immunofluorescencia Immunoblot	Citoesqueleto de microtúbulos
Anti IgG-488 (ratón y conejo)	Molecular Probes (Paisley, UK)	Immunofluorescencia	-
Anti IgG-Cy3 (ratón y conejo)	Jackson Laboratories (West Grove, PA, USA)	Immunofluorescencia	-
Anti IgG-HRP (ratón y conejo)	Promega (Madison, WI, USA)	Immunoblot	-

MATERIALES Y MÉTODOS

2. Plásmidos

<u>Plásmido</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Vector</u>	<u>Marcaje</u>
C1b-PKC θ	I. Merida (CSIC, Madrid)	EGFP	Golgi / citoplasma
ERGIC53-GFP	H.P. Hauri (Biozentrum, University of Basel, Suiza)	EGFP	ERGIC
Gb3 sintetasa-myc	Origene (Rockville, MD, USA)	pCMV6-myc	-
LPP3wt-GFP (humana)	H. Kanoh (University School of Medicine, Sapporo, Japón)	EGFP	RE/ Golgi/ Membrana plasmática
LPP3wt-FLAG (humana)	S. Pyne (University School of Medicine, Sapporo, Japón)	pFLAG-CMV	RE/ Golgi/ Membrana plasmática
LPP3wt-myc (ratón)	Origene (Rockville, MD, USA)	pCMV6-myc	RE/ Golgi/ Membrana plasmática
LPP3S197T-GFP (humana)	H. Kanoh (University School of Medicine, Sapporo, Japón)	EGFP	RE/ Golgi
Cápside de los lentivirus	R. Ríos (CABIMER, Sevilla)	psPAX2	-

MATERIALES Y MÉTODOS

<u>Plásmido</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Vector</u>	<u>Marcaje</u>
Envoltura de los lentivirus	R. Ríos (CABIMER, Sevilla)	PMD2.G	-
shRNA LPP3 (TCR49)	Open Biosystems (Huntsville, AL, USA)	pKLO	-
shRNA LPP3 (TCR51)	Open Biosystems (Huntsville, AL, USA)	pKLO	-
ssDsRed	H.P. Hauri (Biozentrum, University of Basel, Suiza)	pCMV-DsRed	RE/ ERGIC/ Golgi
Rab6-myc	B. Goud (Institut Curie, París)	pCMV-myc	RE/ ERGIC/ Golgi

MATERIALES Y MÉTODOS

3. small interfering RNA (siRNA)

<u>siRNA</u>	<u>Gen</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Secuencia</u>
siRNA J-017312-06 (n°6)	LPP3 (humanA)	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)	5'-GGGACUGUCUCGCGUAUCA-3'
siRNA J-017312-07 (n°7)	LPP3 (humana)	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)	5'-GGAAUUCUACCGGAUCUAU-3'
siRNA J-017312-08 (n°8)	LPP3 (humana)	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)	5'-GGACAUUAUUGACAGGAAC-3'
siRNA J-017312-09 (n°8)	LPP3 (humana)	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)	5'-CAUCAAGUACCCACUGAAA-3'
On-TARGET plus SMART pool siRNA (combinación de 4 secuencas)	LPP1 (humana)	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)	5'-CUGUAUAUGUAUCGGAUUU-3' 5'-CUACAU AUGUCGAGGGAAU-3' 5'-GGAGGACUCUCAUACAACU-3' 5'-GGAGCGAUGUGUUGACUGG-3'
On-TARGET plus SMART pool siRNA (combinación de 4 secuencas)	LPP2 (humana)	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)	5'-CCGCGUGUCUGAUUACAAA-3' 5'-UGACAGACCUGGCCAAGUA-3' 5'-CGACGACUCUGUUGGAAGU-3' 5'-GCUCGGACUUCAACAACUA-3'
Non TARGET pool siRNA (combinación de 4 secuencas)	Secuencias sin homología	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)	Información no disponible

MATERIALES Y MÉTODOS

4. cebadores (“primers”)

<u>Gen</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Secuencia</u>
LPP3 (humana)	Universty of Massachussets Medical School (MA, USA)	Forward 5'-AGCCAGATCAACTGCTCTGAAA -3'
		Reverse 5'-GGCTCCTCGCCAAGTGAAG -3'
LPP2 (humana)	Universty of Massachussets Medical School (MA, USA)	Forward 5'-CTGCTCGGTCTATGTGCAGC -3'
		Reverse 5'-CACCATGCAGTACATCCCAAA -3'
LPP1 (humana)	Universty of Massachussets Medical School (MA, USA)	Forward 5'-GGCAGGTTGTCCTTCTATTCAG -3'
		Reverse 5'-CAGTGTGGGGCGTAAGAGT -3'
B-actina (humana)	Universty of Massachussets Medical School (MA, USA)	Forward 5'-CCTGGCACCCCAGCACAAT -3'
		Reverse 5'- GCCGATCCACACGGAGTACT-3'

MATERIALES Y MÉTODOS

5. Drogas y ligandos

<u>Producto</u>	<u>Función</u>	<u>Concentración</u>	<u>Procedencia</u>
[³² C] Acetato	Base conjugada conjugada del ácido acético [C ₂ H ₃ O ₂] ⁻ utilizado en el marcaje radioactivo de lípidos	1μCi/mL	PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA, USA)
[¹⁴ P] Ácido ortofosfórico	Grupo fosfato marcado con [¹⁴ P] utilizado en el marcaje radioactivo de fosfolípidos	1μCi/mL	PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA, USA)
Brefeldina A	Metabolito fúngico que desorganiza la estructura y al bloquear el ciclo GTP-GDP de Arf1	30μM	Sigma (St.Louis, MO)
Cicloheximida	Antibiótico que inhibe la síntesis proteica	100μg/mL	Sigma (St.Louis, MO)
DOG (2-dioctanoyl-sn-glycerol)	1,2-diacilglicerol sintético con ácidos grasos de cadena corta	3μM	Sigma (St.Louis, MO)
EGF	Factor de crecimiento utilizado en el estudio de la endocitosis por vía de clatrina	50ng/mL	Invitrogen (Paisley, UK)
EGF unido a biotina	Factor de crecimiento utilizado en el estudio de la endocitosis por vía de clatrina	50ng/ml	Invitrogen (Paisley, UK)
Estreptavidina (Alexa 488)	Ligando de unión a biotina acoplado al fluoróforo Alexa-488	1mg/ mL	Invitrogen (Paisley, UK)
Geneticina (G418)	Antibiótico para la selección de células establemente transfectadas	500μg/ml	Invitrogen (Paisley, UK)

MATERIALES Y MÉTODOS

<u>Producto</u>	<u>Función</u>	<u>Concentración</u>	<u>Procedencia</u>
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Ester de forbol que es análogo al diacilglicerol. Poco permeable a la membrana plasmática	100nM	Sigma (St.Louis, MO)
Propranolol	Inhibidor de la fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP/LPP)	100μM	Calbiochem (San Diego, CA)
Puromicina	Antibiótico que selecciona células eucarióticas que son positivas para la puromicina acetiltransferasa	3μg/mL	Sigma (St.Louis, MO)
R59949	Inhibidor de las diacilglicerol cinasas tipo I	30μM	Sigma (St.Louis, MO)
Subunidad B de la toxina de Shigela (STxB)	Toxina de Shigela que se internaliza hasta el RE. Se utiliza como marcador de la vía retrógrada dependiente de Rab6	0,5μg/mL	Johannes Ludger (Instituto Curie, París)
Subunidad B de la toxina de Shigela unida a la secuencia KDEL (STxB-KDEL)	Toxina de Shigela que se internaliza hasta el RE. Se utiliza como marcador de la vía retrógrada dependiente de COPI	0,5μg/mL	Johannes Ludger (Instituto Curie, París)
Transferrina Alexa-488	Ligando utilizado en el estudio de la endocitosis constitutiva dependiente de clatrina	20μg/mL	Invitrogen (Paisley, UK)

***Nota:** Aquéllos productos que no aparecen en esta sección (equipos, reactivos de transfección, software de análisis de imagen, etc), están indicados en el siguiente apartado de métodos.

MÉTODOS

1. Cultivos celulares

Las células HeLa, COS-7 y HEK 293T se obtuvieron de la casa comercial ATCC (Manassas, VA, USA) y las HeLa que constitutivamente expresan Rab6-GFP y VSV-G-GFP nos las proporcionaron los grupos de Bruno Goud (Institut Curie, París) y Vivek Malhotra (Center of Regulatory Genomics, Barcelona) respectivamente. Todas las líneas celulares crecieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con suero bovino fetal (FBS) al 10 % (volumen/volumen) inactivado (ambos de GIBCO, Paisley, UK). Los medios se suplementaron con penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml), piruvato sódico (100 mM) y L-glutamina (200 mM). Las células crecieron a 37 °C en atmósfera saturada de agua y 5 % de CO₂.

2. Silenciamiento por transfección de siRNAs

Para el silenciamiento de la expresión de LPP3, LPP1 y LPP2 en células HeLa o COS-7 se procedió de acuerdo con las instrucciones recomendadas en la ficha técnica del reactivo de transfección Hiperfect (Qiagen, Hilden, Alemania). Brevemente, las células se plaquearon a una densidad de 10⁵ células por pocillo en placas de 6 pocillos. Al cabo de 24 horas, se transfectaron con los siRNAs dirigidos contra los cDNAs de las proteínas LPP1, LPP2 o LPP3 humanas de forma individual o en combinación (según se especifique en la parte de resultados). La transfección se realizó preparando una mezcla de 12µL de Hiperfect y 2,3µL de siRNA (a 20µM) en 100µL de OPTIMEM. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente la mezcla se añadió a pocillos de p6 con 2,2 mL de DMEM completo. De esta forma, la concentración final de los siRNA en el medio fue de 20nM. En el caso de aquellos experimentos en que se utilizó una combinación de diferentes siRNAs, cada uno se añadió a la concentración proporcional para que la concentración total de siRNAs fuese 20nM (por ejemplo, cuando añadimos la combinación de los siRNA nº6 y 8 de LPP3, cada oligómero se añadió a 10nM). Tras 48 horas de la transfección, las células o bien se recogieron para analizar la disminución del mRNA por QRT-PCR (ver apartado 12), o bien se replaquearon (4 x 10⁵ células/pocillo) en placas de 6 pocillos. En este último caso, tras 4 horas se sometieron a un segundo proceso de transfección (en las mismas condiciones que el primero) por

MATERIALES Y MÉTODOS

24 horas. De esta forma, el tiempo total desde la transfección inicial de los siRNAs hasta la realización de los experimentos fue de 72 horas, tras lo cual, las células se recogieron para efectuar análisis de western blot o se fijaron y procesaron para análisis de inmunofluorescencia. Allí donde aparece indicado en el texto se utilizó como control la transfección de un conjunto de secuencias comerciales sin homología con ninguna secuencia del transcriptoma humano (referido en el texto como non-target pool; Dharmacon). En aquellos casos en que las células se sometieron a una transfección adicional con plásmidos, ésta se efectuó durante las últimas 24 horas del proceso de silenciamiento.

3. Transfecciones de plásmidos

Para la producción de lentivirus, transfectamos células HEL293T con el reactivo lipofectamine 2000 (Invitrogen). Brevemente, se prepararon dos tubos Eppendorf con 1,5mL de OPTIMEM (Gibco) cada uno. En uno de los tubos se añadieron 60µL de lipofectamine, y en el otro se añadieron 9µg del plásmido de la envuelta (pPAX), 4,5µg del plásmido de la cápside (pMD2.G) y 13,5µg del plásmido codificante para los shRNA de LPP3. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente se mezclaron ambas soluciones y la mezcla se dejó incubando a temperatura ambiente por 20 minutos más. Finalmente la mezcla se añadió a las células HEK293T, sembradas 24 horas antes en placas de p100 con 6mL de OPTIMEM. Tras 6 horas retiramos el medio con la lipofectamina de las placas y lo sustituimos por DMEM completo si antibióticos.

Para la transfección de plásmidos en células HeLa y COS-7 se utilizó el reactivo Fugene (Promega) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Brevemente, para la transfección sobre pocillos de una placa p6, se preparó una mezcla de 6µL de Fugene y 1-2µg del plásmido a transfectar en 100µL de OPTIMEM. Tras 10-15 minutos de incubación a temperatura ambiente se añadió la mezcla a las células plaqueadas en un pocillo de p6 (70-80% de confluencia) incubadas con 1mL de DMEM completo.

4. Producción e infección lentiviral

Para el silenciamiento de LPP3 en células Swiss3T3 se empleó un sistema de infección lentiviral, consistente en la introducción en el genoma de las células infectadas de una secuencia de DNA cuya transcripción da lugar a un RNA complementario (de aquí en

adelante referido como shRNA) al de la proteína de interés, activando su degradación y por tanto reduciendo los niveles de expresión de la proteína silenciada.

4.1. Producción de los shRNA LPP3 lentivirus

Células 293T se utilizaron como vector para la producción de las partículas lentivirales al transfectarlas con los plásmidos de la cápside, la envuelta y los shRNA de LPP3 utilizando Lipofectamine 2000 (ver detalles en el apartado anterior).

Tras 48 horas de la transfección, el medio de incubación (DMEM sin antibióticos) se filtró utilizando un filtro de 45 μm . En este punto del protocolo, el medio con los lentivirus se alicuotó en fracciones de 5mL, guardándolas a -80°C hasta el momento de su utilización.

4.2. Infección de células swiss3T3 con las partículas lentivirales.

Para llevar a cabo la infección de células swiss3T3, 6×10^5 células por placa se sembraron en placas de p100. Tras 24h de ser plaqueadas, se reemplazó el medio añadiendo 5mL de DMEM fresco. Por cada placa añadimos 5mL del medio conteniendo las partículas lentivirales (obteniendo un volumen final de 10mL por placa). Tras 24 horas, el medio se reemplazó por DMEM suplementado con puromicina ($3 \mu\text{g}/\text{mL}$). Los experimentos se realizaron tras 96 horas desde el momento en que se añadieron las partículas lentivirales. Como control negativo en los experimentos de infección se emplearon células swiss3T3 infectadas con partículas lentivirales vacías (esto es sin contener los plásmidos correspondientes a los shRNAs de LPP3).

5. Inmunofluorescencia

Los experimentos de inmunofluorescencia indirecta se llevaron a cabo en distintas líneas celulares adheridas sobre cubreobjetos de vidrio estériles con un grado de confluencia entre el 70-80%. Teniendo en cuenta el tipo de experimento se llevaron a cabo diferentes técnicas de fijación y permeabilización:

5.1. Fijación con PFA y permeabilización con saponina.

La fijación se realizó con paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS durante 15 min. Tras el tiempo de fijación, el PFA se retiró y seguidamente los cubreobjetos se lavaron con

MATERIALES Y MÉTODOS

una solución 50 mM de NH_4Cl (en PBS) durante 15 min para bloquear los grupos aldehídos remanentes. A continuación las células se permeabilizaron durante 10 minutos con saponina (0.1 %) disuelta en PBS conteniendo un 1 % de BSA (solución de bloqueo). El marcaje de las diferentes proteínas ensayadas se realizó incubando las células permeabilizadas con anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo (PBS, 1% BSA). El tiempo de incubación con los anticuerpos primarios se adaptó a las características óptimas de los diferentes anticuerpos empleados (generalmente 1 hora a temperatura ambiente, o de forma alternativa durante 12-17 horas a 4°C). A continuación, se procedió al lavado (con PBS) de los anticuerpos primarios y a la incubación de las células con anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos y diluidos en la solución de bloqueo. El tiempo de esta última incubación fue de 45-60 min a temperatura ambiente. Finalmente los anticuerpos secundarios se lavaron y los cubreobjetos se fijaron sobre portaobjetos con Mowiol.

5.2. Fijación con PFA a 37°C y permeabilización con saponina.

Excepcionalmente, en aquellos experimentos en que quisimos evaluar la formación de estructuras tubulares de membrana, realizamos una fijación en PFA al 4% a 37°C para preservar mejor dichas estructuras. La fijación se completó a temperatura ambiente durante 5 minutos. El resto del procedimiento fue igual al descrito en el punto anterior.

5.3. Fijación con metanol

Este método conjunto de fijación y permeabilización se utilizó en aquellos experimentos en que quisimos visualizar el citoesqueleto de microtúbulos. Se realizó incubando las células durante 5min en metanol frío (-20°C). En este protocolo, la incubación con metanol conlleva la desestructuración de la membrana plasmática haciendo innecesaria una posterior permeabilización con detergentes.

6. Microscopía en células fijadas y procesamiento de imágenes

Las preparaciones se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 y las imágenes se captaron con una cámara digital Olympus CCD (Lake Success, NY). Para los estudios de cuantificación y colocalización se utilizó un microscopio Leica TCS-SL (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Alemania).

MATERIALES Y MÉTODOS

El procesamiento y análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando el programa Image J 1.43 (NIH, Bethesda, MD). Brevemente, en el conteo del número de partículas de Rab6-GFP, KDELR y ERGIC-53-GFP las imágenes analizadas para cada célula fueron el resultado de la proyección de imágenes obtenidas en diferentes planos desde su base hasta su parte más apical (cada plano separado por 0,5 μm de los planos contiguos). Sobre la imagen resultante trazamos dos áreas, una externa perfilando el perímetro de las células y una interna perfilando el área correspondiente al Golgi. Sobre el área delimitada entre el perímetro del Golgi y el perímetro de la célula aplicamos un *threshold* de intensidad arbitrario (pero igual en todas las células analizadas), obteniendo una imagen en binario de las estructuras por encima de dicho *threshold*. El número de estas estructuras se contabilizó aplicando el plugin “*count particles*” (aceptando como partícula cualquier estructura entre 5 y 200 píxeles).

En el caso del conteo de partículas de ERGIC53-GFP y KDELR los resultados se normalizaron por el área celular (densidad de partículas por área). En la determinación del tamaño de las estructuras puntiformes de ERGIC53-GFP, a partir del área promedio en píxeles de las partículas cuantificadas por célula, calculamos el diámetro promedio (expresado en nm) de dichas estructuras.

El número total de túbulos de Rab6-GFP por célula así como su longitud promedio se calculó resiguiendo manualmente cada una de las estructuras tubulares utilizando el plugin “*NeuronJ*” (entendiendo como estructura tubular cualquier cuya longitud estuviese por encima de su amplitud máxima y de 5 píxeles).

El método para calcular el grado de colocación de diferentes marcadores fue el siguiente: se trazó el área de la célula y a continuación aplicamos un *threshold* para cada uno de los marcadores analizados. Seguidamente, se utilizó el plugin “*colocalization highlighter*”, considerando colocación cuando el ratio entre los diferentes valores de intensidad por encima del *threshold* de cada marcador fue superior a 0,5. Aquellos píxeles situados por encima del *threshold* cumpliendo el criterio de colocación aparecieron en una imagen binaria. Finalmente, el porcentaje de colocación de cada marcador se calculó como el ratio entre el área en píxeles de la imagen binaria de colocación, respecto el área en píxeles del marcaje por encima del *threshold* en la imagen original.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el caso de la colocalización entre LPP3wt-GFP, LPP3S197T-GFP y STxB-cy3, buscamos una aproximación alternativa que permitiese eludir el establecimiento de un *threshold*, al ser la señal de la STxB en el RE muy difusa, haciendo difícil establecer un criterio de señal específica y señal de fondo (background). Sobre las imágenes de LPP3wt-GFP más STxB y LPP3S197T-GFP más STxB-Cy3 ajustamos los niveles de intensidad de cada marcador de tal forma que el valor promedio de intensidad fuese el mismo. A continuación trazamos líneas de forma aleatoria sobre el marcaje de RE de cada uno de los marcadores, obteniendo los respectivos perfiles de intensidad de fluorescencia. Para cada píxel realizamos una substracción de los valores de intensidad de fluorescencia de los dos canales analizados (verde GFP, rojo STxB-cy3) expresando el resultado en valor absoluto ($|GFP - cy3|$), de tal forma que a mayor grado de colocalización (es decir mayor solapamiento de los perfiles de intensidad de cada marcador), menor diferencia. De cada línea trazada cuantificamos el valor promedio de esta diferencia, para cada célula calculamos el valor promedio de 5 líneas, y de cada experimento el valor promedio de 20 células.

7. Experimentos de microscopía confocal en células vivas

Los experimentos de microscopía confocal para el estudio de la dinámica de LPP3wt-GFP, LPP3S197T-GFP, ERGIC53-GFP y Rab6-GFP se realizaron con un microscopio Leica TCS-SL (ver apartado anterior) equipado con un sistema de control de la temperatura y CO₂. Las imágenes que aparecen en las películas 1-6 se adquirieron con un objetivo PL APO 100x (apertura numérica 1,4), excitando a una longitud de onda de 488-nm (intensidad del láser 15%) y fijando la apertura del pinhole en 1 A.U. (*airy units*). La ventana de longitudes de onda para el registro de la fluorescencia se fijó entre 500 y 610 nm. Las imágenes se adquirieron cada 0,6 segundos por los tiempos especificados en el texto y se procesaron utilizando el software ImgeJ (versión 1.43). Diferentes filtros para la reducción de la señal inespecífica (background) se aplicaron a cada experimento para lograr una optimización de las imágenes mostradas. En los estudios de tubulación de ERGIC53-GFP y Rab6-GFP las primeras imágenes se adquirieron inmediatamente después de cambiar las células de un dispositivo de control de temperatura a 15°C al sistema de control de temperatura a 37°C (5% CO₂) acoplado

a la platina del microscopio. Allí donde se especifica en el texto, el propanolol se añadió a una concentración final de 100 μ M cinco minutos antes (ERGIC53-GFP) o justo en el momento de iniciar la grabación (Rab6-GFP). En el experimento de reversión de los efectos del propanolol (ERGIC53-GFP), la droga se retiró cuidadosamente del medio al cabo de 6 minutos de grabación, tras lo cual añadimos a las células 1mL de DMEM fresco.

8. Experimentos de FRAP e iFRAP

En los experimentos de FRAP e iFRAP células COS-7 se plaquearon sobre cubreobjetos de vidrio de 22mm para obtener una confluencia próxima al 70% tras 24 horas. Tras este tiempo, las células se sometieron a transfección con los plásmidos de LPP3wt-GFP y VSV-G-YFP. En el caso de las células transfectadas con el VSV-G-YFP, éstas se incubaron a 40°C desde el momento de su transfección para inducir la acumulación de la proteína en el RE. Aproximadamente tras 24 horas de la transfección iniciamos la captura de imágenes manteniendo las células a 33°C y 5% de CO₂. Para lograr el apagado de la fluorescencia correspondiente al área del Golgi aplicamos 40 pasadas a la máxima potencia del láser de 488 nm. A continuación las imágenes se adquirieron cada 0,657 segundos utilizando un objetivo de 63x (NA 1,32), láser de excitación a 488 nm, filtro de emisión entre 500 y 610 nm y apertura máxima del pinhole (5 A.U), para garantizar la mayor amplitud posible en el registro de la fluorescencia emitida y evitar pérdidas de señal como consecuencia del movimiento de partículas fuera de foco. La recuperación de la fluorescencia asociada al área de Golgi se registró durante un tiempo total de 30 minutos.

De las imágenes adquiridas cuantificamos la evolución temporal de la fluorescencia en diferentes áreas correspondientes al Golgi, el citoplasma de la célula y la señal de fondo (background, área fuera de la célula). Cada imagen de la secuencia temporal fue analizada aplicando las siguientes fórmulas:

- a.) Recuperación de la fluorescencia a lo largo del tiempo normalizada sobre el valor de intensidad inicial correspondiente al área del Golgi:

$$I_{[tx]} = (I_{\text{Golgi}_{[tx]}} / I_{\text{Golgi}_{[t0]}}) \times 100$$

MATERIALES Y MÉTODOS

Donde $I_{\text{Golgi}_{[tx]}}$ representa el valor de intensidad del área del Golgi en el tiempo x (tx) tras el apagado de la fluorescencia e $I_{\text{Golgi}_{[t0]}}$ representa el valor de intensidad del área de Golgi en los instantes previos al fotoblanqueado ($t0$).

- b.)** Recuperación de la fluorescencia a lo largo del tiempo en relación a la señal del citoplasma, normalizada sobre los valores de intensidad iniciales del Golgi y del citoplasma.

$$I_{[t]} = (I_{\text{Golgi}_{[tx]}} / I_{\text{Golgi}_{[t0]}}) \times (I_{\text{citoplasma}_{[t0]}} / I_{\text{citoplasma}_{[tx]}}) \times 100$$

Donde $I_{\text{Golgi}_{[tx]}}$ e $I_{\text{Golgi}_{[t0]}}$ representan los valores de intensidad del área del Golgi antes ($t0$) y x segundos después del fotoblanqueado (tx). De igual forma $I_{\text{citoplasma}_{[t0]}}$ e $I_{\text{citoplasma}_{[tx]}}$ representan los valores de intensidad del área del citoplasma antes ($t0$) y x segundos después del fotoblanqueado (tx).

En los experimentos en que estudiamos la recuperación de la fluorescencia asociada al retículo, se emplearon 80 pasadas del láser 488 a máxima intensidad sobre el área fuera del Golgi. Tras la eliminación de la fluorescencia fuera del Golgi las imágenes se adquirieron utilizando un objetivo de 63x (NA 1,32; pinhole a 1 A.U.) y ajustando el zoom para visualizar con detalle el área adyacente al Golgi (incluyendo el perímetro nuclear). En este caso, con el propósito de obtener imágenes de elevada resolución que nos permitieran observar la estructura túbulo-reticular del RE, optamos por fijar la intensidad del láser 488 al 25% y adquirir las imágenes cada 5 minutos por un periodo máximo de 20 minutos.

Tanto en los experimentos de recuperación de la fluorescencia del Golgi, como en los experimentos de recuperación de la fluorescencia asociada al RE, antes de iniciar las grabaciones se añadió al medio de las células cicloheximida a una concentración final de 0,1 mg/mL.

9. Experimentos de microscopía TIRF

Para los experimentos de microscopía TIRF se utilizó un microscopio Olympus IX81 invertido modificado acoplado a una cámara CCD de 640x448 píxeles desarrollada por

MATERIALES Y MÉTODOS

los laboratorios Lincoln (MIT, MA, USA). La adquisición de las imágenes se hizo con un objetivo Olympus Plan APO 60x (NA 1,45). La iluminación TIRF se introdujo aplicando un ángulo entre 65-68°, adquiriendo una profundidad de 90-121nm al excitar con el láser de 488nm y de 106-141nm con el láser de 568nm. La temperatura del microscopio, incluido en su totalidad dentro de una cámara de control temperatura, se mantuvo a 35°C. Al carecer de un sistema de control de CO₂ las células se incubaron en un buffer KRH 1x (125mM NaCl, 5mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM Hepes) suplementado con piruvato sódico (2Mm) y BSA (0,5%) y ajustando el pH a 7,4. En el estudio de la internalización conjunta de EGF-568 y transferrina-488 ambos ligandos se añadieron conjuntamente a 20µg/mL y 50ng/mL respectivamente. En las células tratadas con propanolol se añadió a una concentración de 100µM conjuntamente con la transferrina y el EGF. Tras 5 minutos de internalización se reemplazó el medio con EGF y transferrina por medio sin los ligandos (pero manteniendo la misma concentración de propanolol en las condiciones de tratamiento). El seguimiento de la internalización conjunta del EGF y la transferrina se realizó durante 20 minutos, adquiriendo imágenes para cada uno de los láseres (488 y 568) cada dos segundos, de tal forma que en total registramos 600 imágenes de la transferrina-488 y 600 imágenes del EGF-568. Cada una de las imágenes se procesó sustrayendo el background (señal de fondo) y el bleeding (excitación del láser a 488 sobre el fluoróforo de 568) entre los diferentes láseres. Luego se estableció un threshold para ambos canales (el correspondiente a la transferrina-Alexa488 y el EGF-568) a partir del cual generamos una imagen binaria, y se analizó el número de píxeles de cada marcador dentro de la zona TIRF y el grado de colocación de ambos marcadores a lo largo de los 20min de internalización.

10. Microscopía electrónica

Para los experimentos de microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizamos células Swiss3T3 control o silenciadas para LPP3 mediante infección lentiviral. Tras 96 horas de la infección, las células se fijaron con 1.25 % glutaraldehído en tampón PIPES que contiene sacarosa (2 %) y Mg₂SO₄ (2 mM) durante 60 min a 37 °C. Seguidamente las células se lavaron con tampón PIPES (3 x 5 min) y se levantaron suavemente de la placa de cultivo con la ayuda de un raspador o scraper. A continuación, se centrifugaron

MATERIALES Y MÉTODOS

a 100 g durante 5 min. Posteriormente, las células se postfijaron en 1 % OsO₄, 1 % K₃Fe (CN)₆ en tampón PIPES durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se lavaron con PIPES (3 x 5 min) y se incubaron con 0.1 % ácido tánico en tampón PIPES durante 5 min para aumentar su contraste. Tras varios lavados con PIPES (3 x 5 min), las células se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol (80 %, 90 %, 95 % y 3 x 100%) y finalmente se incluyeron en resina Epon EMbed-812 polimerizando a 60 °C durante 48 h. Las secciones ultrafinas (40-60 nm) se contrastaron con acetato de uranilo (30 min) y citrato de plomo (10 min). La observación de las secciones ultrafinas se realizó en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 operando a 80-90 kV equipado con una cámara digital modelo Gatan BioScan 792. Para la captación digital de las imágenes se utilizó el programa DigitalMicrograph 3.11.0 (Gatan, Inc., Pleasanton, CA, USA)

11. Experimentos de transporte

11.1. Adquisición de la Resistencia a EndoH del VSV-G

Células HeLa establemente expresando VSV-G-GFP control y silenciadas para LPP3 se incubaron a 40°C las últimas 24 horas del protocolo de silenciamiento. Seguidamente, añadimos a las células cicloheximida (100ng/mL) y las cambiamos a 32°C, permitiendo la salida del VSV-G desde el RE. Las células se lisaron retirando el medio y añadiendo una solución con 0,5% SDS y 1% 2-mercaptoetanol (0,1 ml por pocillo de 35 mm) a diferentes tiempos: en el momento previo al cambio de temperatura (0 minutos), y tras 15 min, 30 min y 60 min del cambio de temperatura a 32°C. Tras desnaturalizar las proteínas de los lisados hirviendo las muestras, 20µg de proteína por lisado se trataron de acuerdo con el protocolo de un kit comercial para la digestión por Endo-H (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA). Brevemente, combinamos 20µg de los lisados con 1µL de *10x Glycoprotein Denaturing Buffer* (0.5% SDS, 40 mM DTT), enrasando la mezcla con H₂O hasta un volumen de 10µL. A continuación desnaturalizamos las proteínas a 100°C durante 10 minutos. Tras la desnaturalización, añadimos a la mezcla 2µL de *10x G5 Reaction Buffer* (50mM de citrato de sodio), 1µL de la Enzima EndoH, H₂O hasta un volumen final de 20µL y dejamos incubando la solución por 1 hora a 37°C. Finalmente las muestras se cargaron en un gel de

MATERIALES Y MÉTODOS

electroforesis (SDS-PAGE al 8% de acrilamida) y los niveles de VSVG-GFP se analizaron por inmunoblot con un anticuerpo anti-GFP.

11.2. Transporte desde el ERGIC al Golgi de la proteína ssDsRed.

Para estudiar el transporte anterógrado de la proteína ssDsRed, células HeLa control y silenciadas para la expresión de LPP3 se cotransfectaron con los plásmidos de ERGIC153-GFP y ssDsRed durante las últimas 24 horas del protocolo de silenciamiento. Tras 17-20 horas de expresión, las células se incubaron a 15°C por 2 horas para bloquear la salida de cargo desde el ERGIC. A continuación las células se incubaron nuevamente a 37°C por 20 minutos, momento en el cual se procedió a su fijación en PFA al 4%. La cuantificación del transporte de la proteína ssDsRed desde el ERGIC al Golgi se llevó a cabo midiendo el porcentaje de colocalización de ssDsRed con ERGIC53-GFP (excluyendo el área perinuclear correspondiente al Golgi) respecto al marcaje total de ssDsRed y ERGIC53-GFP.

11.3. Transporte de la STxB silvestre

Para estudiar el transporte de la subunidad B de la Shiga toxin salvaje (STxB-cy3) utilizamos dos líneas celulares: células HeLa (establemente expresando Rab6-GFP o no, según especifiquemos en el texto) y células COS-7 cotransfectadas con LPP3wt-GFP o LPP3S197T-GFP, conjuntamente con un plásmido codificando la enzima Gb3 sintetasa. La transfección de las células COS-7 con la Gb3 sintetasa fue necesaria debido a los bajos niveles de globotriaosilceramida 3 que presentan las células COS-7.

Brevemente, las células se incubaron durante 15 minutos a 4°C en presencia de 0,5 µg/mL de la STxB-cy3. A continuación retiramos el medio con la toxina, realizamos 3 lavados con PBS frío y añadimos DMEM fresco antes de pasarlas nuevamente a 37°C por espacio de 2 horas (tiempo suficiente para permitir la llegada de la STxB-cy3 al Golgi). Tras este tiempo de incubación a 37°C pasamos las células a 15°C por 1 hora (sincronizando el transporte de la STxB entre el Golgi y el RE), y finalmente incubamos nuevamente las células a 37°C por 10 minutos (en células HeLa) o 1 hora (en células COS-7) y las fijamos en PFA al 4%.

11.4. Transporte de la STxB-KDEL

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio del transporte de la subunidad B de la Shiga toxin fusionada a la secuencia de retención en el RE (STxB-KDEL-cy3), células swiss37 control y silenciadas para la expresión de LPP3 mediante infección lentiviral con shRNAs se incubaron con la STxB-KDEL-cy3 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 45 minutos a 4°C. Posteriormente, la toxina no unida al receptor se retiró del medio y lavamos las células 3 veces en PBS frío, pasándolas a continuación a 19°C por espacio de 2 horas (forzando la acumulación de la STxB-KDEL-cy3 a nivel de los endosomas tempranos). Finalmente las células se incubaron a 37°C y las fijamos en PFA al 4% tras diferentes tiempos del cambio de temperatura.

11.5. Transporte de la transferrina y el EGF

Para los experimentos de endocitosis incubamos células COS-7 en DMEM sin suero 30 minutos antes de añadir simultáneamente la transferrina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el EGF (50ng/mL). En el caso de la transferrina añadimos una forma acoplada al fluoróforo Alexa-488 (Invitrogen), mientras que para el EGF, lo preparamos combinando 50 μL de EGF unido a biotina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con 32 μL de estreptavidina-568 (2mg/mL). Tras añadir los ligandos (a 37°C), al cabo de 5 minutos eliminamos el EGF y la transferrina no internalizados reemplazando el medio por DMEM sin suero. Finalmente las células se fijaron a diferentes tiempos de internalización (ver el apartado de resultados) en PFA al 4%.

Cuando se añadió propranolol (100 μM), se hizo conjuntamente con los ligandos y se mantuvo en el medio durante todo el tiempo de internalización. En los experimentos en que se utilizaron el inhibidor de las DGK de clase I R9949 (30 μM) o el PMA (100nM), se añadieron al medio 30 minutos antes que la transferrina. Cuando utilizamos el DOG (3 μM) se añadió 10 minutos antes de añadir la transferrina. Cuando estudiamos la internalización de transferrina en células tratadas con nocodazol, el nocodazol (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se añadió 1 hora antes de añadir la transferrina.

12. Extractos celulares y western blotting

Para los análisis de western blot, lisamos las células en hielo durante 10 min en tampón de lisis Tris-ID NP40 (pH ~ 7.5) (50 mM Tris; 150 mM NaCl; NP40 1 %; azida 0.02

%). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 500 g durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante se cuantificó por el método de Lowry. Luego se añadió el buffer de carga y se hirvió durante 5 min. Para la electroforesis, 20 µg de proteínas se cargaron en un gel de acrilamida (SDS-PAGE) (diferentes concentraciones dependiendo de la proteína). A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y, por último, se realizó la inmunodetección mediante la técnica de western blotting. Primero, estas membranas se bloquearon con una solución de TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris- HCl, pH ~ 7.5, 0.05 % Tween-20) que contiene 5 % de leche en polvo libre de grasas. Una vez bloqueadas, se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Al día siguiente, tras varios lavados en TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario. Para visualizar el reconocimiento del antígeno se utilizó el ECL (Enhanced Chemiluminescence Luminol, Santa Cruz) y la reacción se reveló mediante la exposición sobre una película fotográfica dentro de un casete protegido de la luz.

13. PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR)

13.1. Extracción de RNA

Para los experimentos de PCR en tiempo real, el RNA total de células COS-7 control y transfectadas con siRNAs específicos para las diferentes isoenzimas de la familia de las PAP2 (LPP1, LPP2 y LPP3) se obtuvo tras 48 horas de la transfección utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen). Brevemente, células plaqueadas en pocillos de p6 al 70-80% de confluencia se incubaron durante 5 minutos a 4°C en 1mL de Trizol. Seguidamente recuperamos las células rascando los pocillos y los lisados se transfirieron a tubos de polipropileno de 1,5mL. Por cada tubo se añadieron 0,5mL de cloroformo y las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C y 12000 g. A continuación recuperamos la fracción del sobrenadante evitando cuidadosamente la interfase de proteínas y añadimos 0,5 mL de isopropanol a cada tubo. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 30 minutos (12000 g), tras lo que retiramos el sobrenadante y resuspendimos el pellet en etanol al 75%. Finalmente, las muestras se centrifugaron una última vez durante 10 minutos a 7500g, tras lo que retiramos el sobrenadante y dejamos secar completamente el pellet de RNA. El RNA se resuspendió en 20µL de H₂O libre de RNAsas y se almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización.

13.2. Obtención de cDNA por PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR)

Para la síntesis de cDNA a partir del RNA purificado utilizamos el kit *iScript cDNA Synthesis* (BIO-RAD) siguiendo las instrucciones indicadas en el manual. Brevemente, en cada reacción añadimos 1µg de RNA, 4µL de *5x iScript Reaction Mix*, 1µL de *iScript Reverse Transcriptase*, y enrasamos la reacción con H₂O libre de RNAsas hasta un volumen final de 20µL. La reacción de PCR reversa se realizó en un dispositivo termociclador (*MJ Mini™ Personal Thermal Cycler*, BIO-RAD) aplicando un programa de 5 minutos a 4°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 82°C. El cDNA obtenido se diluyó 1:4 en H₂O libre de RNAsas y se guardó a -20°C hasta su utilización.

13.3. PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) y análisis de resultados.

Para cada muestra de cDNA, se realizó una mezcla con iQ SYBR Green (20,6µL/muestra) (BIO-RAD; Hércules, CA, USA), primers del gen analizado (1,6µL/muestra), cDNA (6,6µL/muestra) y H₂O (12,4µL/muestra), distribuyendo el volumen final en 3 pocillos (triplicados) de una placa de 96 pocillos (12,5µL/pocillo). Para la reacción de QRT-PCR se utilizó el dispositivo *MyiQ single-color real-time PCR detection system* (BIO-RAD). Para la cuantificación de los resultados se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Donde:

C_T (cycle threshold): Número del ciclo a partir del cual la señal fluorescente supera el umbral determinado por el programa.

ΔC_T (delta cycle threshold): Diferencia entre los valores de C_T del gen de estudio (LPP1, LPP2 o LPP3) y el gen *houskeeping* utilizado como control de carga (en nuestro caso actina).

ΔΔC_T (delta delta cycle threshold): Diferencia entre los valores ΔC_T del gen de estudio en células control y células silenciadas.

14. Determinación de lípidos mediante marcaje radioactivo

Células HeLa control y silenciadas para la expresión de LPP3 se sometieron a marcaje radioactivo con [³²P] ácido ortofosfórico (5 µCi/ml) o [¹⁴C] acetato (1µCi/ml) durante las últimas 24 horas del protocolo de silenciamiento. La fracción lipídica de las células control y silenciadas se obtuvo en hielo aplicando una solución de metanol (2 mL para

MATERIALES Y MÉTODOS

placas de 60 cm² al 80% de confluencia celular). A continuación las células fueron cuidadosamente recogidas (por el método de rascado) y depositadas en tubos de vidrio conteniendo un solución (50% de volumen) de cloroformo. Tras 5 minutos en hielo las diferentes fases de cada muestra (soluble y orgánica) se separaron aplicando un 65% de volumen de agua destilada y cloroformo. Seguidamente agitamos los tubos y los sometimos a una centrifugación de 3000 g durante 10 minutos. La fase orgánica, situada en la parte inferior de los tubos, se lavó en una solución de agua/metanol (1:1) y a continuación se dejó evaporar aplicando una corriente de N₂.

Las diferentes especies moleculares de los extractos lipídicos se separaron por cromatografía de capa fina (TLC). Brevemente, los principales fosfolípidos (fosfatidilcolina, PC; fosfatidiletanolamina, (PE); esfingomiélinea, (SM); fosfatidilinositol, (PI); fosfatidilserina, (PS), y ácido fosfatídico, (PA)) marcados radioactivamente con [³²P]ácido ortofosfórico y [¹⁴C]acetato se separaron por TLC de forma bidimensional aplicando las siguientes fases móviles: en la primera dimensión cloroformo/metanol/NH₄OH (relación de volúmenes 65:35:10); en la segunda dimensión cloroformo/metanol/acetona/ácido acético/agua (relación de volúmenes 10:2:4:2:1). Los lípidos neutros como el triacilglicerol (TAG) y diacilglicerol (DAG) se separaron bidimensionalmente aplicando las siguientes fases móviles: primero cloroformo/metanol (1:1) y después hexano/dietiléter/ácido acético (70:30:1). Finalmente, la señal radioactiva de los fosfolípidos y lípidos neutros marcados con [¹⁴C]acetato y [³²P]ácido ortofosfórico se cuantificó con el dispositivo PhosphoImager (Typhon TRIO, Amersham Biosciences) y analizada con el software de procesamiento de imágenes ImageQuant (Amersham Biosciences).

15. Análisis estadístico.

A menos que en el apartado de resultados se especifique de otra forma, todos los resultados presentados corresponden a la media ± s.e.m (error estándar de la media) de al menos 3 experimentos. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el método de la T de Student para muestras aparejadas, o el método ANOVA de una vía seguido del test Tukey de comparación múltiple. En todos los análisis utilizamos el software GraphPad (San Diego, CA; www.graphpad.com)

RESULTADOS

(I) La LPP3 en la vía secretora

RESULTADOS

1. Localización subcelular de la LPP3

Para determinar la localización subcelular de la LPP3 endógena en células HeLa, empleamos anticuerpos específicos descritos con anterioridad (Long et al., 2008). Los anticuerpos marcaron numerosas estructuras puntiformes especialmente concentradas a nivel perinuclear, colocalizando en gran medida con el marcador de compartimento intermedio ERGIC53-GFP (Fig.1A).

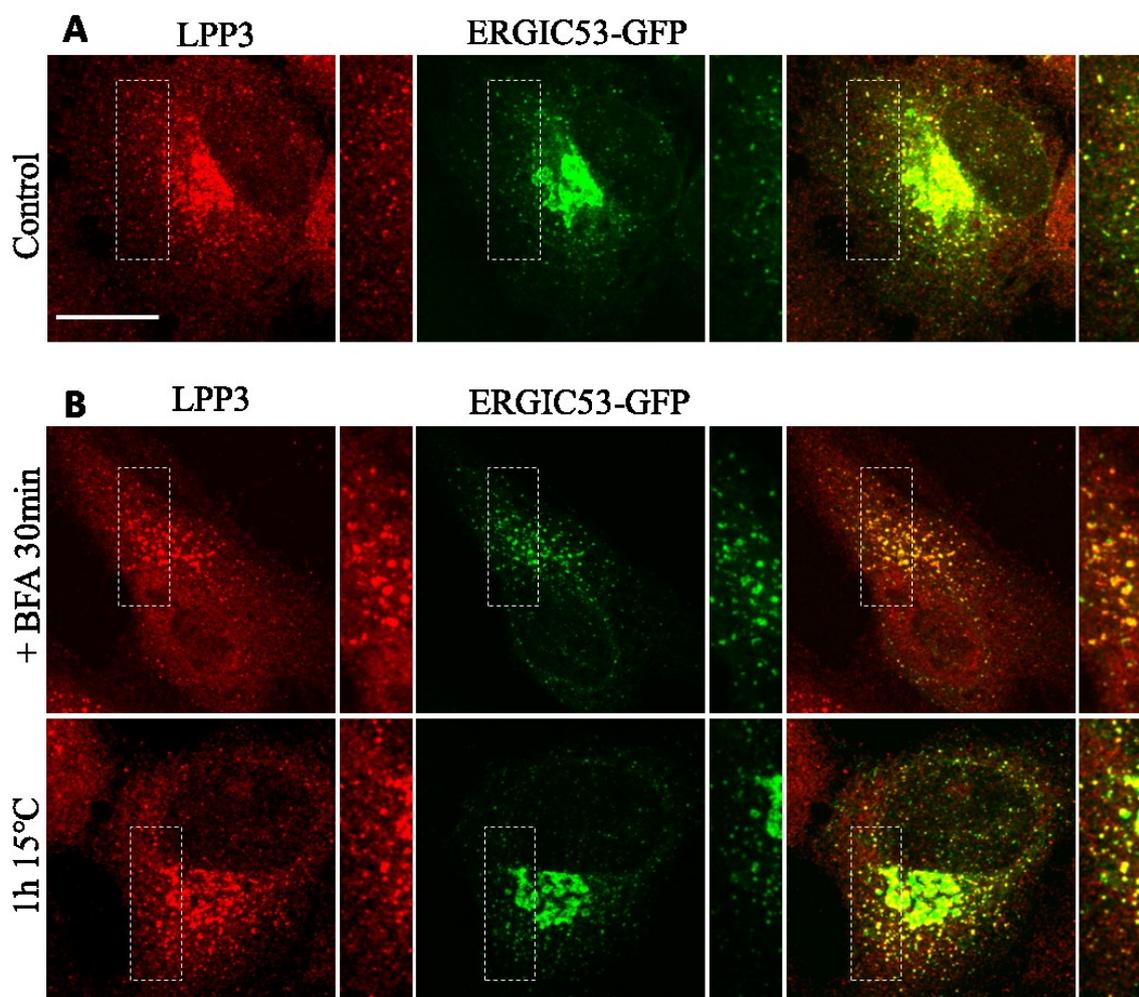


Figura 1. Análisis de la localización subcelular de LPP3. (A). Células HeLa transfectadas con ERGIC-53-GFP y procesadas por inmunocitoquímica (ICC) utilizando anticuerpos anti-LPP3. (B) Células HeLa transfectadas con ERGIC53-GFP se trataron con brefeldina A (BFA) durante 30 minutos (panel superior) o bien se incubaron durante 1 h a 15°C (panel inferior). En ambos casos observamos un extensa colocalización de LPP3 y ERGIC53-GFP a nivel perinuclear y en las estructuras puntiformes periféricas. Barra 10 μ m.

RESULTADOS

Para una caracterización más detallada de la LPP3 en el compartimento intermedio, estudiamos su localización tras tratar las células con brefeldina A (BFA) y al incubarlas a 15°C. La incubación a bajas temperaturas (15-16°C) bloquea el transporte anterógrado y retrógrado desde el ERGIC (Klumperman et al., 1998b; Lippincott-Schwartz et al., 1990; Saraste y Svensson, 1991) y las proteínas de ERGIC y ERES se observan en estructuras vesiculares de tamaño superior al observado en condiciones fisiológicas (Hammond y Glick, 2000). Respecto al tratamiento con BFA, las proteínas de ERGIC y ERES mantienen la misma distribución que en condiciones basales, mientras que las proteínas residentes de Golgi se relocalizan al RE (Klumperman et al., 1998; Hammond y Glick, 2000). Tras ambos tratamientos observamos que la LPP3 mantenía su colocalización con ERGIC53 (**Fig. 1B**), lo que es demostrativo de que se comporta como una proteína de ERES/ERGIC.

Con el objetivo de analizar si parte de la localización perinuclear de LPP3 correspondía al Golgi, tratamos las células con el agente despolimerizador de microtúbulos nocodazol. La despolimerización del citoesqueleto de microtúbulos induce la formación de stacks de Golgi individualizados en proximidad a los ERES (Dejgaard et al., 2007; Ho et al., 1989). Tales ministacks preservan la polaridad cis / trans de las cisternas de Golgi, lo que facilita un análisis más detallado de la distribución de las proteínas en las diferentes cisternas. Tras 3 horas de tratamiento con nocodazol, las células se fijaron y se realizaron dobles marcajes con LPP3 y con diversos marcadores de la vía secretora: sec31A (ERES), KDELr (ERGIC), GM130 (cis-Golgi) y Golgina97 (trans-Golgi/TGN). El análisis de la distribución de LPP3 en relación a estos marcadores, dio como resultado una extensa colocalización de LPP3 con sec31A y KDELr (ERES y ERGIC), y en menor medida con GM130 y Golgina97 (**Fig 2**), mostrando un gradiente de colocalización ERES/ERGIC > cis > trans.

El análisis mediante crioinmunocitoquímica de la localización de la LPP3 endógena mostró marcaje en estructuras vesiculares adyacentes al Golgi ($82 \pm 8\%$) y en menor medida en las cisternas de Golgi ($18 \pm 2\%$) (**Fig. 3**).

Estos resultados confirman que la LPP3 endógena se encuentra enriquecida en los ERES y el compartimento intermedio (ERGIC), es decir, aquellos compartimentos que median la transición de proteínas de la vía secretora entre el Golgi y el RE.

RESULTADOS

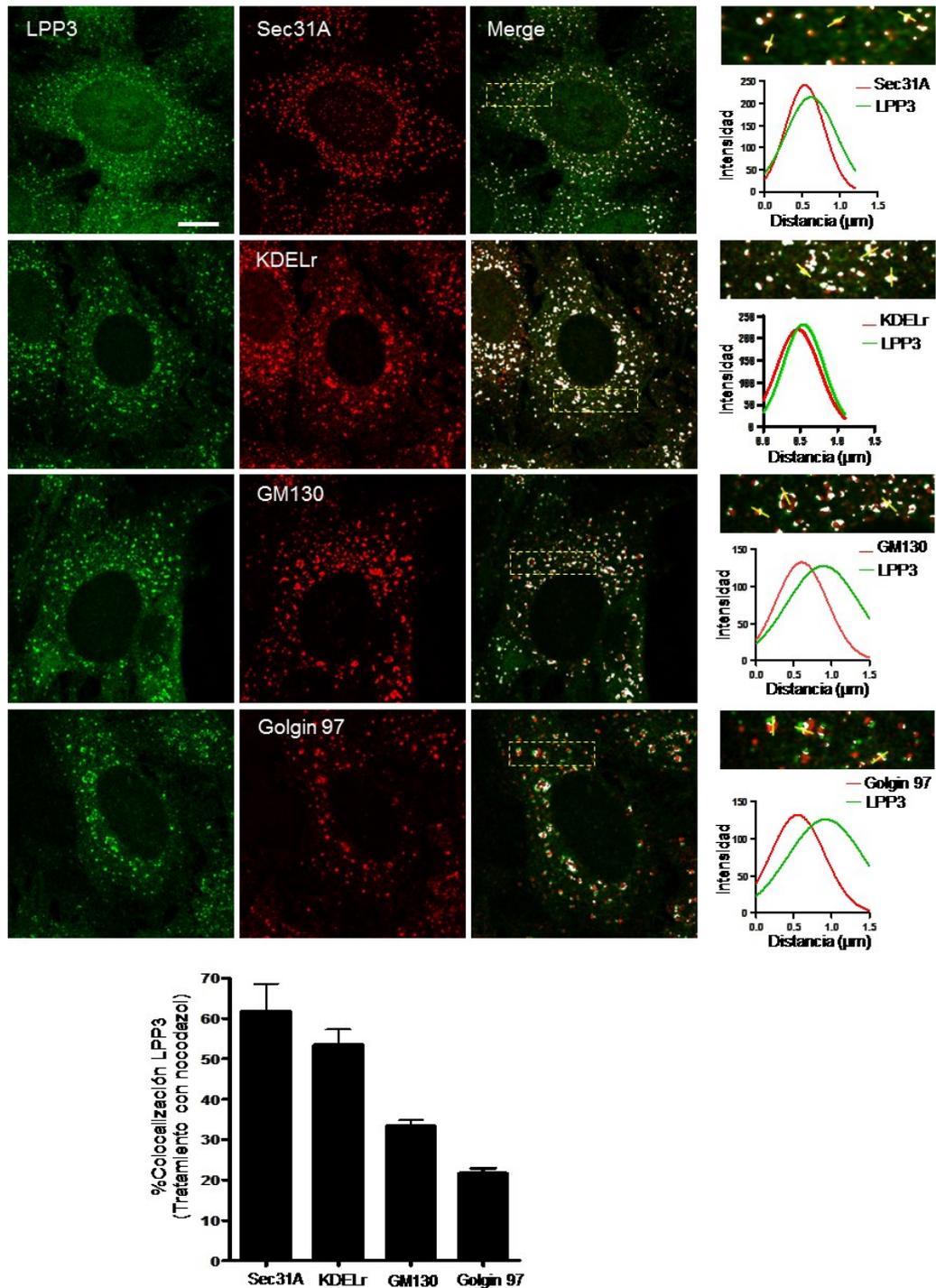


Figura 2. Análisis de la localización subcelular de LPP3 en células HeLa tras tratamiento con nocodazol. (A) Células HeLa tratadas con nocodazol (NZ) por 3 h y procesadas por ICC con los anticuerpos anti-LPP3 más sec31A, KDELr, GM130 y Golgina97. A la derecha, magnificaciones de regiones en las que podemos observar la colocalización de LPP3 con los diferentes marcadores, y el valor promedio de sus respectivas intensidades de fluorescencia a lo largo de la longitud máxima de los ministacks analizados (30 stacks por célula, 10 células por experimento, N=3). (B) Cuantificación del grado de colocalización de LPP3 respecto a sec31A, KDELr, GM130 y Golgina 97, expresado como porcentaje de marcaje de LPP3 que colocaliza con cada marcador en relación al marcaje total de LPP3 (media \pm s.e.m). En la figura podemos observar cómo existe una colocalización gradual de ERES/ERGIC a trans-Golgi/TGN. Barra 10 μm .

RESULTADOS

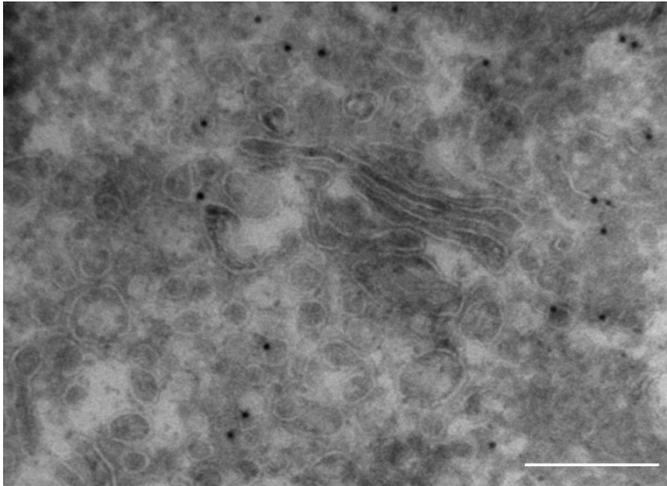


Figura 3. Distribución de LPP3 en vesículas próximas al Golgi. (A). Imagen de microscopía electrónica correspondiente a una sección ultrafina de células HeLa procesadas por crioimmunocitoquímica con anti-LPP3 seguido de marcaje con partículas de oro acopladas a proteína A. Podemos observar marcaje en estructuras de membrana en proximidad a las cisternas de Golgi. Barra, 200nm

2. Parte de la LPP3 cicla de forma constitutiva entre el RE y el Golgi.

Para confirmar los resultados obtenidos por inmunocitoquímica sobre la LPP3 endógena, sobreexpresamos en células COS-7 y HeLa una forma recombinante de la LPP3 humana unida a GFP. En concordancia con lo observado respecto a la proteína endógena, vimos una localización parcial de LPP3 en el Golgi en ambas líneas celulares (**Fig 4A**), en el retículo endoplasmático (especialmente apreciable en las células COS-7) y en la membrana plasmática (especialmente apreciable en las células HeLa).

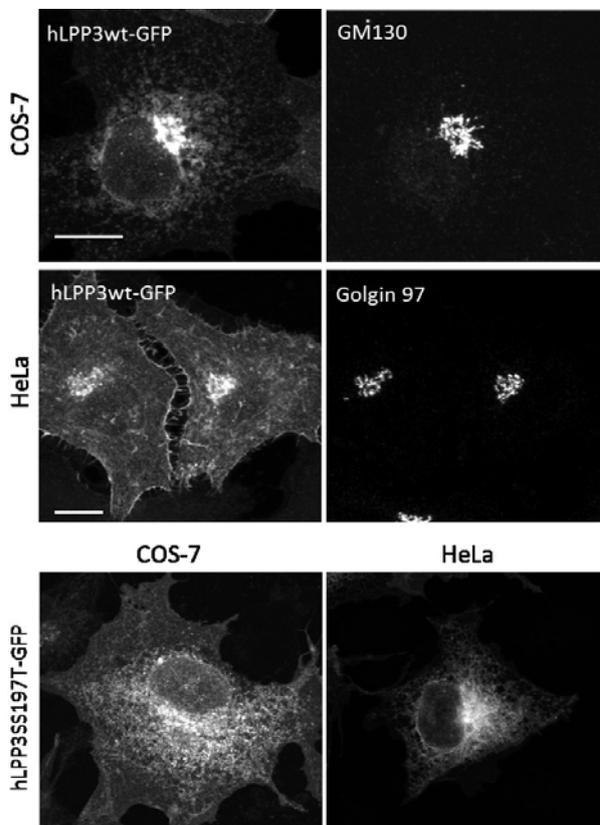


Figura 4. Localización subcelular de las formas salvaje y catalíticamente inactivas de LPP3 expresadas en células COS-7 y HeLa. (A). Células COS-7 (panel superior) y HeLa (panel inferior) transfectadas con hLPP3wt-GFP y procesadas por ICC con anti-GM130 (COS-7) y Golgina97 (HeLa). En las células COS-7 podemos observar una clara distribución de la proteína sobreexpresada en el RE (ver envoltura nuclear) y en el Golgi. En células las HeLa, además de su localización en el Golgi observamos una clara distribución en la membrana plasmática. (B) Células COS-7 (panel de la izquierda) y HeLa (panel de la derecha) transfectadas con el mutante catalíticamente inactivo de LPP3 (mutación de la Ser 197 por Thr en el sitio catalítico, hLPP3S197T). Las imágenes muestran una distribución mayoritariamente de RE en ambos tipos celulares, perdiéndose el marcaje de Golgi y de membrana plasmática. Barras 10µm.

RESULTADOS

Cuando transfectamos una forma mutante catalíticamente inactiva de la LPP3-GFP (substitución de la serina 197 del dominio catalítico por una treonina; de aquí en adelante LPP3S197T-GFP; Escalante-Alcalde et. al., 2003) observamos diferencias respecto la forma silvestre, siendo su localización mayoritariamente de RE (**Fig. 4B**). Esta diferencia nos llevó a analizar por microscopía confocal *in vivo* la dinámica de la proteína silvestre y la catalíticamente inactiva a nivel del RE (**Fig 5**). En referencia a la forma silvestre (hLPP3wt-GFP), la vimos localizada tanto en las cisternas del RE como en estructuras de tipo vesicular. Éstas mostraron un movimiento lento, en ocasiones desplazándose entre cisternas contiguas de RE, aunque sin presentar una direccionalidad concreta (**Fig 5**, panel superior y magnificaciones y **película 1**). Es interesante destacar que este comportamiento dinámico concuerda con el que se ha descrito para proteínas transmembrana asociadas a los ERES (Kano et al., 2004). En relación a la hLPP3S197T-GFP, observamos un movimiento similar de los túbulos del RE, pero no que la proteína se acumulase en estructuras vesiculares como sucedía con la forma silvestre (**Fig 5**, panel inferior y **película 1**).

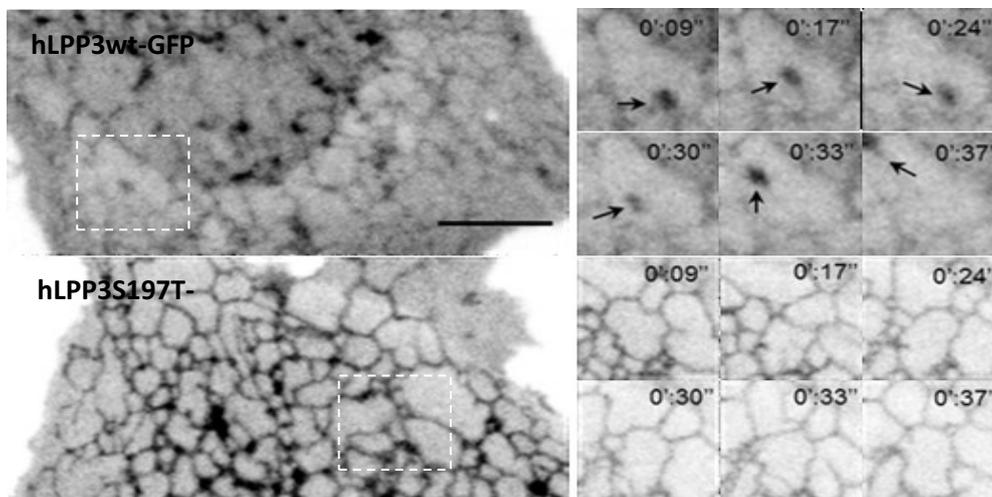


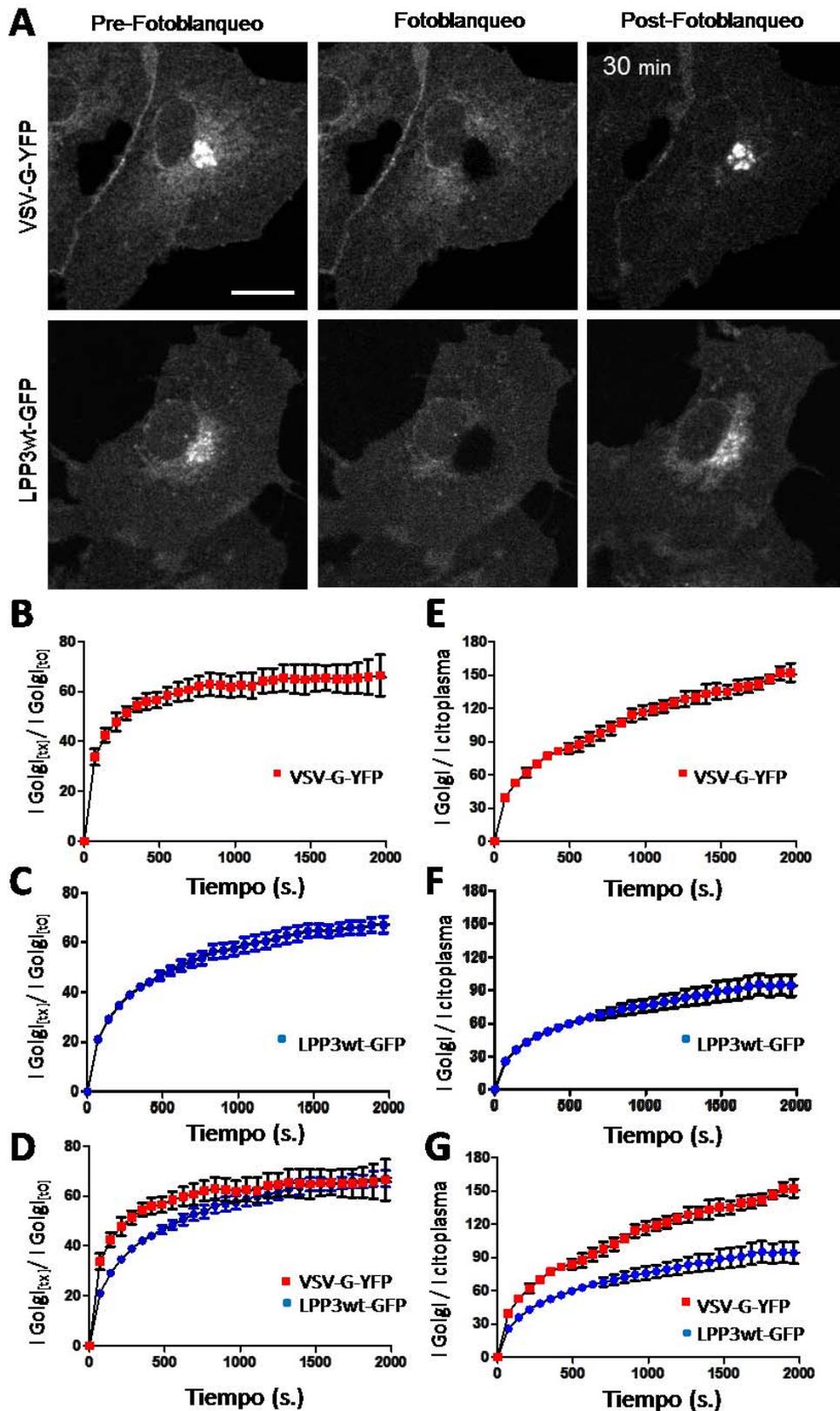
Figura 5. Análisis del movimiento de las formas silvestre y catalíticamente inactivas de LPP3 en asociación con el RE. Imágenes extraídas de la película 1 en las que podemos observar *in vivo* el movimiento de la hLPP3wt-GFP (panel superior) y la hLPP3S197T-GFP (panel inferior) en asociación a la membrana del RE. Las magnificaciones de la derecha corresponden al seguimiento temporal del movimiento de LPP3wt/S197T en las regiones encuadradas. Destaca la presencia de la hLPP3wt-GFP en estructuras de tipo vesicular en estrecha asociación al RE. En las magnificaciones de la derecha podemos observar cómo una de estas estructuras inicia un desplazamiento entre filamentos de RE contiguos arrastrando consigo parte de la membrana del RE. Por el contrario, en las magnificaciones correspondientes al movimiento de la hLPP3S197T-GFP no observamos las estructuras vesiculares, si bien la membrana del RE muestra una dinámica de remodelación muy similar a la observada con la hLPP3wt-GFP. Barras 10 μ m.

RESULTADOS

Para entender mejor la distribución subcelular de la hLPP3wt-GFP entre el RE y el Golgi, realizamos experimentos de recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (FRAP) del área del Golgi. Analizamos el transporte de la hLPP3wt-GFP entre el RE y el Golgi, comparándolo con la dinámica de transporte de la glicoproteína G del virus de la estomatitis (VSV-G). En el caso del VSV-G, la incubación a 40°C induce un mal plegamiento de la proteína, lo que hace que quede retenida en el RE y no se transporte al Golgi. Sin embargo, al pasar las células a 32°C, la proteína se pliega correctamente, permitiendo su salida del RE al Golgi y finalmente a la membrana plasmática. En base a esto, transfectamos células COS-7 con la proteína VSV-G fusionada a YFP y las incubamos a 40°C durante toda la noche. Al día siguiente las células se incubaron a 32°C durante 15 minutos, tras lo que fotoblanqueamos la fluorescencia del Golgi. A partir de este instante, iniciamos un registro de la recuperación de la fluorescencia en el Golgi durante 30 minutos. En las imágenes correspondientes a la **figura 6**, podemos observar cómo a lo largo del tiempo se produjo una recuperación casi completa de la fluorescencia en el Golgi (**figura 6A y 6B**). También vemos que dicha recuperación se produjo en paralelo a una disminución en la fluorescencia del RE (**figura 6A y 6E**). Respecto al transporte de la hLPP3wt-GFP, observamos que la recuperación de la fluorescencia asociada al Golgi se daba con una dinámica muy similar a la observada para el VSV-G (**figura 6A y 6C**). Sin embargo, a diferencia del VSV-G, la fluorescencia asociada al RE se mantuvo estable a lo largo del tiempo (**figura 6A y 6F**). Este resultado podría interpretarse de dos maneras: por un lado podría deberse a que la fracción móvil de la LPP3 en el RE fuese menor en comparación a la del VSV-G, con lo que sólo un determinado porcentaje de la proteína abandonaría el RE en un determinado lapso temporal, permaneciendo el resto establemente asociada al RE (o por mayor tiempo que en el caso de una proteína típicamente secretora). Por otro lado, podría ser consecuencia de que parte de la proteína llegada al Golgi se transportase de nuevo al RE, manteniendo de esta forma un equilibrio en la distribución de la proteína entre ambos compartimentos. Para comprobar esta última posibilidad realizamos el experimento inverso: fotoblanqueamos el área correspondiente a la hLPP3wt-GFP localizada fuera del Golgi y monitorizamos la recuperación de dicha señal a lo largo del tiempo. Tras aproximadamente 20 minutos después del fotoblanqueo fuera del Golgi,

RESULTADOS

observamos que la LPP3-GFP volvía a marcar el RE, lo que indica que parte de la LPP3-GFP se transporta retrógradamente del Golgi al RE (figura 7).



RESULTADOS

Figura 6. Comparativa del transporte del VSV-G y la LPP3 entre el RE y el Golgi. (A). En células COS-7 expresando VSV-G-YFP (paneles superiores) y hLPP3wt-GFP (paneles inferiores) medimos la recuperación de la fluorescencia asociada al Golgi tras fotoblanqueo. En el caso de las células transfectadas con VSV-G-YFP, éstas se incubaron durante toda la noche a 40°C para acumular la proteína en el RE. La imagen previa al bleach se obtuvo tras 15 minutos de incubación a 33°C. En la parte inferior de la figura mostramos la evolución de la fluorescencia en la región fotoblanqueada a lo largo del tiempo. Recuperación de la fluorescencia del VSV-G (B) y LPP3 (C) a lo largo del tiempo expresado como porcentaje respecto a la intensidad registrada antes del bleach. Recuperación de la fluorescencia del VSV-G (D) y LPP3 (E). Cada valor en la escala temporal es el resultado porcentual de la ratio entre la fluorescencia del área fotoblanqueada (Golgi) y la fluorescencia del área del citoplasma, respecto la ratio de ambos valores (fluorescencia del Golgi y fluorescencia del citoplasma) en los momentos previos al bleach. Las gráficas representan la media \pm s.e.m de 5 células. Barras 10 μ m.

Finalmente, profundizamos en las causas de la diferente distribución subcelular de la forma silvestre y del mutante catalíticamente inactivo de la LPP3. Una posible explicación de esta divergencia sería que la mutación S197T en el dominio catalítico indujese un mal plegamiento de la proteína, impidiendo su salida del RE. Otra posible explicación, es que la actividad catalítica de la LPP3 fuese necesaria para el transporte de proteínas de RE a Golgi, incluyendo a la propia LPP3. Una forma de inhibir la actividad catalítica de LPP3 es tratar las células con propanolol (inhibidor de la actividad de las PAP1 y 2; (Billah et al., 1989)). Por ello, nos planteamos estudiar mediante el FRAP del Golgi el transporte anterógrado de la hLPP3wt-GFP en presencia de propanolol. En la **figura 8** se muestra cómo en presencia de propanolol la recuperación de la fluorescencia en el Golgi se produce más lentamente y en un menor porcentaje que en las células control (cuantificación en **8B** y **8C**).

El conjunto de estos resultados indican que la LPP3 no puede ser considerada como una proteína residente de RE o de ERES, ni tampoco como una proteína que transitoriamente se asocia a compartimentos intracelulares en ruta hacia la membrana plasmática (como por ejemplo el VSV-G). Su comportamiento se asemeja, al menos parcialmente, al de una proteína de compartimento intermedio, ciclando entre el RE y el Golgi. Por otra parte, tanto la sobreexpresión de una forma catalíticamente inactiva de LPP3, como la inhibición de la actividad catalítica de las enzimas de la familia de las fosfatasas del ácido fosfatídico (PAP), producen una mayor asociación de la LPP3 en el RE en detrimento de su localización a nivel del Golgi. Curiosamente, estudios anteriores han demostrado que el propanolol no afecta al transporte del VSV-G de RE a Golgi (Fernández-Ulibarri et al; 2007), indicando que el transporte de LPP3 puede estar

RESULTADOS

regulado por mecanismos moleculares diferentes a los del VSV-G. En el apartado de discusión desarrollaremos con mayor detalle esta hipótesis.

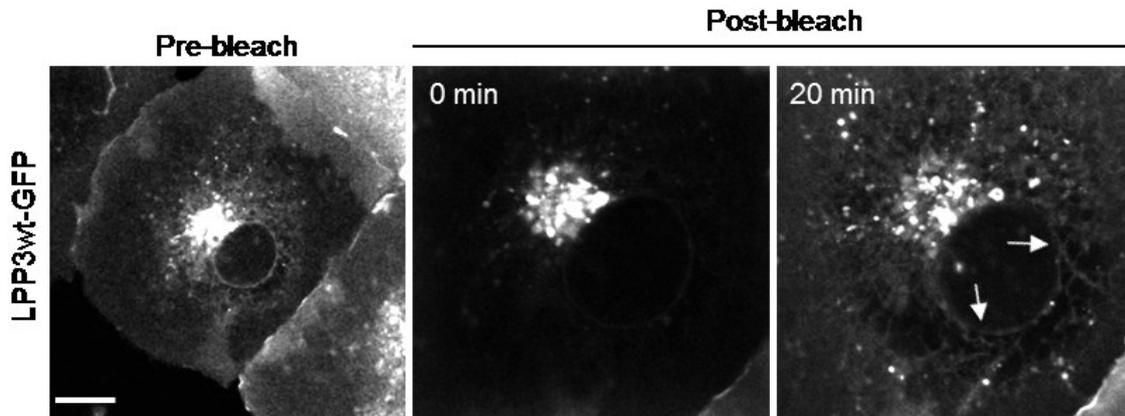
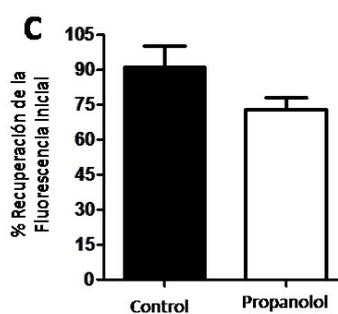
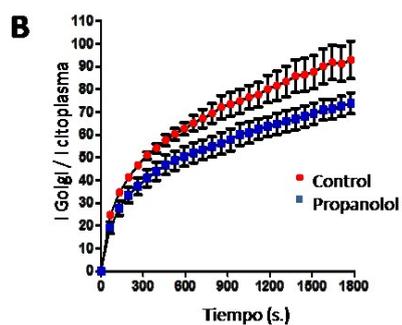
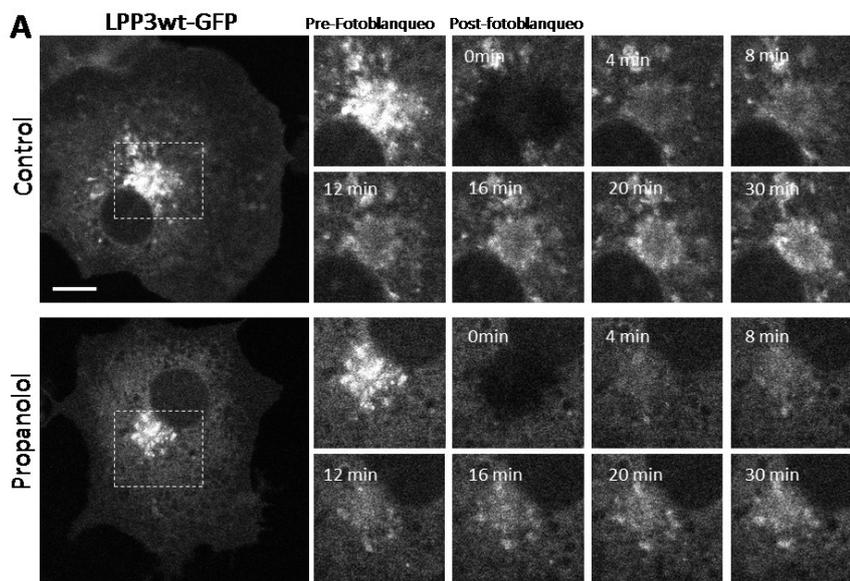


Figura 7. Transporte retrogrado de la LPP3. Células COS-7 se transfectoron con la hLPP3wt-GFP. Tras aproximadamente 20 horas de expresión añadimos cicloheximida a las células, momento en el que fotoblanqueamos la fluorescencia fuera del área del Golgi. En la imagen se muestra el marcaje de hLPP3wt-GFP en los momentos previos al apagado de la fluorescencia, justo después del fotoblanqueo y tras 20 minutos. Las flechas señalan la recuperación del marcaje asociado a la envoltura nuclear, indicativo de la llegada de la proteína al RE. Barra, 10 μ m.



RESULTADOS

Figura 8. Análisis del transporte de LPP3 en presencia de propanolol. (A). En células COS-7 medimos la recuperación de la fluorescencia asociada al Golgi tras fotoblanqueo en condiciones control (paneles superiores y magnificaciones de la derecha) y de tratamiento con propanolol (paneles inferiores y magnificaciones de la derecha). En las magnificaciones podemos observar un retraso en la recuperación de la fluorescencia asociada al Golgi a lo largo del tiempo en las células tratadas con propanolol. (B) Análisis cuantitativo de la recuperación de la fluorescencia en el Golgi en las células control y tratadas con propanolol. Cada valor en la escala temporal es el resultado porcentual de la ratio entre la fluorescencia del área fotoblanqueada (Golgi) y la fluorescencia del área del citoplasma, respecto la ratio de ambos valores (fluorescencia del Golgi y fluorescencia del citoplasma) en los momentos previos al bleach. (C) Promedio del porcentaje de fluorescencia que se recupera en las células control y tratadas con propanolol. Las gráficas representan la media \pm s.e.m de 5 células (control y tratadas con propanolol). Barras 10 μ m.

3. La inhibición de la actividad PAP regula la formación de túbulos asociados a las membranas del compartimento intermedio.

Para profundizar en la importancia de la actividad de las PAP en la formación de intermediarios de transporte entre el RE y el Golgi, analizamos los efectos del propanolol en el transporte de la proteína de compartimento intermedio ERGIC-53-GFP. Células HeLa se transfectaron con un plásmido que codifica para la proteína ERGIC-53-GFP y tras aproximadamente 20-24 horas de expresión, las incubamos a 15°C por espacio de 1 hora. A continuación incubamos las células a 37°C, momento en el que iniciamos un registro por microscopía confocal *in vivo* de las estructuras marcadas con ERGIC53-GFP. De forma consistente con lo publicado en trabajos previos (Ben-Tekaya et al., 2004), justo tras el cambio de temperatura observamos la acumulación de ERGIC-53-GFP en estructuras puntiformes estáticas y de tamaño superior al observado en condiciones fisiológicas. Sin embargo, durante los primeros instantes tras el cambio de temperatura, pudimos ver la formación de intermediarios de transporte de morfología túbulo-vesicular surgiendo de las estructuras puntiformes iniciales. Al poco tiempo encontramos la mayor parte del marcaje de ERGIC53-GFP asociado a estructuras de movilidad rápida, morfología transitoria entre puntiforme y tubular (sin aparente direccionalidad hacia el Golgi o el RE) y a menudo presentando procesos de fusión y fisión con otras estructuras tanto móviles como estáticas (**Fig. 9A** y **película 2**). Contrariamente a lo observado en condiciones control, al añadir propanolol al medio durante los 5 últimos minutos de incubación a 15°C, tras el cambio a 37°C no observamos la formación de túbulos. En estas condiciones, la proteína permaneció acumulada en las estructuras puntiformes engrosadas y de escasa movilidad

RESULTADOS

que observamos a 15°C (**Fig. 9B** y **película 3**). Posteriormente, al retirar el propanolol volvieron a formarse túbulos (**Fig. 9C** y **película 4**).

Estos resultados indican que la actividad catalítica de las proteínas de la familia de las PAP regula la morfología y la formación de intermediarios de transporte desde el ERGIC.

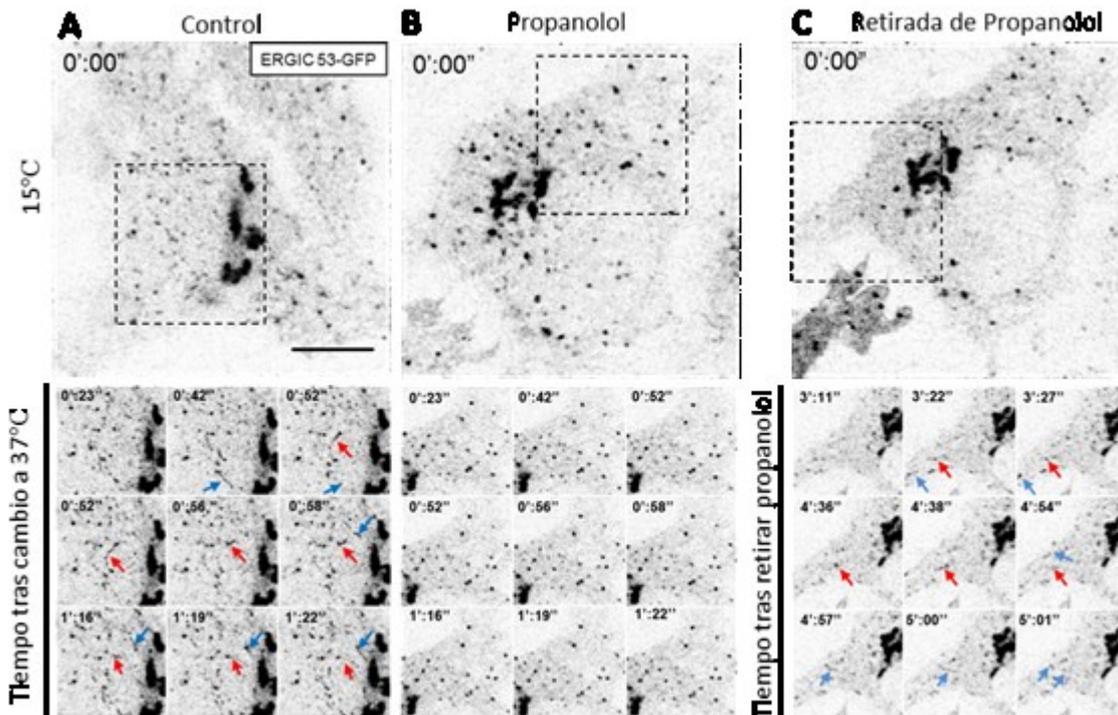


Figura 9. Inhibición de la tubulación del ERGIC en células tratadas con propanolol. Imágenes obtenidas de las películas adjuntas 2, 3 y 4. Células HeLa transfectadas con ERGIC53-GFP se incubaron a 15°C por 1 hora (A) tras lo que las pasamos a 37°C iniciando un registro del movimiento de las partículas marcadas con ERGIC53-GFP a lo largo del tiempo (A y magnificaciones). En el caso de la células tratadas con propanolol (panel B y magnificaciones), la droga se añadió durante los últimos 5 minutos del tiempo de incubación a 15°C, estando presente durante todo el tiempo de la grabación. Comparativamente podemos observar una inhibición casi total de la tubulación del ERGIC en las células tratadas con propanolol. Tras retirar el propanolol del medio (C y paneles) observamos una recuperación progresiva de la formación de túbulos a lo largo del tiempo. Barra, 10 μ m.

4. Silenciamiento de la LPP3 y efectos sobre la tubulación del compartimento intermedio.

Teniendo en cuenta la localización a nivel de ERGIC de la LPP3 endógena, y que la inhibición de la actividad de las PAP mediante el uso de propanolol dio como resultado un bloqueo de la tubulación asociada al compartimento intermedio, nuestro siguiente paso fue averiguar si este efecto se debía a una inhibición de la actividad de LPP3. Con

RESULTADOS

este objetivo silenciamos la expresión de LPP3 en dos líneas celulares distintas: Swiss3T3 (silenciamiento por infección lentiviral de shRNAs) y HeLa (silenciamiento por transfección de siRNAs).

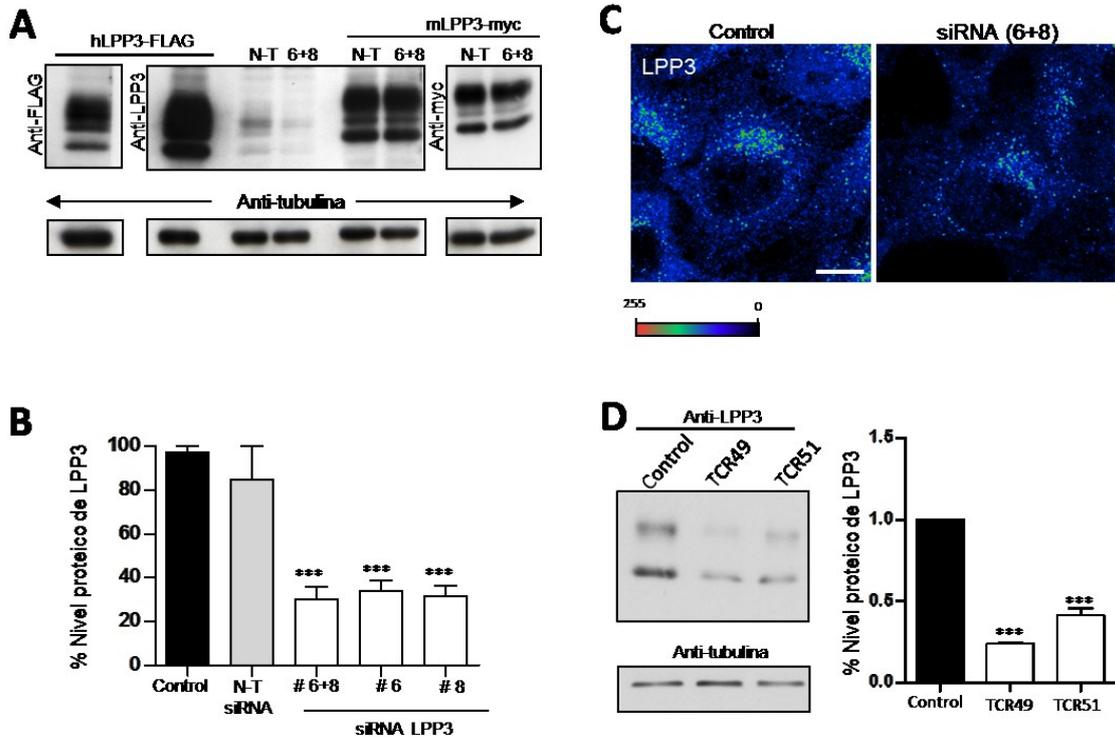


Figura 10. Silenciamiento de la LPP3. (A) Lisados de células HeLa transfectedas con: a) hLPP3wt-FLAG, b) siRNAs inespecificas (non-traget pool, N-T) o dirigidas contra la LPP3 humana (combinación de oligonucleótidos n°6 y n°8) y c) siRNAs N-T o 6+8 más transfección con la mLPP3wt-myc. Los lisados se analizaron por inmunoblot con anticuerpos anti-LPP3, anti-FLAG y anti-myc. (B) Análisis cuantitativo de los niveles de LPP3 en células HeLa control (sometidas al protocolo de transfección sin añadir ninguna secuencia de siRNA), transfectedas con siRNAs inespecificas (N-T), transfectedas con los siRNAs de LPP3 n°6 y n°8, y transfectedas con una combinación de ambos tras 72 horas de silenciamiento (media \pm s.e.m, *** $p \leq 0,001$). (C) Células HeLa control y transfectedas con los siRNAs de LPP3 (6+8), teñidas con anti-LPP3 tras 72 horas de silenciamiento. En la imagen podemos observar cómo la transfección de los siRNAs de LPP3 produce una disminución del marcaje de LPP3. (D) Lisados de células swiss3T3 se obtuvieron tras 96 horas de la infectar las células con lentivirus vacíos (control), o conteniendo dos secuencias de shRNAs (TCR49 y TCR51) contra la LPP3 y se analizaron por inmunoblot con anti-LPP3 (media \pm s.e.m. *** $p \leq 0,001$). La cuantificación de los niveles de LPP3 en las diferentes condiciones ensayadas se muestra en la gráfica de la derecha.

En células HeLa, al transfectar individualmente o en combinación 2 secuencias de siRNA dirigidas contra la secuencia codificante de la LPP3 humana, obtuvimos un nivel de silenciamiento de la proteína del 70% (Fig. 10A y 10B). Como control de

RESULTADOS

especificidad de nuestro anticuerpo, utilizamos lisados de células HeLa previamente transfectadas con un plásmido codificante de la hLPP3wt unida a un tag FLAG. En la **figura 10A**, se muestra cómo nuestro anticuerpo reconoce la LPP3 ectópicamente expresada, obteniendo el mismo patrón de bandas cuando empleamos un anticuerpo anti-FLAG. En la misma figura, también vemos cómo la LPP3 endógena disminuye tras 72 horas de la transfección con los siRNAs. Al analizar el silenciamiento por inmunocitoquímica, también obtuvimos una disminución general, si bien no completa, del marcaje de LPP3 (**Fig. 10C**). Finalmente, transfectamos una forma murina de LPP3 (mLPP3-myc) en células HeLa previamente transfectadas con los siRNAs contra la secuencia humana de la proteína. Tras 24 horas de expresión, lisamos las células y analizamos el contenido de LPP3 por inmunoblot con anticuerpos anti-LPP3 y anti-myc. En la **figura 10A** mostramos que la transfección de los siRNAs dirigidos contra la secuencia humana de LPP3 no afecta a la expresión de la forma murina. Este resultado, por una parte demuestra la especificidad de los siRNAs empleados, y por la otra da validez a la forma murina de la LPP3 en experimentos de rescate (ver más adelante).

Respecto al silenciamiento por infección lentiviral de shRNAs en células Swiss3T3, obtuvimos resultados similares a los mostrados en células HeLa (**Fig. 10D**).

Como primera aproximación al estudio de la función de LPP3 en la regulación de la formación de intermediarios de transporte entre el RE y el Golgi, estudiamos los efectos del silenciamiento sobre la tubulación del ERGIC. Para ello, transfectamos células HeLa con los siRNAs de LPP3 y como control utilizamos un combinado de secuencias de siRNA inespecíficas (*non-target pool*) o bien células transfectadas sin añadir ninguna secuencia de siRNA (“células mock transfectadas”). Las células se incubaron a 15°C durante 30 minutos y luego las pasamos a 37°C durante 10 minutos, tiempo suficiente para observar la aparición de estructuras tubulares tras liberar el bloqueo de temperatura. A continuación, fijamos las células e hicimos inmunocitoquímica con anticuerpos anti-KDELr. Observamos que las células silenciadas presentaban un menor número de estructuras tubulares teñidas con KDELr (**Fig. 11A**, cuantificación en **11B**).

Para comprobar que la inhibición de la tubulación causada por el silenciamiento de LPP3, no fuese consecuencia de una alteración en el citoesqueleto de microtúbulos, comprobamos su estado empleando anticuerpos anti- α III tubulina tanto en células HeLa

RESULTADOS

control como en células silenciadas para LPP3. Ni el silenciamiento de LPP3 ni los cambios de temperatura causaron alteraciones significativas en la integridad del citoesqueleto de microtúbulos (Fig. 11C).

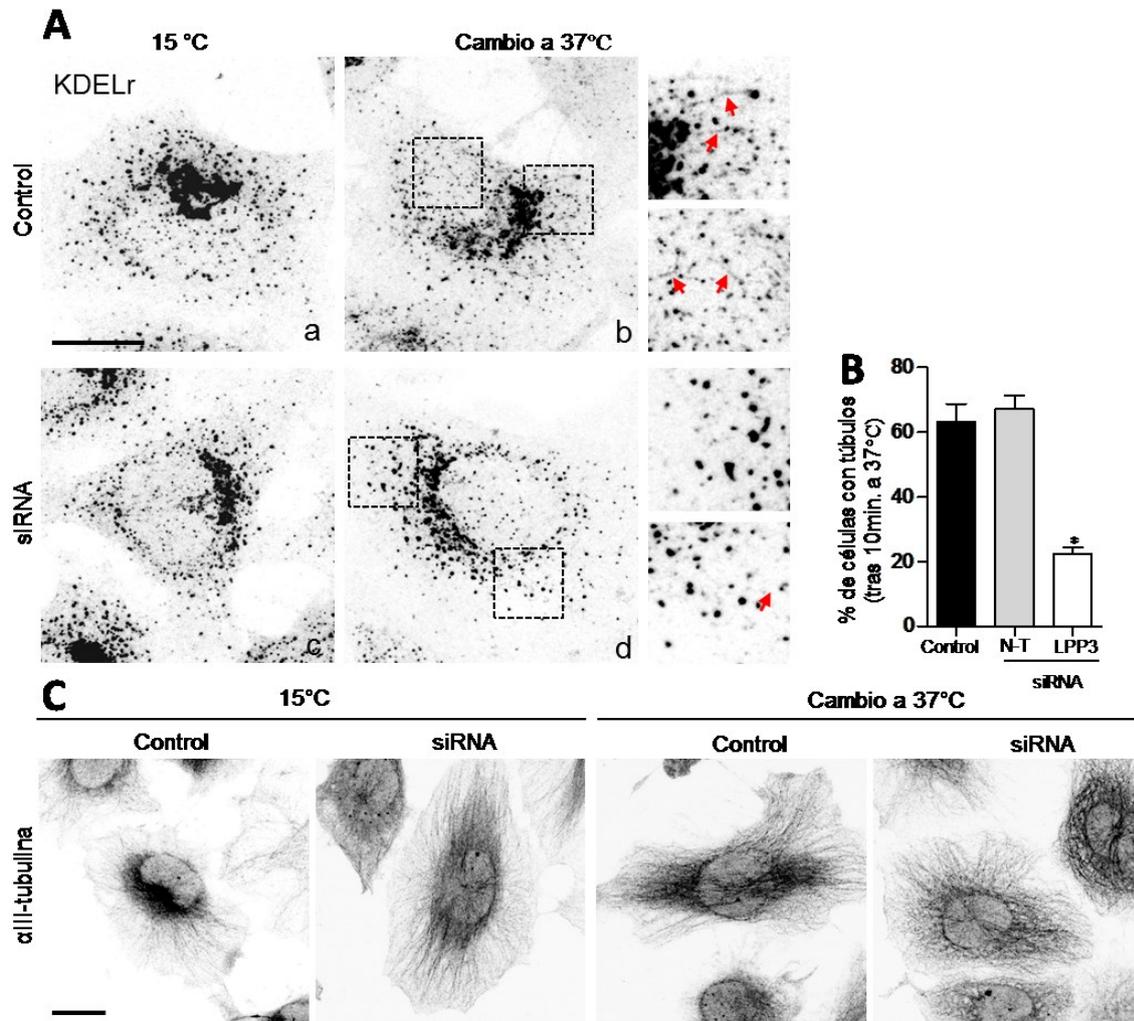


Figura 11. El silenciamiento de LPP3 inhibe la tubulación del ERGIC. (A) Células HeLa control y silenciadas para LPP3 se incubaron a 15°C durante 30 minutos (a y c) y después a 37°C por 10 minutos (b y d). A continuación se fijaron y tiñeron con anti-KDELr. En las magnificaciones de los paneles b y d podemos ver cómo las células control exhiben numerosas estructuras de morfología tubular (ver flechas) que no aparecen en las células silenciadas. (B) Análisis cuantitativo del porcentaje de células control (sometidas al protocolo de transfección sin añadir siRNAs), transfectadas con los siRNAs inespecíficos (N-T), o transfectadas con los siRNAs de LPP3 (6+8) exhibiendo tubulación del ERGIC (media \pm s.e.m., * $p \leq 0,05$). (C) Células HeLa control y silenciadas se sometieron al mismo protocolo de cambios de temperatura, se fijaron en metanol y se tiñeron con anti- α III tubulina. No se observan diferencias en la integridad del citoesqueleto de microtúbulos entre las células control y las silenciadas, ni tampoco entre las células fijadas tras el tiempo de incubación a 15°C y después de 10 minutos de cambiarlas a 37°C. Barras, 10 μ m.

RESULTADOS

Por último, en un estudio anterior realizado en nuestro laboratorio demostramos que el efecto del propranolol en la formación de intermediarios de transporte, está directamente relacionado con una disminución del contenido de DAG en el Golgi (Fernández-Ulibarri et al., 2007). Los efectos del propranolol pueden revertirse añadiendo exógenamente un análogo de DAG (2-dioctanoil-sn-glicerol (DOG)), cuya estructura de ácidos grasos de cadena corta permite su internalización hasta compartimentos de membrana intracelulares. Profundizando en la relación entre la actividad catalítica de LPP3 y su función en el ERGIC, repetimos el experimento de tubulación en células control y silenciadas, pero añadiendo DOG durante los 10 últimos minutos de incubación a 15°C. La adición de DOG en las células silenciadas produjo un incremento significativo de la tubulación asociada al ERGIC (**Fig. 12**). Este resultado permite establecer una conexión entre los efectos del silenciamiento y la actividad catalítica de LPP3, más concretamente con su función en la regulación del metabolismo del DAG. A modo de resumen, el conjunto de estos resultados indica que la LPP3 participa en la formación de túbulos desde el ERGIC, y que este efecto está asociado a la formación de DAG.

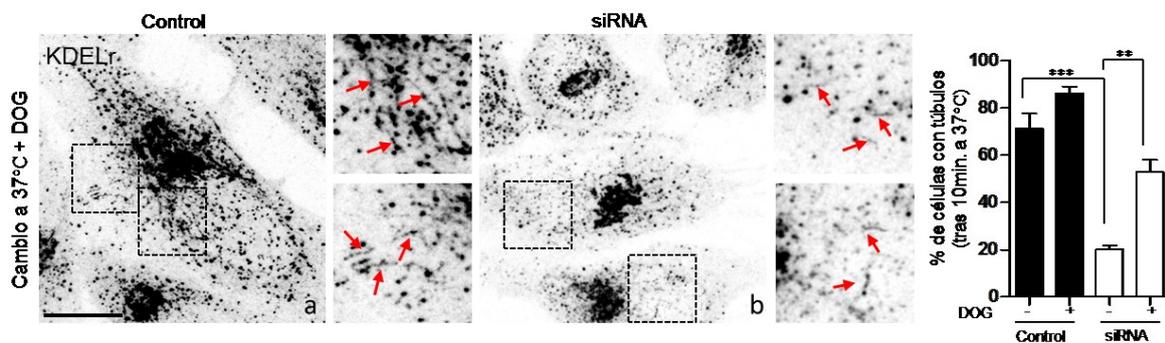


Figura 12. El DOG revierte los efectos del silenciamiento de LPP3 sobre la tubulación del ERGIC. Células HeLa control y silenciadas con los siRNAs de LPP3 se incubaron a 15°C durante 30 minutos, añadiendo en los últimos 5 minutos del tiempo de incubación DOG. A continuación se pasaron a 37°C por 10 minutos, se fijaron y se tiñeron con anti-KDELr. La adición de DOG incrementa el porcentaje de células silenciadas mostrando tubulación del ERGIC (media \pm s.e.m., $p \leq **0,01$; $***p \leq 0,001$). Barras 10 μ m.

5. La LPP3 no está implicada en el transporte anterógrado entre el RE y el Golgi

Nuestro siguiente paso fue examinar si la inhibición de la tubulación del compartimento intermedio causada por el silenciamiento de LPP3 conllevaba algún tipo de alteración en el tráfico anterógrado entre el RE y el Golgi. Con este objetivo utilizamos dos marcadores ampliamente empleados en estudios de transporte en la vía secretora: la

RESULTADOS

proteína transmembrana VSV-G y la proteína luminal ssDsRed (soluble signal sequence-tagged DsRed). Células HeLa constitutivamente expresando la proteína VSV-G unida a GFP, control y silenciadas para LPP3, se incubaron a 40°C durante toda la noche para acumular el VSV-G en el RE. A continuación incubamos las células a 32°C, obtuvimos lisados de las células control y silenciadas tras diferentes tiempos y los sometimos a un test de resistencia a la enzima Endo H. En este ensayo, las proteínas que llegan al Golgi y completan su glicosilación presentan resistencia a EndoH y una menor movilidad electroforética, mientras que las proteínas que no alcanzan el Golgi y por tanto no finalizan su glicosilación son sensibles a la acción de la EndoH y presentan mayor movilidad electroforética. En la **figura 13** podemos ver cómo la dinámica de adquisición de resistencia a EndoH se produjo al mismo tiempo en las células control y en las silenciadas, lo que es demostrativo de que el silenciamiento de LPP3 no impide el transporte entre el RE y el Golgi ni tampoco el transporte intra-Golgi (cis / medial).

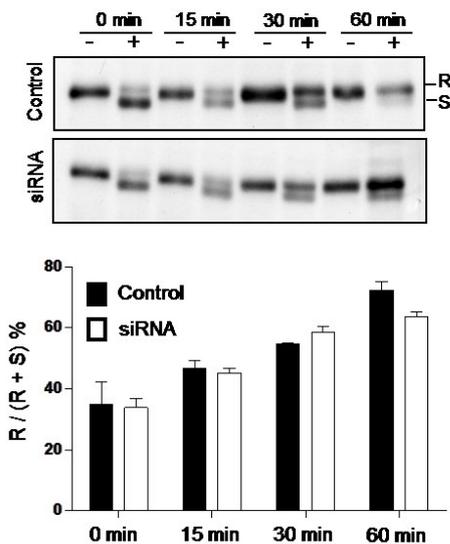


Figura 13. El silenciamiento de LPP3 no afecta el transporte anterógrado entre el RE y el Golgi del VSV-G. Células HeLa establemente expresando la proteína VSV-G-GFP control y silenciadas para LPP3 se incubaron a 40°C durante las últimas 24 horas del protocolo de silenciamiento. A continuación las células se incubaron a 33°C en presencia de cicloheximida y obtuvimos lisados celulares tras diferentes tiempos del cambio de temperatura. Cada lisado se sometió al protocolo de digestión por la enzima EndoH, tras lo que procesamos las muestras por inmunoblot con anti-GFP. En la figura podemos observar cómo el ratio entre la fracción de VSV-G-GFP resistente a EndoH respecto la proteína total no varía entre las células control y las silenciadas a los diferentes tiempos analizados (media \pm s.e.m. N=2).

En nuestro segundo ensayo, cotransfectamos células HeLa control y silenciadas con plásmidos codificando las proteínas ssDsRed y ERGIC53-GFP. Sincronizamos el transporte del ssDsRed desde el ERGIC incubando las células durante 2 horas a 15°C. Tanto en células control como en las silenciadas pudimos observar el ssDsRed acumulado en estructuras puntiformes citoplasmáticas. Por el contrario, al pasar las células a 37°C, se produjo una disminución de estructuras puntiformes, aumentando paralelamente el marcaje en el Golgi (**Fig. 14A**). Medimos el porcentaje de

RESULTADOS

colocalización del ssDsRed con ERGIC53-GFP respecto al marcaje total de ssDsRed (excluyendo el área del Golgi), pero no hubo diferencias entre las células control y las silenciadas (**Fig. 14D**). Sin embargo, el porcentaje de colocalización de ERGIC53-GFP con el ssDsRed respecto al marcaje total de ERGIC53-GFP (exceptuando el área perinuclear correspondiente al Golgi) fue significativamente superior en las células silenciadas (**Fig. 14B**, paneles e y f y magnificaciones; cuantificación en **Fig. 14C**). Este resultado se correlacionaba con una disminución del número de estructuras puntiformes marcadas con ERGIC53-GFP así como con un incremento de su diámetro medio, sugiriendo que de la depleción de LPP3 induce un cambio en la morfología del compartimento intermedio (**Fig. 14E y 14F**).

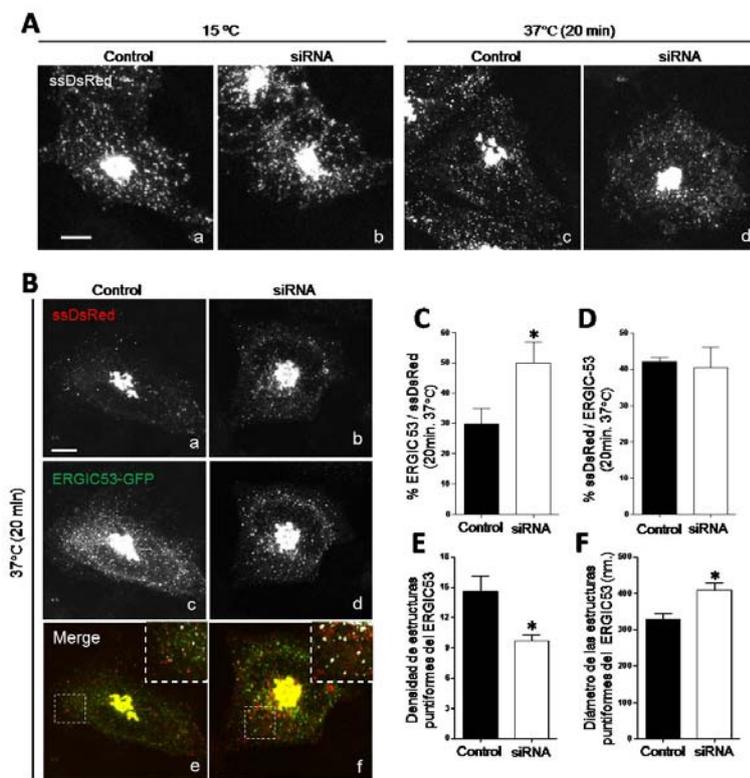
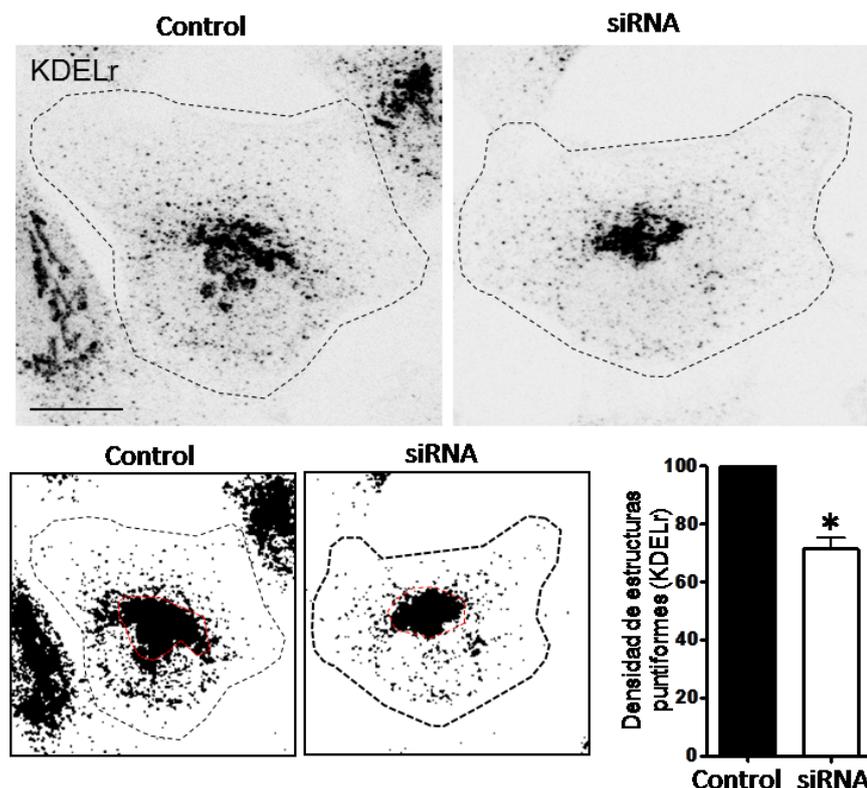


Figura 14. El silenciamiento de LPP3 altera la morfología del ERGIC sin impedir la salida de cargo del ERGIC al Golgi. (A). Células HeLa control y silenciadas para LPP3 se cotransfectaron con los plásmidos codificando la proteína secretora ssDsRed y la proteína ERGIC53-GFP durante las últimas 24 horas del protocolo de silenciamiento. Las células se incubaron a 15°C por 2 horas y luego se pasaron a 37°C por 20 minutos. (A) Tras la incubación a 15°C el patrón de marcaje del ssDsRed se encuentra principalmente en el Golgi, así como en estructuras puntiformes citoplasmáticas. Tras el cambio de temperatura observamos una disminución del número de estructuras puntiformes.

(B) Imágenes representativas de la distribución de ssDsRed en relación a ERGIC53-GFP en células control y silenciadas. En los paneles c y d destaca una disminución del número de estructuras puntiformes marcadas con ERGIC53-GFP en las células silenciadas siendo éstas de mayor tamaño. En los paneles e y f destaca un incremento de la colocalización de ERGIC53-GFP con el ssDsRed (ver magnificaciones de la región encuadrada), sin embargo en ambos casos el marcaje de ssDsRed se encuentra mayoritariamente fuera del ERGIC. (C) Porcentaje de colocalización de ERGIC53-GFP respecto ssDsRed. (D) Porcentaje de colocalización de ssDsRed respecto ERGIC53-GFP. (E) Densidad de estructuras puntiformes de ERGIC53-GFP. (F) Diámetro promedio de las estructuras puntiformes marcadas con ERGIC53-GFP. Las gráficas C, E y F muestran que el silenciamiento de LPP3 causa un incremento de la colocalización de ERGIC53-GFP con ssDsRed que se acompaña con una disminución del número de estructuras puntiformes y un incremento de su diámetro promedio. Sin embargo, el porcentaje de colocalización de ssDsRed con ERGIC53-GFP no muestra variaciones (F), indicativo de que el ssDsRed abandona el ERGIC a una dinámica similar en las células control y silenciadas. Media \pm s.e.m., * $p \leq 0,05$. Barras, 10 μ m

RESULTADOS



*Figura 15. La densidad de partículas del KDELr disminuye al silenciar LPP3. Células HeLa control y silenciadas para LPP3 se fijaron y tiñeron con anti-KDELr. En la figura mostramos cómo en condiciones basales las células silenciadas para LPP3 presentan una disminución de la densidad de estructuras puntiformes (número de partículas dividido por área de la célula, excluyendo el Golgi) marcadas con KDELr. Media \pm s.e.m., * $p \leq 0,05$. Barra, 10 μ m.*

A modo de confirmación, medimos en condiciones fisiológicas (es decir, sin manipulación de temperatura) la densidad de estructuras puntiformes del compartimento intermedio en células control y silenciadas. De acuerdo con los resultados previos, se produjo una disminución de la densidad de estructuras puntiformes marcadas con el KDELr en las células silenciadas (**Fig. 15**).

En referencia a este resultado, se ha descrito que el silenciamiento de algunas proteínas que actúan como receptores transmembrana en el compartimento intermedio impide el reclutamiento de β -COP, causando alteraciones morfológicas en el ERGIC similares a las aquí descritas, es decir, disminución del número de estructuras puntiformes (Mitrovic et al., 2008). En base a esto, examinamos la distribución de β -COP en células HeLa control y silenciadas para LPP3. Ni la incubación a 15°C (1h), ni el paso de las células a 37°C (10 minutos), produjo diferencia alguna en cuanto a la localización de β -COP1 en el ERGIC y el Golgi (**Fig. 16**).

RESULTADOS

El conjunto de estos resultados indica que la LPP3 participa en el mantenimiento de la estructura y la formación de intermediarios de transporte desde el ERGIC, pero no en el transporte anterógrado entre el RE y el Golgi.

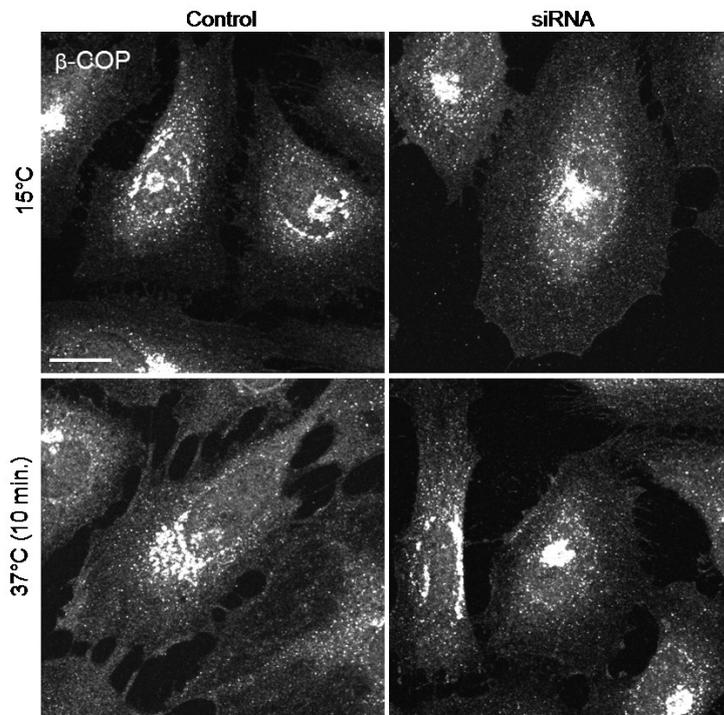


Figura 16. El silenciamiento de LPP3 no produce alteraciones en el reclutamiento del COPI. Células HeLa control y silenciadas para LPP3 se incubaron a 15°C por 1 hora y seguidamente a 37°C por 10 minutos. Las células se fijaron en metanol a y se tiñeron con anti-βCOPI. Podemos observar cómo no existen diferencias aparentes en la distribución del βCOPI a nivel del Golgi ni de las estructuras puntiformes correspondientes al ERGIC entre las células control y silenciadas. Igualmente, no observamos diferencias entre las diferentes temperaturas de incubación (15°C y 37°C). Barra, 10µm.

6. La LPP3 participa en el transporte retrógrado del Golgi al RE

Una vez caracterizado el papel de la LPP3 en las etapas más tempranas de la vía secretora, y basándonos en la localización parcial de la LPP3 endógena y sobreexpresada a nivel del Golgi, pasamos a estudiar la función de la LPP3 en la estructura del Golgi así como en la formación de intermediarios de transporte del Golgi al RE (transporte retrógrado).

Al igual que hicimos en el estudio sobre el ERGIC, analizamos en primer lugar la tubulación del Golgi. Se ha publicado que la incubación de las células a 15°C induce la formación de estructuras tubulares desde el Golgi estando enriquecidas en proteínas Rab (Rab6) y SNAREs (Gos28 y GS15) (Martínez-Alonso et al., 2007). Células HeLa que expresaban niveles moderados de la proteína de fusión Rab6-GFP se incubaron a 15°C por espacio de 1 hora. Tras este tiempo, pasamos las células a 37°C e iniciamos una grabación del Rab6-GFP por microscopía confocal *in vivo*. Justo en los instantes

RESULTADOS

iniciales tras el cambio de temperatura, pudimos ver estructuras tubulares y puntiformes de Rab6-GFP tanto en el citoplasma como asociadas al Golgi. La mayor parte de los túbulos iniciales se fisionaron rápidamente tras el cambio de temperatura, dando lugar a la formación de intermediarios de transporte de morfología vesicular. A lo largo del tiempo de grabación, observamos la salida de nuevas vesículas desde el Golgi, la mayor parte dirigidas principalmente hacia la periferia de la membrana, en donde se ha descrito que se produce su entrada en el RE (White et al., 1999) (**Fig. 17** y **película 5**). Al añadir propanolol justo en el momento de efectuar el cambio de temperatura, pudimos ver una disminución notable de la salida de vesículas de Rab6-GFP desde el Golgi así como que los túbulos adquirirían una mayor longitud (**Fig. 17** y **película 5**).

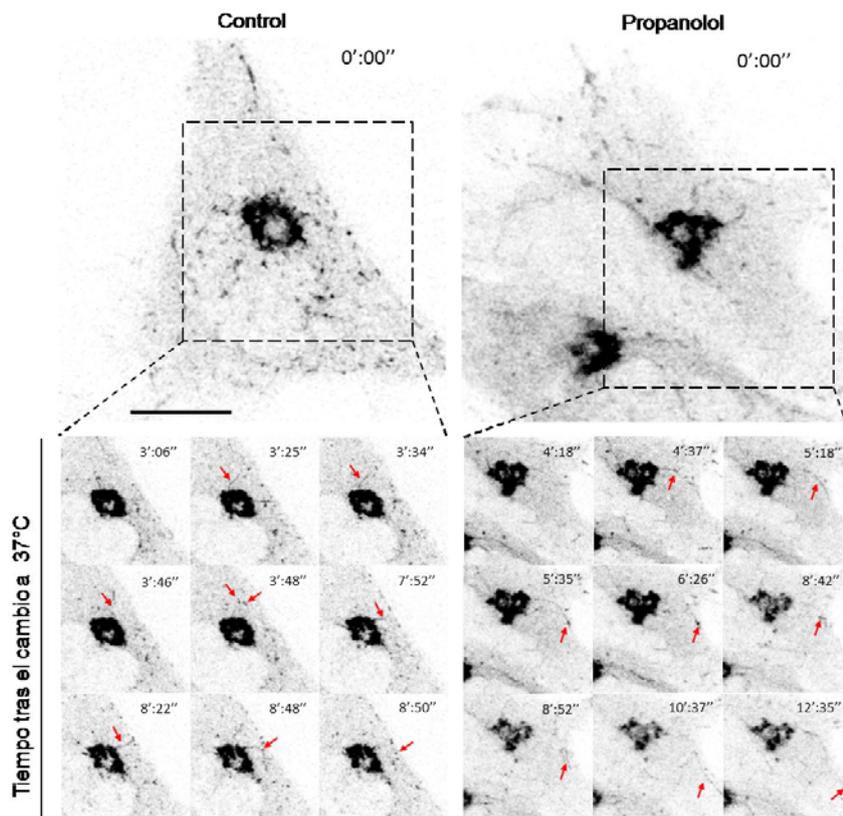


Figura 17. El propanolol altera la formación de intermediarios de transporte Rab6. Imágenes extraídas de la película 5. Células HeLa establemente transfectadas con Rab6-GFP se incubaron a 15°C por 1 hora, tras lo cual iniciamos un registro de la formación y movimiento de los intermediarios de transporte marcados con Rab6-GFP en condiciones control (panel de la izquierda y magnificaciones debajo) y de tratamiento con propanolol (panel de la derecha y magnificaciones debajo). Las flechas de las imágenes correspondientes a la secuencia temporal señalan intermediarios de transporte saliendo del Golgi. En las células tratadas con propanolol podemos observar cómo las estructuras tubulares adquieren una mayor longitud que en las células control, tardando más en producirse su fisión desde el Golgi. Barra, 10µm.

RESULTADOS

A continuación estudiamos si el silenciamiento de LPP3 podía afectar a la formación de intermediarios de transporte de Rab6. Siguiendo el mismo protocolo, células HeLa que expresaban constitutivamente Rab6-GFP, control y silenciadas, se incubaron a 15°C para acumular vesículas y túbulos marcados con Rab6-GFP en el citoplasma. Tras este periodo de incubación, no observamos diferencias aparentes entre las células control y las silenciadas (**Fig. 18A**, paneles a y c). Sin embargo, tras pasar las células nuevamente a 37°C, las células silenciadas presentaron una menor densidad de partículas Rab6-GFP (vesículas y túbulos) en el citoplasma (**Fig. 18B**), un menor número de túbulos por célula (**Fig. 18C**) y un incremento de la longitud promedio de dichos túbulos (**Fig. 18D**). El conjunto de estos resultados es indicativo de que la LPP3 participa en la formación y salida de intermediarios de transporte de Rab6 desde el Golgi.

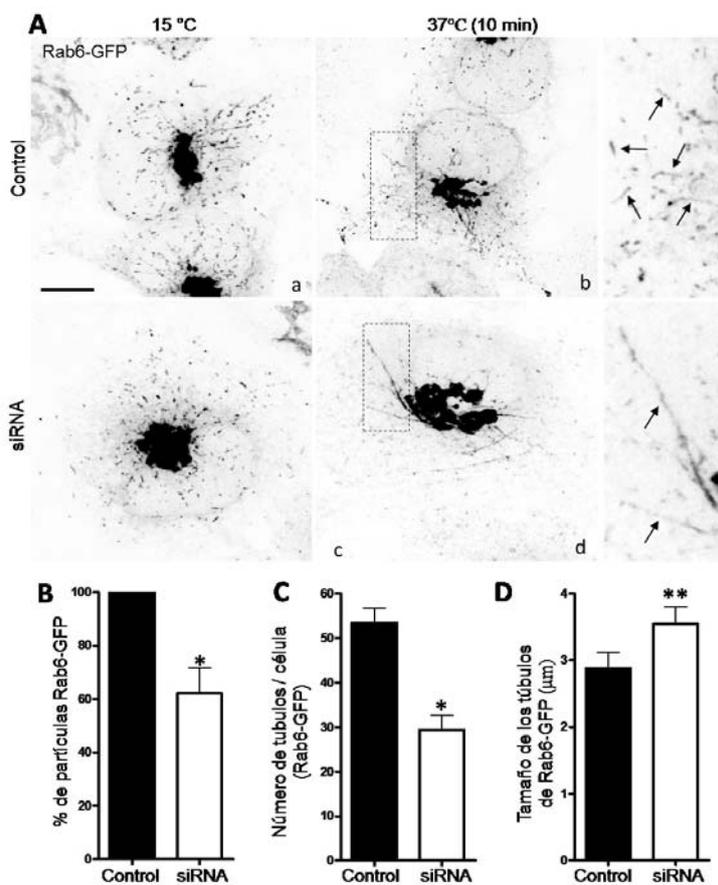


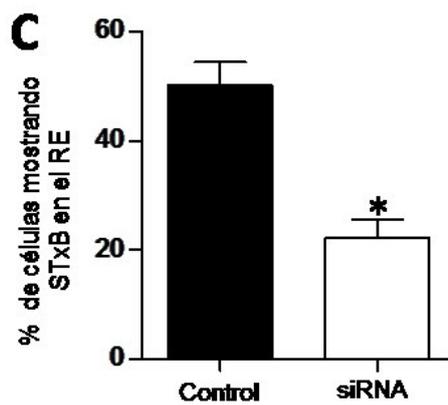
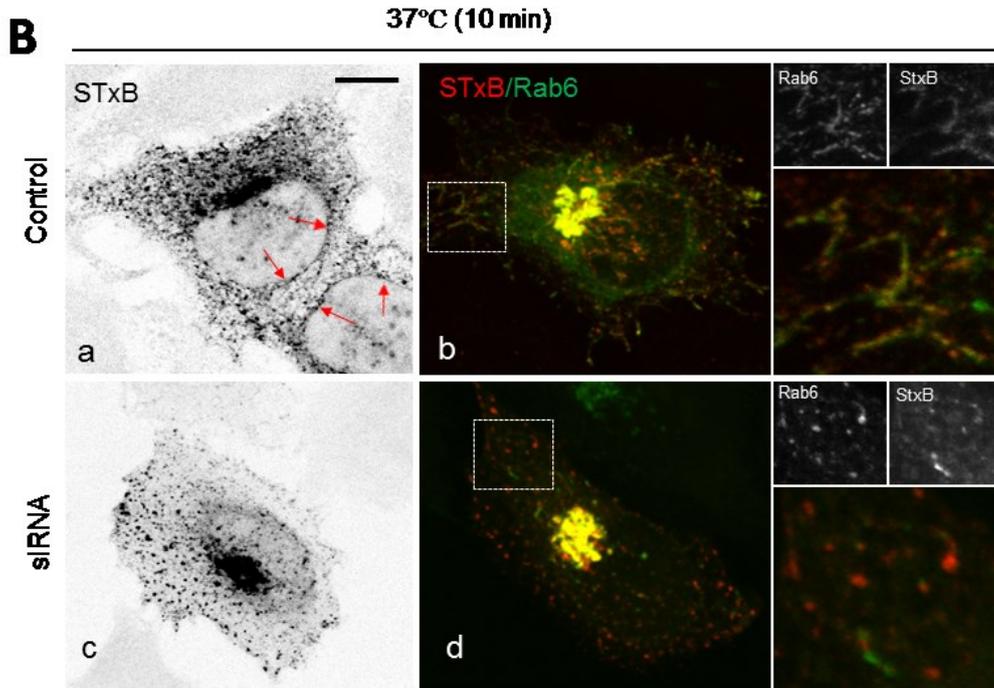
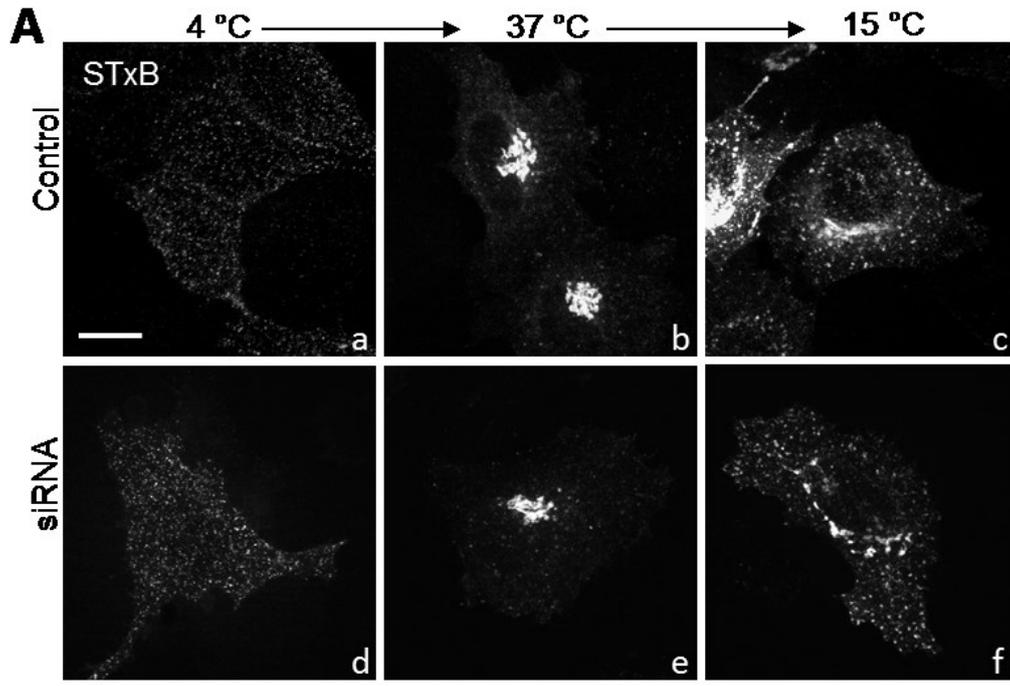
Figura 18. El silenciamiento de LPP3 disminuye la formación de intermediarios de transporte Rab6. (A) Células HeLa establemente expresando Rab6-GFP control y silenciadas para LPP3 se incubaron a 15°C por 1 hora (paneles a y c) y se pasaron a 37°C por 10 minutos (paneles b y d). Las cuantificaciones que aparecen en B, C y D corresponden a los 10 minutos de incubación a 37°C. (B) Número de intermediarios de transporte marcados con Rab6-GFP en las células silenciadas respecto las células control. (C) Cuantificación del número de túbulos de Rab6-GFP por célula. (D) Longitud promedio de los túbulos de Rab6-GFP. Colectivamente las células silenciadas presentan un número inferior de partículas Rab-6 (B) y del número de túbulos (C), acompañado de un incremento de la longitud de éstos (D). Media \pm s.e.m., * $p \leq 0,05$. Barra 10µm.

Para comprobar esta hipótesis estudiamos el tráfico del Golgi al RE de una proteína cuyo transporte retrógrado es dependiente de Rab6: la subunidad B de la Shiga toxin

RESULTADOS

unida al fluoróforo Cy3 (STxB-Cy3). Células HeLa Rab6-GFP control y silenciadas se incubaron a 4°C con la STxB-Cy3 (**Fig. 19A**, paneles a y d), permitiendo la unión de la toxina a su receptor de membrana (el glicosfingolípido Gb3). Tras retirar la toxina no unida a membrana reemplazando el medio, pasamos las células a 37°C durante 2 horas, tiempo suficiente para que se produjese la llegada de la STxB-Cy3 al Golgi. En la **figura 19A** (paneles b y e) mostramos que la internalización hasta el Golgi se produjo de forma simultánea en las células control y las silenciadas. A continuación incubamos las células a 15°C por espacio de 1 hora, sincronizando el transporte de la STxB-Cy3 entre el Golgi y el RE. En este punto pudimos ver un cambio en la distribución de la STxB, que pasó a verse tanto en el Golgi como en estructuras vesiculares distribuidas por el citoplasma (**Fig. 19A**, c y f). Tras pasar a 37°C, en las células control observamos una rápida desaparición del marcaje en vesículas, al tiempo que observamos la aparición de un marcaje de RE (evidente por la tinción de la envoltura nuclear) (**Fig. 19B**, panel a). Sin embargo, en las células silenciadas la localización de la STxB-Cy3 en el RE fue significativamente inferior, y en la mayoría de las células la STxB-Cy3 permaneció retenida en el Golgi y en las estructuras vesiculares formadas tras la incubación a 15°C (**Fig. 19B**, panel c, cuantificación en **19C**). También resulta interesante que en las células control en ocasiones observamos colocalización de Rab6-GFP con la STxB en intermediarios de transporte (vesículas y túbulos), especialmente en regiones próximas a la periferia celular (**Fig. 19B**, panel b). Sin embargo, en las células silenciadas, en concordancia con la disminución de vesículas y túbulos Rab6-GFP positivos (**Fig. 18B**), la mayor parte de las estructuras vesiculares marcadas con STxB mostraron un bajo nivel de colocalización con Rab6-GFP (**Fig. 19B**, panel d). Para comprobar que los defectos en el transporte dependiente de Rab6 no eran inespecíficos, al cabo de 48h de haber transfectado con los siRNAs de LPP3, las células se transfectaron de nuevo con un plásmido codificante para la forma murina de la LPP3 (mLPP3wt-myc). Ya mostramos anteriormente que la expresión de la mLPP3wt-myc no se veía afectada por los siRNAs contra la forma humana (**Fig. 10A**). Tras 72 horas de silenciamiento (las últimas 20 horas expresando la mLPP3-myc) sometimos a las células al protocolo de internalización de la STxB empleado anteriormente, y vimos que la sobreexpresión de mLPP3-myc rescató el defecto en el transporte hasta el RE de la STxB-cy3 (**figura 20**).

RESULTADOS



RESULTADOS

Figura 19. El silenciamiento de LPP3 retrasa el transporte retrógrado del Golgi al RE de la STxB. (A) Células HeLa establemente expresando Rab6-GFP control y silenciadas para LPP3 se incubaron a 4°C por 15 minutos en presencia de la STxB-cy3 (a y d). Tras este tiempo retiramos el medio con la toxina, lo reemplazamos por DMEM fresco, e incubamos las células a 37°C por 2 horas (b y d) seguido de 1 hora a 15°C (e y f). A este tiempo no observamos diferencias en la distribución subcelular de la STxB entre las células control y las silenciadas. (B) Tras la incubación a 15°C, las células se incubaron nuevamente a 37°C por 10 minutos. A este tiempo observamos una mayor proporción de células control exhibiendo localización de la STxB en el RE (panel a, las flechas señalan el marcaje de envoltura nuclear propio de las proteínas de RE) respecto las células silenciadas (panel b). Por otra parte, en las células control pudimos observar una mayor colocalización de la STxB con rab6-GFP (panel b y magnificaciones de la derecha) en comparación con las células silenciadas (panel d y magnificaciones de la derecha). (C) Cuantificación del porcentaje de células control y silenciadas mostrando llegada de la STxB-cy3 al RE. Media \pm s.e.m., * $p \leq 0,05$. Barras, 10 μ m.

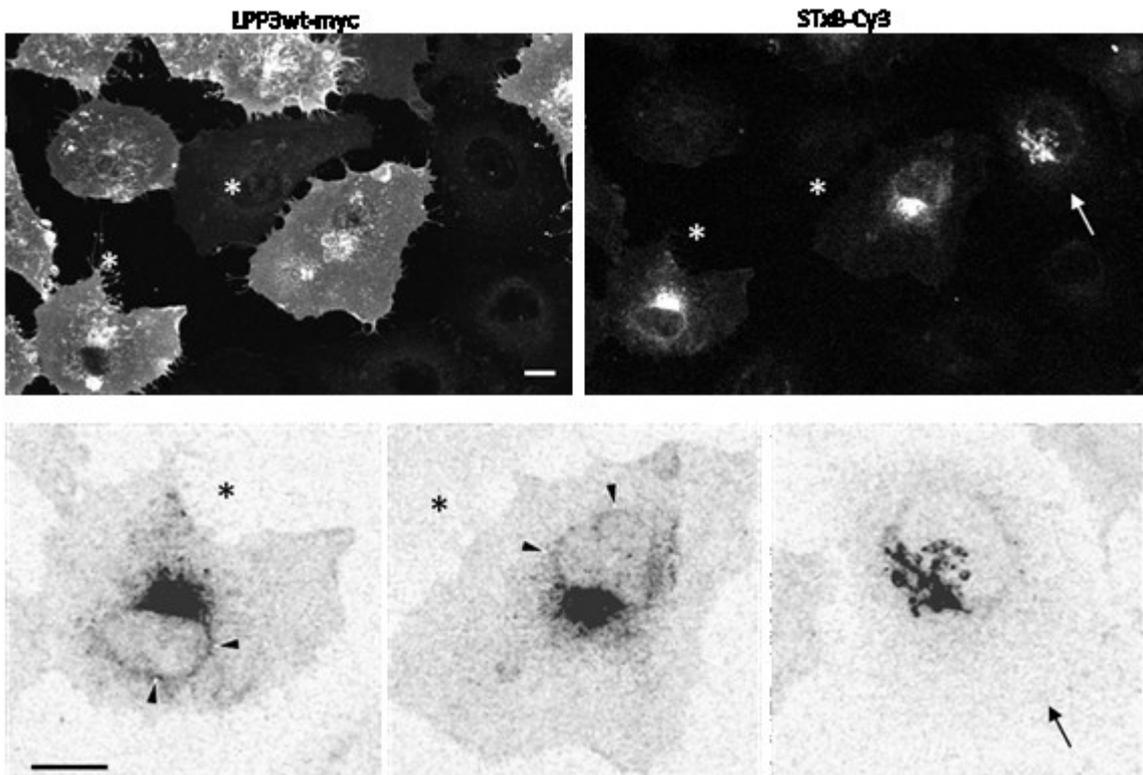


Figura 20. Rescate de los efectos del silenciamiento de la LPP3 sobre el transporte de la STxB por la sobreexpresión de mLPP3wt-myc. Células HeLa silenciadas para LPP3 se transfectaron con un plásmido codificando la forma murina de LPP3 (mLPP3wt-myc) durante las últimas 24 horas del protocolo de silenciamiento. Al cabo de 20-24 horas las células se sometieron al mismo protocolo de internalización de la STxB especificado en la figura 19. En la figura se muestra la distribución de la StxB en células silenciadas sobreexpresando (asteriscos) o no (flecha) la mLPP3wt-myc. Podemos observar cómo en las células que expresan la mLPP3wt-myc la STxB-cy3 presenta una distribución de RE, mientras que en la célula contigua que no sobreexpresa la mLPP3wt-myc, la STxB-cy3 muestra marcaje exclusivamente de Golgi. Barras, 10 μ m.

El conjunto de estos resultados indica que la LPP3 regula el transporte de Golgi a RE Rab6-dependiente.

RESULTADOS

7. La sobreexpresión de un mutante catalíticamente inactivo de LPP3 reproduce los efectos del silenciamiento de LPP3 sobre el tráfico Rab6-dependiente.

Nuestro siguiente paso consistió en examinar si la expresión de la forma silvestre de LPP3 (LPP3wt) o del mutante catalíticamente inactivo (LPP3S197T) causaban alteraciones en el transporte entre el Golgi y el RE. En primer lugar estudiamos la formación de intermediarios de transporte Rab6. Con este propósito, cotransfectamos células HeLa con el plásmido Rab6-myc, conjuntamente con la hLPP3wt-GFP. El análisis de la distribución de ambos marcadores reveló un alto grado de colocalización tanto a nivel del Golgi, así como en estructuras de tipo vesicular y en la membrana plasmática (**Fig. 21A**). Se ha publicado que Rab6 participa además de en el transporte del Golgi a RE, en el del Golgi a la membrana plasmática (Grigoriev et. al., 2007 y 2011, White et al., 1999). Para determinar si una parte de la colocalización de LPP3 y Rab6 se encontraba en intermediarios de transporte dirigidos al RE, utilizamos la STxB. A un tiempo en que la STxB ya ha alcanzado el Golgi y se dirige hacia el RE, pudimos observar colocalización de la toxina con LPP3-GFP en estructuras vesiculares (**Fig. 21B**).

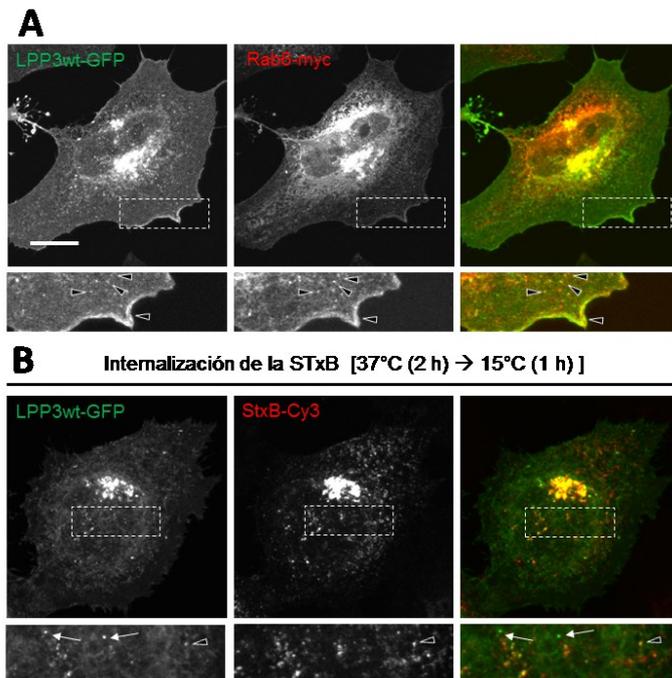


Figura 21. Colocalización de la hLPP3wt-GFP con Rab6 y la STxB. (A) Células HeLa se cotransfectaron con la hLPP3wt-GFP y Rab6-myc y tras aproximadamente 20 horas se fijaron y tiñeron con anti-myc. En la imagen podemos ver cómo LPP3 y Rab6 colocalizan en el Golgi, en regiones de la membrana plasmática y en estructuras de morfología vesicular (señaladas por las puntas de flecha en las magnificaciones).

(B) Células HeLa transfectadas con hLPP3wt-GFP se incubaron por 15 minutos a 4°C en presencia de la STxB, tras lo cual las células se incubaron 2 horas a 37°C y 1 hora a 15°C. En las imágenes podemos observar colocalización de la hLPP3wt-GFP con la STxB-cy3 en estructuras de tipo vesicular (puntas de flecha), sin embargo también observamos vesículas marcadas con hLPP3wt-GFP en las que no hay colocalización con la STxB-cy3 (flechas). Barras 10μm.

RESULTADOS

Este resultado demuestra que al menos una parte de las vesículas que contienen Rab6 y LPP3 se dirigen hacia el RE. Es importante remarcar que esta colocalización a nivel del Golgi sólo se observó en células que presentaban niveles medios /bajos de expresión de Rab6. Las células con altos niveles de expresión, por el contrario, mostraron una localización de Rab6 casi exclusiva en el RE (**Fig. 22A**, paneles a y c). Ello coincide con lo publicado sobre el efecto equivalente al de la brefeldina A cuando se sobreexpresa la forma silvestre de Rab6 o también la constitutivamente activa (Rab6-GTP) (Martínez et. al., 1997). Al sobreexpresar conjuntamente con Rab6 el mutante catalíticamente inactivo de LPP3, se redujo significativamente el porcentaje de células que mostraban Rab6 en el RE (**Fig. 22A**, paneles b y d, cuantificación en **Fig. 22B**).

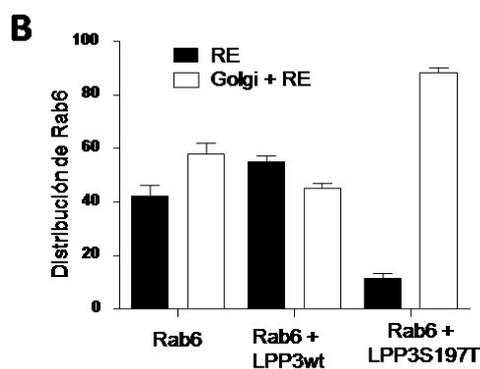
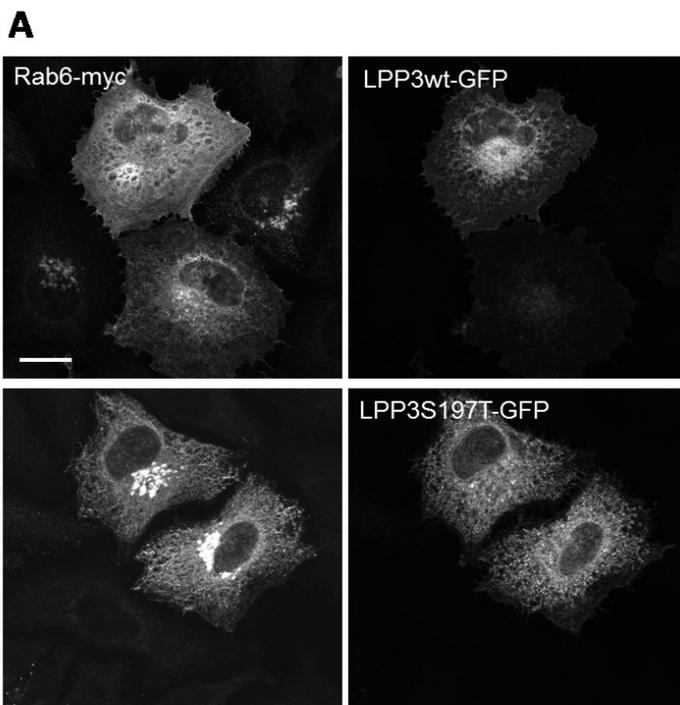


Figura 22. La sobreexpresión de la hLPP3S197T-GFP inhibe la relocalización de Rab6-myc al RE.

(A) Células HeLa se cotransfectaron con la hLPP3wt-GFP (paneles superiores) o hLPP3S197T-GFP (paneles inferiores) más Rab6-myc. Tras 20 horas de expresión las células se fijaron y tiñeron con anti-myc. En las imágenes mostramos colocalización en el RE de la hLPP3wt-GFP y Rab6-myc en células con elevados niveles de expresión de Rab6. Contrariamente, no observamos esta redistribución de Rab6 al RE en aquellas células que conjuntamente con Rab6 expresan la hLPP3S197T-GFP. (B) Cuantificación del porcentaje de célula transfectadas con Rab6-myc, hLPP3wt-GFP más Rab6-myc o hLPP3S197T-GFP más Rab6-myc, mostrando Rab6 exclusivamente en el RE o bien en el Golgi y el RE. Media \pm s.e.m. N = 2. Barra, 10 μ m

RESULTADOS

A continuación examinamos si este bloqueo de la redistribución de Rab6 al RE en las células que expresaban la LPP3S197T, se debía a una inhibición del transporte retrógrado de Rab6. Con este propósito, estudiamos la dinámica de llegada al RE de la STxB en células sobreexpresando las formas silvestre y mutante de LPP3. Transfectamos células COS-7 con la hLPP3wt-GFP o la hLPP3S197T-GFP y las sometimos al protocolo de internalización de la STxB. En la **figura 23A**, vemos colocación en el RE de la STxB con la hLPP3wt-GFP, pero no con la hLPP3S197T-GFP (cuantificación en **23B**).

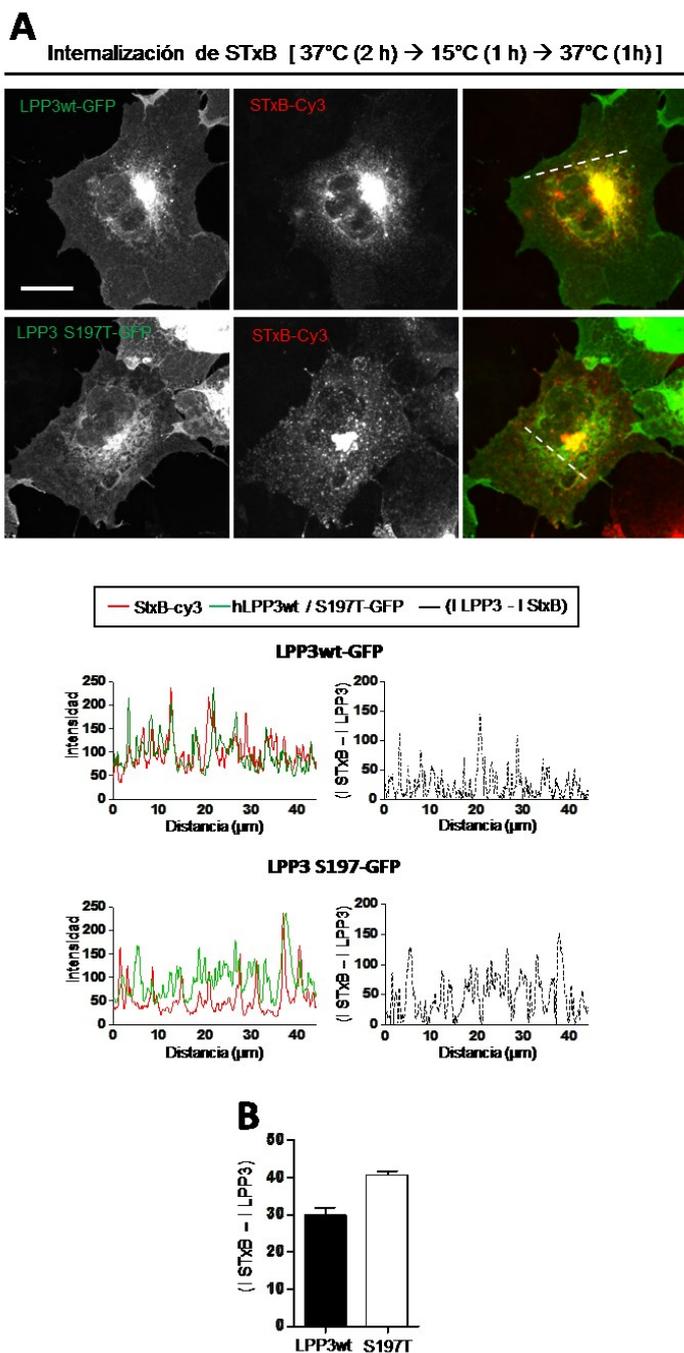


Figura 23. La sobreexpresión de hLPP3S197T-GFP retrasa el transporte de la STxB del Golgi al RE. (A) Células COS-7 se cotransfectaron con hLPP3wt-GFP o hLPP3S197T-GFP más un plásmido codificante para la Gb3-sintasa. Tras aproximadamente 20 horas de expresión las células se incubaron a 4°C por 30 minutos en presencia de la STxB. Tras retirar la toxina del medio las células se incubaron a 37°C por 2 horas, seguido de 1 hora a 15°C y una hora más a 37°C. Las imágenes muestran cómo a este tiempo en las células que sobreexpresan la hLPP3wt-GFP la STxB se encuentra localizada en el RE, sin embargo en las células que sobreexpresan la hLPP3S197T-GFP la STxB se encuentra distribuida entre el Golgi y estructuras de tipo vesicular. (B) En la gráfica, el nivel de localización de la STxB en el RE se calculó como el promedio de la diferencia entre los valores de intensidad de STxB respecto LPP3wt-GFP y LPP3S197T-GFP a lo largo de líneas trazadas aleatoriamente sobre el marcaje reticular de LPP3wt-GFP y LPP3S197T-GFP. A mayor solapamiento de ambos marcajes, menor diferencia respecto los valores de intensidad de cada marcador. Media \pm s.e.m. N=2. Barra, 10 μ m

RESULTADOS

Estos resultados demuestran que la LPP3 se asocia con Rab6 en intermediarios de transporte, parte de los cuales están dirigidos del Golgi al RE. Por otro lado, la sobreexpresión del mutante catalíticamente inactivo de LPP3, reproduce los defectos sobre el transporte retrógrado dependiente de Rab6 obtenidos tras silenciar LPP3.

8. El silenciamiento de la LPP3 produce alteraciones en la ultraestructura del Golgi

A continuación analizamos si las alteraciones funcionales descritas se correlacionaban con algún tipo de alteración a nivel de la ultraestructura del Golgi. Con este objetivo, silenciamos la LPP3 en células swiss3T3 por infección lentiviral de shRNAs. Al cabo de 96 horas, fijamos las células y las observamos por microscopía electrónica. A diferencia de las células control (**Fig. 24A**), las células silenciadas mostraron una cierta dilatación de las cisternas de Golgi acompañada de un incremento del número de perfiles vesiculares, algunos en proceso incompleto de fisión (**Fig. 23B-C**). De forma significativa, algunas de estas estructuras vesiculares mostraron una cubierta de material electrodenso, lo cual es indicativo de la presencia del coatómero (**Fig. 23D**).

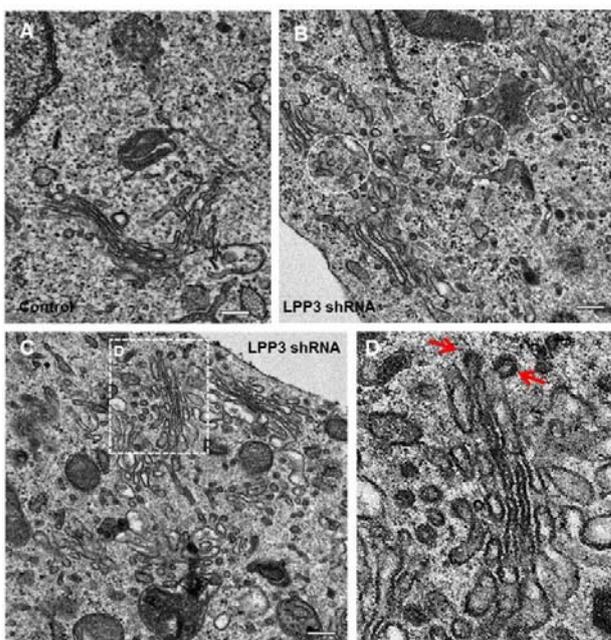


Figura 24. El silenciamiento de LPP3 causa alteraciones en la ultraestructura del Golgi. Células swiss3T3 control (infectadas con lentivirus vacíos) y silenciadas para LPP3 (infectadas con lentivirus conteniendo los shRNAs de LPP3) se fijaron y analizaron por microscopía electrónica tras 96 horas del protocolo de infección lentiviral. (A) Apariencia del Golgi en células control. Observamos la característica morfología de cisternas aplanadas (B-D) En las células silenciadas observamos un incremento notable de perfiles vesiculares en la proximidad de cisternas de Golgi engrosadas (ver círculos en B). En (D) observamos una magnificación del área encuadrada en (C). Las flechas señalan la presencia de vesículas en proceso de gemación de la parte lateral de las cisternas. Observamos que algunas están cubiertas de un material electrodenso, característico de la presencia de COPI. Barra. 200nm.

RESULTADOS

Esta observación hizo que nos planteásemos si tal y como sucede con el transporte retrógrado dependiente de Rab6, el transporte dependiente del coatómero (COP-I) podía verse igualmente alterado tras el silenciamiento de LPP3. Para analizar esta hipótesis monitorizamos el transporte de la STxB que contiene en su COOH la secuencia KDEL. Dicha secuencia permite la interacción de las proteínas con el receptor de KDEL en el Golgi, tras lo que son transportadas al RE en vesículas COP-I. Células Swiss3T3 control y silenciadas con los shRNAs de LPP3 se incubaron con la STxB-KDEL-Cy3 a 19°C para bloquear el transporte desde los endosomas tempranos (**Fig. 25A-J**). A continuación, cambiamos las células a 37°C y las fijamos a diferentes tiempos para evaluar la llegada de la STxB-Cy3 hasta el RE. En la **figura 25** (paneles **E-P**, y gráfica), observamos que en las células silenciadas se produjo un retraso en el transporte de la STxB-KDEL-Cy3 desde el Golgi, indicativo de que la LPP3 también regula el transporte retrógrado dependiente de COP-I.

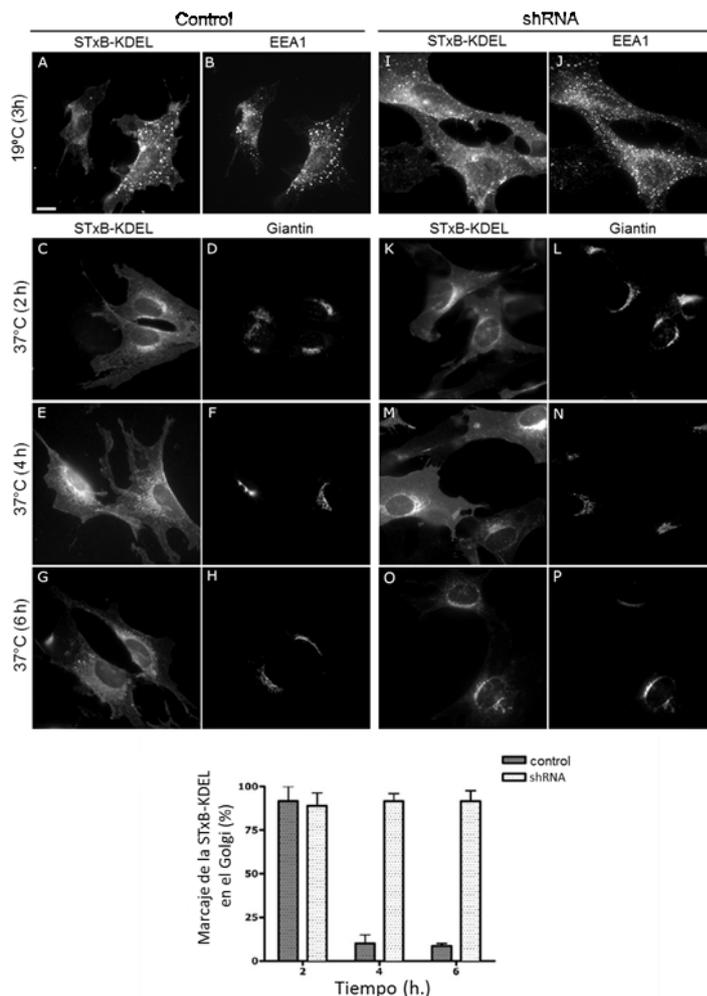


Figura 25. El silenciamiento de LPP3 causa un retraso en el transporte retrógrado de la STxB-KDEL de Golgi a RE. Células Swiss3T3 control y silenciadas se incubaron con la STxB-KDEL-cy3 a 19°C por 3 horas. La localización de la STxB-KDEL-cy3 en este compartimento se determinó haciendo ICC con anti-EEA1 (A, B, I, J). Seguidamente las células se incubaron a 37°C por diferentes tiempos, tras lo que se fijaron y procesaron por ICC con anti-giantina (C-H, K-P). Podemos observar cómo tras 4 y 6 horas de efectuar el cambio de temperatura a 37°C en las células control la STxB-KDEL-cy3 ha llegado al RE, mientras en las células silenciadas todavía la vemos asociada al Golgi. En la gráfica se muestra el porcentaje de células control y silenciadas presentando STxB-KDEL-cy3 en el RE a diferentes tiempos de internalización. Media \pm s.e.m. N = 2. Barra, 10 μ m.

RESULTADOS

Colectivamente estos resultados indican que la LPP3 es necesaria para el correcto mantenimiento de la estructura y funcionalidad del aparato de Golgi, regulando la formación de intermediarios de transporte COP-I y Rab6 dependientes, y por tanto, el transporte retrógrado de cargo del Golgi al RE.

9. Relación entre el DAG y la tubulación del Golgi y alteraciones en la homeostasis del DAG en células silenciadas para LPP3

Una vez determinados los efectos del silenciamiento de la LPP3 en la funcionalidad y morfología del ERGIC y el Golgi, y habiendo establecido una relación entre la actividad catalítica de LPP3 y sus efectos en el transporte (reproduciéndolos al tratar las células con propanolol y mediante la sobreexpresión de una forma catalíticamente inactiva de la proteína), nos planteamos estudiar si existía una conexión directa entre el conjunto de las alteraciones morfológicas y funcionales descritas y la síntesis de DAG dependiente de LPP3.

Como primera aproximación, estudiamos la relación entre el DAG y el transporte retrógrado dependiente de Rab6. Para ello transfectamos células HeLa con el dominio C1b de PKC θ unido a GFP, caracterizado en estudios previos como sensor de los niveles de DAG en el Golgi (Carrasco y Mérida, 2004; Fernandez-Ulibarri et al., 2007) y las sometimos al protocolo de internalización de la STxB descrito anteriormente: 2 horas de internalización a 37°C, seguido de 1 hora de incubación a 15°C para observar la formación de intermediarios de transporte entre el Golgi y el RE. A este tiempo iniciamos una grabación *in vivo* de las células presentando doble marcaje de STxB y el dominio C1. Tras la incubación a 15°C observamos numerosos túbulos formados desde el Golgi y teñidos con el dominio C1 y con la STxB. También vimos colocalización de ambos marcadores en vesículas próximas al RE (**Fig. 26 y película 6**). Estos resultados demuestran que los túbulos de Rab6 con dirección al RE contienen DAG, de lo que hablaremos con mayor profundidad en el apartado de discusión.

A continuación utilizamos el dominio C1b de PKC θ para evaluar si el silenciamiento de LPP3 se correlacionaba con una disminución de los niveles de DAG en el Golgi. Células swiss3T3 control y silenciadas para la expresión de LPP3 se transfectaron con el plásmido de PKC θ -C1b-GFP. Como podemos observar en la **figura 27**, las células

RESULTADOS

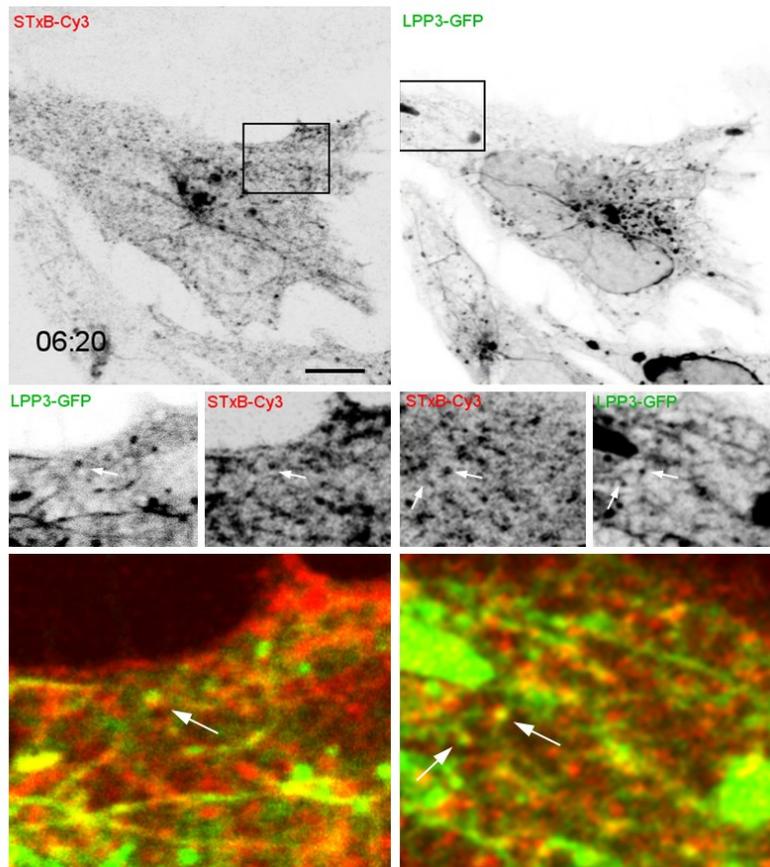


Figura 26. Colocalización de la STxB con el dominio C1b de PKCθ en intermediarios de transporte dirigidos al RE. Imágenes extraídas de la película 6. Células HeLa expresando PKCθ-C1b-GFP se incubaron en presencia de la STxB-cy3 a 4°C por 30 minutos, tras lo cual, la toxina fue retirada del medio y las células se incubaron a 37°C por 2 horas, seguido de 1 hora a 15°C. En este momento se inició una grabación a 37°C registrando simultáneamente el marcaje de PKCθC1b-GFP y STxB-cy3. En la imagen podemos observar cómo existe colocalización entre la STxB-cy3 y la PKCθC1b-GFP a nivel del Golgi y en las estructuras tubulares originadas durante el periodo de incubación a 15°C. En la parte inferior de la imagen mostramos magnificaciones de las regiones encuadradas, en las que se observa colocalización de la STxB-cy3 y la PKCθC1b-GFP en estructuras de tipo vesicular en estrecha asociación a los filamentos del RE (ver flechas y película número 6). Barra, 10µm.

silenciadas presentaron una disminución notable de la intensidad de fluorescencia correspondiente al dominio C1 en el Golgi.

Finalmente nos planteamos estudiar a nivel bioquímico los efectos del silenciamiento sobre la homeostasis del DAG. Con este objetivo células HeLa control y silenciadas para la expresión de LPP3 se incubaron en presencia de [C¹⁴]acetato durante las últimas 24 horas del protocolo de silenciamiento. Al día siguiente, lisamos las células y analizamos el contenido de fosfolípidos y lípidos neutros por cromatografía de capa fina (TLC). Como podemos ver en la **figura 28** tanto el nivel de los principales

RESULTADOS

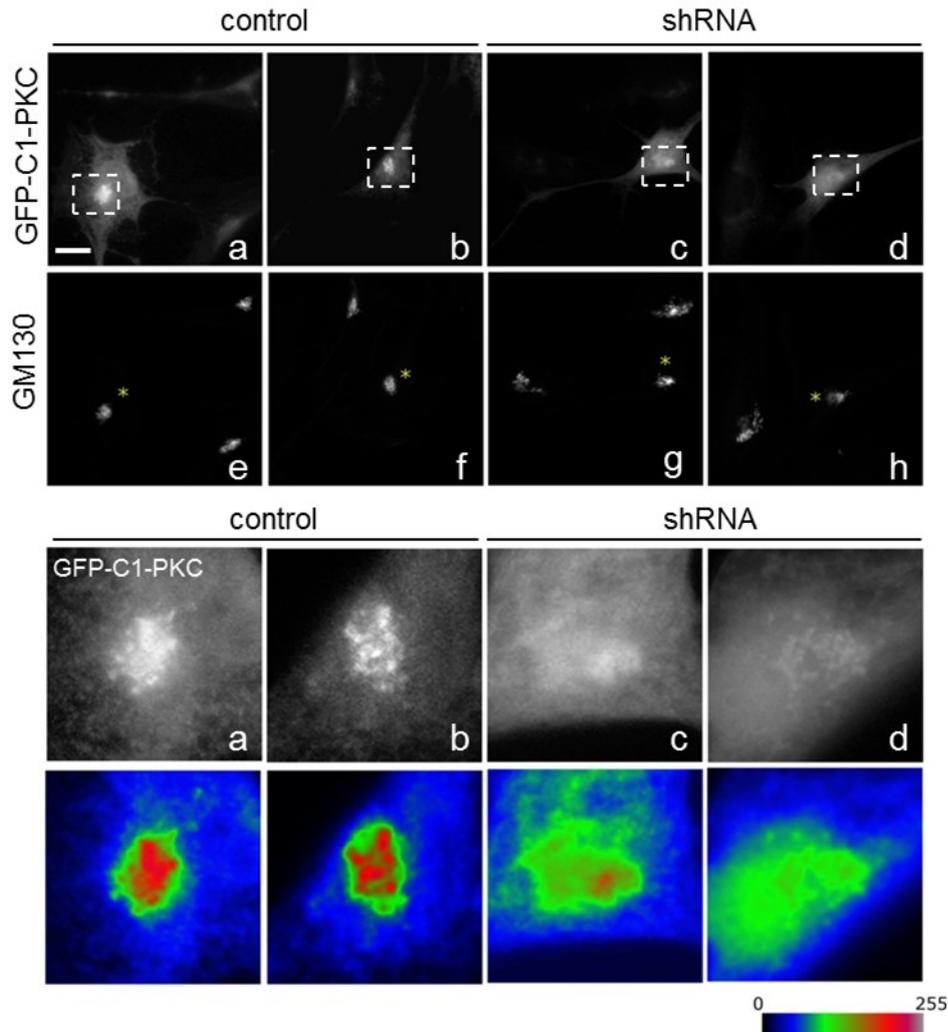


Figura 27. El silenciamiento de *LPP3* causa una disociación del dominio *C1b* de *PKCθ* del Golgi. Células *sw620* control y silenciadas para *LPP3* se transfectaron con *PKCθ-C1b-GFP* las últimas 24 horas del protocolo de silenciamiento. Tras aproximadamente 16-17 horas de expresión las células se fijaron y procesaron por ICC con anti-GM130. En las imágenes podemos observar una disminución en la intensidad del marcaje correspondiente al dominio *C1* en el Golgi en las células silenciadas respecto las células control. Barra, 10 μ m.

fosfolípidos (fosfatidilcolina, PC; fosfatidilserina, PS; fosfatidiletanolamina; PE, esfingomielina, SM, fosfatidilinositol; PI y ácido fosfático; PA) como el nivel de lípidos neutros (suma de diacilglicerol, DAG; triacilglicerol, TAG y colesterol, Chol), expresado como marcaje por microgramo de proteína, experimentó un descenso significativo en las células silenciadas respecto las células control. Por otra parte, al expresar los niveles de los diferentes fosfolípidos como porcentaje respecto al total de fosfolípidos, las cantidades relativas de cada una de las especies moleculares analizadas no experimentaron ninguna variación.

RESULTADOS

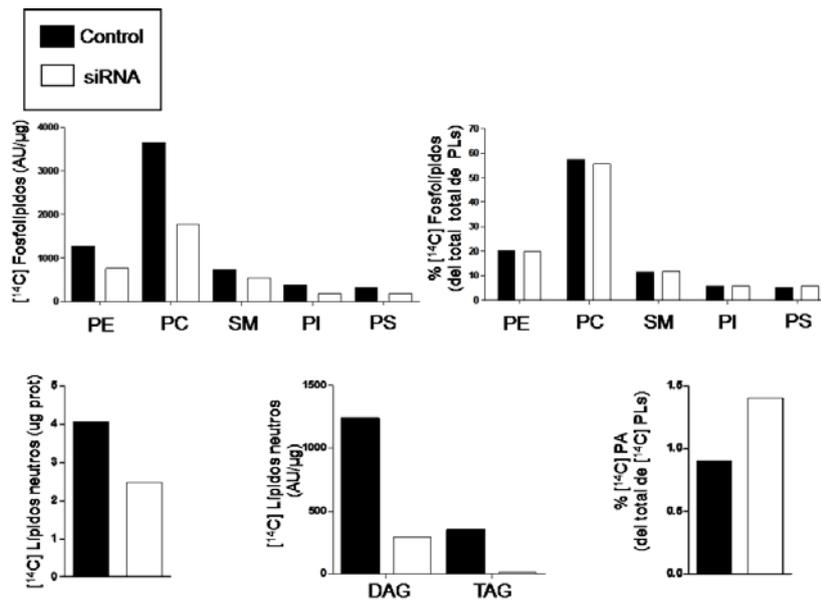


Figura 28. El silenciamiento de LPP3 reduce la síntesis de novo de fosfolípidos y lípidos neutros. Células HeLa control y silenciadas se incubaron con [¹⁴C]-acetato las últimas 24 horas del protocolo de silenciamiento. Los lípidos fueron extraídos, separados por TLC y cuantificamos la señal radioactiva. En las células silenciadas observamos una disminución general del marcaje de los principales fosfolípidos (PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; SM, esfingomielina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina) normalizado por microgramo de proteína. Por otra parte, los niveles relativos de las diferentes especies de fosfolípidos no variaron al ser expresados como porcentaje respecto el total de fosfolípidos. En relación al marcaje de lípidos neutros, en las células silenciadas también obtuvimos una disminución en la cantidad de lípidos neutros (colesterol, diacilglicerol y triacilglicerol) por microgramo de proteína. Sin embargo, en las células silenciadas los niveles relativos de DAG y TAG respecto el total de lípidos neutros se encuentra significativamente disminuido respecto las células control. Esta disminución concuerda con un incremento del porcentaje de PA sobre el total de fosfolípidos.

Contrariamente, al cuantificar el porcentaje relativo de DAG y TAG respecto el marcaje total de lípidos neutros, observamos un notable descenso en las células silenciadas, indicando que la formación de DAG a través de la vía de síntesis *de novo* (la que refleja la incorporación de acetato) se encuentra disminuida por el silenciamiento de LPP3. De forma consistente con este resultado medimos un incremento en el porcentaje de PA respecto al total de fosfolípidos. Estos resultados demuestran que el silenciamiento de LPP3 disminuye la síntesis *de novo* de DAG

Finalmente, para estudiar si esta reducción en la síntesis *de novo* de fosfolípidos se veía compensada por un incremento en las vías de reciclaje, examinamos la incorporación de [³²P] ácido ortofosfórico. Los resultados obtenidos muestran que el marcaje de los principales fosfolípidos no varía en las células silenciadas respecto las control,

RESULTADOS

manteniéndose el porcentaje relativo de las diferentes especies moleculares de fosfolípidos sobre el total de fosfolípidos (Fig. 29).

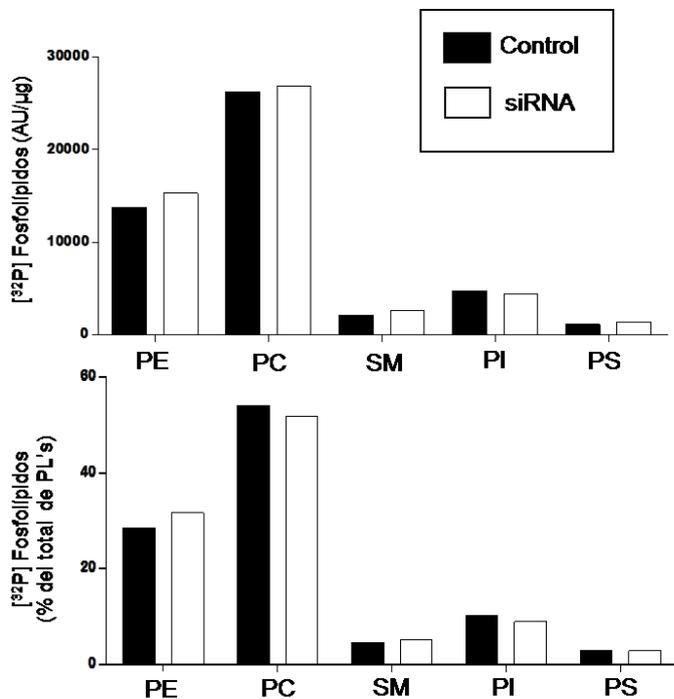


Figura 29. Los niveles de los principales fosfolípidos marcados con [32P] no varían en las células silenciadas. Células HeLa control y silenciadas se incubaron con [32P] las últimas 24 horas del protocolo de silenciamiento. Los lípidos fueron extraídos, separados por TLC y cuantificamos la señal radioactiva. La cuantificación de los principales grupos de fosfolípidos por microgramo de proteína (PE, fosfatidiletanolamía; PC, fosfatidilcolina; SM, esfingomielina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina) no reveló diferencias entre las células control y las silenciadas. Tampoco observamos diferencias en los niveles relativos de los diferentes fosfolípidos expresados como porcentaje respecto el total de fosfolípidos.

A modo de resumen, estos resultados indican que existe una asociación entre el DAG y los intermediarios de transporte que median el transporte retrógrado de la STxB, y que el silenciamiento de LPP3 se correlaciona con una disminución de los niveles de DAG en el Golgi. Por otra parte, si bien el silenciamiento de LPP3 causa una reducción en la síntesis *de novo* de lípidos, las vías de reciclaje permiten mantener los niveles de fosfolípidos en cantidades equivalentes a las de las células control, descartando por tanto, que los efectos funcionales relacionados con el silenciamiento de LPP3 sean consecuencia de una reducción generalizada del contenido celular de fosfolípidos.

RESULTADOS

ÍNDICE DE PELÍCULAS

Película 1: Dinámica in vivo del movimiento de LPP3wt-GFP y LPP3S197T-GFP en el RE.

Película 2: Dinámica del ERGIC (visualizado con ERGIC53-GFP) en células control.

Película 3: Dinámica del ERGIC (visualizado con ERGIC53-GFP) en células tratadas con propanolol.

Película 4: Dinámica del ERGIC (visualizado con ERGIC53-GFP) tras retirar retirar el propanolol del medio (misma célula que en la película 3).

Película 5: Formación de intermediarios de transporte de salida del Golgi marcados con Rab6-GFP en células control y tratadas con propanolol.

Película 6: Visualización conjunta del dominio C1 de PKC θ (PKC θ -C1b-GFP) y de la STxB-cy3 en túbulos saliendo del complejo de Golgi.

***(II) Papel del DAG en la endocitosis
dependiente de clatrina***

RESULTADOS

1. Efectos del propanolol en la internalización de transferrina y EGF.

Como primera aproximación, realizamos experimentos de time-lapse utilizando microscopía TIRF, siguiendo simultáneamente la endocitosis de la transferrina y el EGF en células COS-7 control o tratadas con propanolol. Los resultados que aparecen en la **figura 30** corresponden al análisis de grabaciones efectuadas durante 20 minutos registrando un total de 600 imágenes para cada marcador (transferrina y EGF) y situando el ángulo del láser de tal forma que adquiriésemos imágenes a una profundidad de 150 nm de la membrana plasmática. De estos experimentos analizamos: (1) la velocidad de entrada de la transferrina y del EGF, la cual medimos a partir del número de estructuras positivas para cada uno de los marcadores a lo largo del tiempo, y (2) Las rutas de entrada de ambos marcadores a partir del grado de colocación recíproco de la transferrina y el EGF a lo largo del tiempo.

En la (**Fig. 30E**) podemos ver cómo en células control sólo un porcentaje muy bajo de la transferrina colocaliza con EGF a lo largo del tiempo. A partir de los 5 min de grabación, se produce una drástica desaparición de la transferrina de la zona TIRF (**Fig. 30A**), y por lo tanto la colocación transitoria de los pocos píxeles restantes con el EGF condiciona las fluctuaciones observadas entre valores muy altos y muy bajos, con lo que podemos considerar este efecto un artefacto. Ello resulta más evidente si observamos el porcentaje de píxeles positivos para EGF que colocan con transferrina (**Fig. 30F**). Al internalizarse el EGF más lentamente que la transferrina, la presencia de un número elevado de píxeles de EGF en la zona TIRF durante todo el tiempo de grabación (**Fig. 30C**) hace que la colocación accidental de unos pocos píxeles positivos para transferrina resulte porcentualmente insignificante.

Sin embargo, en las células tratadas con propanolol, el porcentaje de colocación de la transferrina con el EGF se mantiene estable (alrededor de un 10%) durante todo el tiempo de la grabación (**Fig. 30E**). Esto se debe a que se produce una desaparición más lenta de la transferrina de la zona TIRF (**Fig. 30B**), lo que indica un retraso en la internalización de este cargo. En cambio, a diferencia de la transferrina, la internalización del EGF en las células tratadas con propanolol es muy similar al de las células control (**Fig. 30D**).

RESULTADOS

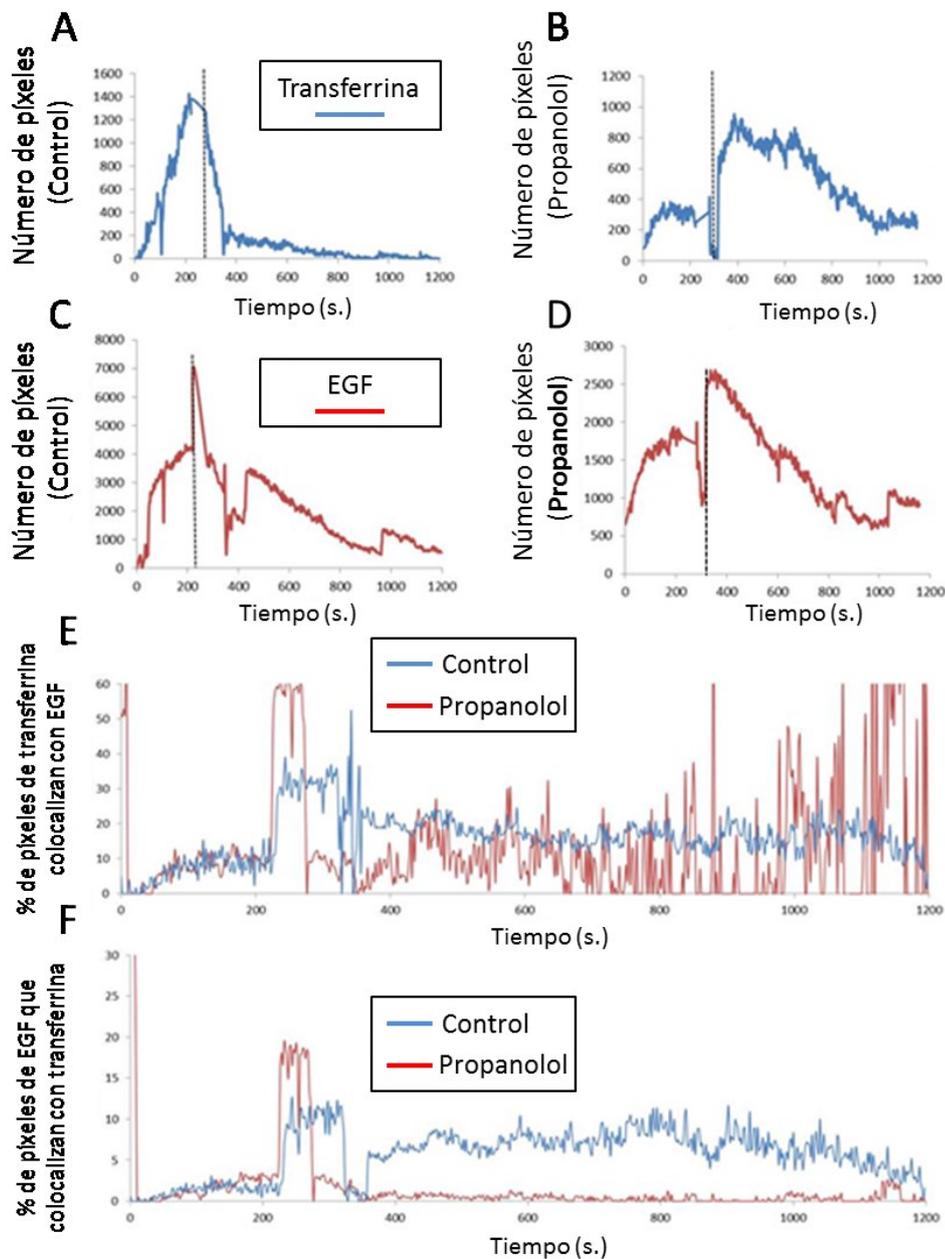


Figura 30. Efectos del propranolol sobre la internalización de transferrina y EGF. (A-F) Gráficas extraídas del análisis de la internalización conjunta de EGF y transferrina obtenidas por microscopía de fluorescencia de reflexión interna TIRF. (A y C) Cuantificación del número de píxeles de transferrina (A) y EGF (C) dentro de la zona TIRF a lo largo del tiempo. (B y D) Cuantificación del número de píxeles de transferrina (B) y EGF (D) dentro de la zona TIRF a lo largo del tiempo en presencia de propranolol. (E) Porcentaje de colocalización de la transferrina respecto a EGF (expresado como número de píxeles marcados con transferrina y EGF respecto número total de píxeles marcados con transferrina) en células control y tratadas con propranolol, (F) Porcentaje de colocalización de EGF con transferrina (expresado como número de píxeles marcados con transferrina y EGF respecto número total de píxeles marcados con EGF) en células control y tratadas con propranolol. Las líneas punteadas perpendiculares señalan el momento, alrededor de los 250 segundos de grabación, en que se retiraron los ligandos del medio, lo cual explica la saturación de la señal en estos puntos.

RESULTADOS

Podemos concluir que en células COS-7, el tratamiento con propanolol no induce cambios en la internalización del EGF pero sí induce un retraso en la internalización de la transferrina, lo que viene reflejado por un aumento de la cantidad de transferrina próxima a la membrana plasmática a tiempos largos de internalización y por una mayor colocalización con el EGF dentro de la zona TIRF. También podemos concluir que el propanolol no parece afectar el proceso de entrada de la transferrina y EGF a través de diferentes poblaciones de endosomas (Leonard et al., 2008), a tenor del bajo nivel de colocalización de ambos marcadores en la proximidad de la membrana plasmática.

2. Efectos del propanolol en el sorting del EGF y la transferrina desde los endosomas tempranos.

Una vez caracterizado el efecto del propanolol sobre la internalización del EGF y la transferrina en la zona más próxima a la membrana plasmática, pasamos a analizar sus efectos en zonas más internas de la célula. Células COS-7 control y tratadas con propanolol se sometieron a un pulso de internalización del EGF y la transferrina por diversos tiempos. En la **figura 31** podemos ver cómo a los 15 minutos de internalización, las células control acumulaban la transferrina en un compartimento perinuclear, mientras que en las células tratadas con propanolol se acumulaba en endosomas de tamaño superior al observado en condiciones fisiológicas. También pudimos observar la aparición de estructuras tubulares marcadas con transferrina proyectándose de forma radial hacia el compartimento de reciclaje. Respecto al EGF, la distribución del marcaje no mostró variaciones significativas entre las células control y silenciadas, pero mientras que en las células control la colocalización del EGF con la transferrina a los 15 minutos de internalización era prácticamente inexistente, en las células tratadas con propanolol el EGF colocalizaba con la transferrina en el mismo compartimento endosomal, aunque permanecía segregado de los túbulos inducidos por el propanolol.

Para caracterizar la naturaleza del compartimento túbulo-vesicular inducido por el propanolol, llevamos a cabo inmunocitoquímica con diferentes marcadores de la vía endocítica tales como EEA1 (endosomas tempranos), rabenosina5 (marcador del primer compartimento endosomal de entrada de la transferrina) y rab11 (endosomas de reciclaje). En células control a los 15 minutos de internalización, la transferrina

RESULTADOS

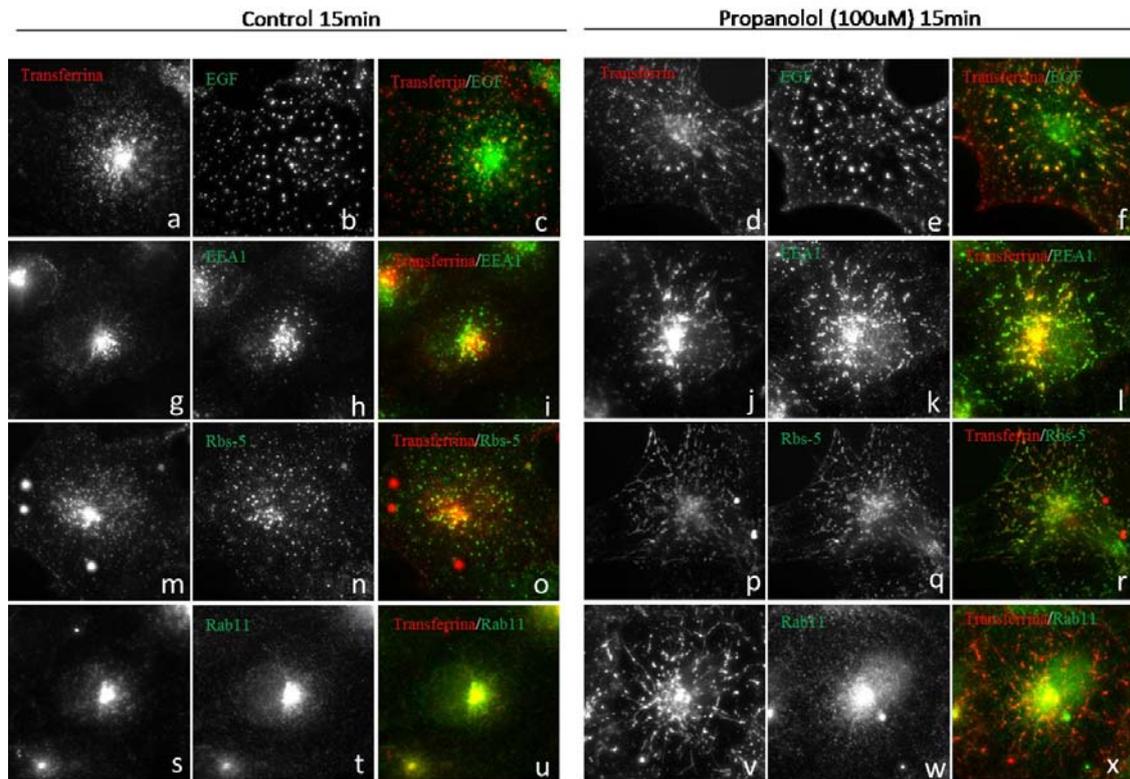


Figura 31. Efectos del propranolol sobre el transporte de EGF y transferrina en compartimentos intracelulares. Células COS-7 control (a-c) y tratadas con propranolol (d-f) se sometieron a un pulso de transferrina y EGF (15 minutos). En las imágenes podemos observar cómo en las células tratadas con propranolol existe colocalización de ambos marcadores en estructuras vesiculares engrosadas, mientras que en las células control, a este tiempo ya hay una segregación evidente de la transferrina (acumulada en un compartimento perinuclear) y el EGF (en estructuras vesiculares periféricas). También observamos que en las células tratadas con propranolol la transferrina aparece en estructuras tubulares que se proyectan desde los endosomas, mientras que el EGF se mantiene fuera de los túbulos. (g-x) Células COS-7 control y tratadas con propranolol fueron sometidas a un pulso de transferrina y a los 15 minutos fijadas y procesadas por ICC con anti-EEA1 (g-l), anti-rabenosina5(m-r) y anti-Rab11(s-x). En las imágenes se muestra la colocalización de transferrina con los marcadores eea-1 y rabenosina5 tanto en las estructuras endosomales como en los túbulos asociados en las células tratadas con propranolol, mientras que en las células control la transferrina aparece acumulada en un compartimento perinuclear colocalizando con el marcador de endosomas de reciclaje Rab-11. Barra, 10µm.

colocalizaba extensamente con Rab11 en el compartimento de endosomas de reciclaje. Sin embargo, en las células tratadas con propranolol la transferrina se acumulaba en un compartimento positivo para EEA1 y rabenosina5.

Este resultado indica que el propranolol produce un retraso en el transporte de la transferrina desde el compartimento de endosomas tempranos a los endosomas de reciclaje. Para saber si el tránsito del EGF de los endosomas tempranos a los tardíos y los lisosomas se encontraba igualmente afectado, estudiamos la dinámica de degradación del receptor de EGF, que tras unirse a EGF sigue la vía de degradación

RESULTADOS

lisosomal. La **figura 32** muestra cómo se produce un retraso en la degradación del receptor de EGF en las células tratadas con propranolol respecto las células control.

En conjunto, estos resultados indican que el propranolol induce un retraso en la salida de cargo (transferrina y EGF) del compartimento de endosomas tempranos a sus compartimentos de destino, endosomas de reciclaje y lisosomas respectivamente. Por otra parte el propranolol induce una alteración morfológica de los endosomas tempranos, caracterizada por un engrosamiento de los mismos, la aparición de una extensa tubulación y la colocalización de marcadores que corresponden a compartimentos endosomales distintos (EEA-1 y rabenosina 5).

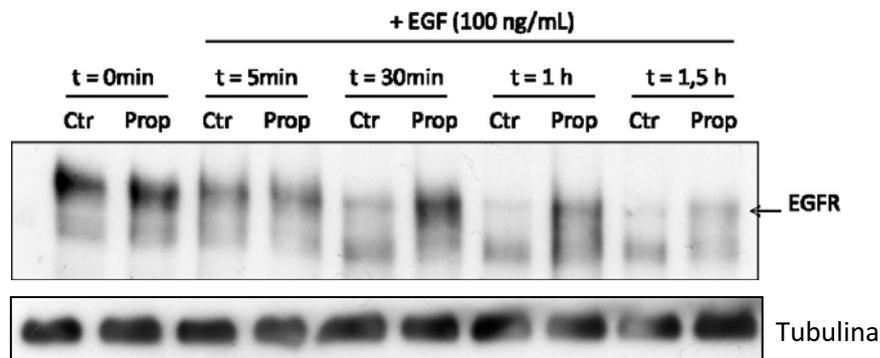


Figura 32. El propranolol retrasa la degradación del EGFR tras estimulación con EGF. Lisados de células HeLa control y tratadas con propranolol se obtuvieron tras diferentes tiempos de estimulación con EGF y se analizaron por inmunoblot con anti-EGFR. En la imagen podemos ver cómo la adición de propranolol induce un retraso en la degradación del receptor de EGF.

3. La tubulación producida por el propranolol requiere de los microtúbulos.

Se ha descrito que el proceso de transporte de cargo desde el compartimento de endosomas tempranos a endosomas de reciclaje es dependiente de microtúbulos. Con el objetivo de examinar la relación entre los túbulos inducidos por el propranolol y el citoesqueleto de microtúbulos, células COS-7 control y tratadas con propranolol se fijaron tras 15 minutos de la internalización de la transferrina, y a continuación se tiñeron con alfa-tubulina. El marcaje con alfa-tubulina no reveló cambios aparentes en la integridad del citoesqueleto de microtúbulos entre las células control y las tratadas con propranolol (**Fig. 33B**), pero observamos una coincidencia en la disposición de los túbulos marcados con transferrina y la red de microtúbulos. Al añadir nocodazol a las células observamos la desaparición de las estructuras tubulares inducidas por el propranolol (**Fig. 33C**). Sin embargo, mientras que en las células control la transferrina

RESULTADOS

se localizaba en finas estructuras puntiformes por todo el citoplasma, en las células tratadas con propanolol se produjo una clara disminución en el número de estructuras vesiculares acompañado de un incremento en su tamaño.

Concluimos pues que la tubulación inducida por el propanolol es dependiente del citoesqueleto de microtúbulos, reforzando la hipótesis de que dichos túbulos suponen intermediarios de transporte dirigidos hacia el compartimento de endosomas de reciclaje. Por otra parte, aún en ausencia del citoesqueleto de microtúbulos, las células tratadas con propanolol presentan un menor número de endosomas, pero de mayor tamaño. Este resultado sugiere que los túbulos inducidos por el propanolol representan intermediarios de transporte dirigidos hacia el compartimento de endosomas de reciclaje, proceso que es dependiente del citoesqueleto de microtúbulos.

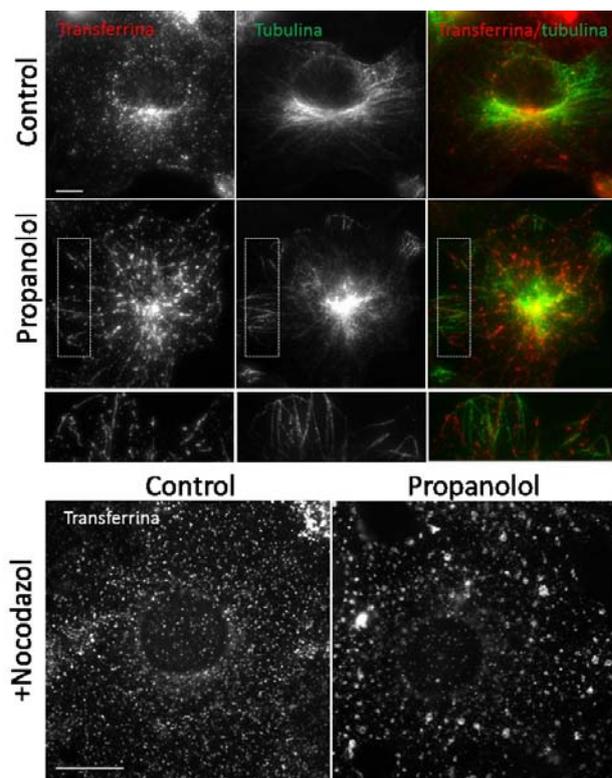


Figura 33. La tubulación de los endosomas inducida por propanolol es dependiente del citoesqueleto de microtúbulos. (A) Células COS-7 control y tratadas con propanolol se fijaron tras 15 minutos de internalización de transferrina y se tiñeron con anti- α tubulina. En las magnificaciones de la región encuadrada podemos ver cómo los túbulos marcados con transferrina resiguen la disposición de los microtúbulos. (B) Células COS-7 se trataron con nocodazol por 3 horas, tras lo que las sometimos a un pulso de transferrina (15 minutos) en presencia o ausencia de propanolol. En la figura mostramos cómo desaparece la tubulación asociada al marcaje de transferrina de las células tratadas con propanolol, sin embargo, respecto el control observamos una notable reducción en el número de estructuras vesiculares, así como un aumento de su tamaño. Barra, 10 μ m.

4. Reversión de los efectos del propanolol en la internalización de la transferrina alterando farmacológicamente las vías de síntesis de PA y DAG.

Con objeto de determinar si los resultados descritos hasta el momento tienen relación directa con la acción inhibitoria del propanolol sobre la síntesis del DAG a partir de PA, llevamos a cabo varios experimentos de reversión con agentes farmacológicos que

RESULTADOS

incrementan o disminuyen los niveles de DAG y PA, respectivamente. Para lograr el efecto contrario al del propanolol, es decir, disminuir los niveles de PA e incrementar los niveles de DAG bloqueando la conversión de DAG a PA, comparamos los efectos del propanolol en la internalización de transferrina en presencia o ausencia del inhibidor de familia de las DAGK clase I R59949. En la **figura 34** se muestra cómo en células tratadas con R59949 no se produjo ningún cambio en la internalización de transferrina respecto las células control no tratadas. Sin embargo cuando tratamos las células conjuntamente con propanolol y R59949, apreciamos una notable atenuación de los efectos del propanolol, disminuyendo tanto el número de túbulos como el tamaño de las estructuras vesiculares. Por otro lado, al tratar de compensar la disminución de los niveles intracelulares de DAG por efecto del propanolol suplementando las células con DOG, observamos una disminución del número de túbulos pero no vimos una reversión aparente del efecto de engrosamiento de los endosomas.

Para llevar a cabo la estrategia contraria, es decir potenciar el desequilibrio entre los niveles de PA y DAG, añadimos a las células PMA, activador de la PLD y por tanto de la síntesis de PA a partir de fosfatidilcolina (PC). En células tratadas con PMA y propanolol pudimos observar aún con mayor claridad un efecto sinérgico del propanolol y el PMA sobre la formación de endosomas engrosados. Sin embargo, al igual que al suplementar las células con DOG, el efecto del propanolol sobre la tubulación se vio notablemente inhibido.

De estos resultados concluimos en primer lugar que los efectos del propanolol están relacionados con una alteración en los niveles de PA y DAG, ya que al disminuir los niveles de PA y aumentar los niveles de DAG inhibiendo la actividad DGK (con el R59949), los efectos del propanolol se ven atenuados. Por otra parte, el restablecimiento de los niveles de DAG disminuye la tubulación inducida por el propanolol, ya que tanto la adición de DOG como del inhibidor de la DGK reducen la formación de túbulos. Sin embargo, un restablecimiento de los niveles de DAG no bastaría para revertir los efectos del propanolol sobre la formación de estructuras vesiculares engrosadas.

5. Relación entre los efectos del propanolol y el citoesqueleto de actina

Debido a que la adición del DOG no revertió los efectos del propanolol sobre la formación de endosomas engrosados, pero sí vimos reversión al añadir un inhibidor de

RESULTADOS

15 minutos de internalización de transferrina

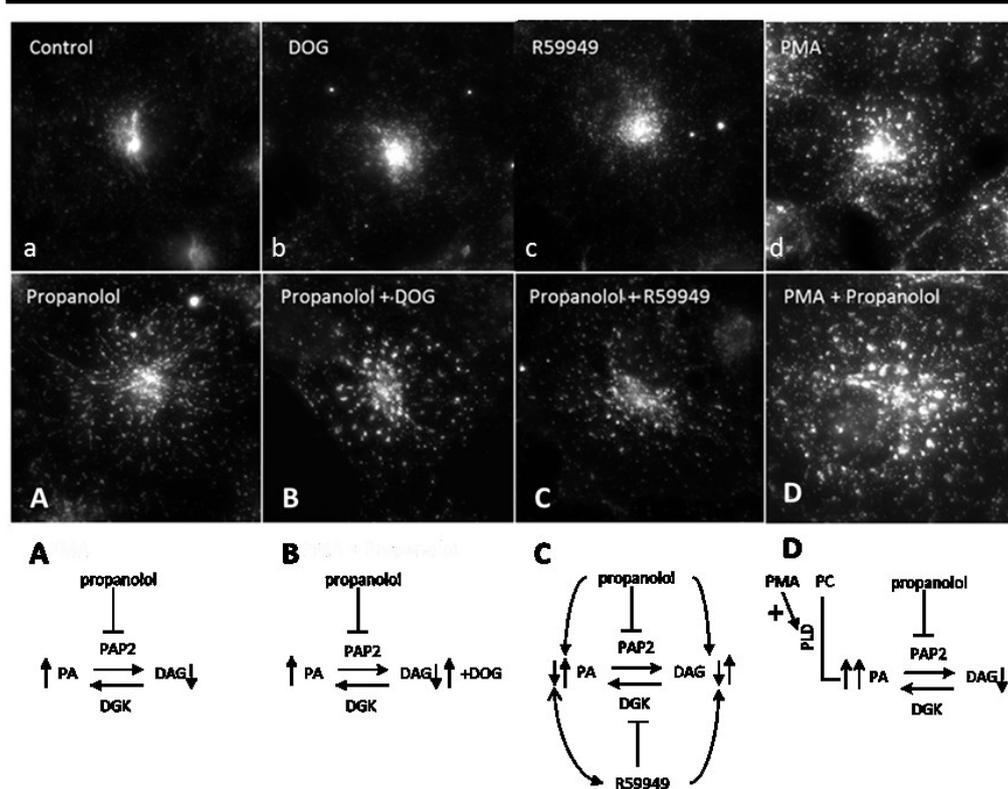


Figura 34. Reversión parcial de los efectos del propanolol sobre la morfología de los endosomas mediante la inhibición de DGK o la adición de DOG. (a-b) Células COS-7 se sometieron a un pulso de transferrina en presencia de DOG (b) R59949 (c) o PMA (d). (A-D) Idénticas condiciones de tratamiento pero en presencia de propanolol. En las condiciones en que utilizamos DOG, R59949 y PMA, éstos se añadieron al medio 30 minutos antes de añadir la transferrina, mientras que el propanolol fue añadido simultáneamente a la transferrina. En la parte inferior de la imagen (A-D) mostramos esquemas que representan los efectos de los diferentes tratamientos aplicados sobre la conversión de PA a DAG. Barra, 10 μ m.

la DGK, nos planteamos si los efectos causados por el propanolol podían deberse principalmente a un incremento inicial de los niveles de PA. Se sabe que el PA actúa como efector de la PIP5K y que un incremento de los niveles de PIP2 en los endosomas tempranos, conlleva un bloqueo en la salida de cargo de este compartimento asociado a un aumento en la polimerización de actina. Para estudiar si se daba esta situación en las células tratadas con propanolol, examinamos el citoesqueleto de actina en relación a los marcadores EEA-1 (endosomas tempranos) y el receptor de transferrina (endosomas tempranos y endosomas de reciclaje). La **figura 35** muestra cómo las células tratadas con propanolol presentaron un cambio en la morfología y distribución tanto de EEA1 como del receptor de transferrina, caracterizado por la presencia de endosomas tempranos engrosados (EEA-1) y en el caso del receptor de transferrina por una redistribución de su habitual localización perinuclear (característica de endosomas de

RESULTADOS

reciclaje) a zonas más periféricas de la célula. Sin embargo, no observamos ninguna asociación evidente entre los endosomas marcados con EEA-1 y el receptor de transferrina y el marcaje con faloidina.

Si bien experimentos adicionales deberían ser realizados, estos resultados sugieren que los cambios morfológicos del compartimento endosomal inducidos por el propanolol parecen ser independientes de la actina.

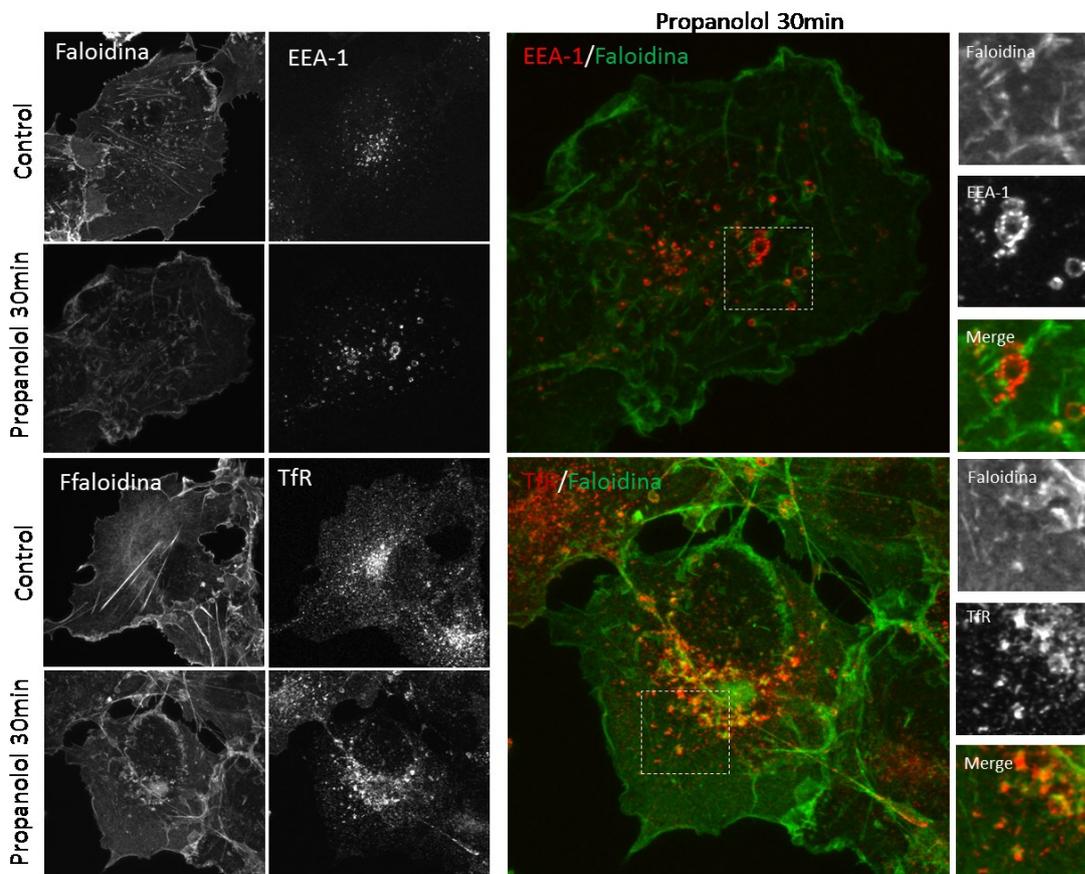


Figura 35 Los efectos morfológicos del propanolol sobre el compartimento endosomal no están relacionados con alteraciones del citoesqueleto de actina. Células COS-7 se trataron con propanolol por 30 minutos, tras lo que las teñimos con faloidina y anti-EEA1 (paneles superiores) o bien faloidina y anti-TfR (receptor de transferrina; paneles inferiores). En la figura podemos apreciar cómo el propanolol induce un engrosamiento de los endosomas tempranos (marcaje con eea-1) y un cambio de distribución del receptor de transferrina, que pierde su localización típicamente perinuclear para verse en estructuras vesiculares engrosadas más periféricas. En las magnificaciones situadas a la derecha de las imágenes, podemos ver cómo en las células tratadas con propanolol el marcaje de faloidina no colocaliza de forma evidente con los endosomas engrosados teñidos con el eea-1 y el receptor de transferrina. Barra, 10µm

RESULTADOS

6. Continuación del proyecto a través del estudio del silenciamiento de las diferentes LPPs.

La continuación de este proyecto iría encaminada a establecer una relación entre las enzimas de la familia de las LPPs y los efectos morfológicos y funcionales descritos con el propanolol. Si bien en el momento de escritura de esta tesis todavía carecemos de resultados funcionales sólidos sobre los efectos del silenciamiento de las diferentes isoformas de la familia de las LPPs, cerramos este apartado con la caracterización del silenciamiento de LPP1, LPP2 y LPP3.

Debido a que carecemos de anticuerpos específicos contra LPP1 y LPP3, analizamos por RT-PCR los niveles de mRNA de cada una de las LPP a partir de lisados de células COS-7 tras 48 horas de haber sido transfectadas con siRNAs específicos de LPP1, LPP2 y LPP3. Tanto al añadir los diferentes siRNA para las diferentes proteínas de la familia de forma individual, como al añadirlos en combinación, obtuvimos niveles de silenciamiento por encima del 90% en el caso de LPP1 y LPP2 y aproximadamente del 60-70% para la LPP3 (**figura 36**).

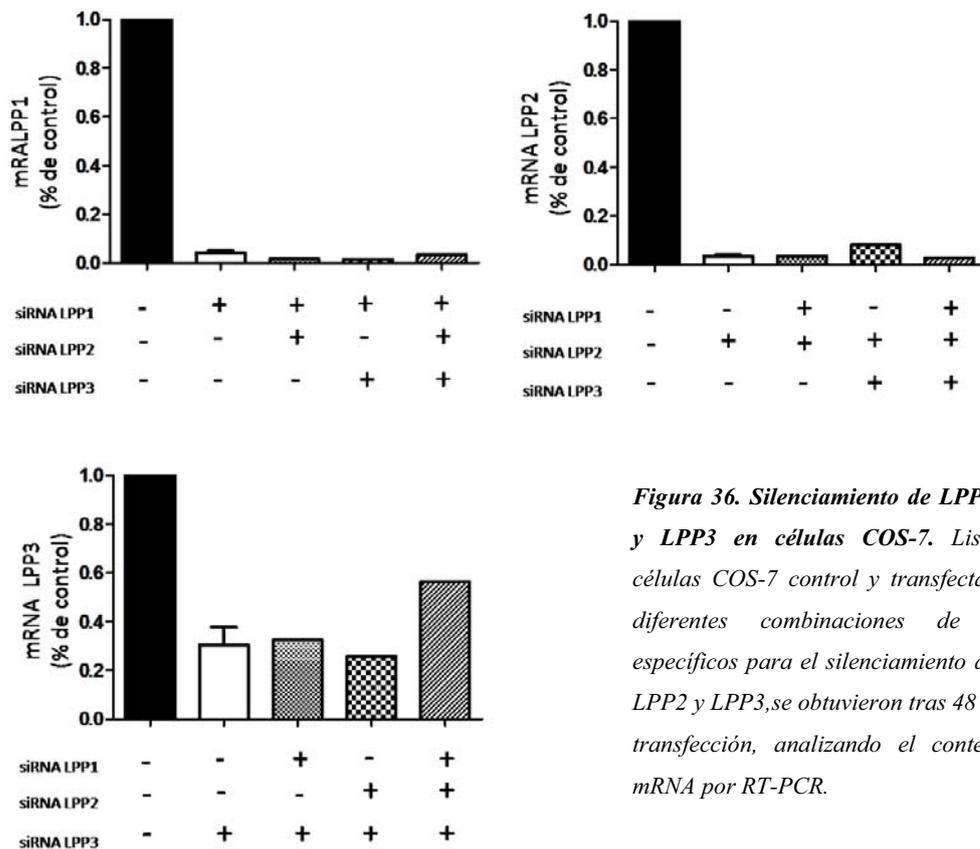


Figura 36. Silenciamiento de LPP1, LPP2 y LPP3 en células COS-7. Lisados de células COS-7 control y transfectadas con diferentes combinaciones de siRNAs específicos para el silenciamiento de LPP1, LPP2 y LPP3, se obtuvieron tras 48 horas de transfección, analizando el contenido de mRNA por RT-PCR.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

(I) LA LPP3 EN EL TRÁFICO DE LA VÍA SECRETORA

1. Localización subcelular de la LPP3

En este estudio aportamos evidencias de que la proteína LPP3 se encuentra distribuida a lo largo de diferentes compartimentos de la vía secretora, desde los sitios de salida del RE (ERES), hasta compartimentos distales del Golgi (trans-Golgi / TGN). Esta localización subcelular concuerda con lo publicado sobre la existencia de dos formas estables de LPP3: una que presenta una N-glicosilación incompleta (y por tanto sensible a EndoH) y otra con glicanos maduros (resistentes a EndoH) (Sciorra y Morris, 1999). Se ha demostrado mediante experimentos de pulso y caza que una parte de la LPP3 no completa su glicosilación (Sciorra y Morris, 1999), indicativo de que una parte de la LPP3 se encuentra de forma relativamente estable entre el RE y el Golgi. Mediante experimentos de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo del área del Golgi, hemos comparado la dinámica de transporte entre el RE y el Golgi del VSV-G-YFP con la LPP3wt-GFP. Los resultados muestran que, mientras la recuperación de los valores iniciales de fluorescencia en el Golgi es muy similar para ambas proteínas, el tiempo de residencia de la LPP3 en el RE es mayor que el del VSV-G. Al fotoblanquear la fluorescencia fuera del Golgi, o sea del marcaje en el RE, hemos observado que a lo largo del tiempo se recupera la señal de la LPP3wt-GFP en el RE. Ya que estos experimentos se realizaron en presencia de cicloheximida, esta recuperación de la fluorescencia en el RE necesariamente debe proceder de la proteína localizada en el Golgi, lo que indica que una parte de la LPP3 se transporta retrógradamente al RE. Estos resultados conjuntamente con la colocalización de la LPP3 endógena con marcadores de ERES y ERGIC indican que la LPP3 no puede ser considerada como una proteína que se dirige directamente hacia la membrana plasmática, sino que una parte de la proteína reside establemente en compartimentos de la etapa temprana de la vía secretora, siguiendo un transporte bidireccional entre el RE y el Golgi.

Respecto al mecanismo molecular a través del cual podría producirse el transporte retrógrado de LPP3, a diferencia de las isoenzimas LPP1 y LPP2, la LPP3 contiene entre los aminoácidos 279-283 de su extremo C-terminal (en contacto con el citoplasma) la secuencia KTKTT. Dicha secuencia coincide con 2 de los motivos de interacción con el coatómero descritos en proteínas de compartimento intermedio

DISCUSIÓN

(concretamente las secuencias KXXXX y KKXX) (Beck et al., 2009; Jackson et al., 1990; Nilsson et al., 1989). Una hipotética interacción de este motivo con la maquinaria COPI podría explicar la localización de una parte de la LPP3 entre el RE y el Golgi, siguiendo un sistema de reciclaje similar al de ERGIC-53 o el receptor de KDEL (Cabrera et al., 2003; Rohde et al., 2003; Schindler et al., 1993). Por otra parte la colocalización de la LPP3wt-GFP con la subunidad B de la Shiga toxin (STxB), cargo que sigue una vía de transporte retrógrado dependiente de Rab6, indica que el transporte retrógrado de la LPP3 ocurre más probablemente en vesículas Rab6. Un sistema mixto en el que la LPP3 pudiese seguir ambas vías de transporte no es probable, puesto que se ha demostrado que las vesículas de Rab6 excluyen el cargo que sigue la vía de transporte retrógrado dependiente de COPI. Cualquiera que sea el mecanismo a través del cual se produzca el reciclaje de LPP3 de Golgi a RE, parte del *pool* total de LPP3 escaparía de este sistema, y completaría su N-glicosilación en los compartimentos distales del Golgi para dirigirse a la membrana plasmática, donde su localización se ha asociado a balsas lipídicas (Kai et al., 2006) y en las uniones adherentes (Humtsoe et al., 2010).

2. Papel de la LPP3 en la síntesis de DAG y en la síntesis *de novo* de fosfolípidos y lípidos neutros.

La maquinaria enzimática que regula el metabolismo lipídico en los diferentes compartimentos de la vía secretora determina su morfología, la formación de intermediarios de transporte y el reclutamiento de proteínas necesarias para su correcta funcionalidad (Bechler et al., 2010; Ben-Tekaya et al., 2010; Brown et al., 2003; de et al., 2000; Morikawa et al., 2009; San et al., 2009; Schmidt y Brown, 2009; Subathra et al., 2011). En este trabajo incorporamos la proteína LPP3 al conjunto de enzimas lipídicas implicadas en la formación de intermediarios de transporte entre el RE y el Golgi a través de regular la producción de diacilglicerol (DAG). El silenciamiento de LPP3 reduce la incorporación de [¹⁴C] acetato en el DAG y el triacilglicerol (TAG), así como en las mayores clases de fosfolípidos, indicando que existe una inhibición en el proceso de síntesis *de novo* de glicerofosfolípidos. Hasta ahora se había atribuido a la enzima LPP3 un papel en la síntesis de DAG proveniente de la formación de PA producido por la PLD. En este contexto la LPP3 participaría en la reconversión o

DISCUSIÓN

reciclaje de fosfolípidos ya presentes en las membranas: la activación de PLD consumiría PC para formar PA y la LPP3 defosforilaría el PA para formar DAG. Apoyando esta visión se ha publicado que la sobreexpresión de LPP3 produce un incremento notable de la síntesis de DAG tras la estimulación con PMA (que tiene como uno de sus mecanismos efectores la activación de PLD). Dicho incremento es varias órdenes de magnitud superior al cuantificado en células estimuladas únicamente con PMA o estimuladas con PMA y sobreexpresando la isoenzima LPP1 (Sciorra y Morris 1999). El hecho de que LPP3, conjuntamente con PLD2, se encuentre en dominios de membrana resistentes a la extracción con detergentes no iónicos enriquecidos en caveolina-1 (balsas lipídicas) también ha servido como argumento para proponer una función secuencial de LPP3 en el metabolismo del PA producido por la PLD. Nuestros resultados demuestran que la LPP3 también resulta necesaria en la conversión del PA que proviene de la *síntesis de novo* a DAG y que este paso es importante en la formación del resto de los principales glicerosfosfolípidos, la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilserina (PS), así como del lípido neutro TAG. El incremento observado en los niveles de PA marcado con [^{14}C] acetato en células silenciadas para LPP3 también refuerza esta idea. Por otra parte, hemos observado que en las células silenciadas el marcaje de los principales fosfolípidos con [^{32}P] ácido ortofosfórico no varía ni en cuanto a niveles totales ni en la proporción de los diferentes fosfolípidos respecto al nivel total de fosfolípidos. Debemos tener en cuenta, que a diferencia del [^{14}C] acetato, que sólo se incorporaría tanto en lípidos neutros como en fosfolípidos provenientes de la vía de síntesis *de novo*, el marcaje con [^{32}P] ácido ortofosfórico se incorpora tanto en aquéllos fosfolípidos que provienen de la síntesis *de novo* como en aquéllos ya presentes en las membranas y que son reconvertidos a otras especies lipídicas por la acción de enzimas con actividad cinasa (por ejemplo la diacilglicerol cinasa). El hecho de que el silenciamiento de la LPP3 no varíe los niveles de fosfolípidos marcados con [^{32}P] ácido ortofosfórico es indicativo de que las vías de reciclaje de fosfolípidos pueden actuar compensando la disminución observada en la síntesis *de novo*, y que los efectos funcionales producidos al silenciar la LPP3 no puede atribuirse a una disminución generalizada de los niveles de los principales fosfolípidos.

Además de implicar a la LPP3 en la formación del DAG necesario para la síntesis *de novo* de lípidos, hemos observado que el silenciamiento de LPP3 reduce la presencia en el Golgi del dominio C1b de PKC θ (que actúa como sensor de DAG), indicando que la LPP3 está implicada en la síntesis de DAG en las membranas de Golgi.

3. Papel de la LPP3 en la formación de intermediarios de transporte.

En nuestro trabajo mostramos que el tratamiento con propanolol a una concentración que inhibe a las enzimas de la familia PAP2 (LPP1, LPP2 y LPP3) y el silenciamiento de la LPP3, impiden la formación de túbulos desde el compartimento intermedio (ERGIC). Proponemos que la LPP3 es necesaria a nivel del ERGIC para la gemación de estructuras que requieren un alto grado de curvatura de membrana (como los túbulos), y que este efecto está relacionado con su actividad catalítica y la producción de DAG. Apoyando esta interpretación, la adición de DOG (dioctanoil-sn-glicerol), un análogo de DAG de cadena corta que penetra en membranas intracelulares, atenúa los efectos inhibitorios del silenciamiento de LPP3 sobre la tubulación del ERGIC. En relación a esto último, se ha demostrado que la formación de DAG a partir de PA resulta necesaria para la gemación de intermediarios de transporte desde el Golgi (Asp et al., 2009). Los autores de dicho estudio observaron que al utilizar una concentración de propanolol lo suficientemente alta como para inhibir a las enzimas de las familias PAP1 (lipinas 1 y 2) y PAP2, la ultraestructura de las cisternas no mostraba perfiles vesiculares. Los autores propusieron que las enzimas de las familias PAP1 y PAP2, actuarían en las etapas iniciales de la formación de vesículas, es decir, induciendo la curvatura positiva (proceso de gemación). Sin embargo, en resultados previos de nuestro grupo demostramos que la utilización de propanolol a una concentración inferior que no inhibe las PAP1 (Meier et al., 1998), produce la acumulación de vesículas tipo COPI en áreas adyacentes al Golgi, muchas de ellas conectadas a las cisternas por la zona del cuello (Fernandez-Ulibarri et al., 2007), interpretándolo como que se interfiere el proceso final de escisión de la vesícula. Otro factor a tener en cuenta a la hora de explicar las diferencias entre ambos estudios es, aparte de la diferente concentración de propanolol, el tiempo de tratamiento con la droga antes de analizar sus efectos. En el primer estudio observaron la ausencia de perfiles vesiculares tras 5 minutos de tratamiento con propanolol, mientras que en nuestro estudio el incremento de perfiles vesiculares sin

DISCUSIÓN

fisionarse se midió tras 15 minutos de tratamiento. Es posible que una inhibición completa de las enzimas PAP1 y PAP2 bloquee la gemación de vesículas y que la inhibición únicamente de las enzimas PAP2 cause un retraso, pero no un bloqueo, de la gemación de intermediarios de transporte. Esta interpretación, explicaría el aumento de perfiles vesiculares tras 15 minutos de tratamiento con propanolol como consecuencia de un retraso de la etapa de gemación. Sin embargo, también sería compatible con un defecto de ambos procesos, la gemación y la fisión. De hecho la observación de que el tratamiento con propanolol desplaza del Golgi ArfGAP1, necesario en la fisión del coatómero, refuerza esta hipótesis.

El conjunto de estos resultados previos y los que exponemos en este trabajo, indican que las enzimas de la familia PAP1 y la isoenzima LPP3 (familia PAP2) podrían cooperar en la formación de intermediarios de transporte en el ERGIC y el Golgi tanto en las etapas iniciales (gemación) como en las etapas más tardías de fisión, ambos procesos dependientes de cambios en la curvatura de las membranas. A nivel del Golgi, la inhibición de la actividad PAP2 con propanolol y el silenciamiento de LPP3 reducen el número de intermediarios de transporte (vesículas y túbulos) marcados con Rab6. Por otra parte, a pesar de que hay una disminución del número de túbulos, observamos un incremento en su longitud media. Este efecto no se puede explicar implicando a la LPP3 únicamente en una etapa concreta de la formación de intermediarios de transporte Rab6. Un defecto en la gemación reduciría el número de vesículas y túbulos, pero no observaríamos un incremento de la longitud promedio de los túbulos. Un defecto en la fisión disminuiría el número de vesículas, pero incrementaría el número de túbulos, tal y como sucede, por ejemplo, cuando se inhibe la actividad de miosinaII (Miserey-Lenkei et al, 2010). Por lo tanto, proponemos un modelo en que, en una etapa inicial, la LPP3 (cuyo dominio catalítico se orienta hacia el lumen) formaría DAG (estructura cónica) en la hemimembrana interna. En esta etapa la LPP3 actuaría de forma coordinada con la enzima citosólica PLA2, que forma LPA (estructura cónica invertida) en la hemimembrana externa (de Figueiredo et al., 2000; San Pietro et al., 2009; Yang et al., 2011). La acumulación de lípidos de estructura cónica (DAG) en la hemimembrana luminal y de estructura cónica invertida (LPA) en la hemimembrana citosólica, actuaría sinérgicamente promoviendo la gemación de vesículas y túbulos desde las membranas del Golgi. Por otra parte, aunque no existen pruebas experimentales que permitan

DISCUSIÓN

determinar la localización del DAG a la largo de una vesícula o túbulo, la etapa de fisión requiere de una fuerte curvatura sobre el cuello de vesículas y túbulos. Una de las características del DAG es su rápida translocación entre las hemimembranas de la bicapa (proceso conocido como “flip flop”). Esto permitiría que el DAG inicialmente generado en la hemimembrana luminal pudiese rápidamente pasar a la membrana citosólica, ayudando a la formación de curvatura negativa. Por otra parte, la acumulación de DAG en la membrana citosólica, también podría ayudar al reclutamiento de ArfGAP1 a través de su dominio LPS (Antonny et al., 1997; Ambroggio et al., 2010) potenciando la fisión de las vesículas tipo COPI.

4. Papel de la LPP3 en la regulación del transporte retrógrado.

A pesar de que no podemos conocer con exactitud en qué etapa la LPP3 participa en la biogénesis de vesículas y túbulos, nuestros resultados demuestran que juega un papel en la regulación del tráfico entre el Golgi y el RE. Tanto el silenciamiento de la LPP3 como la sobreexpresión de un mutante catalíticamente inactivo retrasan el transporte retrógrado dependiente de Rab6 de la STxB. En línea con nuestros resultados empleando el propanolol (Fernández-Ulibarri et al, 2007), vemos que el silenciamiento de LPP3 también causa un retraso en el transporte dependiente de COPI de la STxB-KDEL. Además, el análisis ultraestructural del Golgi por microscopía electrónica en células silenciadas para LPP3, refleja un incremento del número de vesículas en estrecha proximidad a las cisternas y mostrando una fisión incompleta. Algunas de estas vesículas contienen la cubierta COPI. No resulta fácil explicar las razones por las cuáles la LPP3 pueda estar afectando diferentes vías de transporte, con distintos requerimientos moleculares (una dependiente de Rab6 y otra dependiente de COPI). Una posible explicación se basa en el papel del DAG como generador de curvatura a partir de sus características estructurales. Puesto que la formación de curvatura resulta necesaria en ambos tipos de intermediarios de transporte, una disminución de los niveles de DAG podría afectar a ambas vías. Otra explicación sería que el DAG es necesario para el reclutamiento de proteínas implicadas en el transporte retrógrado dependiente de COPI y de Rab6. Respecto al transporte COPI, se ha demostrado que el propanolol induce una disociación de la proteína de fisión ArfGAP1 de las membranas de Golgi (Fernández-Ulibarri et al, 2007). Aunque no se ha demostrado que el DAG

DISCUSIÓN

intervenga en el reclutamiento de ninguno de los componentes moleculares del transporte de Rab6, el nivel de conocimiento que tenemos sobre esta vía y los mecanismos que la regulan es escaso. De hecho, no ha sido hasta hace poco que se ha implicado a Rab6 en la salida de cargo con destino a la membrana plasmática, aparte de su función ya conocida en el transporte retrógrado independiente de COPI. El silenciamiento de Rab6 causa un retraso en la llegada del VSV-G a la membrana plasmática (Grigoriez et al, 2007; Miserey-Lenkei et al, 2010). Por otra parte, el silenciamiento de la proteína motora del citoesqueleto de actina miosinaII, causa la formación de túbulos de Rab6 desde el TGN que contienen tanto VSV-G como la STxB (Miserey-Lenkei et al, 2010). Curiosamente, el fenotipo de tubulación que se observa al inhibir o silenciar miosinaII recuerda al observado cuando se sobreexpresa un dominante negativo (catalíticamente inactivo) de la proteína PKD (Liljedahl et al. 2001; Bossard et al. 2007), cuyo reclutamiento en el TGN depende de DAG (Baron y Malhotra 2002). Teniendo en cuenta que el silenciamiento de PKD causa un retraso en la salida de cargo con destino a la membrana basolateral y que los túbulos inducidos por un dominante negativo de PKD contienen VSV-G (Liljedahl et al. 2001; Bossard et al. 2007), es factible que PKD participe de la maquinaria de fisión de las vesículas Rab6. Hemos probado que las células a 15°C producen túbulos desde el Golgi marcados con el dominio C1b de PKC θ . Un efecto interesante, es que mientras los túbulos de Rab6 inducidos a 15°C se fisianan y desaparecen rápidamente después del cambio de temperatura, los túbulos marcados con el dominio C1b persisten durante mucho más tiempo. Es posible que la sobreexpresión del dominio C1b cause un cierto desplazamiento de PKD del TGN al competir por los mismos sitios de unión. Reforzando esta idea, la sobreexpresión de los dos dominios C1 de PKC θ (dominios C1a y b) produce aún en condiciones fisiológicas (a 37°C) la fragmentación y tubulación del TGN (resultados no mostrados). En el caso de que esta hipótesis fuese cierta, puesto que los túbulos del dominio C1b contienen STxB, la PKD participaría en la fisión de los intermediarios de transporte retrógrado dependientes de Rab6. Una manera de profundizar en el papel del DAG en la formación de intermediarios de transporte Rab6, podría ser explorar la función de PKD en este proceso.

5. Papel de la LPP3 en la regulación del transporte anterógrado.

DISCUSIÓN

Respecto al transporte anterógrado de RE a Golgi, no hemos observado afectación del transporte del VSV-G ni de la proteína soluble ssDsRed en células silenciadas para LPP3. Sin embargo, hemos observado que el silenciamiento de LPP3 produce un incremento de la colocalización de ERGIC 53-GFP con el ssDsRed tras cambiar las células de 15°C a 37°C (es decir, al reactivar el transporte desde el ERGIC hacia el Golgi). En la introducción hemos explicado la existencia de dos modelos para describir el transporte de proteínas desde el RE al Golgi. En el modelo de maduración, el ERGIC se forma como consecuencia de la fusión de vesículas tipo COPII tras su salida de los ERES, a partir de aquí, las estructuras resultantes siguen un transporte direccional hacia el Golgi, donde se fusionan para dar lugar al cis-Golgi. En el modelo alternativo, el ERGIC se considera un compartimento de membrana estable desde el cual, el cargo que llega del RE, se incorpora en intermediarios de transporte de salida hacia el Golgi o de vuelta al RE. Apoyando este modelo, recientemente se ha publicado un trabajo en el que se analizó la dinámica de ERGIC53-GFP conjuntamente con el ssDsRed (Ben-Tekaya et al, 2005). Los autores observaron que tras bloquear el transporte anterógrado del ssDsRed desde el ERGIC incubando las células a bajas temperaturas, el cambio a 37°C inducía el *sorting* de ERGIC53-GFP y el ssDsRed desde zonas del ERGIC positivas para ambos marcajes.

Teniendo en cuenta este último modelo, la mayor colocalización de ERGIC53-GFP con el ssDsRed en las células silenciadas para LPP3 podría deberse a un defecto en el *sorting* de las proteínas de compartimento intermedio de aquellas regiones del ERGIC que contienen cargo con destino anterógrado. Esto explicaría: 1) la reducción en el número total de estructuras marcadas con ERGIC53, 2) el incremento de su diámetro promedio, y 3) una menor segregación de ERGIC53 y el ssDsRed. Teniendo en cuenta que el transporte anterógrado no se ve afectado al silenciar LPP3, y que tanto el silenciamiento como el tratamiento con propanolol reducen la tubulación del ERGIC, no es probable que los túbulos representen mayoritariamente intermediarios de transporte dirigidos hacia el Golgi. Alternativamente, pueden suponer un tipo de transporte de proteínas residentes del compartimento intermedio (como ERGIC53) entre diferentes regiones del ERGIC, y/o un mecanismo de *sorting* de estas proteínas del cargo con destino al Golgi.

DISCUSIÓN

Debido al retraso en el transporte retrógrado dependiente de COPI de la STxB-KDEL en las células silenciadas para LPP3, la disminución en el número de estructuras vesiculares del ERGIC también podría explicarse como consecuencia de una disminución del transporte retrógrado desde el cis-Golgi al ERGIC. Al no estar afectado el transporte anterógrado, un menor transporte retrógrado se reflejaría en una disminución del contenido de membranas del ERGIC.

Más difícil de explicar, resulta el hecho de que el mutante catalíticamente inactivo de LPP3 se localice más en el RE que la forma silvestre. Inicialmente nos planteamos la hipótesis de que la actividad catalítica de LPP3 fuese necesaria para el transporte anterógrado, pero esto no resulta probable ya que el silenciamiento de LPP3 no retrasa el transporte del ssDsRed ni el VSV-G. Sin embargo, el silenciamiento de LPP3 no es completo, y el tratamiento con propanolol, aunque ligeramente, retrasa el transporte de la LPP3wt de RE a Golgi. Si bien la hipótesis más factible para explicar esta diferente distribución tenga que ver con algún tipo de plegamiento defectuoso de la LPP3 mutada, no podemos descartar taxativamente que la LPP3 regule la salida de cargo de RE a Golgi, aún si ser tan relevante en este proceso como en el transporte retrógrado.

En conclusión, nuestro estudio muestra que la LPP3 participa en la formación de intermediarios de transporte en diferentes compartimentos de la etapa temprana de la vía secretora, siendo necesaria para el transporte retrógrado de Golgi a RE. Esta función se añade a su papel en la regulación de diferentes mecanismos fisiológicos (Escalante-Alcalde et. al., 2003; Long et. al., 2005; Humtsoe et. al., 2010), y permite incorporarla al creciente conjunto de enzimas del metabolismo lipídico cuya función resulta necesaria para el transporte intracelular.

(II) EL DAG EN LA ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE CLATRINA

1. Efectos de la inhibición de la actividad de las PAP en la internalización del EGF y la transferrina.

Como primera aproximación al estudio de la función de la vía de síntesis de DAG a partir de PA (vía de las enzimas PAP) en la endocitosis dependiente de clatrina, examinamos por microscopía TIRF la dinámica de internalización conjunta del EGF y la transferrina en células control y tratadas con propanolol. Se ha demostrado que la internalización de la transferrina y el EGF desde la membrana plasmática presenta dinámicas diferentes (Leonard et al, 2008). El EGF permanece durante más tiempo en zonas próximas a la membrana plasmática, mientras que la transferrina se dirige rápidamente hacia el compartimento de endosomas de reciclaje (situado a nivel perinuclear). También se ha publicado que el *sorting* de ambos ligandos comienza desde el inicio del proceso de internalización. Esto es debido a una diferente distribución de sus respectivos receptores en la membrana plasmática, desde donde se dirigen hacia diferentes poblaciones endosomales. Mientras las vesículas de clatrina que contienen el EGF van directamente hacia los endosomas tempranos (positivos para EEA-1), las vesículas de transferrina se fusionan con un compartimento endosomal distinto, caracterizado por la presencia de la proteína rabenosina-5 (Navaroli et al., 2012).

Al analizar la internalización del EGF y la transferrina en células control observamos que, de acuerdo con los resultados previamente descritos, la transferrina desaparece mucho más rápidamente que el EGF de la zona TIRF, indicativo de que después de su internalización, se dirige inmediatamente a compartimentos situados en zonas más internas de la célula. Al tratar las células con propanolol, la transferrina permanece por más tiempo en las zonas más próximas a la membrana plasmática, pero no observamos diferencias en la internalización del EGF. Estudios recientes han demostrado la importancia de la producción de DAG a partir de la acción de la PLC en la endocitosis de la transferrina (Subramanya et al, 2009 y 2010). Basándonos en nuestros resultados, pensamos que la conversión de PA a DAG también sería necesaria en este proceso. Respecto al EGF, se ha descrito la importancia del PA en su internalización (Antonescu et al., 2010), pero nuestros resultados apuntan a que en este caso, si bien unos niveles basales de PA serían necesarios para la endocitosis del EGF, incrementar el PA

DISCUSIÓN

inhibiendo su conversión a DAG no acelera la internalización del EGF. También hemos analizado el porcentaje de colocalización de la transferrina y el EGF en la zona TIRF en condiciones control y de tratamiento con propanolol. El propanolol incrementa el porcentaje de colocalización del EGF con la transferrina, pero esto se debe principalmente a que el número de estructuras marcadas con transferrina en la zona TIRF es mayor a lo largo del tiempo que en las células control. A pesar de esto, el porcentaje de colocalización entre ambos marcadores es bajo, lo que indica que el propanolol no altera el proceso de *sorting* que ocurre en la membrana plasmática, es decir, que en presencia de propanolol la entrada del EGF y la transferrina continúa ocurriendo en regiones diferentes de la membrana plasmática.

2. Efectos de la inhibición de la actividad de las PAP en el transporte de transferrina y EGF desde el compartimento de endosomas tempranos.

Al analizar los efectos del propanolol en el transporte de la transferrina y del EGF desde el compartimento endosomal, hemos observado que el propanolol causa el engrosamiento y la tubulación de los endosomas tempranos. En células control, tras 15 minutos de internalización conjunta del EGF y la transferrina ambos marcadores se encuentran totalmente segregados: el EGF en el compartimento de endosomas tempranos y la transferrina en el compartimento de endosomas de reciclaje. En cambio, en células tratadas con propanolol la transferrina y el EGF colocalizan en el compartimento de endosomas tempranos. Si bien a nivel de la membrana plasmática la transferrina y el EGF se internalizan en diferentes intermediarios de transporte, el propanolol causa un impedimento del *sorting* de ambos cargos desde los endosomas tempranos. Resulta interesante que mientras existe colocalización de la transferrina y el EGF en el cuerpo de los endosomas, la transferrina penetra en los túbulos causados por el propanolol, pero no así el EGF. Esto es indicativo de que los túbulos son intermediarios de transporte que median el *sorting* de la transferrina hacia los endosomas de reciclaje. Por otra parte, el tratamiento con propanolol también causa una alteración en el transporte de cargo hacia la vía de degradación lisosomal, ya que hemos observado que tras añadir EGF, la degradación del EGFR se ve retrasada. En referencia a este punto, resulta interesante especular que ambos procesos, el defecto en la fisión de los intermediarios de transporte dirigidos a la vía de reciclaje y el retraso en la vía de

DISCUSIÓN

degradación, puedan estar relacionados. Se ha publicado que el proceso de maduración de los endosomas tempranos a endosomas tardíos determina la formación de túbulos. El cambio de Rab5 (endosomas tempranos) a Rab7 (endosomas tardíos) coincide con el momento de mayor tubulación de los endosomas (van Weering et al., 2012). Más recientemente, se ha publicado que tratar las células con un inhibidor de dinamina impide la fisión de los túbulos formados en el compartimento de endosomas tempranos (Mesaki et al., 2011). En estas condiciones se produce una inhibición del movimiento de los endosomas tempranos asociado al citoesqueleto de microtúbulos, así como un retraso en su acidificación. Los autores proponen que el correcto *sorting* de cargo con destino a la vía de reciclaje es necesario para la maduración de los endosomas tempranos a endosomas tardíos.

A partir de nuestros resultados, proponemos que la formación de DAG a partir de PA sería necesaria para la fisión de los intermediarios de transporte que median la salida de cargo del compartimento de endosomas tempranos al compartimento de reciclaje. Este defecto en la fisión, también podría explicar que hubiese un retraso en la degradación del receptor de EGF como consecuencia de un bloqueo del proceso de maduración de endosomas tempranos a endosomas tardíos.

3. Papel del PA y el DAG en el tráfico de la transferrina.

Para determinar si los efectos morfológicos y funcionales del tratamiento con propanolol son efectivamente dependientes de una disminución de los niveles de DAG, utilizamos diferentes tratamientos de reversión, como por ejemplo el inhibidor de las DAGK tipo I R59949. Se ha demostrado que este inhibidor disminuye los niveles totales de PA de la célula (Antonescu et al, 2010). Como este PA proviene de la fosforilación del DAG, resulta lógico pensar que también incrementa los niveles totales de DAG. Al añadir de forma conjunta el propanolol y el R59949 observamos una notable disminución del número de túbulos, una disminución del tamaño de los endosomas y una mayor concentración de la transferrina a nivel perinuclear (compartimento de reciclaje). Estos resultados sugieren que los efectos causados por el propanolol están mediados por un desequilibrio de los niveles de PA y DAG. Cuando simplemente tratamos de revertir la disminución de DAG añadiendo el análogo DOG, si bien se produce una disminución en la tubulación, no conseguimos revertir el fenotipo

DISCUSIÓN

de endosomas engrosados, ni el transporte de la transferrina al compartimento perinuclear. Se ha demostrado que la estimulación con ésteres de forbol induce la fusión homotípica de los endosomas tempranos en un proceso dependiente de PKC (Aballay et al., 1999). Más recientemente se ha publicado que al inhibir calmodulina, se produce un engrosamiento de los endosomas tempranos acompañado de un bloqueo en el transporte desde este compartimento, y que este efecto está mediado por una sobre-activación de PKC δ (Lladó et al, 2008). Si bien nuestros resultados apuntan a que la formación de DAG a partir de PA resulta importante en la fisión de los túbulos dirigidos hacia los endosomas de reciclaje, no podemos descartar que al tratar las células con elevadas concentraciones de DOG estemos activando una serie de mecanismos moleculares que inhiban el transporte desde los endosomas tempranos. Esto nos hace pensar que puede existir una estrecha regulación de los niveles de DAG en los diferentes compartimentos de la vía endocítica, siendo importante para el mantenimiento de su morfología y funcionalidad.

4. Continuación del proyecto

En el anterior apartado de la discusión hemos hablado del papel que puede jugar el DAG en la formación de intermediarios de transporte a través facilitar la curvatura de las membranas. Una forma de continuar este proyecto podría ser buscar mecanismos moleculares que ayudasen a explicar los efectos morfológicos y funcionales observados con el propanolol. A modo de ejemplo, nos planteamos si el defecto en el transporte desde los endosomas tempranos podía deberse a una alteración en la polimerización del citoesqueleto de actina. El tratamiento con propanolol, al bloquear la conversión de PA a DAG, incrementaría los niveles de PA. El PA estimula la actividad de las enzimas PIP5K lo que produce PIP2 (Moritz et al., 1992). Se ha publicado que una acumulación de PIP2 en los endosomas tempranos bloquea la salida de cargo desde este compartimento. Esto se debe a un incremento de la formación de F-actina dependiente de N-WASP en asociación a la membrana endosomal (Vicinanza et al., 2011). Si bien no hemos observado una clara asociación de F-actina con los endosomas engrosados producidos por el propanolol, se podrían intentar aproximaciones experimentales alternativas, como estudiar si se produce un reclutamiento del dominio PH de unión a

DISCUSIÓN

PIP2 en los endosomas tempranos, o ver si la sobreexpresión de la proteína PIP2-fosfatasa de endosomas tempranos OCRL puede revertir los efectos del propanolol.

Otro aspecto interesante sería la identificación del papel de las diferentes proteínas de la familia PAP2 (LPP1, LPP2 y LPP3), cuya localización, al menos parcialmente, se encuentra en la membrana plasmática, en la endocitosis dependiente de clatrina y en el tráfico desde el compartimento de endosomas tempranos hacia las vías de reciclaje y degradación.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES (I): La LPP3 en la vía secretora

1. La LPP3 se localiza de forma diferencial en distintos compartimentos de la vía secretora.
2. La LPP3 cicla en parte entre el RE y el Golgi.
3. La LPP3 regula la arquitectura y la dinámica de membranas del ERGIC.
4. La LPP3 regula la formación de intermediarios del transporte retrógrado (Rab6-dependiente y COPI-dependiente) pero no el transporte anterógrado (ER-Golgi), en un mecanismo dependiente de su actividad catalítica.
5. La LPP3 regula los niveles de DAG en el Golgi, y la formación de DAG en el contexto de la síntesis *de novo* de lípidos.

CONCLUSIONES (II): El DAG en la endocitosis dependiente de clatrina

6. La actividad PAP2 participa en las primeras etapas de la endocitosis clatrina dependiente de tipo constitutiva (transferrina), sin afectar a la endocitosis regulada del EGF.
7. La actividad PAP2 es necesaria para la fisión de intermediarios de transporte desde el compartimento de endosomas tempranos, y para la maduración a endosomas tardíos.
8. La actividad PAP2 participa en el transporte hacia los endosomas de reciclaje regulando la conversión de PA a DAG.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aballay, A., YP.D. Stahl, y L.S. Mayorga. 1999. Phorbol ester promotes endocytosis by activating a factor involved in endosome fusion. *Journal of cell science*. 112 (Pt 15):2549-2557.
- Ahn, E.H., and J.J. Schroeder. 2010. Induction of apoptosis by sphingosine, sphinganine, and C(2)-ceramide in human colon cancer cells, but not by C(2)-dihydroceramide. *Anticancer research*. 30:2881-2884.
- Ambroggio, E., B. Sorre, P. Bassereau, B. Goud, J.B. Manneville, y B. Antony. 2010. ArfGAP1 generates an Arf1 gradient on continuous lipid membranes displaying flat and curved regions. *The EMBO journal*. 29:292-303.
- Antonescu, C.N., G. Danuser, y S.L. Schmid. 2010. Phosphatidic acid plays a regulatory role in clathrin-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell*. 21:2944-2952.
- Antony, B. 2006. Membrane deformation by protein coats. *Current opinion in cell biology*. 18:386-394.
- Antony, B., S. Beraud-Dufour, P. Chardin, y M. Chabre. 1997a. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*. 36:4675-4684.
- Antony, B., J. Bigay, J.F. Casella, G. Drin, B. Mesmin, y P. Gounon. 2005. Membrane curvature and the control of GTP hydrolysis in Arf1 during COPI vesicle formation. *Biochemical Society transactions*. 33:619-622.
- Antony, B., I. Huber, S. Paris, M. Chabre, y D. Cassel. 1997b. Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *The Journal of biological chemistry*. 272:30848-30851.
- Antony, B., D. Madden, S. Hamamoto, L. Orci, y R. Schekman. 2001. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nature cell biology*. 3:531-537.
- Asp, L., F. Kartberg, J. Fernandez-Rodriguez, M. Smedh, M. Elsnér, F. Laporte, M. Barcena, K.A. Jansen, J.A. Valentijn, A.J. Koster, J.J. Bergeron, y T. Nilsson. 2009. Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Molecular biology of the cell*. 20:780-790.
- Baines, A.C., y B. Zhang. 2007. Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. *Trends in biochemical sciences*. 32:381-388.
- Bannykh, S.I., y W.E. Balch. 1997. Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *The Journal of cell biology*. 138:1-4.
- Bannykh, S.I., T. Rowe, y W.E. Balch. 1996. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *The Journal of cell biology*. 135:19-35.
- Bao, J., I. Alroy, H. Waterman, E.D. Schejter, C. Brodie, J. Gruenberg, y Y. Yarden. 2000. Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors

BIBLIOGRAFÍA

- from a degradative pathway to the recycling endosome. *The Journal of biological chemistry*. 275:26178-26186.
- Bard, F., y V. Malhotra. 2006. The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annual review of cell and developmental biology*. 22:439-455.
- Barila, D., M. Plateroti, F. Nobili, A.O. Muda, Y. Xie, T. Morimoto, y G. Perozzi. 1996. The Dri 42 gene, whose expression is up-regulated during epithelial differentiation, encodes a novel endoplasmic reticulum resident transmembrane protein. *The Journal of biological chemistry*. 271:29928-29936.
- Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M.F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, y R. Schekman. 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 77:895-907.
- Baron, C.L., y V. Malhotra. 2002. Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science*. 295:325-328.
- Bazzoni, G., y E. Dejana. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*. 84:869-901.
- Beck, R., M. Rawet, F.T. Wieland, y D. Cassel. 2009. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett*. 583:2701-2709.
- Becker, K.P., y Y.A. Hannun. 2003. cPKC-dependent sequestration of membrane-recycling components in a subset of recycling endosomes. *The Journal of biological chemistry*. 278:52747-52754.
- Becker, K.P., y Y.A. Hannun. 2004. Isoenzyme-specific translocation of protein kinase C (PKC) β 1 and not PKC β 2 to a juxtannuclear subset of recycling endosomes: involvement of phospholipase D. *The Journal of biological chemistry*. 279:28251-28256.
- Bechler, M.E., A.M. Doody, E. Racoosin, L. Lin, K.H. Lee, y W.J. Brown. 2010. The phospholipase complex PAFAH 1b regulates the functional organization of the Golgi complex. *J.Cell Biol*. 190:45-53.
- Ben-Tekaya, H., R.A. Kahn, y H.P. Hauri. 2010. ADP ribosylation factors 1 and 4 and group VIA phospholipase A regulate morphology and intraorganellar traffic in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Mol.Biol.Cell*. 21:4130-4140.
- Ben-Tekaya, H., K. Miura, R. Pepperkok, y H.P. Hauri. 2005. Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC. *Journal of cell science*. 118:357-367.
- Beznoussenko, G.V., y A.A. Mironov. 2002. Models of intracellular transport and evolution of the Golgi complex. *The Anatomical record*. 268:226-238.
- Bi, X., R.A. Corpina, y J. Goldberg. 2002. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*. 419:271-277.

BIBLIOGRAFÍA

- Bi, X., J.D. Mancias, y J. Goldberg. 2007. Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23.Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Developmental cell*. 13:635-645.
- Bielli, A., C.J. Haney, G. Gabreski, S.C. Watkins, S.I. Bannykh, y M. Aridor. 2005. Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *The Journal of cell biology*. 171:919-924.
- Bigay, J., y B. Antony. 2012. Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Developmental cell*. 23:886-895.
- Bigay, J., J.F. Casella, G. Drin, B. Mesmin, y B. Antony. 2005. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *The EMBO journal*. 24:2244-2253.
- Bigay, J., P. Gounon, S. Robineau, y B. Antony. 2003. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature*. 426:563-566.
- Billah, M.M., S. Eckel, T.J. Mullmann, R.W. Egan, y M.I. Siegel. 1989. Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in signal transduction. *J.Biol.Chem*. 264:17069-17077.
- Blakely, R.D., y A.L. Bauman. 2000. Biogenic amine transporters: regulation in flux. *Current opinion in neurobiology*. 10:328-336.
- Blazquez, M., y K.I. Shennan. 2000. Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 78:181-191.
- Blumental-Perry, A., C.J. Haney, K.M. Weixel, S.C. Watkins, O.A. Weisz, y M. Aridor. 2006. Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export. *Dev Cell*. 11:671-682.
- Bonfanti, L., A.A. Mironov, Jr., J.A. Martinez-Menarguez, O. Martella, A. Fusella, M. Baldassarre, R. Buccione, H.J. Geuze, A.A. Mironov, y A. Luini. 1998. Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell*. 95:993-1003.
- Bossard, C., D. Bresson, R.S. Polishchuk, y V. Malhotra. 2007. Dimeric PKD regulates membrane fission to form transport carriers at the TGN. *J Cell Biol*. 179:1123-1131.
- Bretscher, M.S., y S. Munro. 1993. Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*. 261:1280-1281.
- Brindley, D.N. 2004. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 92:900-912.

BIBLIOGRAFÍA

- Brindley, D.N., y C. Pilquill. 2009. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J.Lipid Res.* 50 Suppl:S225-S230.
- Brown, W.J., K. Chambers, y A. Doody. 2003. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic.* 4:214-221.
- Brugger, B., R. Sandhoff, S. Wegehingel, K. Gorgas, J. Malsam, J.B. Helms, W.D. Lehmann, W. Nickel, y F.T. Wieland. 2000. Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles. *The Journal of cell biology.* 151:507-518.
- Budnik, A., y D.J. Stephens. 2009. ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS letters.* 583:3796-3803.
- Buss, F., J.P. Luzio, y J. Kendrick-Jones. 2002. Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic.* 3:851-858.
- Cabrera, M., M. Muniz, J. Hidalgo, L. Vega, M.E. Martin, y A. Velasco. 2003. The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol.Biol.Cell.* 14:4114-4125.
- Cao, H., S. Weller, J.D. Orth, J. Chen, B. Huang, J.L. Chen, M. Stamnes, y M.A. McNiven. 2005. Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nature cell biology.* 7:483-492.
- Cardenas, J., S. Rivero, B. Goud, M. Bornens, y R.M. Rios. 2009. Golgi localisation of GMAP210 requires two distinct cis-membrane binding mechanisms. *BMC biology.* 7:56.
- Carrasco, S., y I. Merida. 2004. Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC θ and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Molecular biology of the cell.* 15:2932-2942.
- Carreno, S., A.E. Engqvist-Goldstein, C.X. Zhang, K.L. McDonald, y D.G. Drubin. 2004. Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network. *The Journal of cell biology.* 165:781-788.
- Cremona, O. 2001. Live stripping of clathrin-coated vesicles. *Developmental cell.* 1:592-594.
- Cukierman, E., I. Huber, M. Rotman, y D. Cassel. 1995. The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science.* 270:1999-2002.
- Choi, J.H., J.B. Park, S.S. Bae, S. Yun, H.S. Kim, W.P. Hong, I.S. Kim, J.H. Kim, M.Y. Han, S.H. Ryu, R.L. Patterson, S.H. Snyder, y P.G. Suh. 2004. Phospholipase C-gamma1 is a guanine nucleotide exchange factor for dynamin-1 and enhances dynamin-1-dependent epidermal growth factor receptor endocytosis. *Journal of cell science.* 117:3785-3795.
- daSilva, L.L., E.L. Snapp, J. Denecke, J. Lippincott-Schwartz, C. Hawes, y F. Brandizzi. 2004. Endoplasmic reticulum export sites and Golgi bodies behave as single mobile secretory units in plant cells. *The Plant cell.* 16:1753-1771.

BIBLIOGRAFÍA

- de, F.P., D. Drecktrah, R.S. Polizotto, N.B. Cole, J. Lippincott-Schwartz, y W.J. Brown. 2000. Phospholipase A2 antagonists inhibit constitutive retrograde membrane traffic to the endoplasmic reticulum. *Traffic*. 1:504-511.
- Deacon, E.M., T.R. Pettitt, P. Webb, T. Cross, H. Chahal, M.J. Wakelam, and J.M. Lord. 2002. Generation of diacylglycerol molecular species through the cell cycle: a role for 1-stearoyl, 2-arachidonoyl glycerol in the activation of nuclear protein kinase C-beta1 at G2/M. *Journal of cell science*. 115:983-989.
- Deguil, J., L. Pineau, E.C. Rowland Snyder, S. Dupont, L. Beney, A. Gil, G. Frapper, y T. Ferreira. 2011. Modulation of lipid-induced ER stress by fatty acid shape. *Traffic*. 12:349-362.
- Dejgaard, S.Y., A. Murshid, K.M. Dee, y J.F. Presley. 2007. Confocal microscopy-based linescan methodologies for intra-Golgi localization of proteins. *J.Histochem.Cytochem*. 55:709-719.
- Di Paolo, G., y P. De Camilli. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*. 443:651-657.
- Diaz Anel, A.M., y V. Malhotra. 2005. PKCeta is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus. *J Cell Biol*. 169:83-91.
- Doucet, C.M., J.A. Talamas, y M.W. Hetzer. 2010. Cell cycle-dependent differences in nuclear pore complex assembly in metazoa. *Cell*. 141:1030-1041.
- Dumaresq-Doiron, K., M.F. Savard, S. Akam, S. Costantino, y S. Lefrancois. 2010. The phosphatidylinositol 4-kinase PI4KIIIalpha is required for the recruitment of GBF1 to Golgi membranes. *Journal of cell science*. 123:2273-2280.
- Duran, J.M., F. Campelo, J. van Galen, T. Sachsenheimer, J. Sot, M.V. Egorov, C. Rentero, C. Enrich, R.S. Polishchuk, F.M. Goni, B. Brugger, F. Wieland, y V. Malhotra. 2012. Sphingomyelin organization is required for vesicle biogenesis at the Golgi complex. *The EMBO journal*. 31:4535-4546.
- Echard, A., F. Jollivet, O. Martinez, J.J. Lacapere, A. Rousselet, I. Janoueix-Lerosey, y B. Goud. 1998. Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science*. 279:580-585.
- English, A.R., N. Zurek, y G.K. Voeltz. 2009. Peripheral ER structure and function. *Current opinion in cell biology*. 21:596-602.
- Escalante-Alcalde, D., L. Hernandez, H. Le Stunff, R. Maeda, H.S. Lee, C. Jr Gang, V.A. Sciorra, I. Daar, S. Spiegel, A.J. Morris, y C.L. Stewart. 2003. The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development*. 130:4623-4637.
- Eugster, A., G. Frigerio, M. Dale, y R. Duden. 2000. COP I domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *The EMBO journal*. 19:3905-3917.

BIBLIOGRAFÍA

- Eugster, A., G. Frigerio, M. Dale, y R. Duden. 2004. The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Molecular biology of the cell*. 15:1011-1023.
- Fairn, G.D., N.L. Schieber, N. Ariotti, S. Murphy, L. Kuerschner, R.I. Webb, S. Grinstein, y R.G. Parton. 2011. High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. *The Journal of cell biology*. 194:257-275.
- Fan, W., A. Nassiri, y Q. Zhong. 2011. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:7769-7774.
- Farquhar, M.G. 1985. Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annual review of cell biology*. 1:447-488.
- Fernández-Ulibarri, I. El papel del diacilglicerol en el tráfico de membranas en la zona entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi. 2008. Tesis.
- Fernandez-Ulibarri, I., M. Vilella, F. Lazaro-Dieguez, E. Sarri, S.E. Martinez, N. Jimenez, E. Claro, I. Merida, K.N. Burger, y G. Egea. 2007. Diacylglycerol is required for the formation of COPI vesicles in the Golgi-to-ER transport pathway. *Molecular biology of the cell*. 18:3250-3263.
- Fiedler, K., M. Veit, M.A. Stamnes, y J.E. Rothman. 1996. Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science*. 273:1396-1399.
- Franco, M., P. Chardin, M. Chabre, y S. Paris. 1996. Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1GDP to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor. *The Journal of biological chemistry*. 271:1573-1578.
- Frost, A., R. Perera, A. Roux, K. Spasov, O. Destaing, E.H. Egelman, P. De Camilli, y V.M. Unger. 2008. Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell*. 132:807-817.
- Frost, A., V.M. Unger, y P. De Camilli. 2009. The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell*. 137:191-196.
- Galic, M., S. Jeong, F.C. Tsai, L.M. Joubert, Y.I. Wu, K.M. Hahn, Y. Cui, y T. Meyer. 2012. External push and internal pull forces recruit curvature-sensing N-BAR domain proteins to the plasma membrane. *Nature cell biology*. 14:874-881.
- Gallop, J.L., C.C. Jao, H.M. Kent, P.J. Butler, P.R. Evans, R. Langen, y H.T. McMahon. 2006. Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *The EMBO journal*. 25:2898-2910.
- Girod, A., B. Storrie, J.C. Simpson, L. Johannes, B. Goud, L.M. Roberts, J.M. Lord, T. Nilsson, y R. Pepperkok. 1999. Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nature cell biology*. 1:423-430.
- Glick, B.S., ay V. Malhotra. 1998. The curious status of the Golgi apparatus. *Cell*. 95:883-889.

BIBLIOGRAFÍA

- Godi, A., A. Di Campi, A. Konstantakopoulos, G. Di Tullio, D.R. Alessi, G.S. Kular, T. Daniele, P. Marra, J.M. Lucocq, y M.A. De Matteis. 2004. FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol.* 6:393-404.
- Grigoriev, I., D. Splinter, N. Keijzer, P.S. Wulf, J. Demmers, T. Ohtsuka, M. Modesti, I.V. Maly, F. Grosveld, C.C. Hoogenraad, y A. Akhmanova. 2007. Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Developmental cell.* 13:305-314.
- Grigoriev, I., K.L. Yu, E. Martinez-Sanchez, A. Serra-Marques, I. Smal, E. Meijering, J. Demmers, J. Peranen, R.J. Pasterkamp, P. van der Sluijs, C.C. Hoogenraad, y A. Akhmanova. 2011. Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Current biology : CB.* 21:967-974.
- Grosheva, I., M. Shtutman, M. Elbaum, y A.D. Bershadsky. 2001. p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *Journal of cell science.* 114:695-707.
- Hammond, A.T., y B.S. Glick. 2000. Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Molecular biology of the cell.* 11:3013-3030.
- Hanada, K., K. Kumagai, N. Tomishige, y T. Yamaji. 2009. CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta.* 1791:684-691.
- Hara-Kuge, S., O. Kuge, L. Orci, M. Amherdt, M. Ravazzola, F.T. Wieland, and J.E. Rothman. 1994. En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *The Journal of cell biology.* 124:883-892.
- Hausser, A., P. Storz, S. Martens, G. Link, A. Toker, y K. Pfizenmaier. 2005. Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex. *Nat Cell Biol.* 7:880-886.
- Hawes, C., y B. Satiat-Jeunemaitre. 2005. The plant Golgi apparatus--going with the flow. *Biochimica et biophysica acta.* 1744:466-480.
- He, C.Y. 2007. Golgi biogenesis in simple eukaryotes. *Cellular microbiology.* 9:566-572.
- He, C.Y., H.H. Ho, J. Malsam, C. Chalouni, C.M. West, E. Ullu, D. Toomre, y G. Warren. 2004. Golgi duplication in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of cell biology.* 165:313-321.
- Henderson, G.P., L. Gan, y G.J. Jensen. 2007. 3-D ultrastructure of *O. tauri*: electron cryotomography of an entire eukaryotic cell. *PLoS one.* 2:e749.
- Ho, W.C., V.J. Allan, M.G. van, E.G. Berger, y T.E. Kreis. 1989. Reclustering of scattered Golgi elements occurs along microtubules. *Eur.J.Cell Biol.* 48:250-263.
- Holthuis, J.C., y K.N. Burger. 2003. Sensing membrane curvature. *Developmental cell.* 5:821-822.

BIBLIOGRAFÍA

- Holthuis, J.C., y T.P. Levine. 2005. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6:209-220.
- Hooks, S.B., S.P. Ragan, y K.R. Lynch. 1998. Identification of a novel human phosphatidic acid phosphatase type 2 isoform. *FEBS letters*. 427:188-192.
- Hsu, V.W., y J.S. Yang. 2009. Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS letters*. 583:3758-3763.
- Huang, M., J.T. Weissman, S. Beraud-Dufour, P. Luan, C. Wang, W. Chen, M. Aridor, I.A. Wilson, y W.E. Balch. 2001. Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *The Journal of cell biology*. 155:937-948.
- Huang, Y.L., H.S. Lin, S.U. Chen, y H. Lee. 2009. Tyrosine sulphation of sphingosine 1-phosphate 1 (S1P1) is required for S1P-mediated cell migration in primary cultures of human umbilical vein endothelial cells. *Journal of biochemistry*. 146:815-820.
- Humtsoe, J.O., R.A. Bowling, Jr., S. Feng, y K.K. Wary. 2005. Murine lipid phosphate phosphohydrolase-3 acts as a cell-associated integrin ligand. *Biochemical and biophysical research communications*. 335:906-919.
- Humtsoe, J.O., S. Feng, G.D. Thakker, J. Yang, J. Hong, y K.K. Wary. 2003. Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP. *The EMBO journal*. 22:1539-1554.
- Humtsoe, J.O., M. Liu, A.B. Malik, y K.K. Wary. 2010. Lipid phosphate phosphatase 3 stabilization of beta-catenin induces endothelial cell migration and formation of branching point structures. *Mol Cell Biol*. 30:1593-1606.
- Ichikawa, S., y Y. Hirabayashi. 1998. Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends in cell biology*. 8:198-202.
- Idkowiak-Baldys, J., K.P. Becker, K. Kitatani, y Y.A. Hannun. 2006. Dynamic sequestration of the recycling compartment by classical protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 281:22321-22331.
- Jackson, M.R., T. Nilsson, y P.A. Peterson. 1990. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 9:3153-3162.
- Janmey, P.A., y P.K. Kinnunen. 2006. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in cell biology*. 16:538-546.
- Jasinska, R., Q.X. Zhang, C. Pilquil, I. Singh, J. Xu, J. Dewald, D.A. Dillon, L.G. Berthiaume, G.M. Carman, D.W. Waggoner, y D.N. Brindley. 1999. Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters. *The Biochemical journal*. 340 (Pt 3):677-686.

BIBLIOGRAFÍA

- Jia, Y.J., M. Kai, I. Wada, F. Sakane, y H. Kanoh. 2003. Differential localization of lipid phosphate phosphatases 1 and 3 to cell surface subdomains in polarized MDCK cells. *FEBS letters*. 552:240-246.
- Jovanovic, O.A., F.D. Brown, y J.G. Donaldson. 2006. An effector domain mutant of Arf6 implicates phospholipase D in endosomal membrane recycling. *Molecular biology of the cell*. 17:327-335.
- Kai, M., F. Sakane, Y.J. Jia, S. Imai, S. Yasuda, y H. Kanoh. 2006. Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts. *J.Biochem*. 140:677-686.
- Kai, M., I. Wada, S. Imai, F. Sakane, y H. Kanoh. 1996. Identification and cDNA cloning of 35-kDa phosphatidic acid phosphatase (type 2) bound to plasma membranes. Polymerase chain reaction amplification of mouse H2O2-inducible hic53 clone yielded the cDNA encoding phosphatidic acid phosphatase. *The Journal of biological chemistry*. 271:18931-18938.
- Kai, M., I. Wada, S. Imai, F. Sakane, y H. Kanoh. 1997. Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase. *J.Biol.Chem*. 272:24572-24578.
- Kano, F., A.R. Tanaka, S. Yamauchi, H. Kondo, y M. Murata. 2004. Cdc2 kinase-dependent disassembly of endoplasmic reticulum (ER) exit sites inhibits ER-to-Golgi vesicular transport during mitosis. *Molecular biology of the cell*. 15:4289-4298.
- Kay, J.G., M. Koivusalo, X. Ma, T. Wohland, y S. Grinstein. 2012. Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Molecular biology of the cell*. 23:2198-2212.
- Kelly, R.B. 1985. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science*. 230:25-32.
- Kerkhoff, E., J.C. Simpson, C.B. Leberfinger, I.M. Otto, T. Doerks, P. Bork, U.R. Rapp, T. Raabe, and R. Pepperkok. 2001. The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Current biology : CB*. 11:1963-1968.
- Kessels, M.M., y B. Qualmann. 2004. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *Journal of cell science*. 117:3077-3086.
- Klemm, R.W., C.S. Ejsing, M.A. Surma, H.J. Kaiser, M.J. Gerl, J.L. Sampaio, Q. de Robillard, C. Ferguson, T.J. Proszynski, A. Shevchenko, y K. Simons. 2009. Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *The Journal of cell biology*. 185:601-612.
- Klumperman, J., A. Schweizer, H. Clausen, B.L. Tang, W. Hong, V. Oorschot, and H.P. Hauri. 1998a. The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *Journal of cell science*. 111 (Pt 22):3411-3425.
- Klumperman, J., A. Schweizer, H. Clausen, B.L. Tang, W. Hong, V. Oorschot, y H.P. Hauri. 1998b. The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J.Cell Sci*. 111 (Pt 22):3411-3425.

BIBLIOGRAFÍA

- Kondylis, V., y C. Rabouille. 2009. The Golgi apparatus: lessons from *Drosophila*. *FEBS letters*. 583:3827-3838.
- Kuge, O., C. Dascher, L. Orci, T. Rowe, M. Amherdt, H. Plutner, M. Ravazzola, G. Tanigawa, J.E. Rothman, y W.E. Balch. 1994. Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *The Journal of cell biology*. 125:51-65.
- Ladinsky, M.S., D.N. Mastronarde, J.R. McIntosh, K.E. Howell, y L.A. Staehelin. 1999. Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *The Journal of cell biology*. 144:1135-1149.
- Lazaro-Diequez, F. (2008). Implicación de los filamentos de actina en la arquitectura, homeostasis y tráfico de salida del aparato de Golgi y estudio de la formación y degradación de un agrosoma de actina (Tesis).
- Lee, C., y L.B. Chen. 1988. Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell*. 54:37-46.
- Lee, C.S., I.S. Kim, J.B. Park, M.N. Lee, H.Y. Lee, P.G. Suh, y S.H. Ryu. 2006. The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nature cell biology*. 8:477-484.
- Lee, M.C., y E.A. Miller. 2007. Molecular mechanisms of COPII vesicle formation. *Seminars in cell & developmental biology*. 18:424-434.
- Lee, M.C., L. Orci, S. Hamamoto, E. Futai, M. Ravazzola, y R. Schekman. 2005. Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell*. 122:605-617.
- Leonard, D., A. Hayakawa, D. Lawe, D. Lambright, K.D. Bellve, C. Standley, L.M. Lifshitz, K.E. Fogarty, y S. Corvera. 2008. Sorting of EGF and transferrin at the plasma membrane and by cargo-specific signaling to EEA1-enriched endosomes. *Journal of cell science*. 121:3445-3458.
- Leung, D.W., C.K. Tompkins, y T. White. 1998. Molecular cloning of two alternatively spliced forms of human phosphatidic acid phosphatase cDNAs that are differentially expressed in normal and tumor cells. *DNA and cell biology*. 17:377-385.
- Levi, S., M. Rawet, L. Kliouchnikov, A. Parnis, y D. Cassel. 2008. Topology of amphipathic motifs mediating Golgi localization in ArfGAP1 and its splice isoforms. *The Journal of biological chemistry*. 283:8564-8572.
- Levine, T.P., y S. Munro. 1998. The pleckstrin homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes. *Curr Biol*. 8:729-739.
- Levine, T.P., y S. Munro. 2002. Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr Biol*. 12:695-704.

BIBLIOGRAFÍA

- Lewis, M.J., y H.R. Pelham. 1992. Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell*. 68:353-364.
- Liljedahl, M., Y. Maeda, A. Colanzi, I. Ayala, L.J. Van, y V. Malhotra. 2001. Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell*. 104:409-420.
- Lippincott-Schwartz, J., J.G. Donaldson, A. Schweizer, E.G. Berger, H.P. Hauri, L.C. Yuan, y R.D. Klausner. 1990. Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell*. 60:821-836.
- Lippincott-Schwartz, J., T.H. Roberts, y K. Hirschberg. 2000. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annual review of cell and developmental biology*. 16:557-589.
- Loder, M.K., y H.E. Melikian. 2003. The dopamine transporter constitutively internalizes and recycles in a protein kinase C-regulated manner in stably transfected PC12 cell lines. *The Journal of biological chemistry*. 278:22168-22174.
- Long, J., P. Darroch, K.F. Wan, K.C. Kong, N. Ktistakis, N.J. Pyne, y S. Pyne. 2005. Regulation of cell survival by lipid phosphate phosphatases involves the modulation of intracellular phosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate pools. *Biochem.J.* 391:25-32.
- Long, J.S., N.J. Pyne, y S. Pyne. 2008. Lipid phosphate phosphatases form homo- and hetero-oligomers: catalytic competency, subcellular distribution and function. *Biochem.J.* 411:371-377.
- Losev, E., C.A. Reinke, J. Jellen, D.E. Strongin, B.J. Bevis, y B.S. Glick. 2006. Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature*. 441:1002-1006.
- Lowe, M. 2011. Structural organization of the Golgi apparatus. *Current opinion in cell biology*. 23:85-93.
- Lund, K.A., C.S. Lazar, W.S. Chen, B.J. Walsh, J.B. Welsh, J.J. Herbst, G.M. Walton, M.G. Rosenfeld, G.N. Gill, y H.S. Wiley. 1990. Phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at threonine 654 inhibits ligand-induced internalization and down-regulation. *The Journal of biological chemistry*. 265:20517-20523.
- Llado, A., P. Timpson, S. Vila de Muga, J. Moreto, A. Pol, T. Grewal, R.J. Daly, C. Enrich, y F. Tebar. 2008. Protein kinase Cdelta and calmodulin regulate epidermal growth factor receptor recycling from early endosomes through Arp2/3 complex and cortactin. *Molecular biology of the cell*. 19:17-29.
- Majoul, I., K. Sohn, F.T. Wieland, R. Pepperkok, M. Pizza, J. Hillemann, y H.D. Soling. 1998. KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *The Journal of cell biology*. 143:601-612.
- Malhotra, V., y S. Mayor. 2006. Cell biology: the Golgi grows up. *Nature*. 441:939-940.

BIBLIOGRAFÍA

- Martinez-Alonso, E., J. Ballesta, y J.A. Martinez-Menarguez. 2007. Low-temperature-induced Golgi tubules are transient membranes enriched in molecules regulating intra-Golgi transport. *Traffic*. 8:359-368.
- Martinez, O., C. Antony, G. Pehau-Arnaudet, E.G. Berger, J. Salamero, y B. Goud. 1997. GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:1828-1833.
- Masuda, M., S. Takeda, M. Sone, T. Ohki, H. Mori, Y. Kamioka, y N. Mochizuki. 2006. Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *The EMBO journal*. 25:2889-2897.
- Matanis, T., A. Akhmanova, P. Wulf, E. Del Nery, T. Weide, T. Stepanova, N. Galjart, F. Grosveld, B. Goud, C.I. De Zeeuw, A. Barnekow, y C.C. Hoogenraad. 2002. Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nature cell biology*. 4:986-992.
- Matsuoka, K., L. Orci, M. Amherdt, S.Y. Bednarek, S. Hamamoto, R. Schekman, y T. Yeung. 1998. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*. 93:263-275.
- Matsuura-Tokita, K., M. Takeuchi, A. Ichihara, K. Mikuriya, y A. Nakano. 2006. Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature*. 441:1007-1010.
- McMahon, H.T., and J.L. Gallop. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. 438:590-596.
- Mechtcheriakova, D., A. Wlachos, J. Sobanov, F. Bornancin, G. Zlabinger, T. Baumruker, y A. Billich. 2007. FTY720-phosphate is dephosphorylated by lipid phosphate phosphatase 3. *FEBS letters*. 581:3063-3068.
- Meier, K.E., K.C. Gause, A.E. Wisehart-Johnson, A.C. Gore, E.L. Finley, L.G. Jones, C.D. Bradshaw, A.F. McNair, y K.M. Ella. 1998. Effects of propranolol on phosphatidate phosphohydrolase and mitogen-activated protein kinase activities in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*. 10:415-426.
- Merisko, E.M., M. Fletcher, y G.E. Palade. 1986. The reorganization of the Golgi complex in anoxic pancreatic acinar cells. *Pancreas*. 1:95-109.
- Mesaki, K., K. Tanabe, M. Obayashi, N. Oe, y K. Takei. 2011. Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS one*. 6:e19764.
- Meyer zu Heringdorf, D., y K.H. Jakobs. 2007. Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 1768:923-940.
- Miller, E., B. Antony, S. Hamamoto, y R. Schekman. 2002. Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *The EMBO journal*. 21:6105-6113.

BIBLIOGRAFÍA

- Mills, G.B., and W.H. Moolenaar. 2003. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nature reviews. Cancer*. 3:582-591.
- Miranda, M., C.C. Wu, T. Sorkina, D.R. Korstjens, y A. Sorkin. 2005. Enhanced ubiquitylation and accelerated degradation of the dopamine transporter mediated by protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 280:35617-35624.
- Miserey-Lenkei, S., G. Chalancon, S. Bardin, E. Formstecher, B. Goud, y A. Echard. 2010. Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nature cell biology*. 12:645-654.
- Mitrovic, S., H. Ben-Tekaya, E. Koegler, J. Gruenberg, y H.P. Hauri. 2008. The cargo receptors Surf4, endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC)-53, and p25 are required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi. *Mol.Biol.Cell*. 19:1976-1990.
- Mogelsvang, S., N. Gomez-Ospina, J. Soderholm, B.S. Glick, y L.A. Staehelin. 2003. Tomographic evidence for continuous turnover of Golgi cisternae in *Pichia pastoris*. *Molecular biology of the cell*. 14:2277-2291.
- Monetta, P., I. Slavin, N. Romero, y C. Alvarez. 2007. Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Molecular biology of the cell*. 18:2400-2410.
- Moolenaar, W.H. 2002. Lysophospholipids in the limelight: autotaxin takes center stage. *The Journal of cell biology*. 158:197-199.
- Moolenaar, W.H., L.A. van Meeteren, y B.N. Giepmans. 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 26:870-881.
- Morikawa, R.K., J. Aoki, F. Kano, M. Murata, A. Yamamoto, M. Tsujimoto, y H. Arai. 2009. Intracellular phospholipase A1gamma (iPLA1gamma) is a novel factor involved in coat protein complex I- and Rab6-independent retrograde transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J.Biol.Chem*. 284:26620-26630.
- Moritz, A., P.N. De Graan, W.H. Gispen, y K.W. Wirtz. 1992. Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *The Journal of biological chemistry*. 267:7207-7210.
- Moriue, T., J. Igarashi, K. Yoneda, K. Nakai, H. Kosaka, y Y. Kubota. 2008. Sphingosine 1-phosphate attenuates H2O2-induced apoptosis in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 368:852-857.
- Morris, K.E., L.M. Schang, y D.N. Brindley. 2006. Lipid phosphate phosphatase-2 activity regulates S-phase entry of the cell cycle in Rat2 fibroblasts. *J.Biol.Chem*. 281:9297-9306.
- Morrison, P., K. Takishima, y M.R. Rosner. 1993. Role of threonine residues in regulation of the epidermal growth factor receptor by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 268:15536-15543.

BIBLIOGRAFÍA

- Nagaya, H., I. Wada, Y.J. Jia, y H. Kanoh. 2002. Diacylglycerol kinase delta suppresses ER-to-Golgi traffic via its SAM and PH domains. *Molecular biology of the cell*. 13:302-316.
- Nakano, A., y A. Luini. 2010. Passage through the Golgi. *Current opinion in cell biology*. 22:471-478.
- Navaroli, D.M., K.D. Bellve, C. Standley, L.M. Lifshitz, J. Cardia, D. Lambright, D. Leonard, K.E. Fogarty, y S. Corvera. 2012. Rabenosyn-5 defines the fate of the transferrin receptor following clathrin-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:E471-480.
- Nhek, S., M. Ngo, X. Yang, M.M. Ng, S.J. Field, J.M. Asara, N.D. Ridgway, y A. Toker. 2010. Regulation of oxysterol-binding protein Golgi localization through protein kinase D-mediated phosphorylation. *Molecular biology of the cell*. 21:2327-2337.
- Nilsson, T., M. Jackson, y P.A. Peterson. 1989. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 58:707-718.
- Nishikawa, K., A. Toker, K. Wong, P.A. Marignani, F.J. Johannes, y L.C. Cantley. 1998. Association of protein kinase C μ with type II phosphatidylinositol 4-kinase and type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *The Journal of biological chemistry*. 273:23126-23133.
- Orci, L., M. Ravazzola, P. Meda, C. Holcomb, H.P. Moore, L. Hicke, y R. Schekman. 1991. Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:8611-8615.
- Paccaud, J.P., W. Reith, J.L. Carpentier, M. Ravazzola, M. Amherdt, R. Schekman, y L. Orci. 1996. Cloning and functional characterization of mammalian homologues of the COPII component Sec23. *Molecular biology of the cell*. 7:1535-1546.
- Padron, D., R.D. Tall, y M.G. Roth. 2006. Phospholipase D2 is required for efficient endocytic recycling of transferrin receptors. *Molecular biology of the cell*. 17:598-606.
- Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. 189:867.
- Pathre, P., K. Shome, A. Blumental-Perry, A. Bielli, C.J. Haney, S. Alber, S.C. Watkins, G. Romero, y M. Aridor. 2003. Activation of phospholipase D by the small GTPase Sar1p is required to support COPII assembly and ER export. *The EMBO journal*. 22:4059-4069.
- Pelham, H.R. 1989. Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annual review of cell biology*. 5:1-23.
- Pelham, H.R. 1991. Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Current opinion in cell biology*. 3:585-591.

BIBLIOGRAFÍA

- Pelletier, L., C.A. Stern, M. Pypaert, D. Sheff, H.M. Ngo, N. Roper, C.Y. He, K. Hu, D. Toomre, I. Coppens, D.S. Roos, K.A. Joiner, y G. Warren. 2002. Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 418:548-552.
- Peter, B.J., H.M. Kent, I.G. Mills, Y. Vallis, P.J. Butler, P.R. Evans, y H.T. McMahon. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*. 303:495-499.
- Pettitt, T.R., A. Martin, T. Horton, C. Liossis, J.M. Lord, y M.J. Wakelam. 1997. Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 272:17354-17359.
- Ponnambalam, S., y S.A. Baldwin. 2003. Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Molecular membrane biology*. 20:129-139.
- Praefcke, G.J., y H.T. McMahon. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5:133-147.
- Presley, J.F., N.B. Cole, T.A. Schroer, K. Hirschberg, K.J. Zaal, y J. Lippincott-Schwartz. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature*. 389:81-85.
- Preuss, D., J. Mulholland, A. Franzusoff, N. Segev, y D. Botstein. 1992. Characterization of the *Saccharomyces* Golgi complex through the cell cycle by immunoelectron microscopy. *Molecular biology of the cell*. 3:789-803.
- Pusapati, G.V., D. Krndija, M. Armacki, G. von Wichert, J. von Blume, V. Malhotra, G. Adler, y T. Seufferlein. 2010. Role of the second cysteine-rich domain and Pro275 in protein kinase D2 interaction with ADP-ribosylation factor 1, trans-Golgi network recruitment, and protein transport. *Molecular biology of the cell*. 21:1011-1022.
- Pyne, S., K.C. Kong, y P.I. Darroch. 2004. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Seminars in cell & developmental biology*. 15:491-501.
- Pyne, S., S.C. Lee, J. Long, y N.J. Pyne. 2009. Role of sphingosine kinases and lipid phosphate phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphate signalling in health and disease. *Cell Signal*. 21:14-21.
- Qualmann, B., D. Koch, y M.M. Kessels. 2011. Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *The EMBO journal*. 30:3501-3515.
- Radhakrishnan, A., J.L. Goldstein, J.G. McDonald, y M.S. Brown. 2008. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell metabolism*. 8:512-521.
- Rambourg, A., C.L. Jackson, y Y. Clermont. 2001. Three dimensional configuration of the secretory pathway and segregation of secretion granules in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*. 114:2231-2239.

BIBLIOGRAFÍA

- Ramirez, I.B., y M. Lowe. 2009. Golgins and GRASPs: holding the Golgi together. *Seminars in cell & developmental biology*. 20:770-779.
- Rhee, S.G. 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annual review of biochemistry*. 70:281-312.
- Rios, R.M., y M. Bornens. 2003. The Golgi apparatus at the cell centre. *Current opinion in cell biology*. 15:60-66.
- Rivera, R., y J. Chun. 2008. Biological effects of lysophospholipids. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 160:25-46.
- Roberts, R., V.A. Sciorra, y A.J. Morris. 1998a. Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *The Journal of biological chemistry*. 273:22059-22067.
- Roberts, R., V.A. Sciorra, y A.J. Morris. 1998b. Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *J.Biol.Chem.* 273:22059-22067.
- Rohde, H.M., F.Y. Cheong, G. Konrad, K. Paiha, P. Mayinger, y G. Boehmelt. 2003. The human phosphatidylinositol phosphatase SAC1 interacts with the coatamer I complex. *J.Biol.Chem.* 278:52689-52699.
- Rossanese, O.W., J. Soderholm, B.J. Bevis, I.B. Sears, J. O'Connor, E.K. Williamson, y B.S. Glick. 1999. Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*. 145:69-81.
- Rothman, J.E., y F.T. Wieland. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science*. 272:227-234.
- Roux, A., D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Prost, P. Bassereau, y B. Goud. 2005. Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *The EMBO journal*. 24:1537-1545.
- Rozelle, A.L., L.M. Machesky, M. Yamamoto, M.H. Driessens, R.H. Insall, M.G. Roth, K. Luby-Phelps, G. Marriott, A. Hall, y H.L. Yin. 2000. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Current biology : CB*. 10:311-320.
- Saitoh, A., H.W. Shin, A. Yamada, S. Waguri, y K. Nakayama. 2009. Three homologous ArfGAPs participate in coat protein I-mediated transport. *The Journal of biological chemistry*. 284:13948-13957.
- San, P.E., M. Capestrano, E.V. Polishchuk, A. DiPentima, A. Trucco, P. Zizza, S. Mariggio, T. Pulvirenti, M. Sallèse, S. Tete, A.A. Mironov, C.C. Leslie, D. Corda, A. Luini, y R.S. Polishchuk. 2009. Group IV phospholipase A(2)alpha controls the formation of inter-cisternal continuities involved in intra-Golgi transport. *PLoS.Biol.* 7:e1000194.

BIBLIOGRAFÍA

- Saraste, J., y K. Svensson. 1991. Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport. *J.Cell Sci.* 100 (Pt 3):415-430.
- Sarri, E., A. Sicart, F. Lazaro-Dieiguez, y G. Egea. 2011. Phospholipid synthesis participates in the regulation of diacylglycerol required for membrane trafficking at the Golgi complex. *J.Biol.Chem.* 286:28632-28643.
- Sato, K., y A. Nakano. 2007. Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS letters.* 581:2076-2082.
- Scales, S.J., R. Pepperkok, y T.E. Kreis. 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell.* 90:1137-1148.
- Sciorra, V.A., y A.J. Morris. 1999. Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. *Molecular biology of the cell.* 10:3863-3876.
- Sciorra, V.A., y A.J. Morris. 2002. Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. *Biochimica et biophysica acta.* 1582:45-51.
- Schindler, R., C. Itin, M. Zerial, F. Lottspeich, y H.P. Hauri. 1993. ERGIC-53, a membrane protein of the ER-Golgi intermediate compartment, carries an ER retention motif. *Eur.J.Cell Biol.* 61:1-9.
- Schmidt, J.A., y W.J. Brown. 2009. Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 regulates Golgi complex structure and function. *J.Cell Biol.* 186:211-218.
- Schweizer, A., J.A. Fransen, T. Bachi, L. Ginsel, y H.P. Hauri. 1988. Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. *The Journal of cell biology.* 107:1643-1653.
- Shaywitz, D.A., L. Orci, M. Ravazzola, A. Swaroop, y C.A. Kaiser. 1995. Human SEC13Rp functions in yeast and is located on transport vesicles budding from the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology.* 128:769-777.
- Shemesh, T., A. Luini, V. Malhotra, K.N. Burger, y M.M. Kozlov. 2003. Prefission constriction of Golgi tubular carriers driven by local lipid metabolism: a theoretical model. *Biophysical journal.* 85:3813-3827.
- Shen, Y., L. Xu, y D.A. Foster. 2001. Role for phospholipase D in receptor-mediated endocytosis. *Molecular and cellular biology.* 21:595-602.
- Shibata, Y., J. Hu, M.M. Kozlov, y T.A. Rapoport. 2009. Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annual review of cell and developmental biology.* 25:329-354.
- Shugrue, C.A., E.R. Kolen, H. Peters, A. Czernik, C. Kaiser, L. Matovcik, A.L. Hubbard, and F. Gorelick. 1999. Identification of the putative mammalian orthologue of Sec31P, a component of the COPII coat. *Journal of cell science.* 112 (Pt 24):4547-4556.

BIBLIOGRAFÍA

- Sigal, Y.J., M.I. McDermott, y A.J. Morris. 2005. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem.J.* 387:281-293.
- Sohn, K., L. Orci, M. Ravazzola, M. Amherdt, M. Bremser, F. Lottspeich, K. Fiedler, J.B. Helms, y F.T. Wieland. 1996. A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *The Journal of cell biology.* 135:1239-1248.
- Sorkina, T., M. Miranda, K.R. Dionne, B.R. Hoover, N.R. Zahniser, y A. Sorkin. 2006. RNA interference screen reveals an essential role of Nedd4-2 in dopamine transporter ubiquitination and endocytosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 26:8195-8205.
- Sprong, H., P. van der Sluijs, y G. van Meer. 2001. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2:504-513.
- Stephens, D.J., y R. Pepperkok. 2001. Illuminating the secretory pathway: when do we need vesicles? *Journal of cell science.* 114:1053-1059.
- Storrie, B., y T. Nilsson. 2002. The Golgi apparatus: balancing new with old. *Traffic.* 3:521-529.
- Subathra, M., A. Qureshi, y C. Luberto. 2011. Sphingomyelin synthases regulate protein trafficking and secretion. *PLoS.One.* 6:e23644.
- Subramanya, S., C.F. Hardin, D. Steverding, y K. Mensa-Wilmot. 2009. Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C regulates transferrin endocytosis in the African trypanosome. *The Biochemical journal.* 417:685-694.
- Subramanya, S., y K. Mensa-Wilmot. 2010. Diacylglycerol-stimulated endocytosis of transferrin in trypanosomatids is dependent on tyrosine kinase activity. *PloS one.* 5:e8538.
- Sun, Z., F. Anderl, K. Frohlich, L. Zhao, S. Hanke, B. Brugger, F. Wieland, y J. Bethune. 2007. Multiple and stepwise interactions between coatomer and ADP-ribosylation factor-1 (Arf1)-GTP. *Traffic.* 8:582-593.
- Szul, T., y E. Sztul. 2011. COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology.* 26:348-364.
- Takenawa, T. 2010. Phosphoinositide-binding interface proteins involved in shaping cell membranes. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences.* 86:509-523.
- Tang, B.L., F. Peter, J. Krijnse-Locker, S.H. Low, G. Griffiths, y W. Hong. 1997. The mammalian homolog of yeast Sec13p is enriched in the intermediate compartment and is essential for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Molecular and cellular biology.* 17:256-266.
- Tanyi, J.L., Y. Hasegawa, R. Lapushin, A.J. Morris, J.K. Wolf, A. Berchuck, K. Lu, D.I. Smith, K. Kalli, L.C. Hartmann, K. McCune, D. Fishman, R. Broadus, K.W. Cheng, E.N. Atkinson, J.M. Yamal, R.C. Bast, E.A. Felix, R.A. Newman, y G.B. Mills. 2003a. Role of decreased

BIBLIOGRAFÍA

- levels of lipid phosphate phosphatase-1 in accumulation of lysophosphatidic acid in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 9:3534-3545.
- Tanyi, J.L., A.J. Morris, J.K. Wolf, X. Fang, Y. Hasegawa, R. Lapushin, N. Auersperg, Y.J. Sigal, R.A. Newman, E.A. Felix, E.N. Atkinson, y G.B. Mills. 2003b. The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer research*. 63:1073-1082.
- Terasaki, M., L.B. Chen, y K. Fujiwara. 1986. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *The Journal of cell biology*. 103:1557-1568.
- Thor, F., M. Gautschi, R. Geiger, y A. Helenius. 2009. Bulk flow revisited: transport of a soluble protein in the secretory pathway. *Traffic*. 10:1819-1830.
- Tigyi, G., y A.L. Parrill. 2003. Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Progress in lipid research*. 42:498-526.
- van den Brink-van der Laan, E., J.A. Killian, y B. de Kruijff. 2004. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et biophysica acta*. 1666:275-288.
- van Meer, G., y Q. Lisman. 2002. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *The Journal of biological chemistry*. 277:25855-25858.
- van Meer, G., D.R. Voelker, y G.W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:112-124.
- van Weering, J.R., P. Verkade, y P.J. Cullen. 2012. SNX-BAR-mediated endosome tubulation is co-ordinated with endosome maturation. *Traffic*. 13:94-107.
- Vicinanza, M., A. Di Campli, E. Polishchuk, M. Santoro, G. Di Tullio, A. Godi, E. Levtchenko, M.G. De Leo, R. Polishchuk, L. Sandoval, M.P. Marzolo, y M.A. De Matteis. 2011. OCRL controls trafficking through early endosomes via PtdIns4,5P(2)-dependent regulation of endosomal actin. *The EMBO journal*. 30:4970-4985.
- Villani, M., M. Subathra, Y.B. Im, Y. Choi, P. Signorelli, P.M. Del, y C. Luberto. 2008. Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the Golgi. *Biochem.J*. 414:31-41.
- Waggoner, D.W., A. Gomez-Munoz, J. Dewald, y D.N. Brindley. 1996. Phosphatidate phosphohydrolase catalyzes the hydrolysis of ceramide 1-phosphate, lysophosphatidate, and sphingosine 1-phosphate. *J.Biol.Chem*. 271:16506-16509.
- Walch-Solimena, C., y P. Novick. 1999. The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase pik1 regulates secretion at the Golgi. *Nat Cell Biol*. 1:523-525.

BIBLIOGRAFÍA

- Wary, K.K., y J.O. Humtsoe. 2005. Anti-lipid phosphate phosphohydrolase-3 (LPP3) antibody inhibits bFGF- and VEGF-induced capillary morphogenesis of endothelial cells. *Cell communication and signaling : CCS*. 3:9.
- Waterman-Storer, C.M., y E.D. Salmon. 1998. Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Current biology : CB*. 8:798-806.
- Waters, M.G., T. Serafini, y J.E. Rothman. 1991. 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*. 349:248-251.
- White, J., L. Johannes, F. Mallard, A. Girod, S. Grill, S. Reinsch, P. Keller, B. Tzschaschel, A. Echard, B. Goud, y E.H. Stelzer. 1999. Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *The Journal of cell biology*. 147:743-760.
- Wilson, D.W., M.J. Lewis, y H.R. Pelham. 1993. pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 268:7465-7468.
- Yang, J.S., H. Gad, S.Y. Lee, A. Mironov, L. Zhang, G.V. Beznoussenko, C. Valente, G. Turacchio, A.N. Bonsra, G. Du, G. Baldanzi, A. Graziani, S. Bourgoïn, M.A. Frohman, A. Luini, y V.W. Hsu. 2008. A role for phosphatidic acid in COPI vesicle fission yields insights into Golgi maintenance. *Nature cell biology*. 10:1146-1153.
- Yang, J.S., S.Y. Lee, S. Spano, H. Gad, L. Zhang, Z. Nie, M. Bonazzi, D. Corda, A. Luini, y V.W. Hsu. 2005. A role for BARS at the fission step of COPI vesicle formation from Golgi membrane. *The EMBO journal*. 24:4133-4143.
- Yang, J.S., C. Valente, R.S. Polishchuk, G. Turacchio, E. Layre, D.B. Moody, C.C. Leslie, M.H. Gelb, W.J. Brown, D. Corda, A. Luini, y V.W. Hsu. 2011. COPI acts in both vesicular and tubular transport. *Nat. Cell Biol*. 13:996-1003.
- Yang, J.S., L. Zhang, S.Y. Lee, H. Gad, A. Luini, y V.W. Hsu. 2006. Key components of the fission machinery are interchangeable. *Nature cell biology*. 8:1376-1382.
- Yang, L., A. Seifert, D. Wu, X. Wang, V. Rankovic, H. Schroder, L.O. Brandenburg, V. Holtt, y T. Koch. 2010. Role of phospholipase D2/phosphatidic acid signal transduction in micro- and delta-opioid receptor endocytosis. *Molecular pharmacology*. 78:105-113.
- Yeaman, C., M.I. Ayala, J.R. Wright, F. Bard, C. Bossard, A. Ang, Y. Maeda, T. Seufferlein, I. Mellman, W.J. Nelson, y V. Malhotra. 2004. Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nat Cell Biol*. 6:106-112.
- Yoshihisa, T., C. Barlowe, y R. Schekman. 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science*. 259:1466-1468.
- Zahniser, N.R., y S. Doolen. 2001. Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacology & therapeutics*. 92:21-55.

BIBLIOGRAFÍA

- Zhao, L., J.B. Helms, B. Brugger, C. Harter, B. Martoglio, R. Graf, J. Brunner, y F.T. Wieland. 1997. Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:4418-4423.
- Zhao, Y., S.K. Kalari, P.V. Usatyuk, I. Gorshkova, D. He, T. Watkins, D.N. Brindley, C. Sun, R. Bittman, J.G. Garcia, E.V. Berdyshev, y V. Natarajan. 2007. Intracellular generation of sphingosine 1-phosphate in human lung endothelial cells: role of lipid phosphate phosphatase-1 and sphingosine kinase 1. *The Journal of biological chemistry*. 282:14165-14177.
- Zhao, Y., P.V. Usatyuk, R. Cummings, B. Saatian, D. He, T. Watkins, A. Morris, E.W. Spannake, D.N. Brindley, y V. Natarajan. 2005. Lipid phosphate phosphatase-1 regulates lysophosphatidic acid-induced calcium release, NF-kappaB activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *The Biochemical journal*. 385:493-502.
- Zimmerberg, J., y S. McLaughlin. 2004. Membrane curvature: how BAR domains bend bilayers. *Current biology : CB*. 14:R250-252.

ANEXO

Lipid phosphate phosphatase 3 participates in transport carrier formation and protein trafficking in the early secretory pathway

Enric Gutiérrez-Martínez^{1,2}, Inés Fernández-Ulibarri^{1,*}, Francisco Lázaro-Diéguez^{1,‡}, Ludger Johannes³, Susan Pyne⁴, Elisabet Sarri¹ and Gustavo Egea^{1,2,§}

¹Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

²Instituts d'Investigació Biomèdica, August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and Nanociència i Nanotecnologia (IN2UB), 08036 Barcelona, Spain

³Institute Curie, CNRS-UMR 144, 75005 Paris, France

⁴Cell Biology Group, Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Science, University of Strathclyde, Glasgow, UK

*Present address: Helmholtz-University Group Oncolytic Adenoviruses, DKFZ German Cancer Research Center, Heidelberg University Hospital, 69120 Heidelberg, Germany

‡Present address: Department of Developmental and Molecular Biology, Albert Einstein College of Medicine, The Bronx, 10461 New York, NY, USA

§Author for correspondence (egea@ub.edu)

Accepted 27 March 2013

Journal of Cell Science 126, 2641–2655

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.117705

Summary

The inhibition of phosphatidic acid phosphatase (PAP) activity by propanolol indicates that diacylglycerol (DAG) is required for the formation of transport carriers at the Golgi and for retrograde trafficking to the ER. Here we report that the PAP2 family member lipid phosphate phosphatase 3 (LPP3, also known as PAP2b) localizes in compartments of the secretory pathway from ER export sites to the Golgi complex. The depletion of human LPP3: (i) reduces the number of tubules generated from the ER–Golgi intermediate compartment and the Golgi, with those formed from the Golgi being longer in LPP3-silenced cells than in control cells; (ii) impairs the Rab6-dependent retrograde transport of Shiga toxin subunit B from the Golgi to the ER, but not the anterograde transport of VSV-G or ssDsRed; and (iii) induces a high accumulation of Golgi-associated membrane buds. LPP3 depletion also reduces levels of *de novo* synthesized DAG and the Golgi-associated DAG contents. Remarkably, overexpression of a catalytically inactive form of LPP3 mimics the effects of LPP3 knockdown on Rab6-dependent retrograde transport. We conclude that LPP3 participates in the formation of retrograde transport carriers at the ER–Golgi interface, where it transitorily cycles, and during its route to the plasma membrane.

Key words: Diacylglycerol, Phosphatidic acid phosphatase, Golgi, ERGIC, Endoplasmic reticulum, Lipid homeostasis

Introduction

The Golgi complex is involved in the processing, sorting and transport of membrane components (lipids and proteins) to appropriate subcellular destinations, and is also a membranous platform for signaling, metabolic and cytoskeleton proteins. Transport to and from the Golgi complex is mediated by transport carriers (vesicles and/or tubules), which are generated in sequential stages beginning with the formation of a bud, followed by its elongation, constriction and final fission. These different stages require tight control of membrane deformations by a complex molecular machinery composed of coat proteins, motors and protein domains that bend membranes (Krauss et al., 2008; Roux et al., 2005; Sorre et al., 2009), and lipid components that recruit cytosolic proteins, modulate protein functions and modify the architecture and physical properties of the membrane bilayer (Bard and Malhotra, 2006; Burger, 2000; Huijbregts et al., 2000; Kooijman et al., 2005; Lippincott-Schwartz and Phair, 2010; Shemesh et al., 2003; van Meer et al., 2008). Membrane curvature is facilitated by conical lipid molecules such as lysophosphatidic acid (LPA), phosphatidic acid (PA) and diacylglycerol (DAG).

DAG has a dual role in the formation of carriers since it acts as a scaffold and activator of proteins involved in signaling and membrane fission such as PKD and ArfGAP1 (Baron and

Malhotra, 2002; Fernández-Ulibarri et al., 2007), and it also facilitates negative curvature. Moreover, there is a constant and relatively large pool of DAG in Golgi membranes (Lev, 2006). For all these reasons, DAG has been extensively associated with vesicular transport events at the Golgi in yeast and mammalian cells (Asp et al., 2009; Baron and Malhotra, 2002; Fernández-Ulibarri et al., 2007; Keams et al., 1997; Litvak et al., 2005; Sarri et al., 2011). Nonetheless, PA has recently been reported to regulate transport carrier formation at the Golgi (Yang et al., 2008; Yang et al., 2011).

DAG at the Golgi is tightly regulated by metabolic pathways that affect its consumption and production. On the one hand, CDP-cholinephosphotransferase (CPT) consumes DAG to generate phosphatidylcholine (PC) (Henneberry et al., 2002; Sarri et al., 2011; Tian et al., 2008) and diacylglycerol kinase (DAGK) converts DAG into PA (Mérida et al., 2008; Nagaya et al., 2002). On the other hand, DAG is generated by sphingomyelin synthases (SMSs) that convert PC and ceramide into sphingomyelin (SM) and DAG (Subathra et al., 2011; Villani et al., 2008), and by the sequential coupling of phospholipase D (PLD) and phosphatidic acid phosphatases (PAPs) in which the former generates PC-derived PA, which in turn is dephosphorylated by the latter to DAG (Roth, 2008; Sciorra and Morris, 1999).

Two types of mammalian PAPs have been identified according to their subcellular localization, substrate affinities and regulatory mechanisms (Brindley et al., 2009; Grimsey et al., 2008; Pyne et al., 2005; Sigal et al., 2005). PAP1 enzymes are cytoplasmic, Mg^{2+} -dependent and inhibited by N-ethylmaleimide, and PA is their only known substrate. PAP2 enzymes are integral membrane proteins, Mg^{2+} -independent, and insensitive to N-ethylmaleimide. PAP2 are also known as lipid phosphate phosphatases (LPPs) because, in addition to PA, they can also catalyze *in vitro* the dephosphorylation of other lipid phosphates such as ceramide-1-phosphate (C1P), sphingosine-1-phosphate (S1P), and lysophosphatidic acid (LPA) with different affinities (PA ~LPA >C1P>S1P) (Long et al., 2005; Roberts et al., 1998; Waggoner et al., 1996). Due to the crucial role of the substrates and products of PAP activity in cell signaling, several PAP isoforms have been shown to contribute to the production of lipid signaling metabolites both inside and outside cells (Brindley and Pilquil, 2009; Pyne et al., 2009).

In mammals, three LPP isoforms have been reported: LPP1 (PAP2a), LPP2 (PAP2c) and LPP3 (PAP2b). LPPs are glycoproteins with a channel-like structure containing six putative transmembrane domains. The catalytic site is arranged into three distinct conserved domains (C1–C3) and faces the extracellular side of the plasma membrane or the luminal side of endomembranes (Long et al., 2008; Zhang et al., 2000). This topology is important since lipid phosphates do not easily cross membranes and therefore, their access to LPPs, particularly in intracellular compartments, will be a major factor in their dephosphorylation rate and metabolism (Brindley and Pilquil, 2009). At present, the only experimental strategy to regulate a particular LPP isoform is by modulating its expression (Escalante-Alcalde et al., 2003; Kai et al., 1997; Long et al., 2008; Ulrix et al., 1998). All LPPs are present to some extent in the plasma membrane (Alderton et al., 2001; Jasinska et al., 1999; Kai et al., 2006), while LPP2 and LPP3 have been variably localized in endomembranes such as ER, endosomes, vesicular structures and the Golgi complex (Alderton et al., 2001; Morris et al., 2006; Sciorra and Morris, 1999). However, little is known about their role in these subcellular compartments. The use of propranolol, which inhibits general PAP activity (Pappu and Hauser, 1983), has indicated that the DAG generated in this reaction is involved in the fission (Fernández-Ulibarri et al., 2007) and in budding (Asp et al., 2009) at the Golgi complex, with the subsequent alteration in membrane trafficking at the ER–Golgi interface. Here we examine the molecular machinery involved in the production of DAG required for the membrane trafficking. We show that the PAP2 family member lipid phosphate phosphatase 3 (hereafter LPP3, also known as PAP2b) localizes in the early secretory pathway trafficking stations such as ER export sites (ERES), the ER–Golgi intermediate compartment (ERGIC) and the Golgi complex, mainly contributing to the retrograde transport.

Results

LPP3 localizes in compartments of the secretory pathway

Single labeling experiments in HeLa cells with anti-LPP3 antibodies (Long et al., 2008) stained a Golgi-like perinuclear region and peripheral dot-like structures, overlapping with the endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment (ERGIC) markers ERGIC53-GFP (Fig. 1A) and KDEL receptor (KDELr) (not shown). To assess the localization of LPP3 in more

detail, cells were treated with the microtubule-depolymerizing agent nocodazole (NZ) and co-labeled for LPP3 and markers of several transport stations along the secretory pathway, such as Sec31A (endoplasmic reticulum exiting sites, ERES), KDELr (endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment, ERGIC), GM130 (*cis*-Golgi) and Golgin97 (*trans*-Golgi/TGN) (Fig. 1). NZ treatment induces the formation of Golgi ministacks that, despite their small size, preserve the structural and molecular polarity (*cis*-to-*trans*) of the Golgi ribbon (Dejgaard et al., 2007; Ho et al., 1989), which in turn facilitates colocalization analysis. In NZ-treated cells, LPP3 overlapped with all these markers to a variable extent (Sec31A >KDELr >GM130 >Golgin 97) (Fig. 1B,C). Previous studies have reported LPP3 at the ER and the plasma membrane (Long et al., 2008; Sciorra and Morris, 1999), but with our anti-LPP3 antibodies the staining of both subcellular compartments (except for ERES) was not obvious. However, LPP3 was observed in both compartments after the expression of the human GFP-tagged LPP3 (hLPP3-GFP) in COS-7 and HeLa cells, in addition to its localization at the Golgi (supplementary material Fig. S1). The presence of LPP3 at ERES led us to examine its dynamics at the ER. To this end, COS-7 cells expressing hLPP3-GFP were examined by time-lapse confocal microscopy. They showed dot-like structures that exhibited slow, short range movements within ER cisterna, with no clear directionality (Fig. 1D; supplementary material Movie 1). Sometimes, these dot-like structures jumped from one cisterna to another (supplementary material Movie 1). This dynamic behavior is in accordance with what has been reported for ERES-associated transmembrane proteins (Hammond and Glick, 2000; Kano et al., 2004).

A pool of LPP3 constitutively cycles between the ER and the Golgi, and behaves like an ERGIC-resident protein

To examine the dynamics of LPP3 in the secretory pathway to the plasma membrane, we compared the ER-to-Golgi transport of LPP3 with that of a characteristic secretory protein, the membrane-associated vesicular stomatitis virus glycoprotein G (VSV-G), using the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) technique at the Golgi area. VSV-G was induced to accumulate at the ER at 40°C overnight, and then cells were treated with cycloheximide and incubated for 15 minutes at 32°C, which allows VSV-G to reach the Golgi. At this point the Golgi-associated fluorescence was photobleached and its recovery was analyzed. After 30 minutes, most of the fluorescence at the ER was lost, while the initial Golgi-associated fluorescence intensity was recovered (supplementary material Fig. S2A). Conversely, in cells expressing hLPP3-GFP the fluorescence at the ER barely decreased despite the arrival of LPP3 at the Golgi. This difference could be explained if LPP3 were more stably associated with ER membranes than VSV-G, or if LPP3 were in part constitutively recycled back from the Golgi to the ER. To investigate this latter possibility, we bleached the fluorescence signal out of the Golgi area in COS-7 cells expressing hLPP3-GFP for 24 hours and then added cycloheximide. After the photobleaching, we observed a partial recovery of the ER-associated signal (supplementary material Fig. S2B), which most likely have come from a pool of hLPP3-GFP located at the ERGIC and at the Golgi that is recycled back to the ER.

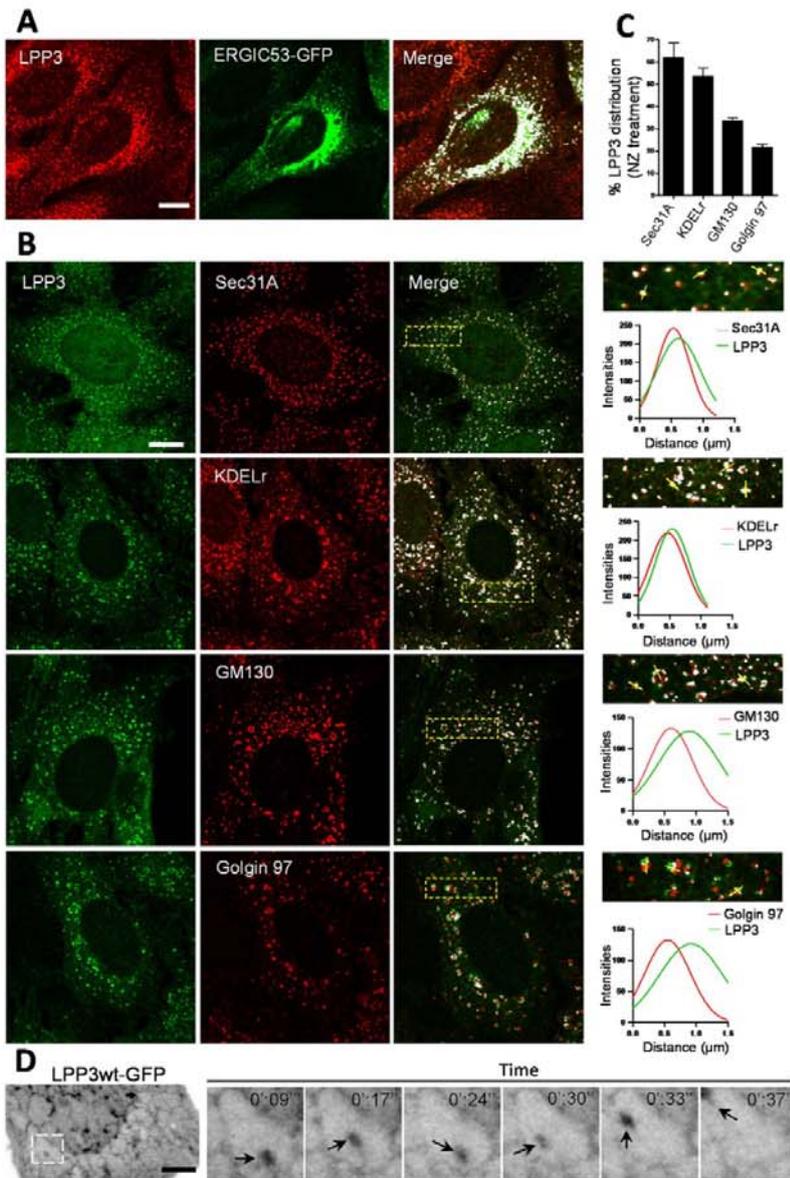


Fig. 1. Subcellular localization of LPP3 in compartments of the secretory pathway. (A) HeLa cells expressing ERGIC53-GFP stained with anti-LPP3 antibody. (B) HeLa cells treated with nocodazole (NZ) and stained with anti-LPP3 and anti-Sec31A, anti-KDELr, anti-GM130 and Golgin 97 antibodies. The rightmost panels show magnifications of the nocodazole-induced ministacks for each staining condition (enlarged boxes). Graphs depicting the average fluorescence intensity profiles taken from lines traced over 30 ministacks. (C) Quantitative analysis of the results shown in B. (D) Time-lapse frames extracted from supplementary material Movie 1 showing the dynamic association of LPP3-GFP in the ER of COS-7 cells. The arrow points to an LPP3 dot-like structure moving within ER cisterna. Scale bars: 10 μ m.

Collectively, these results strongly indicate that LPP3 behaves, in part, like an ERGIC-resident protein, cycling between the ER and the Golgi.

LPP3 participates in ERGIC membrane dynamics

As a first approach to examining the functional role of LPP3 in membrane trafficking at the ER–Golgi interphase, we used propranolol (an inhibitor of PAP activity; Billah et al., 1989) to assess its effect on the dynamics of ERGIC-53, a protein which constitutively cycles between the Golgi and the ER. HeLa cells expressing ERGIC53-GFP were incubated first at 15°C, which blocks both anterograde and retrograde protein transport from the ERGIC, resulting in the accumulation of recycling proteins in the swollen peripheral ERGIC clusters (Klumperman et al., 1998; Saraste and Svensson, 1991). The cells were then

rewarmed to 37°C. In agreement with previous reports (Ben-Tekaya et al., 2005), control cells showed numerous ERGIC53-GFP positive globular-like structures moving throughout the cytoplasm and forming transient tubular structures in a continuous process of elongation and shrinkage (Fig. 2A; supplementary material Movie 2). In contrast, propranolol-treated cells showed very few tubules emanating from ERGIC53-GFP structures (Fig. 2B; supplementary material Movie 3), which were less motile than untreated cells (compare supplementary material Movies 2, 3). When propranolol was removed, ERGIC tubulation was re-established (Fig. 2C; supplementary material Movie 4).

We next studied the role of LPP3 in ERGIC- and Golgi-associated membrane dynamics and protein transport. For this purpose, we suppressed the expression of LPP3 by transient

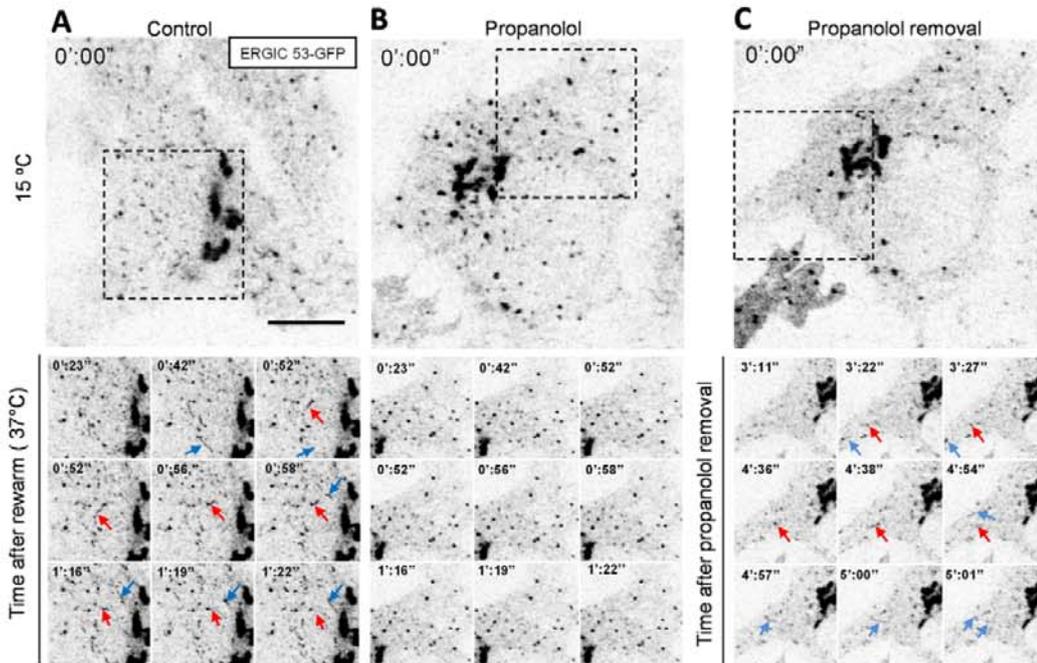


Fig. 2. Inhibition of ERGIC tubulation by propanolol. (A,B) Time series of live cells extracted from supplementary material Movies 2, 3 and 4. HeLa cells expressing ERGIC53-GFP were incubated at 15°C for 1 hour with no addition (control) (A) or in the presence of propanolol (60 μ M) for the last 5 minutes (B) and then shifted to 37°C. Magnifications from the indicated cell region recorded over time are shown below. (C) Initial time-point after washing propanolol in cell shown in B. Magnifications below show different time-points afterwards. In A and C, arrows with the same color indicate the temporal dynamics of the same ERGIC53-GFP dot-like structure. Scale bar: 10 μ m.

transfection of siRNAs and lentiviral infection with shRNAs in HeLa and Swiss 3T3 cells, respectively. In HeLa cells, two out of four different siRNAs against LPP3 exhibited a reduction in the protein level (about 70%) when added either individually or together (Fig. 3A). A similar decrease in LPP3 protein levels was also obtained in Swiss 3T3 cells (supplementary material Fig. S3). As a proof of specificity, we show that our anti-LPP3 antibody recognizes the expressed form of the human FLAG-tagged LPP3, giving the same electrophoretic bands pattern as that given by the anti-FLAG antibody (Fig. 3A).

To examine the effects of LPP3 silencing on the tubulation of the ERGIC, control and LPP3-knockdown HeLa cells were incubated at 15°C for 1 hour and then shifted to 37°C, fixed and stained for KDELr (Fig. 3B). At 15°C, a large amount of KDELr-stained dot-like structures appeared dispersed throughout the cytoplasm in both control and LPP3-silenced cells (Fig. 3B). After rewarming, numerous tubules appeared in control cells, but their formation was reduced in silenced cells (Fig. 3B,C) as occurred in propanolol-treated cells (Fig. 2B). To investigate the link between the inhibitory effect of LPP3 depletion on the ERGIC tubulation and the decrease in the DAG pool (see below), we examined whether the reduction in ERGIC tubulation could be prevented by adding the short fatty acid chain diacylglycerol analogue 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol (DOG). When added shortly before the rewarming of LPP3-silenced cells, DOG significantly recovered the tubulation of KDELr-associated dot-like structures (Fig. 3D,E). Collectively, these results support the participation of LPP3 in ERGIC membrane dynamics.

LPP3 is not involved in the transport of anterograde cargo

To examine whether the effects on ERGIC dynamics of LPP3 depletion alter protein transport from the ER to the Golgi, we used two cargo markers: the transmembrane VSV-G and the soluble signal sequence-tagged DsRed (ssDsRed) proteins. HeLa cells constitutively expressing the thermosensitive mutant form (ts045) of the GFP-tagged VSV-G were transfected with oligonucleotides (#6 and #8) to silence the expression of LPP3. After 48 hours, transfected cells were incubated overnight at 40°C to accumulate VSV-G-GFP in the ER. Upon a shift to the permissive temperature (32°C), we analyzed the kinetics of acquisition of Endo H resistance, which is a hallmark of VSV-G transported to the *cis*/middle Golgi. The transport of VSV-G from the ER to the Golgi was not perturbed in LPP3-depleted cells (Fig. 4A). Next, we analyzed the ssDsRed transport from ERGIC peripheral clusters in control and LPP3-silenced HeLa cells that had been co-transfected with ERGIC53-GFP and ssDsRed. After blocking the transport from the ERGIC by incubating cells for 2 hours at 15°C, ssDsRed mainly accumulated in enlarged peripheral punctated structures and in the Golgi in both control and LPP3-silenced cells (Fig. 4Ba,b). After 20 minutes of rewarming to 37°C (Fig. 4Bc,d,C), LPP3-silenced cells showed greater colocalization of ERGIC53-GFP peripheral punctated structures with the ssDsRed than control cells (compare magnified insets in Fig. 4Ce,f, Fig. 4D for quantitative analysis). However, the percentage of ssDsRed that colocalized with ERGIC53-GFP over the total ssDsRed-positive punctated structures remained unaltered between control and LPP3-silenced cells (Fig. 4E). This result indicates

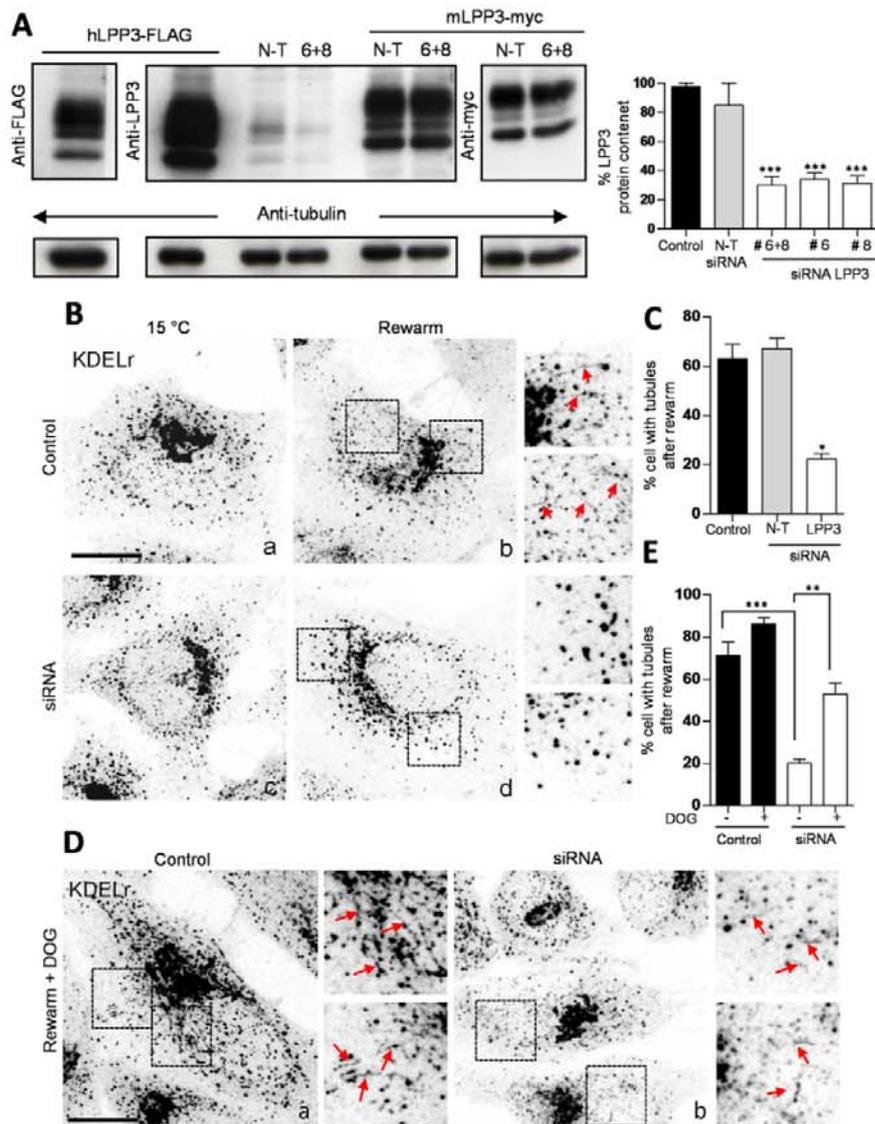


Fig. 3. ERGIC tubulation is inhibited in LPP3 knockdown cells. (A) Lysates from HeLa cells transfected with human LPP3-FLAG were subjected to western blot and incubated with anti-FLAG and anti-LPP3 antibodies. Lysates of these same cells as well as lysates from cells transfected for 72 hours with a non-target pool of siRNAs (N-T) or with a combination of two LPP3-specific siRNAs (6+8) were revealed with anti-LPP3 antibodies. Equally processed LPP3 knockdown cells were transfected for the last 24 hours with murine LPP3-myc and examined by western blotting with anti-LPP3 and anti-myc antibodies. Quantitative analysis of resulting LPP3 levels in the indicated transfection conditions are shown on the right. (B) Control (mock-transfected) and LPP3-silenced HeLa cells were first incubated at 15 °C for 30 minutes (Ba,c) and afterwards shifted to 37 °C for 10 minutes (Bb,d), fixed and stained with anti-KDELr antibody. The boxed areas are shown at higher magnification on the right. Arrows indicate tubular structures. (C) Quantitative analysis of cells showing KDELr-stained tubules after 10 minutes of rearming in control cells (mock-transfected), non-targeting cells (N-T) and cells transfected with LPP3 siRNAs. (D) Control and LPP3-silenced cells were incubated at 15 °C for 30 minutes in the presence of DOG for the last 10 minutes, then rewarmed to 37 °C and processed as indicated in A. Small red arrows point to representative tubular structures. (E) Quantitative analysis of results shown in D. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Scale bars: 10 μm .

that the transport of ssDsRed from the ERGIC to the Golgi was not impaired by the depletion of LPP3. Moreover, we observed a decrease in the density of ERGIC53-GFP punctated structures in LPP3-silenced cells (compare ERGIC53-GFP panels in Fig. 4C,c,d, Fig. 4F for quantitative analysis), which was accompanied by an increase in their average size (Fig. 4G). Similar results were observed in cells cultured at 37 °C, showing a significant decrease in the density of endogenous KDELr dot-like structures in LPP3-silenced cells with respect to control cells (supplementary material Fig. S4). Collectively these results indicate that LPP3 participates in the maintenance of the architecture and dynamics of the ERGIC, but not in the anterograde transport of membrane and luminal cargo.

LPP3 participates in the retrograde protein transport

Previous reports indicate that incubation of cells at 15 °C induces the formation of tubules enriched in Golgi-associated SNAREs

(Gos28 and GS15) and Rab (Rab6) proteins (Martínez-Alonso et al., 2007). As in our examination of the membrane tubulation from the ERGIC, here we first studied the formation of Rab6-GFP tubular and vesicular transport carriers in control and propranolol-treated cells by live imaging (supplementary material Fig. S5). After 1 hour at 15 °C, control cells showed a large number of tubular and vesicular Rab6-containing structures connected to the Golgi and dispersed throughout the cytoplasm. To study the dynamics of Rab6-GFP transport carriers formed at 15 °C, cells were then rewarmed to 37 °C (supplementary material Fig. S5; Movie 5). In control cells, there was a fast consumption of previously formed Rab6-GFP tubules in small vesicles and a fast formation of new thin, short tubular structures. Some of these tubules were distributed throughout the cytoplasm and were moving rapidly towards the cell periphery, whereas others emerged directly from the Golgi (supplementary material Fig. S5; Movie 5). Propranolol-treated cells showed a decrease in the rate of newly formed Rab6-GFP transport carriers exiting the

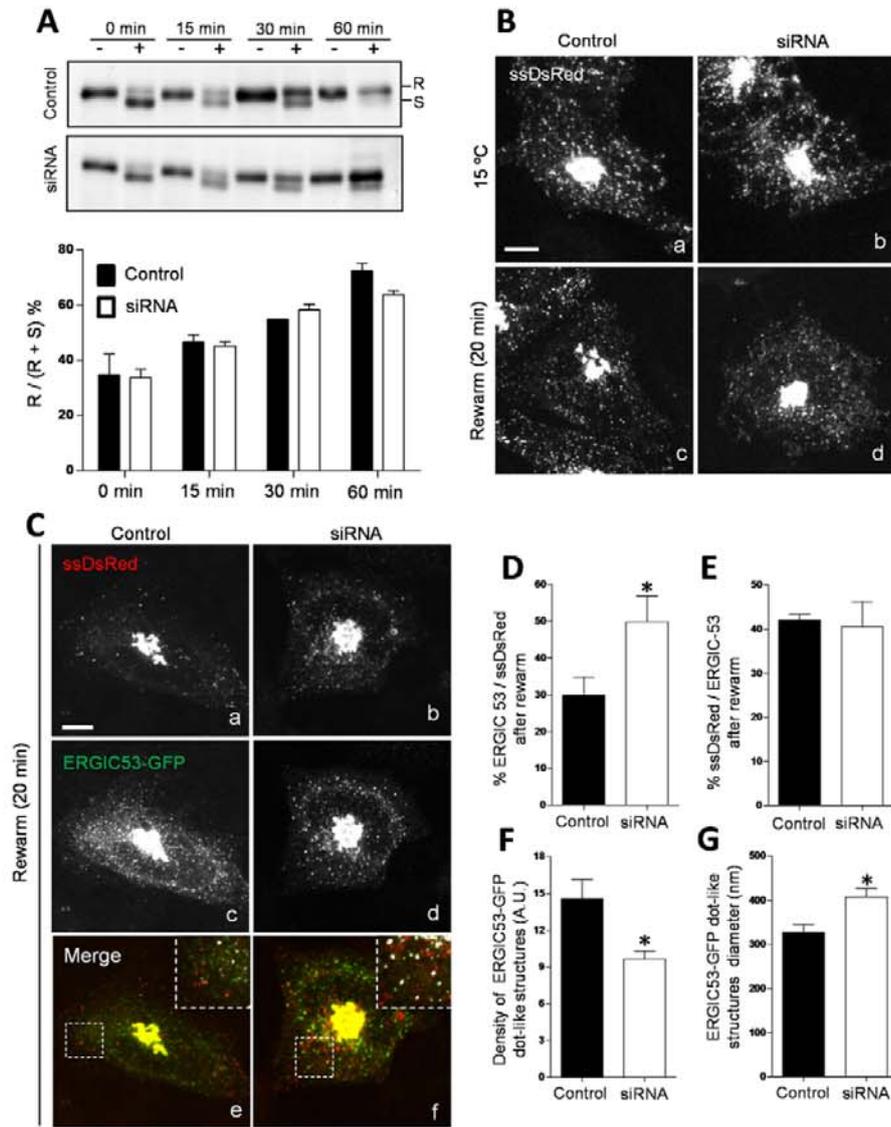


Fig. 4. LPP3 silencing perturbs ERGIC membrane dynamics and morphology but not ER-to-Golgi VSV-G transport.

(A) Control and LPP3-silenced HeLa cells constitutively expressing VSVG-GFP were lysed at different time-points after the shift to the permissive temperature (32°C) and incubated with Endo H. Total amount of VSVG-GFP was examined by western blot with an anti-GFP antibody. The ratio (in percentage) of the amount of Endo H-resistant form (R) to that of the total amount (Endo H-resistant plus Endo H-sensitive forms; R+S) for each time-point is shown. (B) Control and LPP3-silenced HeLa cells were co-transfected overnight with ssDsRed and ERGIC53-GFP. Then, cells were incubated at 15°C for 2 hours (Ba,b) and shifted to 37°C for 20 minutes (Bc,d). (C) Colocalization (white points in insets) of ERGIC53-GFP and ssDsRed in control (Ca,c,e) and LPP3-silenced (Cb,d,f) cells after 20 minutes of rewarming. (D) ERGIC53-GFP colocalizing with ssDsRed as a percentage of the total number of ERGIC53-GFP dot-like structures. (E) ssDsRed colocalizing with ERGIC53-GFP as a percentage of the total number of ssDsRed punctuated structures. (F) Density of ERGIC53-GFP dot-like structures. (G) Size of ERGIC53-GFP clusters. * $P \leq 0.05$. Scale bars: 10 μm .

Golgi, but they were more extended, and remained so for a longer time before their total disruption into small vesicular structures (supplementary material Fig. S5; Movie 6). Next, we examined the morphology and density of newly generated Rab6-GFP transport carriers (tubules and vesicles) from Golgi membranes in control and LPP3-silenced HeLa cells stably expressing Rab6-GFP, which, as before, had first been cooled to 15°C for 1 hour and then shifted to 37°C. After 10 minutes of rewarming, LPP3-depleted cells showed fewer Rab6-GFP particles than control cells (compare Fig. 5Ab,d, Fig. 5B,C for quantitative analysis). Interestingly, although LPP3-silenced cells contained fewer tubules, they were longer than those in control cells (Fig. 5D). Collectively, these results indicate that LPP3 participates in the formation of Rab6-GFP transport carriers generated at the Golgi.

To further investigate the role of LPP3 in Rab6-dependent protein transport, we analyzed the trafficking of the cy3-tagged subunit B of the Shiga toxin (STxB), which is transported from

the Golgi to the ER in a COPI-independent and Rab6-dependent manner (White et al., 1999). Control and LPP3 silenced cells stably expressing Rab6-GFP were incubated with STxB at 4°C for 30 minutes (supplementary material Fig. S6a,d), washed to remove unbound STxB and then shifted to 37°C to initiate the internalization of the toxin. After 2 hours at 37°C, STxB was mostly seen at the Golgi (supplementary material Fig. S6b,e). When cells were subsequently incubated at 15°C for 60 minutes, STxB appeared in enlarged peripheral vesicular structures, with the concomitant loss of the Golgi staining (supplementary material Fig. S6c,f). At 15°C, we could barely see STxB colocalizing with Rab6-GFP (data not shown), in agreement with previous reports demonstrating that Golgi-emerging tubules formed at low temperature lack cargo (Martínez-Alonso et al., 2007). When cells were rewarmed to 37°C for 10 minutes STxB reached the ER in about 50% of control cells, which was assessed by visualization of the characteristic reticular and nuclear envelope

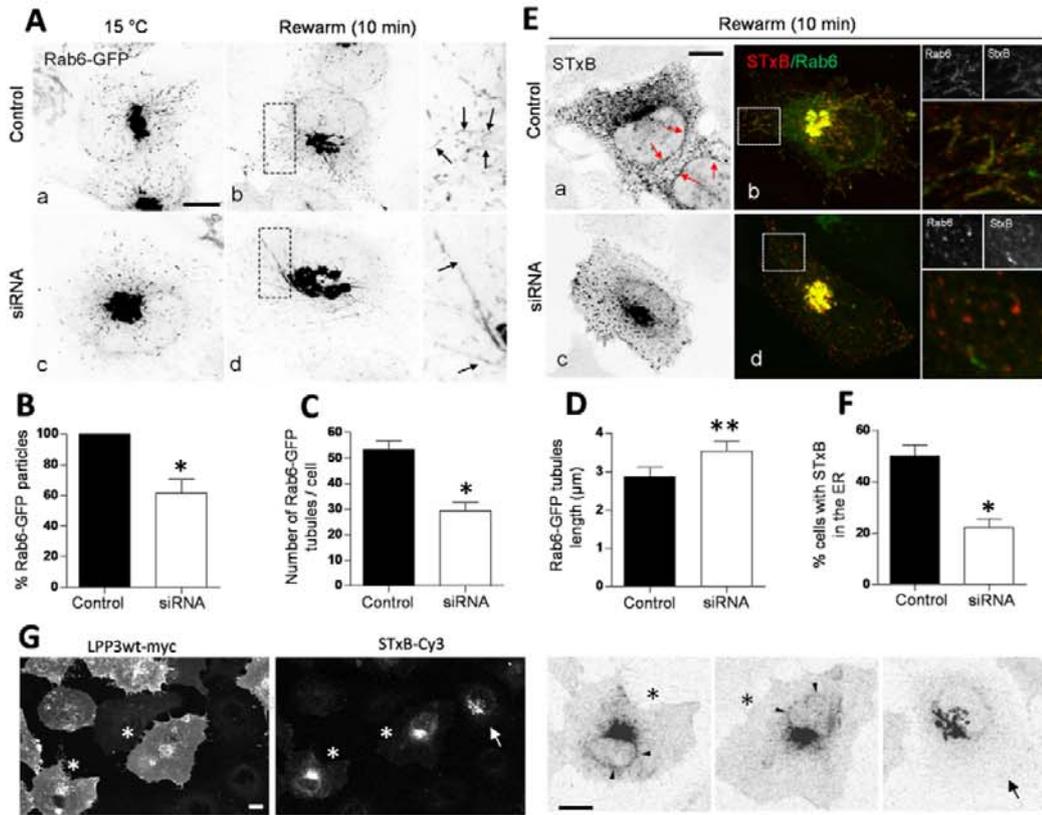


Fig. 5. Alterations of Rab6-dependent protein transport in LPP3 knockdown cells. (A) Control and LPP3-silenced HeLa cells stably transfected with Rab6-GFP were incubated at 15°C for 1 hour (Aa,c) and then shifted to 37°C for 10 minutes before fixation (Ab,d). The boxed areas are shown at higher magnification on the right. Arrows indicate Rab6-GFP tubular structures. (B–D) Quantitative analysis of all cytoplasmic structures (punctated and tubular) that contain Rab6-GFP (B), number of Rab6-GFP tubules per cell (C) and tubule length (D) in control and LPP3-silenced cells. (E) STxB was internalized for 2 hours at 37°C followed by 1 hour at 15°C and 10 minutes rewarming to 37°C. Cy3-STxB nuclear envelope staining appears in control (arrows in Ea) but not in LPP3-silenced (Ec) cells expressing Rab6-GFP. Colocalization of cy3-STxB in vesicles and tubules in control (Eb) and LPP3-silenced (Ed) cells. (F) Quantitative analysis of STxB in the ER; * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.01$. (G) Human LPP3 knockdown cells were transfected for the last 24 hours of silencing (72 hours) with the plasmid expressing the murine myc-tagged LPP3 wild-type form (LPP3wt-myc). Subsequently, cells were incubated with cy3-STxB following the same internalization protocol as indicated above. Human LPP3-silenced cells expressing murine LPP3wt (asterisks) showed Golgi- and ER-like staining patterns of STxB, whereas neighboring cells not expressing mLPP3-myc only showed the Golgi-like pattern (arrow). Panels on the right are higher magnifications of indicated cells shown in the left panels (arrowheads point to STxB in the ER). Scale bars: 10 μm.

ring patterns stained with cy3-STxB (Fig. 5Ea, red arrows). Conversely, in LPP3-silenced cells most STxB remained in the peripheral vesicle-like structures (Fig. 5Ec,F for quantitative analysis). In control cells, Rab6-GFP tubules contained STxB (Fig. 5Eb and magnified boxes). Taking into account that at 15°C the STxB was barely present in tubular structures, we conclude that most of these tubules containing STxB and Rab6-GFP were newly formed during the rewarming to 37°C. Conversely, in most of LPP3-silenced cells, co-labeled tubules were almost absent (Fig. 5Ed and magnified boxes), which is consistent with the reduction of Rab6-GFP tubular structures caused by LPP3 depletion (Fig. 5C).

To ensure that the observed trafficking defects caused by LPP3-silencing did not represent off-target effects of siRNA transfection, we performed rescue experiments involving murine LPP3, which lacks complementation for human siRNA sequences, and its protein expression levels are not perturbed (Fig. 4A). Remarkably, expression of this siRNA-resistant

murine LPP3 protein reversed the blockade of the STxB arrival at the ER (Fig. 5G, asterisks).

Finally, we examined whether COPI-dependent retrograde transport is also regulated by LPP3. To this end, we monitored the transport of STxB containing the KDEL sequence in its COOH-terminus (STxB-KDEL) (Johannes et al., 1997). When STxB-KDEL reaches the ER compartment, it is retained, showing an ER-like staining pattern. Control and LPP3-silenced Swiss 3T3 cells were incubated with cy3-STxB-KDEL at 19°C to accumulate the toxin in early endosomes. Subsequently, cells were shifted to 37°C to synchronize the toxin transport first to the Golgi and then to the ER, which in control cells occurred in 6 hours (supplementary material Fig. S7). In contrast, at this time STxB-KDEL was still accumulated in the Golgi of LPP3 silenced cells (supplementary material Fig. S7). Taken together, these results indicate that LPP3 is involved in both COPI-dependent and COPI-independent (Rab6-dependent) transport from the Golgi to the ER.

A catalytically inactive LPP3 mutant reduces the formation of Rab6 transport carriers and the retrograde protein transport

Our next step was to test whether the expression of the wild-type (LPP3wt) and the catalytically inactive mutant (LPP3S197T; Escalante-Alcalde et al., 2003) forms of human LPP3 affected protein transport at the ER–Golgi interface. First, we examined the formation of Rab6-containing transport carriers. When LPP3wt and Rab6 were co-expressed, both proteins colocalized at the Golgi and in cytoplasmic vesicular structures (Fig. 6A; see arrowheads in magnified boxes). The presence of both proteins in transport carriers provides no information about their directionality, since Rab6-containing transport carriers transit anterogradely to the plasma membrane (Grigoriev et al., 2007; Grigoriev et al., 2011) and retrogradely to the ER (White et al., 1999). To investigate whether some of these vesicular structures mediate in retrograde transport, we examined the colocalization of LPP3wt-GFP with internalized cy3-STxB. After 2 hours of STxB internalization at 37°C followed by 1 hour at 15°C, colocalization of LPP3 with STxB was seen in some vesicular structures (Fig. 6B and magnified boxes). Rab6 and LPP3 colocalization at the Golgi and in vesicular structures was seen only in cells expressing moderate levels of Rab6-myc.

Conversely, cells expressing high levels of Rab6-myc either alone or together with LPP3-GFP showed a complete redistribution of Rab6 into the ER (supplementary material Fig. S8). This observation is in accordance with the previously reported BFA-like phenotypical effect caused by Rab6wt or GTP-bound overexpression (Martinez et al., 1997). Remarkably, the co-expression of Rab6-myc with the catalytically inactive LPP3 mutant (LPP3S193T-GFP) strongly reduced the redistribution of Rab6wt to the ER, with the concomitant increase of Rab6 still present in the Golgi (supplementary material Fig. S8A,B).

To study whether this blockade in the Rab6 redistribution to the ER caused by LPP3S197T mutant was due to inhibition of Golgi-to-ER retrograde transport, we monitored the arrival of retrograde cargo at the ER. In this case, we measured the colocalization of STxB with LPP3wt-GFP or LPP3S197T-GFP at the ER in COS-7 cells after 2 hours of internalization of STxB at 37°C, followed by 1 hour at 15°C and an additional hour of rewarming. At this time, in cells expressing LPP3wt part of STxB had reached the nuclear envelope, which was not the case in cells expressing the LPP3S197T mutant form (Fig. 6C,D).

Collectively, these results indicate that LPP3wt-GFP associates with Rab6 transport carriers, which are in part transported from

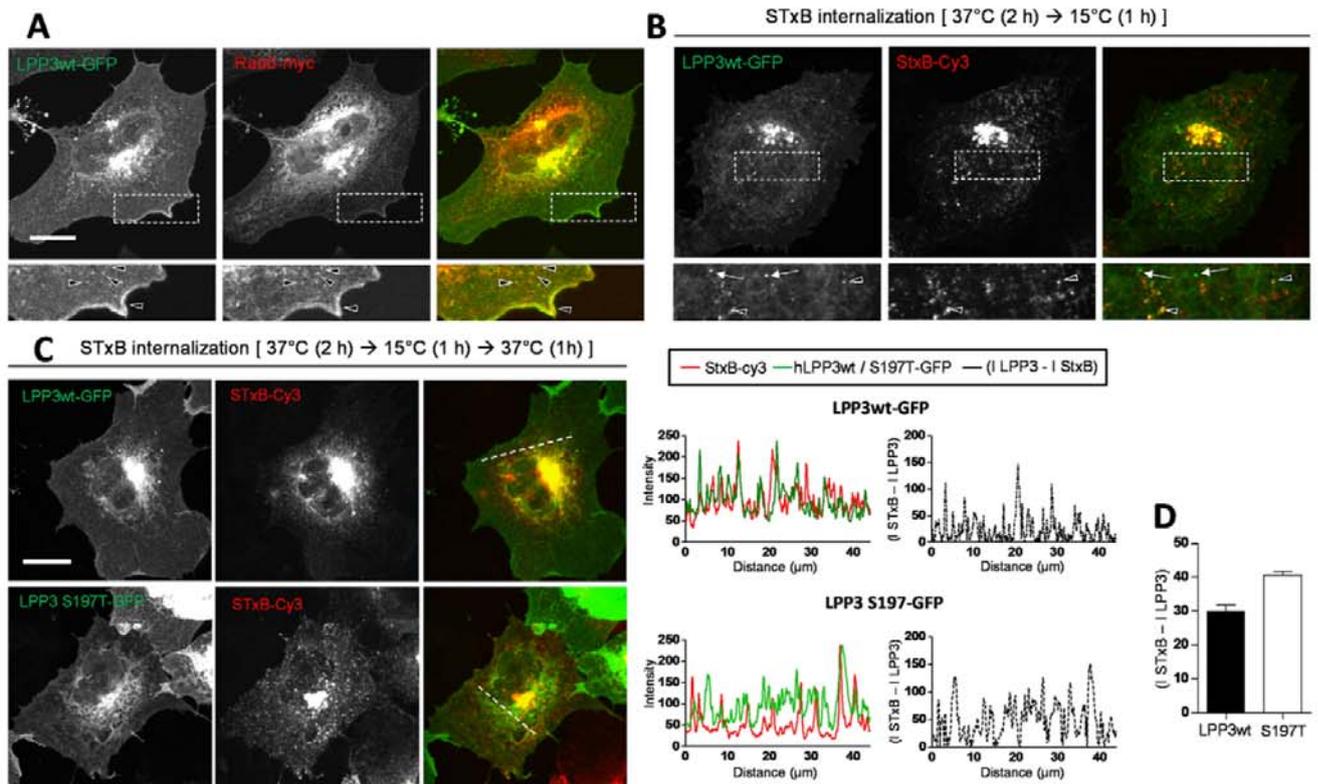


Fig. 6. Catalytically inactive LPP3 mutant impairs Rab6-dependent Golgi-to-ER protein transport. (A) HeLa cells were co-transfected with human LPP3wt-GFP and Rab6-myc plasmids and the colocalization of both proteins analyzed by confocal microscopy. Magnified pictures below show subcellular structures co-labeled for both proteins (arrowheads). (B) HeLa cells expressing human LPP3wt-GFP with internalized STxB (see protocol for Fig. 5E). Magnified pictures below show vesicular structures labeled only for LPP3 (arrows) or co-labeled for LPP3 and STxB (arrowheads). (C) Representative images of STxB internalized in COS-7 cells expressing human LPP3-GFP or human LPP3S197T. On the right are representative examples of human LPP3-GFP or LPP3S197T-GFP and cy3-STxB intensity profiles from random lines traced through the reticular cytoplasmic area. (D) Quantitative results from 5 lines per cell and 10 cells per experiment in two independent experiments. Scale bars: 10 μ m.

the Golgi to the ER, and that the expression of the catalytically inactive mutant and the silencing of LPP3 produce similar defects in Rab6-dependent retrograde protein transport.

Ultrastructural alterations in the ER–Golgi interface in LPP3-silenced cells

We examined the ultrastructure in the ER–Golgi interface area in Swiss 3T3 cells depleted of LPP3 by means of the lentiviral shRNA system. Unlike control cells (Fig. 7A), LPP3-silenced cells showed some slightly swollen cisternae (Fig. 7C) and an invariably abnormal accumulation of numerous vesicular membrane profiles as well as membrane buds attached to Golgi cisternae and peri-Golgi tubulovesicular structures (Fig. 7B,C; arrowheads in D). Interestingly, some budding profiles clearly contained an electron-dense material attached to the cytoplasmic face, which indicates the presence of the co-atomer (Fig. 7D, arrows) while others did not show this electron-dense content. No alterations in the ER were observed. Together, data supports the participation of LPP3 in the formation of COPI-dependent and COPI-independent transport carriers at the ERGIC and Golgi.

Alterations in the homeostasis of DAG in LPP3-silenced cells

To assess whether the aforementioned alterations in the ER–Golgi interface protein transport in LPP3-silenced cells were caused by changes in the phosphatidic acid (PA)-derived DAG, we first measured the production of DAG, triacylglycerol (TAG) and major phospholipids using radioactive labeling. The [^{14}C]acetate incorporation into DAG, TAG, and major phospholipids decreased in LPP3-silenced cells (Fig. 8A,C), which indicates that the newly synthesized DAG is reduced,

which compromises the *de novo* synthesis of TAG and phospholipids in LPP3-silenced cells. Consistent with this conclusion, the incorporation of [^{14}C]acetate into PA as a percentage of total [^{14}C]acetate incorporation into the lipids was higher in LPP3-silenced cells than in control cells (Fig. 8B), indicating the accumulation of the *de novo* synthesized PA. To investigate whether the reduction of newly synthesized phospholipids was compensated by an enhancement of the recycling pathways, we examined the incorporation of [^{32}P]orthophosphoric acid. We observed that the [^{32}P] labeling of major phospholipids was similar in control and LPP3-silenced cells (Fig. 8D), which confirmed a higher recycling of phospholipids in LPP3-silenced cells, compared to controls.

Next, we examined whether the DAG pool present in Golgi membranes was also affected after the silencing of LPP3. To this end, we expressed the GFP-tagged C1b domain of PKC θ (GFP-C1b), which in control conditions localizes to the Golgi and acts as a dynamic sensor of DAG content in this compartment (Carrasco and Merida, 2004; Fernández-Ulibarri et al., 2007). LPP3-silenced Swiss 3T3 cells showed lesser GFP-C1b domain in the Golgi than control cells (supplementary material Fig. S9). Taken together, these results indicate that the depletion of LPP3 reduced *de novo* synthesized DAG and the Golgi-associated DAG content.

Discussion

LPP3 localization at the ER–Golgi interphase

Here we provide evidence that human LPP3 is present in compartments of the secretory pathway from ERES to the *trans*-Golgi. The localization of LPP3 in the ER and the ERGIC is consistent with the presence of different pools of LPP3, one non-glycosylated and with immature N-glycans (Endo-H sensitive),

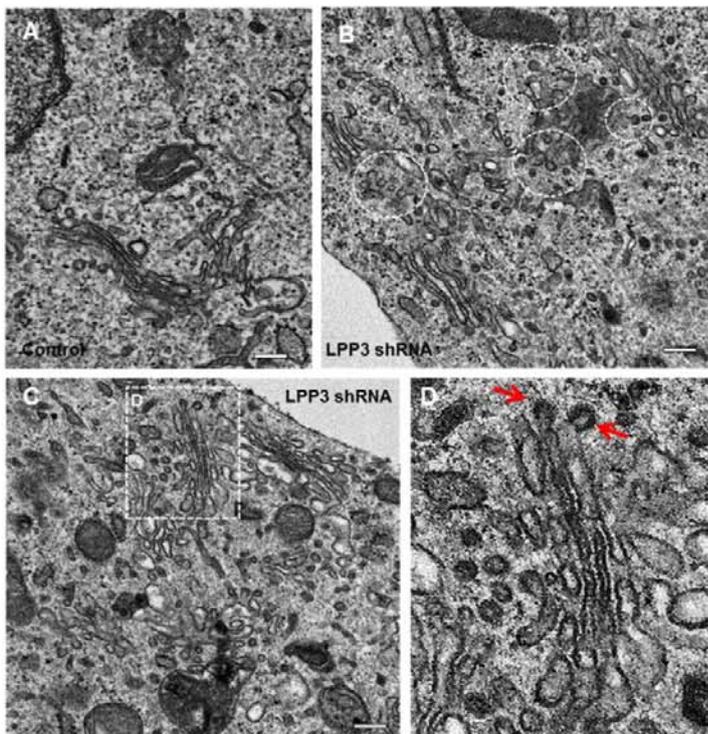


Fig. 7. Golgi and peri-Golgi membrane buds in LPP3-silenced cells. Swiss 3T3 cells were infected with an empty vector (control) or with LPP3 shRNA lentivirus (TCR49), fixed after 96 hours of infection and processed for TEM. (A) In control cells, the Golgi exhibits an extended ribbon structure containing flat cisternae surrounded by a few peri-Golgi vesicular structures. (B–D) In LPP3 knockdown cells, Golgi stacks show slightly swollen cisternae and numerous peri-Golgi vesicular profiles that remained attached to the cisterna by a neck (outlined by white circles). Arrows in D (which is a magnification of the box outlined in C) indicate the presence of an electron-dense material that corresponds to the co-atomer. Scale bars: 200 nm.

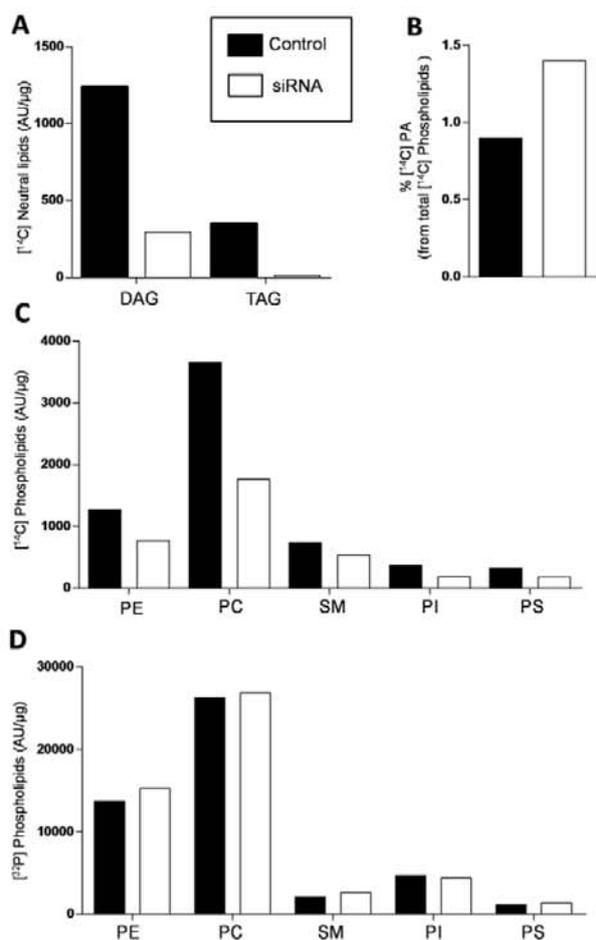


Fig. 8. Reduction of the *de novo* synthesis of DAG, TAG and major phospholipids in LPP3-silenced cells. (A–D) Control and LPP3-silenced HeLa cells were labeled with [¹⁴C]acetate (A–C) or with [³²P]orthophosphoric acid (D) for the last 24 hours of the silencing protocol. Lipids were extracted, separated by TLC and counted for radioactivity. The labeling with [¹⁴C]acetate of DAG and TAG (A) and main phospholipids (C), but not PA (B) is reduced in LPP3-silenced cells, whereas the labeling of phospholipids with [³²P]orthophosphoric acid is similar in control and silenced cells (D). Results are from a representative experiment. PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; SM, sphingomyelin; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; DAG, diacylglycerol; TAG, triacylglycerol.

and the other with mature N-glycans (Endo-H resistant) (Sciorra and Morris, 1999). Remarkably, the time-lapse analysis of LPP3 transport at the ER–Golgi interphase strongly suggests that part of the protein constitutively cycles between the ER and the Golgi, and behaves like an ERGIC-resident protein. The association of the overexpressed LPP3 with the STxB in vesicular structures directed to the ER indicates that LPP3 retrograde transport from the Golgi is partly Rab6-dependent. We also notice that unlike LPP1 and LPP2 isoforms, LPP3 contains the sequence KTKTT in the position 279–283 of its cytoplasmic C-terminus, which matches one of the two canonical motifs (KXXXX and KKXX) by which integral membrane proteins are incorporated into COPI transport carriers (Beck et al., 2009; Jackson et al., 1990; Nilsson

et al., 1989). This could explain the interaction of LPP3 with the COPI machinery, which is later retrieved from the ERGIC and Golgi membranes and carried back to the ER and ERGIC respectively, in a similar manner to other ERGIC proteins such as ERGIC53, KDELR and Sac1 (Cabrera et al., 2003; Rohde et al., 2003; Schindler et al., 1993). Whatever the mechanism by which LPP3 recycles at the ER–Golgi interface, some of it escapes from the retrieval system to complete N-glycosylation at distal Golgi membranes and it finally reaches the plasma membrane, where it seems to associate with lipid rafts (Kai et al., 2006).

LPP3 metabolizes lipids involved in early secretory membrane trafficking

The enzymatic machinery that regulates membrane lipids in compartments of the secretory pathway determines their morphology, associated membrane trafficking and lipid–protein interaction (Bechler et al., 2010; Ben-Tekaya et al., 2010; Brown et al., 2003; de Figueiredo et al., 2000; Morikawa et al., 2009; San Pietro et al., 2009; Schmidt and Brown, 2009; Subathra et al., 2011). Here we incorporate LPP3 into the enzymatic machinery (PLD, SMS, LPAAT3, and PLA₂) already related to the generation of the DAG necessary for the transport carrier formation along the secretory pathway. The observation that the depletion of LPP3 reduces [¹⁴C]acetate incorporation into DAG and TAG, as well as into the major phospholipid classes, points to inhibition of the *de novo* synthesis of glycerolipids in LPP3-silenced cells. Taking into account that the conversion of PA to DAG is a necessary step for the *de novo* synthesis of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylserine (PS), as well as the neutral lipid TAG, we postulate that LPP3 generates DAG by dephosphorylating the *de novo* synthesized PA in addition to the PA that comes from the PLD-induced hydrolysis of PC (Sciorra and Morris, 1999). The increase in [¹⁴C]acetate labeled PA supports this idea. On the other hand, the observation that the labeling of major phospholipids with [³²P]orthophosphoric acid (PC, SM, PE, PS and PI) is the same in control and LPP3-silenced cells indicates that the recycling pathways for the synthesis of phospholipids maintain the same levels of phospholipids in LPP3-silenced cells as those in control cells. Besides, we observed a reduction in Golgi-associated DAG.

LPP3 in the transport carrier formation process and in protein transport at the ER–Golgi interface

Here we show that propanolol and LPP3 depletion cause similar impairments in the formation of ERGIC tubules. We consider that DAG formation mediated by LPP3 is required for the budding of highly curved tubular transport carriers from the ERGIC (and Golgi) membranes, since the addition of DOG (a short chain cell membrane-permeant DAG) prevented the inhibitory effects caused by the depletion of LPP3. In this context, recent studies have suggested a role for PA-derived DAG in the budding stage of transport carrier formation in Golgi membranes (Asp et al., 2009). This work showed that in the presence of 300 μM propanolol, which completely inhibits the PAP1 and PAP2 families of enzymes, Golgi cisternae remain flat without any omega profiles (which is indicative of vesicle formation), suggesting that PAP1 and PAP2 were involved in the initial budding stage. However, we reported earlier that 60 μM propanolol, which does not completely inhibit PAP1 proteins (Meier et al., 1998) and does not perturb the microtubular

network, induced the accumulation of COPI-coated budding vesicles at the Golgi and peri-Golgi membranes (Fernández-Ulibarri et al., 2007), thus implicating PAP2 enzymes in the fission step of vesicle generation. Thus, these previous results and those reported here indicate that PAP1 and the PAP2 subtype LPP3 could cooperate in the formation of transport carriers both in the ERGIC and in the Golgi. Likewise, LPP3 seems to regulate budding and fission at the Golgi, since the decrease in the number of Rab6-GFP transport carriers occurring when the PAP activity was inhibited by propanolol, LPP3 was silenced or the catalytically inactive LPP3 was expressed indicates that budding is impaired. The concomitant increase in the length of the Rab6 tubules also points to a defect in the final fission of these tubules. Therefore, we envision a model in which, at an early stage, LPP3 (whose catalytic domain faces the lumen) would form DAG (a cone-shape lipid) in the inner leaflet of the bilayer. At this stage LPP3 could coordinately act with cPLA₂, which forms LPA (an inverted cone-shape lipid, which in turn might be enhanced by the inhibition of LPP3) in the cytoplasmic leaflet of the bilayer (de Figueiredo et al., 2000; San Pietro et al., 2009; Yang et al., 2011), allowing membranes to bend outward into the cytosol, thereby facilitating initial budding. Although there are no experimental data showing the precise localization of DAG in a budding vesicle/tubule, the strong negative curvatures generated in the neck clearly require DAG and its spontaneous flip-flop between the two membrane leaflets. On the other hand, the presence of DAG permits and enhances the negative curvature necessary for the recruitment of ArfGAP1 through its ALP motif (Antony et al., 1997; Ambroggio et al., 2010). Thus, local DAG accumulation and the increased recruitment of ARFGAP1 could act together, leading to the progressive pre-fission constriction of the neck in such a way that final vesicle/tubule scission could occur even without the involvement of a fission protein. In any case, whatever the biophysical mechanism involved or the stage in the transport carrier formation in which LPP3 participates, cargo trafficking at the ER–Golgi interface should be affected. This is indeed the case in LPP3-silenced cells and in cells overexpressing a catalytically inactive form of LPP3, where retrograde cargo (STxB) transport is impaired. Although the transport of VSV-G from the ER to the Golgi was unaltered in LPP3-silenced cells, we observed increased colocalization of ERGIC53-GFP with ssDsRed after the rewarming to 37°C from 15°C. A possible explanation for this apparent discrepancy is that the depletion of LPP3 perturbs the maturation and/or sorting functions of ERGIC compartment. In contraposition to the maturation model, in which ERGIC clusters would represent transport vehicles for protein delivery to the Golgi, recent studies show that the ERGIC is a stable compartment which is made up of numerous discontinuous elements that function in bidirectional sorting to the ER and to the Golgi. The reduction in the number of ERGIC53-GFP elements (with the concomitant increase in their size) as well as the greater association of ERGIC53-GFP with the ssDsRed secretory protein seen in LPP3-silenced cells indicates that ERGIC-resident proteins (such as ERGIC53) cannot be efficiently sorted from transport carriers that contain anterograde protein cargo (such as ssDsRed). Then, tubulation could be more involved in the interconnection and membrane exchange occurring between ERGIC stationary clusters (which would determine the steady number of ERGIC dot-like structures at physiological conditions) rather than a critical process for transport of anterograde cargo at the

ER–Golgi interphase. Likewise, the decrease in density of ERGIC clusters could result from impairment in the retrograde transport from the *cis*-Golgi to the ERGIC, which is supported by the delay in the STxB-KDEL transport from the Golgi to the ER and the accumulation of uncompleted fissioned buds in Golgi cisternae.

Remarkably, the retrograde trafficking impairment occurring in LPP3-depleted cells does not distinguish between COPI-dependent and COPI-independent mechanisms, as both wild type STxB (COPI-independent) and STxB-KDEL (COPI-dependent) were equally perturbed in LPP3-silenced cells. These results suggest that the DAG pool derived from the LPP3 activity is involved more in generating the membrane curvature than in acting as an acceptor for the recruitment of a specific molecular machinery that discriminates between the COPI-dependent or COPI-independent retrograde protein transports.

In conclusion, our study shows that LPP3, *en route* to the plasma membrane (where it has a variety of physiological functions (Escalante-Alcalde et al., 2003; Long et al., 2005; Humtsoe et al., 2010), acts in early compartments of the secretory pathway, in particular in the formation of retrograde transport carriers. LPP3 dephosphorylates at least *de novo* synthesized PA to generate DAG, which is in turn necessary for the aforementioned transport process. Thus, LPP3 can be added to the increasing arsenal of enzymatic machinery that regulates the lipid metabolism of secretory compartments, which contributes to the formation of transport carriers.

Materials and Methods

Antibodies and plasmids

Rabbit polyclonal antibodies against LPP3 used for immunocytochemistry were generated to the 223–235 amino acid sequence of the human protein (Alderton et al., 2001). Antibodies used for western blotting were provided by H. Kanoh (Sapporo Medical University School of Medicine, Japan). Mouse monoclonal antibodies to KDEL receptor were purchased from Calbiochem, BD Transduction Laboratories (San José, CA, USA). Mouse monoclonal antibodies to GM130 and myc, and rabbit polyclonal antibodies to FLAG were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Mouse monoclonal antibody to Golgin97 and rabbit polyclonal antibody to GFP were purchased from Molecular Probes (Paisley, United Kingdom). Secondary antibodies [F(ab')₂ fragments] conjugated to Cy3- or Alexa-488 were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Secondary antibodies conjugated to HRP were from Promega (Madison, WI, USA).

Plasmids: LPP3wt-GFP and LPP3S197T-GFP were provided by H. Kanoh (Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan), Rab6-myc was from B. Goud (Institut Curie, Paris, France), GFP-C1 domain-PKC θ was from I. Mérica (CSIC, Madrid, Spain), and ERGIC53-GFP and ssDsRed were from H.-P. Hauri (Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland). Plasmids encoding mouse LPP3wt-myc and human Gb3 synthase were purchased from Origene (Rockville, MD, USA). The second-generation lentivirus packaging (psPAX2) and envelope plasmids (pMD2.G) were provided by R.M. Rios (Cabimer, Sevilla, Spain). Cy3-conjugated wild type Shiga toxin B subunit (STxB) and STxB coupled to the KDEL sequence (STxB-KDEL) were provided by L. Johannes (Institut Curie, Paris, France).

Chemicals and reagents

2-dioctanoyl-sn-glycerol (DOG) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), propanolol and nocodazole were from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Endoglycosidase H (Endo H) was purchased from New England Biolabs (Beverly, MA) and [¹⁴C]acetate and [³²P]orthophosphoric acid were from PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA, USA). Unless otherwise stated, all other chemicals were from Sigma or Calbiochem.

Cell lines and cell culture conditions

HeLa cells stably expressing Rab6-GFP were provided by B. Goud (Institut Curie, Paris, France). HeLa cells stably expressing VSVG-GFP were provided by V. Malhotra (Center of Regulatory Genomics, Barcelona, Spain). HeLa, COS-7, Swiss 3T3, and 293T cells were cultured in DMEM (Invitrogen, Paisley, United Kingdom) containing 10% of fetal calf serum (FCS; GIBCO/BRL Invitrogen, Paisley, United Kingdom) and supplemented with sodium pyruvate (1 mM),

glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Cells were grown in a humidified incubator in 5% CO₂ at 37°C. Expression of stably transfected HeLa Rab6-GFP and HeLa VSV-GFP cells was maintained by adding geneticin (500 µg/ml) to the culture medium. For the temperature experiments, cells were cultured in a temperature-controlled incubator at 15°C for different periods of time. Where indicated, cells were treated with nocodazole (NZ, 30 µM), propranolol (60 or 100 µM) or DOG (3 µM) for the indicated times.

LPP3 silencing and plasmids transfection

The negative control non-targeting pool of siRNAs and the siRNA sequences against human LPP3 – oligonucleotide #6 (5'-GGGACUGUCUCGGUAUCA-3') and oligonucleotide #8 (5'-GGACAUUAUUGACAGGAAC-3') were obtained from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). siRNA transfections were performed using HiPerfect (Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, HeLa cells were seeded at a density of 10⁵ cells in six-well culture plates for 24 hours. Thereafter, cells were transfected for 48 hours with the indicated oligonucleotides alone or both together at a final concentration of 20 nM when added individually or 10 nM for each oligo when added together. Subsequently, cells were detached with trypsin, re-seeded at a density of 4 × 10⁵ cells/well in six-well culture plates and subjected to a second round of reverse transfection for 24 hours more. Therefore, silencing experiments were carried out for a total of 72 hours, after which time cells were collected for western blot or fixed for immunofluorescence analysis. Control cells were mock transfected or, where indicated, transfected with the non-targeting pool of siRNAs following the protocol described above.

For rescue experiments cells were transfected with the murine form of LPP3 24 hours before the total 72 hours of siRNA human LPP3 transfection.

For LPP3 silencing using lentiviral-based system in Swiss 3T3, the hairpin sequences designed against mouse LPP3 mRNA were the following: TRC49/TRCN0000081249 (5'-CCGGCGGGTATCTGACTACAAGCATCTCGAGATTGTAGTACCCGTTG-3') and TRC51/TRCN0000081251 (5'-CCGGCCTG-ATTTACAGTACAGATCAATCTCGAGAGATCTGACCTGTTTTG-3') and they were purchased from Open Biosystems (Huntsville, AL, USA). Clone details for creating shRNAs against LPP3 are available online (<http://www.thermoscientificbio.com>). The viral particles were produced by transient co-transfection of plasmid encoding LPP3 shRNA and packaging vectors into 293T cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Paisley, United Kingdom). The resulting supernatant was collected after 96 hours. For the infection, Swiss 3T3 cells were seeded at a density of 6 × 10⁵ cells in 100-cm² plates for 24 hours. Thereafter, lentiviral particles containing shRNAs were added to the culture medium for 24 hours. The post-transduction culture medium was subsequently replaced with complete DMEM supplemented with puromycin (3 µg/ml). After 96 hours, infected cells were collected for western blotting or fixed for immunofluorescence analysis. Control Swiss 3T3 cells were infected with lentiviral particles lacking the plasmids containing the LPP3 shRNAs. For plasmid transfections, Eugene (Promega) were used for HeLa cells and Lipofectamine 2000 for Swiss3T3 and 293T cells, following the manufacturer's instructions in all cases.

Immunofluorescence

Indirect immunofluorescence assays were carried out as previously described (Fernández-Ulbarri et al., 2007), except when the tubulation of the ERGIC was examined. In this case, cells were first fixed at 37°C with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 10 minutes followed by additional 10 minutes of fixation at room temperature. The antibodies were used at the following dilutions: anti-LPP3 (1:100), anti-KDELr (1:500), anti-Golgin97 (1:500), anti-GM130 (1:1000), anti-EEA1 (1:50), anti-mouse-Cy3 (1:200), anti-mouse-Alexa488 (1:100), anti-rabbit-Cy3 (1:200) and anti-rabbit-Alexa488 (1:100). Coverslips were mounted on microscope slides using Mowiol (Calbiochem). Microscopy and imaging were performed either with an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with a cooled Olympus CCD camera (Lake Success, NY) or with a TCS-SL laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Confocal images were taken with a PL APO 63× (NA 1.32) or PL APO 100× (NA 1.4) objectives. For each cell, different images with an optical size of 0.5 µm from the ventral surface to the top of the cell were acquired.

Live imaging

Time-lapse fluorescence confocal microscopy experiments were carried out using a TCS-SL laser-scanning confocal spectral microscope (see above) equipped with an incubation system with temperature and CO₂ control. GFP images were acquired with a PL APO 100× (NA 1.4) objective, 488-nm laser line (excitation intensity 15%), excitation beam splitter RSP 500, emission range detection: 500–610 nm and the confocal pinhole set at 1 Airy unit. Images were recorded at 0.6-second intervals for a maximum of 15 minutes and processed using the freeware ImageJ. Filters were used to optimize each experiment. For the analysis of ERGIC53-GFP and Rab6-GFP tubulation, the initial frame was acquired immediately after shifting cells from a temperature-controlled incubator at 15°C to another incubation system coupled to the TCS-SL confocal at 37°C. In the

experiments with ERGIC53-GFP, where indicated, propranolol was added 5 minutes before the shift from 15°C to 37°C. In the reversion experiment, propranolol containing media was carefully replaced after 6 minutes of incubation of cells at 37°C by adding fresh media. In the experiments with Rab6-GFP, propranolol was added at the moment of the temperature shift.

FRAP and iFRAP experiments

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments were performed using the Leica confocal mentioned above equipped with an incubation system with temperature and CO₂ control. COS-7 cells were seeded to a 35-mm plate (Nunc, Roskilde, Denmark) containing a glass coverslip of 22 mm (Micro cover glass; Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). 24 hours after seeding COS-7 cells were transfected with LPP3-GFP and VSVG-YFP. In the case of VSV-G transfected cells were incubated at 40°C to accumulate the protein at the ER overnight. For FRAP experiments 24 hours after transfection, the glass coverslip was mounted in the video confocal chamber, keeping the cells at 33°C. For FRAP experiments, the whole Golgi area was photobleached using 40 scans with the 488 nm laser line at full power. Subsequent images were taken every 0.657 seconds using 63× oil immersion objective lens (numerical aperture, 1.32), 488 nm laser line and the confocal pinhole set at 5 Airy units to minimize changes in fluorescence efficiency attributable to proteins moving away from the plane of focus. Recovery of the Golgi-associated intensity was monitored for about 30 minutes.

To evaluate the results of photobleaching experiments, the observed fluorescence equilibration in the bleached region (the Golgi complex) was quantified using the Image Processing Leica Confocal Software. Background fluorescence was measured in a random field outside of cells. All experiments were background subtracted, corrected and normalized using the equation described below. For each time point the relative recovery of total fluorescent intensity in the bleached Golgi region was calculated as:

$$I_{[t]} = (I_{\text{Golgi}_{[t]}}/I_{\text{Golgi}_{[0]}}) \times (I_{\text{Cytoplasm}_{[t]}}/I_{\text{Cytoplasm}_{[0]}}) \times 100,$$

where $I_{\text{Golgi}_{[t]}}$ and $I_{\text{Cytoplasm}_{[t]}}$ are the average fluorescence intensities of the bleached (Golgi) and unbleached (Cytoplasm) regions at the time-point x , and $I_{\text{Golgi}_{[0]}}$ and $I_{\text{Cytoplasm}_{[0]}}$ are the average intensities of the corresponding areas before the Golgi bleach.

For iFRAP experiments, after about 24 hours of transfection with LPP3wt-GFP, COS-7 cells were treated with cycloheximide (Sigma, St.Louis, MO, USA) at 0.1 mg/ml just before performing photobleach of the fluorescence out of the Golgi by 80 scans with the 488 nm laser line at full power. Afterwards, images were collected with a 63× oil immersion objective lens (numerical aperture, 1.32, pinhole set at 1 Airy units) applying a 6× zoom to visualize the endoplasmic reticulum fluorescence recovery along time. Images were collected every 5 minutes for 20 minutes.

Image processing

All the images were analyzed using the freeware ImageJ version 1.33 by Wayne Rasband (NIH, Bethesda, USA). Briefly, the total number of Rab6-GFP tubular structures per cell was the result of summing the tubules counted in each slice. The density of ERGIC53-GFP and KDELr dot-like structures was calculated setting an arbitrary threshold on the Z projection of different slices and making a ratio between the number of vesicles and the cell area (in both cases excluding the Golgi). The size of ERGIC53-GFP dot-like structures was calculated converting the average area in pixels of individual vesicles to their diameter (in nanometers). Rab6-GFP number of tubular and globular transport carriers was calculated as indicated above by counting the number of structures between 5 and 200 pixels. The length of Rab6-GFP tubules was calculated from the Z projection of different slices by measuring the area in pixels of drawn lines connecting the extremes of each tubule. The method to quantify colocalization between the different markers was the following: the cell area was delineated setting up a threshold for each of the markers assessed. Afterwards, colocalization analysis was performed using the ImageJ plugin named 'colocalization highlighter', considering 'colocalization' when the ratio of fluorescence intensities between red and green channels was above 0.5. Those pixels above the threshold in which this ratio is accomplished appear in a binary image color as white. Thereafter, a ratio between the number of pixels of one channel that colocalizes with the marker in the other channel and the total number of pixels above the threshold measured for each of the channels was obtained. To quantify colocalization between LPP3wt-GFP and LPP3S197T-GFP with the StxB-cy3 subunit at the ER, the fluorescence intensity profiles of each marker were obtained tracing lines randomly along the reticular staining of LPP3wt and LPP3S197T. For each pixel we calculated the difference between the LPP3wt/S197T-GFP and StxB-cy3 intensities.

Protein transport assays

For the ssDsRed transport assay, HeLa cells were co-transfected with plasmids encoding ssDsRed and ERGIC53-GFP. After 17–20 hours of expression, anterograde traffic from the ERGIC was blocked by incubating cells at 15°C for

2 hours. Thereafter, cells were warmed to 37°C and incubated at 37°C for 20 minutes to allow ssDsRed transport to the Golgi.

For the VSVG-GFP Endo-H resistance acquisition transport assay, HeLa cells stably expressing VSV-G-GFP were incubated the last 24 hours of silencing at 40°C. Cycloheximide was added to a final concentration of 100 ng/ml, and then cells were shifted to 32°C to allow transport. Cell lysates at different time-points after the temperature shift were obtained solubilizing pellets in 0.5% SDS and 1% 2-mercaptoethanol (0.1 ml per 35-mm dish), and heated to 100°C. Then, 20 µg of protein from each lysate was digested with Endo-H according to the manufacturer's protocol and subjected to SDS-PAGE on 8% gels. VSVG-GFP was detected by immunoblotting with an anti-GFP antibody.

For the wild-type Shiga toxin B fragment (STxB) transport assay, we used two cell lines: HeLa cells (wild type or stably expressing Rab6-GFP) and COS-7 cells co-transfected with either LPP3wt-GFP or LPP3S197T-GFP together with a plasmid encoding the enzyme Gb3 synthase. Transfection with the Gb3 synthase in COS-7 cells was necessary as this cell line express very low levels of the STxB receptor Gb3. Briefly, cells were first incubated for 15 minutes in DMEM in the presence of 0.5 µg/ml of Cy3-STxB. Subsequently, the unbound Shiga toxin was removed by three washes with ice-cold PBS. Thereafter, fresh DMEM was added and cells were incubated at 37°C for 2 hours to accumulate internalized STxB in the Golgi. Next, retrograde transport from the Golgi to the ER was synchronized incubating cells for 1 hour at 15°C, after which STxB arrival in the ER was allowed by shifting cells to 37°C for 10 minutes (in HeLa) or 1 hour (in COS-7).

For the Shiga toxin B subunit containing the KDEL sequence (STxB-KDEL) transport assay, Swiss 3T3 cells were first incubated with Cy3-ST-B-KDEL (4 µg/ml) for 45 minutes at 4°C and, subsequently, the unbound toxin was removed by three washes with ice-cold PBS. Thereafter, cells were incubated with DMEM at 19°C for 2 hours to accumulate the internalized STxB-KDEL in early/recycling endosomes. Next, cells were shifted to 37°C. In all transport experiments cells were fixed in PFA (4% in PBS) at the indicated times.

Transmission electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), Swiss 3T3 cells infected with the LPP3 shRNA lentivirus were rapidly fixed after 96 hours post-infection with 1.25% glutaraldehyde in PIPES buffer (0.1 M, pH 7.4) containing sucrose (2%) and Mg₂SO₄ (2 mM) for 60 minutes at 37°C. Cells were then gently scraped, pelleted at 100×g for 10 minutes, rinsed in PIPES buffer (3×5 minutes), and postfixed with 1% (wt/vol) OsO₄, 1% (wt/vol) K₃Fe(CN)₆ in PIPES buffer for 1 hour at room temperature in the dark. They were then treated for 5 minutes with tannic acid (0.1%) in PIPES buffer, rinsed in distilled water, block-stained with 1% uranyl acetate in 70% ethanol for 1 hour, dehydrated with graded ethanol solutions, and finally embedded in Epon plastic resin (EMS, Hatfield, PA). Ultrathin sections were stained with lead citrate and observed on a JEOL 1010 electron microscope (Peabody, MA). Micrographs of randomly selected areas were obtained with a GatanBioscan digital camera (Pleasanton, CA) at the same final magnification.

Determination of lipid labeling

Control and silenced cells were labeled with 5 µCi/ml [³²P]orthophosphoric acid or 1 µCi/ml [¹⁴C]acetate for the last 24 hours of LPP3 silencing. Lipids were extracted as previously described (Sarrí et al., 2011). Individual lipid classes were separated by TLC, identified with authentic standards and counted for radioactivity. Major phospholipid classes such as phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), sphingomyelin (SM), phosphoinositol (PI) and phosphatidylserine (PS), as well as phosphatidic acid (PA) in [¹⁴C]- and [³²P]-labeled lipid extracts were separated in two-dimensional thin layer chromatography (TLC) with the following mobile phases: first, chloroform/methanol/NH₄OH (65:35:10 by volume); second, chloroform/methanol/acetone/acetic acid/water (10:2:4:2:1 by volume). Neutral lipids such as triacylglycerol (TAG) and diacylglycerol (DAG) in [¹⁴C]acetate-labeled lipid extracts were separated by two-dimensional TLC with the mobile phases: first, chloroform/methanol (10:1 v/v); second, hexane/diethyl ether/acetic acid (70:30:1 by volume). The [¹⁴C]-labeled lipids and the [³²P]-labeled phospholipids separated in the TLC plates were counted for radioactivity with a PhosphorImager (Typhon TRIO, Amersham Biosciences), and analyzed with ImageQuant software (Amersham Biosciences).

Statistics

Unless stated otherwise, data are presented as mean ± s.e.m. of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed with either a paired Student's *t*-test or ANOVA one-way followed by Tukey's multiple comparison test. For statistical computation and estimation of significance, we used the online software GraphPad (San Diego, CA; www.graphpad.com).

Acknowledgements

We thank our colleagues for generously providing antibodies, plasmids and cells used in this study, Maite Muñoz for technical support, staff of SCT-UB for confocal microscope advice, Rosa M.

Rios for helping us in the production of lentiviral particles containing shRNAs against LPP3, Jean-Baptiste Manneville and members of the lab for helpful discussions and Robin Rycroft for editorial assistance. G.E. dedicates this article to his late father Victoriano Egea-López and to his uncle Joaquin Egea-López.

Author contributions

E.G.-M., I.F.-U., F.L.-D and E.S. performed the experiments, data collection and analysis; S.P. and L.J. generated essential molecular tools and contributed to manuscript editing; I.F.-U and G.E. conceived the study; E.G.-M, E.S. and G.E. wrote the manuscript.

Funding

This study was financed by the Ministerio de Ciencia e Innovación [grant number BFU2009-07186 to G.E.]. E.G.-M. is a predoctoral fellow from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR; Generalitat de Catalunya, Catalunya, Spain).

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.117705/-/DC1>

References

- Alderton, F., Darroch, P., Sambhi, B., McKie, A., Ahmed, I. S., Pyne, N. and Pyne, S. (2001). G-protein-coupled receptor stimulation of the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway is attenuated by lipid phosphate phosphatases 1, 1a, and 2 in human embryonic kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 13452-13460.
- Ambroggio, E., Sorre, B., Bassereau, P., Goud, B., Manneville, J. B. and Antonny, B. (2010). ArfGAP1 generates an Arf1 gradient on continuous lipid membranes displaying flat and curved regions. *EMBO J.* **29**, 292-303.
- Antony, B., Huber, L., Paris, S., Chabre, M. and Cassel, D. (1997). Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J. Biol. Chem.* **272**, 30848-30851.
- Asp, L., Kartberg, F., Fernandez-Rodríguez, J., Smedh, M., Elsner, M., Laporte, F., Bárcena, M., Jansen, K. A., Valentijn, J. A., Koster, A. J. et al. (2009). Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol. Biol. Cell* **20**, 780-790.
- Bard, F. and Malhotra, V. (2006). The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 439-455.
- Baron, C. L. and Malhotra, V. (2002). Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* **295**, 325-328.
- Bechler, M. E., Doody, A. M., Racoosin, E., Lin, L., Lee, K. H. and Brown, W. J. (2010). The phospholipase complex PAFAH1b regulates the functional organization of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **190**, 45-53.
- Beck, R., Rawet, M., Wieland, F. T. and Cassel, D. (2009). The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett.* **583**, 2701-2709.
- Ben-Tekaya, H., Miura, K., Pepperkok, R. and Hauri, H. P. (2005). Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC. *J. Cell Sci.* **118**, 357-367.
- Ben-Tekaya, H., Kahn, R. A. and Hauri, H. P. (2010). ADP ribosylation factors 1 and 4 and group VIA phospholipase A₂ regulate morphology and intraorganellar traffic in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Mol. Biol. Cell* **21**, 4130-4140.
- Billah, M. M., Eckel, S., Mullmann, T. J., Egan, R. W. and Siegel, M. I. (1989). Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in signal transduction. *J. Biol. Chem.* **264**, 17069-17077.
- Brindley, D. N. and Pilquill, C. (2009). Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J. Lipid Res.* **50** Suppl., S225-S230.
- Brindley, D. N., Pilquill, C., Sariahtmetoglu, M. and Reue, K. (2009). Phosphatidate degradation: phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 956-961.
- Brown, W. J., Chambers, K. and Doody, A. (2003). Phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* **4**, 214-221.
- Burger, K. N. (2000). Greasing membrane fusion and fission machineries. *Traffic* **1**, 605-613.
- Cabrera, M., Muñoz, M., Hidalgo, J., Vega, L., Martín, M. E. and Velasco, A. (2003). The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4114-4125.
- Carrasco, S. and Merida, I. (2004). Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC θ and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2932-2942.
- de Figueiredo, P., Drecktrah, D., Polizzotto, R. S., Cole, N. B., Lippincott-Schwartz, J. and Brown, W. J. (2000). Phospholipase A₂ antagonists inhibit constitutive retrograde membrane traffic to the endoplasmic reticulum. *Traffic* **1**, 504-511.
- Dejgaard, S. Y., Murshid, A., Dee, K. M. and Presley, J. F. (2007). Confocal microscopy-based linescan methodologies for intra-Golgi localization of proteins. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 709-719.

- Escalante-Alcalde, D., Hernandez, L., Le Stunff, H., Maeda, R., Lee, H. S., Jr, Jr-Gang-Cheng, Sciorra, V. A., Daar, I., Spiegel, S. and Morris, A. J. et al. (2003). The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development* **130**, 4623-4637.
- Fernández-Ulibarri, I., Vilella, M., Lázaro-Díez, F., Sarri, E., Martínez, S. E., Jiménez, N., Claro, E., Mérida, I., Burger, K. N. and Egea, G. (2007). Diacylglycerol is required for the formation of COPI vesicles in the Golgi-to-ER transport pathway. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3250-3263.
- Grigoriev, I., Splinter, D., Keijzer, N., Wulf, P. S., Demmers, J., Ohtsuka, T., Modesti, M., Maly, I. V., Grosveld, F., Hoogenraad, C. C. et al. (2007). Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev. Cell* **13**, 305-314.
- Grigoriev, I., Yu, K. L., Martínez-Sánchez, E., Serra-Marques, A., Smal, I., Meijering, E., Demmers, J., Peränen, J., Pasterkamp, R. J., van der Sluijs, P. et al. (2011). Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Curr. Biol.* **21**, 967-974.
- Grimsey, N., Han, G. S., O'Hara, L., Rochford, J. J., Carman, G. M. and Siniosoglou, S. (2008). Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2. *J. Biol. Chem.* **283**, 29166-29744.
- Hammond, A. T. and Glick, B. S. (2000). Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3013-3030.
- Henneberry, A. L., Wright, M. M. and McMaster, C. R. (2002). The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of Fatty Acid and lipid head group specificity. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3148-3161.
- Ho, W. C., Allan, V. J., van Meer, G., Berger, E. G. and Kreis, T. E. (1989). Reclustering of scattered Golgi elements occurs along microtubules. *Eur. J. Cell Biol.* **48**, 250-263.
- Huijbregts, R. P., Topalof, L. and Bankaitis, V. A. (2000). Lipid metabolism and regulation of membrane trafficking. *Traffic* **1**, 195-202.
- Huntsoe, J. O., Liu, M., Malik, A. B. and Wary, K. K. (2010). Lipid phosphatase 3 stabilization of beta-catenin induces endothelial cell migration and formation of branching point structures. *Mol. Cell Biol.* **30**, 1593-1606.
- Jackson, M. R., Nilsson, T. and Peterson, P. A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **9**, 3153-3162.
- Jasinska, R., Zhang, Q. X., Pilquill, C., Singh, I., Xu, J., Dewald, J., Dillon, D. A., Berthiaume, L. G., Carman, G. M., Waggoner, D. W. et al. (1999). Lipid phosphatase phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters. *Biochem. J.* **340**, 677-686.
- Johannes, L., Tenza, D., Antony, C. and Goud, B. (1997). Retrograde transport of KDEL-bearing B-fragment of Shiga toxin. *J. Biol. Chem.* **272**, 19554-19561.
- Kano, F., Tanaka, A. R., Yamauchi, S., Kondo, H. and Murata, M. (2004). Cdc2 kinase-dependent disassembly of endoplasmic reticulum (ER) exit sites inhibits ER-to-Golgi vesicular transport during mitosis. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4289-4298.
- Kai, M., Wada, I., Imai, S., Sakane, F. and Kanoh, H. (1997). Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* **272**, 24572-24578.
- Kai, M., Sakane, F., Jia, Y. J., Imai, S., Yasuda, S. and Kanoh, H. (2006). Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts. *J. Biochem.* **140**, 677-686.
- Kearns, B. G., McGee, T. P., Mayinger, P., Gedvilaitė, A., Phillips, S. E., Kagiwada, S. and Bankaitis, V. A. (1997). Essential role for diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex. *Nature* **387**, 101-105.
- Klumperman, J., Schweizer, A., Clausen, H., Tang, B. L., Hong, W., Oorschot, V. and Hauri, H. P. (1998). The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J. Cell Sci.* **111**, 3411-3425.
- Kooijman, E. E., Chupin, V., Fuller, N. L., Kozlov, M. M., de Kruijff, B., Burger, K. N. and Rand, P. R. (2005). Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* **44**, 2097-2102.
- Krauss, M., Jia, J. Y., Roux, A., Beck, R., Wieland, F. T., De Camilli, P. and Haucke, V. (2008). Arf1-GTP-induced tubule formation suggests a function of Arf family proteins in curvature acquisition at sites of vesicle budding. *J. Biol. Chem.* **283**, 27717-27723.
- Lev, S. (2006). Lipid homeostasis and Golgi secretory function. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 363-366.
- Lippincott-Schwartz, J. and Phair, R. D. (2010). Lipids and cholesterol as regulators of traffic in the endomembrane system. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 559-578.
- Litvak, V., Dahan, N., Ramachandran, S., Sabanay, H. and Lev, S. (2005). Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat. Cell Biol.* **7**, 225-234.
- Long, J., Darroch, P., Wan, K. F., Kong, K. C., Ktistakis, N., Pyne, N. J. and Pyne, S. (2005). Regulation of cell survival by lipid phosphate phosphatases involves the modulation of intracellular phosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate pools. *Biochem. J.* **391**, 25-32.
- Long, J. S., Pyne, N. J. and Pyne, S. (2008). Lipid phosphate phosphatases form homo- and hetero-oligomers: catalytic competency, subcellular distribution and function. *Biochem. J.* **411**, 371-377.
- Martinez, O., Antony, C., Pehau-Arnau, G., Berger, E. G., Salamero, J. and Goud, B. (1997). GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1828-1833.
- Martinez-Alonso, E., Ballesta, J. and Martínez-Menárguez, J. A. (2007). Low-temperature-induced Golgi tubules are transient membranes enriched in molecules regulating intra-Golgi transport. *Traffic* **8**, 359-368.
- Meier, K. E., Gause, K. C., Wisheart-Johnson, A. E., Gore, A. C., Finley, E. L., Jones, L. G., Bradshaw, C. D., McNair, A. F. and Ella, K. M. (1998). Effects of propranolol on phosphatidate phosphohydrolase and mitogen-activated protein kinase activities in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Cell. Signal.* **10**, 415-426.
- Mérida, I., Avila-Flores, A. and Merino, E. (2008). Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *Biochem. J.* **409**, 1-18.
- Morikawa, R. K., Aoki, J., Kano, F., Murata, M., Yamamoto, A., Tsujimoto, M. and Arai, H. (2009). Intracellular phospholipase A1gamma (iPLA1gamma) is a novel factor involved in coat protein complex I- and Rab6-independent retrograde transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **284**, 26620-26630.
- Morris, K. E., Schang, L. M. and Brindley, D. N. (2006). Lipid phosphate phosphatase-2 activity regulates S-phase entry of the cell cycle in Rat2 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **281**, 9297-9306.
- Nagaya, H., Wada, I., Jia, Y. J. and Kanoh, H. (2002). Diacylglycerol kinase delta suppresses ER-to-Golgi traffic via its SAM and PH domains. *Mol. Biol. Cell* **13**, 302-316.
- Nilsson, T., Jackson, M. and Peterson, P. A. (1989). Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **58**, 707-718.
- Pappu, A. S. and Hauser, G. (1983). Propranolol-induced inhibition of rat brain cytoplasmic phosphatidate phosphohydrolase. *Neurochem. Res.* **8**, 1565-1575.
- Pyne, S., Long, J. S., Ktistakis, N. T. and Pyne, N. J. (2005). Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1370-1374.
- Pyne, S., Lee, S. C., Long, J. and Pyne, N. J. (2009). Role of sphingosine kinases and lipid phosphate phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphate signalling in health and disease. *Cell. Signal.* **21**, 14-21.
- Roberts, R., Sciorra, V. A. and Morris, A. J. (1998). Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *J. Biol. Chem.* **273**, 22059-22067.
- Rohde, H. M., Cheong, F. Y., Konrad, G., Paiha, K., Mayinger, P. and Boehmelt, G. (2003). The human phosphatidylinositol phosphatase SAC1 interacts with the coatomer I complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 52689-52699.
- Roth, M. G. (2008). Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* **9**, 1233-1239.
- Roux, A., Cuvelier, D., Nassoy, P., Prost, J., Bassereau, P. and Goud, B. (2005). Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *EMBO J.* **24**, 1537-1545.
- San Pietro, E., Capestrano, M., Polishchuk, E. V., DiPentima, A., Trucco, A., Zizza, P., Marigliò, S., Pulvirenti, T., Sallèse, M., Tete, S. et al. (2009). Group IV phospholipase A(2)alpha controls the formation of inter-cisternal continuities involved in intra-Golgi transport. *PLoS Biol.* **7**, e1000194.
- Saraste, J. and Svensson, K. (1991). Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport. *J. Cell Sci.* **100**, 415-430.
- Sarri, E., Sicart, A., Lázaro-Díez, F. and Egea, G. (2011). Phospholipid synthesis participates in the regulation of diacylglycerol required for membrane trafficking at the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **286**, 28632-28643.
- Schindler, R., Itin, C., Zerial, M., Lottspeich, F. and Hauri, H. P. (1993). ERGIC-53, a membrane protein of the ER-Golgi intermediate compartment, carries an ER retention motif. *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 1-9.
- Schmidt, J. A. and Brown, W. J. (2009). Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 regulates Golgi complex structure and function. *J. Cell Biol.* **186**, 211-218.
- Sciorra, V. A. and Morris, A. J. (1999). Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3863-3876.
- Shemesh, T., Luini, A., Malhotra, V., Burger, K. N. and Kozlov, M. M. (2003). Prefission constriction of Golgi tubular carriers driven by local lipid metabolism: a theoretical model. *Biophys. J.* **85**, 3813-3827.
- Sigal, Y. J., McDermott, M. I. and Morris, A. J. (2005). Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem. J.* **387**, 281-293.
- Sorre, B., Callan-Jones, A., Manneville, J. B., Nassoy, P., Joanny, J. F., Prost, J., Goud, B. and Bassereau, P. (2009). Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 5622-5626.
- Subathra, M., Qureshi, A. and Luberto, C. (2011). Sphingomyelin synthases regulate protein trafficking and secretion. *PLoS ONE* **6**, e23644.
- Tian, Y., Pate, C., Andreolotti, A., Wang, L., Tuomanen, E., Boyd, K., Claro, E. and Jackowski, S. (2008). Cytokine secretion requires phosphatidylcholine synthesis. *J. Cell Biol.* **181**, 945-957.
- Ulrix, W., Swinnen, J. V., Heyns, W. and Verhoeven, G. (1998). Identification of the phosphatidic acid phosphatase type 2a isozyme as an androgen-regulated gene in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *J. Biol. Chem.* **273**, 4660-4665.
- van Meer, G., Voelker, D. R. and Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112-124.
- Villani, M., Subathra, M., Im, Y. B., Choi, Y., Signorelli, P., Del Poeta, M. and Luberto, C. (2008). Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the Golgi. *Biochem. J.* **414**, 31-41.
- Waggoner, D. W., Gómez-Muñoz, A., Dewald, J. and Brindley, D. N. (1996). Phosphatidate phosphohydrolase catalyzes the hydrolysis of ceramide 1-phosphate, lysophosphatidate, and sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* **271**, 16506-16509.

- White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B. et al. (1999). Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.* **15**, 743-760.
- Yang, J. S., Gad, H., Lee, S. Y., Mironov, A., Zhang, L., Beznoussenko, G. V., Valente, C., Turacchio, G., Bonsra, A. N., Du, G. et al. (2008). A role for phosphatidic acid in COPI vesicle fission yields insights into Golgi maintenance. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1146-1153.
- Yang, J. S., Valente, C., Polishchuk, R. S., Turacchio, G., Layre, E., Moody, D. B., Leslie, C. C., Gelb, M. H., Brown, W. J., Corda, D. et al. (2011). COPI acts in both vesicular and tubular transport. *Nat. Cell Biol.* **13**, 996-1003.
- Zhang, Q. X., Pilquill, C. S., Dewald, J., Berthiaume, L. G. and Brindley, D. N. (2000). Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action. *Biochem. J.* **345**, 181-184.