

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
FACULTAD DE MEDICINA



*EL PAPEL DEL DIACILGLICEROL EN EL TRÁFICO DE MEMBRANAS EN LA ZONA
ENTRE EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y EL COMPLEJO DE GOLGI*

Tesis presentada por Inés Fernández Ulibarri
para optar al título 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 y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Dr. Gustavo Egea Guri

Inés Fernandez Ulibarri

Barcelona, Diciembre 2008

A mis padres

A mi hermano

A Sebastian

*"Cuando emprendas el viaje hacia Ítaca
debes rogar que el viaje sea largo,
lleno de peripecias, lleno de experiencias".
(Paulo Coelho).*

Agradecimientos

Muchísimas gracias a todos por el apoyo que he recibido durante todo este tiempo!! Por enseñarme tantas cosas, por ayudarme y aconsejarme, por ser unos compañeros estupendos y por todos esos ratitos inolvidables que hemos compartido: las cenas de Navidad (con regalos incluidos), las publicaciones de los “papers” (con pastitas incluidas), las comidas en el “zulo”, los cafelitos en el claustro....A todos gracias!!

En primer lugar me gustaría darle las gracias a Gustavo por darme la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio. Gracias por estar siempre que te he necesitado. Por tu inquietud científica y tu capacidad de trabajo. Por tus consejos, por tu rigurosidad y por el entusiasmo que siempre ha mostrado por este trabajo.

Gracias a toda la gente de mi grupo. Los que están y los que ya se han ido. A Montse por el trabajo compartido durante los dos primeros años de mi tesis, su diplomacia a la hora de decir las cosas y lo más importante a ser muy crítica conmigo. También quería darles las gracias a los primeros compis que tuve al llegar. A Steffan que gracias a él instauramos los seminarios de grupo en inglés. También agradecerles a Juanma, Olga y Miguel por ayudarme en los inicios y por esos cafelitos en la quinta planta “pa” solucionar el mundo. También a Isabel por recordarme constantemente que debía tener paciencia para aprender y por los buenos ratos que pasamos charlando con un buen vino hasta las mil. A Frank por las juergas que nos hemos pegado juntos. A Enma por su simpatía, buen humor y su risa. A Yovanet, por su tarta de tiramisú y sus carcajadas que se escuchaban por todo el lab. A mi amiga Pilet por todo el tiempo que hemos pasado juntas y por lo que nos queda por pasar. A Javito por haberme echo reír tanto, por ser un gran “secretario adjunto de organización de grupo” y por nuestras confianzas en el cuarto de cultivos. A Bet por su capacidad de crítica y por todo ese tiempo que me ha dedicado cuando le he pedido ayuda. A Susana E por nuestras charlas, por echarme una mano cuando estaba desorientada, por ver la banda que no veía y por su espíritu de superación. A Sergi por su simpatía, a Enric por haber sido mis manos mientras escribía la tesis y a las nuevas chicas del lab, Laia y Susana G, por vuestra apoyo y ánimo.

A Jordi y todos los miembros de su grupo, pasados y presentes. A Pep, a Esther y a Silvieta por los momentos compartidos. A Mikel y Susana Pezzi con los que me divertí un montón sobretodo a la hora de la merienda. A Nurieta por todos esos momentos que hemos pasado siempre que has venido a Barcelona. Quería agradecerles especialmente a Chucho, a Jman y a Raquel la amistad que me han

brindado dentro y fuera del labo. Desde luego, sin vosotros esto no hubiera sido lo mismo. Lo hemos pasado muy bien juntos y espero que volvamos a encontrarnos. España, Venezuela, Escocia, Alemania...Cualquier sitio es muy buena opción ¿no creéis? Raquel, gracias por ser tan genial como eres. A Cristi por ser tan divertida y por ese viaje relámpago a Estocolmo. A todas las chicas del labo de la tercera a Ana, a Empar, a Noelia y a Miriam por esos buenos ratos que pasamos y por acogerme cuando hice mis cultivos en suspensión y las RT-PCR. A los de los quinta planta a Jr, Anita “la portuguesa”, a Laura, a Paola, a Maria, a Dani, a Xavito, a Ingrid, a Bego y Albert por ayudarme siempre que estaba en vuestra mano y porque ha sido un verdadero placer compartir el laboratorio con vosotros.

A Maite, por mantener el orden del laboratorio. Sin tí todo hubiera sido un caos y mucho más complicado. A las técnicos del confocal, en especial a Maria Calvo por su tiempo y toda su ayuda. A las secres con más paciencia del mundo, Nuria y Carme, por vuestra sonrisa y eficiencia.

A Sakari Kellokumpu por acogerme en su laboratorio durante mi Erasmus en Oulu. Flipé cuando por primera vez en mi vida tuve mi primer juego de pipetas automáticas (en la facultad utilizábamos “peras”). También quería agradecerles a Nina y Antti, mis compañeros de aquella época, por aceptarme tan bien en el grupo, por su inestimable ayuda y simpatía. A Felix Wieland por su hospitalidad y generosidad al acogerme en su laboratorio en Heidelberg. A la gente de su grupo, especialmente a Britta Bruguer por una cena encantadora e inolvidable y por recordarme que hay gente estupenda en cualquier parte del mundo. A Rosa Rios por tratarme como una más en su laboratorio en el Cabimer (Sevilla) durante 3 meses en el 2007. A la gente de su labo, en especial a Jesulito, que bueno eres....y a mi amiga Sabrina que hizo que mi estancia en Sevilla fuera increíble. Gracias por nuestros desayunos, por animarme a probar los “pajaritos” y por ser tan alegre y con ese sentido del humor gaditano insuperable.

A mis amigos y amigas de aquí y de allá. Mil gracias a todos porque me encanta saber que siempre estáis ahí. Agradeceros por recibirme siempre que vuelvo como si no hubiera pasado el tiempo.

A mi tía Carmen por animarme y cuidarme aunque estemos tan lejos. Gracias por la comiditas y los paseos cuando estaba histérica escribiendo la tesis. Gracias especialmente a mis fans incondicionales: mis padres. Por confiar en mi, por escucharme y aconsejarme sobretodo durante estos duros meses. Por dejarme volar y por enseñarme que el “mundo” es muy grande. Por quererme, valorarme y

respetarme. Gracias a mi mami por prepararme los "táperes" durante muchos años de la tesis. Estoy segura que muchos del lab no olvidarán la "fruta peladita" que me preparabas. A mi hermano por quererme tanto, por ser un gran amigo y por ser el mejor hermano que se puede tener.

A Sebastian por estar a mi lado. Por su ayuda infinita durante estos últimos meses que no han sido nada fáciles: la tesis, las becas, cartas, CV... Gracias por ese tiempo dedicado a leer, corregir y aconsejarme. Por admirarme, por tu ilusión por vivir y por luchar por lo que quieres. Por sorprenderme, por hacerme más libre, por ser mi amigo y, sobretodo, por quererme. Hacemos un gran equipo!!

Muchas gracias a todos

Indice

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ABREVIATURAS | 3 |
| INTRODUCCIÓN | |
| I. TRÁFICO INTRACELULAR DE MEMBRANAS | |
| 1.- RUTAS O VÍAS DE TRÁFICO INTRACELULAR | 7 |
| 1.1.- La ruta endocítica y de reciclaje | 7 |
| 1.2.- La ruta secretora o biosintética | 9 |
| 2.- EL COMPLEJO DE GOLGI | 10 |
| 2.1.- Estructura del complejo de Golgi | 10 |
| 2.2.- Funciones del complejo de Golgi | 10 |
| 3.- TRÁFICO DE MEMBRANAS ASOCIADO AL COMPLEJO DE GOLGI | 12 |
| ETAPA TEMPRANA DE LA VÍA SECRETORA | 13 |
| 3.1.- Transporte entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi | 13 |
| 3.2.- Transporte de membranas intra-Golgi | 16 |
| ETAPA TARDÍA DE LA VÍA SECRETORA | 17 |
| 3.3.- Transporte de membranas post-Golgi | 17 |
| II. BIOGÉNESIS DE LA VESÍCULAS COPI | |
| 1.- ETAPAS DE FORMACIÓN DE LAS VESÍCULAS COPI | 18 |
| 2.- CONCEPTOS DE CURVATURA Y MECANISMOS DE DEFORMACIÓN DE MEMBRANA | 20 |
| 3.- MAQUINARIA MOLECULAR IMPLICADA EN LA FISIÓN DE LAS VESICULAS COPI | 24 |
| 3.1.- CtBP3/BARS | 24 |
| 3.2.- ArfGAP1 | 24 |
| 3.3.- Fosfolipasa D | 26 |
| 3.4.- Proteína quinasa C y Proteína quinasa D | 26 |
| III. DINÁMICA Y COMPOSICIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES | |
| 1.- LOS LÍPIDOS DE LAS BIOMEMBRANAS | 27 |
| 1.1.- Clasificación, estructura y función | 27 |
| 1.2.- Metabolismo lipídico y localización subcelular | 29 |
| 1.3.- El papel de los lípidos en la estructuras y dinámica de las membranas | 31 |
| 2.- EL DIACILGLICEROL | 32 |
| 2.1.- Características estructurales | 32 |
| 2.2.- Metabolismo del diacilglicerol en el complejo de Golgi | 34 |
| 2.3.- Papel del diacilglicerol como segundo mensajero en el complejo de Golgi | 38 |
| 2.4.- El diacilglicerol en la deformación de la membrana y en la fisión de intermediarios de transporte | 39 |
| ANTECEDENTES, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS | 43 |

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

| | |
|-----------------------|----|
| 1.- Reactivos | 47 |
| 2.- Anticuerpos | 48 |
| 3.- Plásmidos | 49 |

MÉTODOS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.- Líneas y cultivos celulares | 50 |
| 5.- Técnicas morfológicas | |
| 5.1.- Inmunocitoquímica y microscopía de epifluorescencia | 51 |
| 5.2.- Análisis cuantitativo de las imágenes | 52 |
| 5.3.- Microscopia confocal <i>in vivo</i> | 52 |
| 5.4.- Microscopia electrónica de transmisión | 54 |
| 5.5.- Análisis estereológico | 54 |
| 5.6.- Tomografía electrónica y reconstrucción tridimensional | 55 |
| 6.- Técnicas bioquímicas y de biología molecular | |
| 6.1.- Fraccionamiento celular | 56 |
| 6.1.- Aislamiento de las membranas de Golgi de células en cultivo | 56 |
| 6.2.- Cuantificación de los niveles de diacilglicerol | 57 |
| 6.3.- Transfecciones con ADN plasmídico | 57 |
| 6.4.- Producción e infección lentiviral | 58 |
| 6.5.- Extractos celulares y western blotting | 60 |
| 6.6.- Mutagénesis dirigida | 60 |
| 7.- Ensayos de transporte intracelular | |
| 7.1.- Uso de la brefeldina A como herramienta para estudiar el flujo anterógrado y retrógrado de membranas | 61 |
| 7.2.- Ensayo de transporte con el virus de la estomatitis vesicular | 61 |
| 7.3.- Ensayo de de transporte con el virus de la toxina Shiga | 61 |

RESULTADOS

I.- EL DAG PARTICIPA EN LA FORMACIÓN DE LAS VESÍCULAS COPI Y EN EL TRANSPORTE

RETRÓGRADO DE PROTEÍNAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1.- El propanolol, el U73122 y la FB1 disminuyen los niveles de DAG en el Golgi | 67 |
| 1.2.- El propanolol y el U73122 bloquean el transporte retrógrado pero no el anterógrado | 69 |
| 1.3.- El propanolol y el U73122 alteran la formación de túbulos en las membranas de Golgi inducidos por la BFA | 76 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.4.- El DOG y el PDBu previenen la inhibición del transporte retrógrado del receptor de KDEL inducido por el propanolol y el U73122 | 78 |
| 1.5.- El DOG y el PDBu previenen el aumento de la densidad de gemas asociadas al Golgi inducidas por el propanolol o el U73122 | 83 |
| 1.6.- La reducción del DAG disminuye la localización de ArfGAP1, pero no de CtBP3/BARS, en las membranas de Golgi | 87 |
| Figuras Suplementarias | 91 |
| Videos | 97 |
| | |
| II.- LA LPP3 EN LA ORGANIZACIÓN DEL GOLGI Y EN EL TRANSPORTE EN LA ZONA DEL RE/CG | |
| 2.1.- La LPP3 se comporta como una proteína residente del Golgi en presencia de BFA y NZ | 101 |
| 2.2.- La LPP3 es necesario para mantener los niveles de DAG en el Golgi | 102 |
| 2.3.- El silenciamiento de la LPP3 inhibe el transporte retrógrado de proteínas | 107 |
| 2.4.- Modificaciones en la expresión de la LPP3 alteran la estructura del complejo de Golgi | 111 |
| | |
| III.- REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LA PKCϵ EN EL GOLGI COMO EFECTOR DEL DAG Y SU PARTICIPACIÓN EN EL TRANSPORTE EN LA ZONA RE/CG | |
| 3.1.- La PKC ϵ se comporta como una proteína residente del Golgi en presencia de BFA | 117 |
| 3.2.- La localización de la PKC ϵ en el Golgi depende de los niveles de DAG | 119 |
| 3.3.- El DOG aumenta el reclutamiento de la PKC ϵ fosforilada en el Golgi | 121 |
| 3.4.- El mutante catalítico inactivo de la PKC ϵ no altera el transporte retrógrado de proteínas | 124 |
| 3.5.- La PKC ϵ localiza mayoritariamente en el TGN | 125 |
| Videos | 127 |
| DISCUSIÓN | 131 |
| CONCLUSIONES | 143 |
| BIBLIOGRAFÍA | 147 |

ANEXO169

Fernández-Ulibarri I, Vilella M, Lázaro-Diéguez F, Sarri E, Martínez SE, Jiménez N, Claro E, Mérida I, Burger KN, Egea G. 2007. Diacylglycerol is required for the formation of COPI vesicles in the Golgi-to-ER transport pathway. *Mol.Biol.Cell.* 18: 3250-63 .

Abreviaturas

3D Tridimensional
AG Acidos grasos
BFA Brefeldina A
C1 Dominio C1
C1P Ceramida-1-fosfato
Cer Ceramida
CI Compartimento intermedio
COPI Coatómero
DAG Diacilglicerol
DAGK Diacilglicerol quinasa
DOG 2-dioctanoil-sn-glicerol
FB1 Fumonisina B1
GFP Proteína fluorescente verde
Golgi Complejo de Golgi
ITs Intermediarios de transporte
KDELr Receptor de KDEL
LPA Acido lisofosfatídico
LPPs Fosfatasas de lípidos fosfatos
LTB Latrunculina B
MET Microscopía electrónica de transmisión
MTs Microtúbulos
NZ Nocodazole
PA Acido fosfatídico
PAP Fosfatasa del ácido fosfatídico
PC Fosfatidilcolina
PC-PLC Fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina
PDBu Forbol-12, 13-dibutirato
PE Fosfatidiletanolamina
PI Fosfatidilinositol
PI(4)P Fosfatidilinositol-4-fosfato
PI(4,5)P₂ Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato fosfato
PI-PLC Fosfolipasa C específica para fosfoinosítidos
PIPT Proteína transferidora de fosfatidilcolina
PKC Proteína quinasa C
PKD Proteína quinasa D
PLD Fosfolipasa D
PMA Forbol-12-miristato-13-acetato
PS Fosfatidilserina

RE Retículo endoplasmático

S1P Esfingosina-1-fosfato

Ser Serina

shRNA ARN interferencia *short hairpin*

SM Esfingomielina

SMS Esfingomielina Sintasa

STx Toxina Shiga

TGN Red *trans*-Golgi

ts045-VSV Mutante termosensible del virus de la estomatitis vesicular

VSV-G Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular

VTCs Estructuras membranosa túbulovesiculares

YFP Proteína fluorescente amarilla