



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Papel del Ácido Fosfatídico generado por la Enzima
Fosfolipasa D2 en la Formación de Túbulos del
Complejo de Golgi

D^a. Narcisa Martínez Martínez

2015



D. **José Ángel Martínez Menárguez** Catedrático de Universidad del Área de Biología Celular en el departamento de Biología Celular e Histología y Dña. **Emma Martínez Alonso** Profesora Contratada Doctor de Universidad del Área de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Papel del ácido fosfatídico generado por la enzima fosfolipasa D2 en la formación de túbulos del complejo de Golgi”, realizada por Dña. **Narcisa Martínez Martínez**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el departamento de Biología Celular e Histología, y que presenta para la obtención del grado de Doctor con mención de doctor internacional por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de enero de 2015

José Ángel Martínez Menárguez

Emma Martínez Alonso

A mis padres, Miguel y Antonia

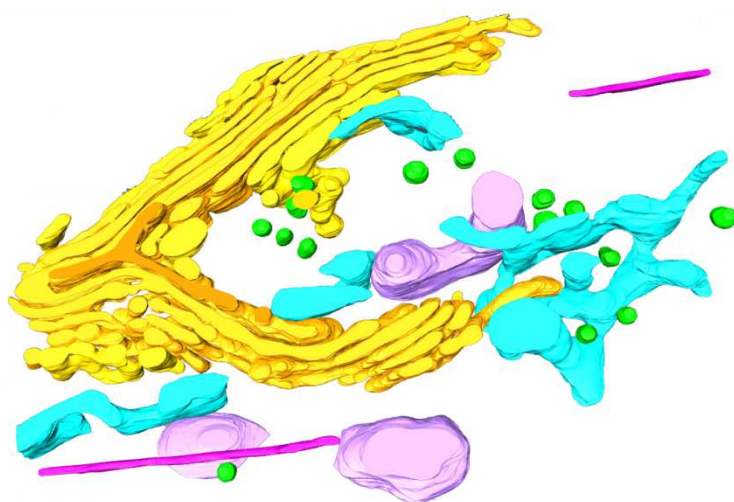
ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
ABSTRACT	5
I INTRODUCCIÓN	13
II OBJETIVOS	19
III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	23
1 Transporte intracelular	25
2 Compartimentos de la vía secretora	25
2.1 Retículo Endoplasmático	26
2.2 Compartimento intermedio	27
2.3 El complejo de Golgi	28
2.4 Red del trans-Golgi	29
3 Intermediarios de transporte	30
3.1 Vesículas	30
3.2 Túbulos	34
4 Transporte en la vía secretora	38
4. 1 Transporte entre el RE y el complejo de Golgi	38
4.2 Transporte intra-Golgi	41
4.3 Transporte post-Golgi	49
5 Maquinaria molecular responsable de la formación de túbulos	51
6 Papel de los lípidos en la estructura y dinámica de las membranas	56
7 Conceptos de curvatura y mecanismos de deformación de membrana	59
8 Glicerolípidos y enzimas modificadoras de lípidos	62
8.1 Diacilglicerol	63
8.2 Ácido lisofosfatídico	63
8.3 Ácido fosfatídico	64
8.4 Fosfolipasa D	66

IV MATERIAL Y MÉTODOS	71
1 Reactivos	73
2 Anticuerpos	74
3 Inhibidores	76
4 Plásmidos y siRNA	77
5 Cultivo celular y tratamientos	78
5.1 Cultivo celular	78
5.2 Inducción de túbulos derivados del complejo de Golgi	78
5.3 Tratamientos farmacológicos	79
5.3.1 Tratamientos farmacológicos sobre células con tubulación inducida	79
5.3.2 Inhibición específica de las isoformas de la enzima PLD	81
6 Técnicas Morfológicas	81
6.1 Inmunofluorescencia	81
6.2 Cuantificación de complejos de Golgi tubulados y número de túbulos	82
6.3. Microscopía electrónica convencional	82
6.4 Crioultramicroscopía	83
7 Técnicas bioquímicas y de biología molecular	85
7.1 Transformación y amplificación de células competentes	85
7.2 Purificación de ADN plasmídico	85
7.3 Transfección transitoria de vectores de expresión	86
7.4 Transfección transitoria de ARN de interferencia de pequeño tamaño	87
7.5 Extracción, purificación y cuantificación de ARN	88
7.6 Síntesis de ADNc	88
7.7 PCR cuantitativa o RT-PCR a tiempo real	89
7.8 Inmunodetección de proteínas por Western blotting	90
V RESULTADOS	93
1 Análisis del papel de glicerolípidos en células con tubulación inducida	95
1.1 Tubulación inducida a baja temperatura.	95
1.1.1 Efecto de propranolol sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi en condiciones de baja temperatura.	97
1.1.2 Efecto de 1-butanol sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi en condiciones de baja temperatura.	99

1.1.3 Efecto de CI976 sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi en condiciones de baja temperatura.	101
1.1.4 Efecto de R59022 sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi en condiciones de baja temperatura.	103
1.2 Tubulación inducida por brefeldina A.	105
1.2.1 Efecto de propranolol sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos por brefeldina A.	106
1.2.2 Efecto de 1-butanol sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos por brefeldina A.	108
2 Papel de las isoformas de PLD en la morfología del complejo de Golgi.	110
2.1 Distribución de las isoformas PLD1 y PLD2 en células con tubulación inducida a 15°C y BFA.	110
2.2 Efecto del silenciamiento génico de PLD2 en células con tubulación inducida a 15°C y BFA.	115
3 Papel de PLD2 en el complejo de Golgi en condiciones fisiológicas.	121
3.1 Localización ultraestructural de PLD2.	121
3.2 Efecto del silenciamiento de PLD2.	123
3.3 Efecto de inhibidores específicos de las isoformas PLD1 y PLD2.	128
3.4 Análisis morfológico del complejo de Golgi en células transfectadas con PLD2-GFP.	130
4 Distribución de proteínas relacionadas con la formación de las cubiertas COPI en células con tubulación inducida.	133
5 Caracterización del papel de glicerolípidos en el reclutamiento de ArfGAP1 en el complejo de Golgi.	136
VI DISCUSIÓN	141
VII CONCLUSIONS	155
VIII BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXO	185
AGRADECIMIENTOS	201

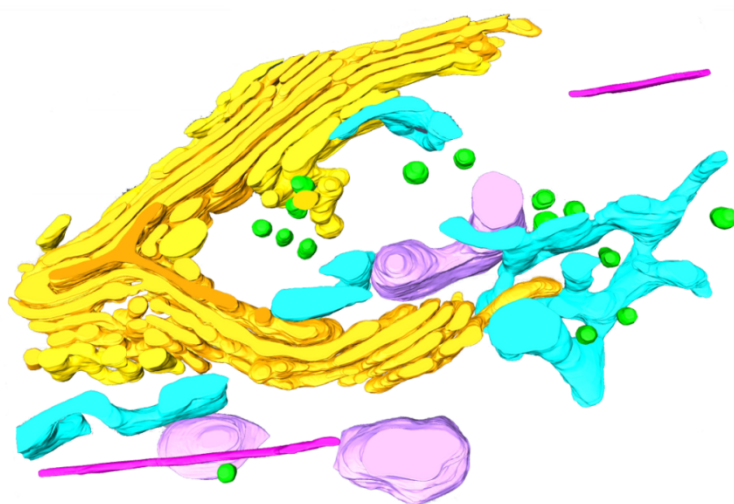
ABREVIATURAS



ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
ALPS	Sensor de empaquetamiento de lípidos de ArfGAP1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BFA	Brefeldina A
CGN	red del cis-Golgi
COPI	Coatómero de tipo I
COPII	Coatómero de tipo II
DAG	Diacilglicerol
DGK	Diacilglicerol cinasa
ER	Retículo endoplasmático
ERES	Sitios de salida del retículo endoplasmático
ERGIC	Compartimento intermedio
GAP	Proteína activadora de GTPasas
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
IT	Intermediario de transporte
KDEL r	Receptor de la secuencia KDEL (lys-asp-glu-leu)
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPAAT	Aciltransferasa de ácido lisofosfatídico
LPAT	Transferasa de ácido lisofosfatídico
LPP	Fosfatasa de lípidos fosfatos
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Fosfatasa del ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PC-PLD	Fosfolipasa D específica de fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PH	Dominio PH (<i>Pleckstrin homology domain</i>)
PI	Fosfatidilinositol
PIP	Fosfatidilinositol fosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLD	Fosfolipasa D
PS	Fosfatidilserina

PX	Dominio PX (<i>Phox homology domain</i>)
RE	Retículo endoplásmico
RT-PCR	PCR acoplada a la reacción de la transcriptasa inversa
siRNA	ARN de interferencia de pequeño tamaño
SNARE	Receptor de las proteínas SNAP
T2	N-acetil-galactosaminiltransferasa T2
TGN	Red del <i>trans</i> -Golgi

ABSTRACT



Membrane flux into, through and out of the Golgi complex is mediated by vesicular and tubular transport intermediates. Much information is available on the composition and molecular machinery involved in the formation and fusion of COPI-, COPII- and clathrin-coated vesicles with the corresponding target membranes. It is known that coat complexes, tethering factors and Rab and SNARE proteins play a key role in these processes. More recently, lipids and lipid-modifying enzymes have been added to this list of important regulatory molecules that are necessary for the deformation of the membrane during budding and fission. In contrast, despite the fact that they are a common feature of the secretory (and endocytic) pathway, little is known about the mechanisms regulating tubular transport intermediates.

The first indications about the molecular machinery involved in the formation of tubules came from studies on brefeldin A (BFA), a fungal drug that induces extensive tubulation of the Golgi complex followed by fusion of this organelle into the endoplasmic reticulum. BFA-induced Golgi tubules may be representative of the tubules that mediate COPI-independent Golgi-to-ER transport. Another experimental condition that induces extensive Golgi tubulation is low temperature (15°C). In contrast to BFA-induced tubules, such tubules are enriched in some molecules (Golgi resident enzymes, specific Rabs and SNAREs involved in intra-Golgi transport) but not others (anterograde and retrograde cargo, matrix proteins). Thus, low temperature-induced tubules may represent transport carriers operating in intra-Golgi transport, more specifically in the recycling of resident enzymes. As described BFA-induced tubules, the formation of low temperature-induced tubules may also depend on COPI machinery.

Tubule formation needs the deformation and further elongation of Golgi membranes, processes which may require a specific lipid composition. There is growing evidence that glycerolipids, such as lysophosphatidic acid (LPA), phosphatidic acid (PA) and diacylglycerol (DAG) play an important role in tubule formation by mediating protein recruitment to membranes, by modulating protein functions or by directly affecting membrane curvature. Hence, the enzymes associated with the metabolism of these lipids, such as phospholipases, acyltransferases and lipid kinases, probably play a key role in tubule formation. The coordinate action of lipid modifying enzymes in the biogenesis of vesicles and tubules has also been demonstrated. The association with membranes of components of the COPI machinery depends on a specific lipid composition.

The aim of the present study was to deepen our understanding of the molecular mechanisms that participate in tubular formation. More specifically, we analysed the role of glycerolipids and related enzymatic activities in the generation and/or maintenance of Golgi tubules as well as their relationship with the COPI machinery.

To ascertain the role of lipid and lipid-modifying enzymes in Golgi tubule formation, specific inhibitors of enzymes involved in the metabolism of membrane lipids were used. The reagents 1-butanol, CI976 and R59022 block the formation of PA, whereas propranolol reduces the levels of DAG and increases PA. As the initial model, we used HeLa cells cultured at 15°C for 45 minutes in the presence of inhibitor with or without pre-treatment with the same inhibitor for 15 min at 37°C and then immunolabelled for N-acetyl-galactosaminyltransferase T2 as Golgi marker. When cells incubated at low temperature were treated with the pharmacological agents CI976, R59022 and 1-butanol, the number of cells with tubules significantly decreased with respect to control conditions. On the contrary, when cells were cultured with propranolol, this percentage increased. These results show that PA plays a key role in the synthesis and maintenance of the tubular transport carriers induced by low temperature. The highest inhibition of tubular formation was obtained with 1-butanol, which block the action of the enzyme phospholipase D (PLD), suggesting that this pathway is the most important for the formation of this kind of tubule. Previous studies using propranolol showed that DAG is necessary for the formation of BFA-induced Golgi tubules. In agreement with these studies, we found that propranolol inhibited the formation of these tubules. In contrast, 1-butanol increased the number of BFA-induced tubules. These findings confirm that Golgi tubules induced by low temperature and BFA require different lipidic species.

In mammals there are two isoforms of PLD, called PLD1 and PLD2. It may be possible that one or both of these isoforms are involved in the formation of the PA necessary for Golgi tubular formation at low temperature. To explore this hypothesis, we first analysed whether low temperature affects the distribution of these isoforms. It was found that low temperature did not change PLD1 distribution, whereas PLD2 concentrated in the perinuclear area. This result pointed to PLD2 as the isoform involved in the formation of low temperature-induced Golgi tubules, and to confirm this role, we analysed the formation of Golgi tubules in depleted cells by using small interfering RNA (siRNA). We found that the percentage of cells with Golgi tubules significantly decreased in depleted cells cultured at 15°C for 45 min or 3h.

Low temperature experiments support a role for PLD2 in the formation of Golgi tubules. To confirm this, we explored the role of this enzyme under physiological conditions (37°C). First, we analysed how PLD2 depletion affected Golgi morphology. By using immunofluorescence analysis we found that PLD2 depletion induced the formation of tubules containing the Golgi matrix proteins GM130 and GRASP65 but did not contain neither Golgi resident enzymes nor other Golgi markers. To analyze in more detail the morphological changes that occur in the Golgi complex after siRNA treatments, the cells were examined by transmission electron microscopy. PLD2-depleted cells exhibited a typical well organized Golgi apparatus composed of flattened cisternae and some tubules were observed emerging from the lateral rims and cis cisternae. To confirm that tubulation in depleted cells was specifically related with the enzymatic activity of PLD2, we used isoform-specific inhibitors for PLD2 and PLD1. Once again, we observed GM130- and GRASP65-immunoreactive tubules. Conversely, PLD1 inhibitor did not induce tubulation. We also analysed how the overexpression of PLD2 might affect Golgi morphology. The Golgi complex of overexpressing cells was apparently lost when analysed by immunofluorescence. Electron microscopical analysis of PLD2-overexpressed cells showed a disorganised Golgi complex, where most stacks were replaced by tubular networks, supporting that this enzyme regulates Golgi morphology. Finally, we assessed the localization of endogenous PLD2 within the Golgi membranes by cryoimmunoelectron microscopy. Quantitative analysis showed that 61% of the enzyme was located in Golgi cisternae, both in central regions of stacks and in the lateral rims, from which the tubules grow. On the other hand, 39% of PLD2 was observed in peri-Golgi tubule-vesicular membranes. Most of the immunolabelled vesicles were uncoated (80% of the immunolabelled vesicles) although some showed clathrin (12%) and COPI (7%) coats. These results support the idea that PLD2 is an important player in Golgi tubulation.

Many data support that COPI coats are involved in the formation of tubular carriers. To investigate the involvement of COPI coats in Golgi tubulation we analysed the effect of the incubation at 15°C on the distribution of the COPI components. The main finding was that ArfGAP1 was recruited into the Golgi region in HeLa cells cultured at low temperature, as did PLD2. This result suggests that ArfGAP1 also plays a role in the formation of low temperature-induced Golgi tubules. Previous studies showed that the association of a GTP-tagged form of ArfGAP1 with the Golgi complex depends on DAG. We wanted to know whether there is a relation between the PA generated by PLD2 and the association of ArfGAP1 with Golgi membranes. For this purpose, the way in which lipid inhibitors affected ArfGAP1 distribution was analysed.

Of the inhibitors used, only propranolol and the PLD2-specific inhibitor VU0364739 induced ArfGAP1 detachment from Golgi membranes. This suggests that ArfGAP1 interacts with DAG and/or the PA generated by PLD2 during the formation of different types of Golgi tubules.

In conclusion, we show that this enzyme and its product, PA, are key regulators in Golgi tubule formation. We first demonstrate that low temperature-induced tubules, in contrast to their BFA-induced counterparts, require PA. The data obtained with different inhibitors suggest that all routes that regulate the amount of this lipid contribute to tubule formation. PA can be generated by the action of LPA acyltransferase, DAG kinase and PLD. In our low temperature experiments, the maximum inhibition was obtained with 1-butanol, therefore we focused on PA generation from phosphatidylcholine catalysed by PLD. It should be mentioned that mammalian PLD maintains high enzymatic activity at temperatures around 15°C. PLD is associated with important cell signalling pathways that regulate cell survival, proliferation, migration, cytoskeletal organization, endocytosis and exocytosis, differentiation and defence. The altered expression of PLD has been associated with several diseases, including cancer and neurodegeneration. The product of the enzyme, PA, is an anionic phospholipid which is able to recruit and activate positively charged proteins. In addition, it can be converted into other signalling molecules such as LPA and DAG. So far, PLD has been found to interact with 58 proteins and 5 lipids. PLD1 and PLD2 are widely expressed and share 50% homology.

Low temperatures induce a redistribution of PLD2 isoform from cytoplasm to the Golgi area. The fact that low temperatures induce movement of peripheral ERGIC elements to the Golgi area may explain the increased labelling observed at the perinuclear area. We found some PLD2-immunoreactivity in ERGIC elements. Furthermore, our EM images, under physiological conditions, showed PLD2-immunolabelled peri-Golgi tubule-vesicular elements, which may correspond to these intermediates. It might be also possible that low temperature affects the recycling of the enzyme through ERGIC/Golgi membranes, so that, PLD2 could not be released into cytosol remaining in the Golgi membranes. Conversely, the increase in perinuclear labelling might correspond to a pool of cytosolic enzyme recruited to the Golgi membranes. PLD2 (and PLD1) have PX and PH domains with an affinity for phosphoinositides, but low affinity for Golgi-associated phosphoinositides. Its specific binding to membranes and the intracellular location of PLD2 also depends on palmitoylation in the PH domain. In fact, the exact distribution of the isoforms is not well known, but PLD2 seems to be more membrane-bound, including lipid rafts.

The role of PLD2 in tubule formation was also confirmed under physiological conditions. The endogenous enzyme is located in the lateral rims of the Golgi apparatus from which the tubules grow. Second and importantly, depletion experiments and the use of specific inhibitors confirmed that this enzyme is involved in the formation of a specific set of Golgi tubules containing matrix proteins. Finally, over-expression of a GFP-tagged form of enzyme induced the replacement of stacked cisternae by tubular networks. The final conclusion is that this isoform is a key regulator of Golgi morphology and tubule formation. Activation or inhibition of the enzyme will induce the formation of specific tubules containing resident enzymes or matrix proteins, respectively.

Apart from their specific lipid composition, coat complexes may be involved in tubule formation. We found that low temperature and BFA affect COPI coat components and regulatory molecules very differently. Although low temperature also induces the detachment of COPI coat proteins, the process is very slow compared with BFA. Moreover, Arf1 stimulates PLD activity, although to a greater extent in the case of PLD1 isoform. The most dramatic and interesting difference between BFA and low temperature treatments is found in the case of ArfGAP1, which is recruited in the Golgi area at 15°C but detached from these membranes soon after the addition of the fungal drug. Although ArfGAP1 binds highly curved membranes, this is not the case with BFA-treated cells. The specific recruitment of ArfGAP1 into the Golgi area at low temperature suggests that this phenomenon might be related to tubule formation. The role of ArfGAP1 is controversial. Classically, it was considered that the hydrolysis of GTP in GTP-bound Arf triggers the loss of the COPI coats. Conversely, it might be involved in coat polymerization, promoting vesicle formation. Its role in cargo sorting is also under discussion. PA interacts with members of the GAP family, including AGAP1 and Rho-GAP, although, to the best of our knowledge, such interaction has not been described for ArfGAP1.

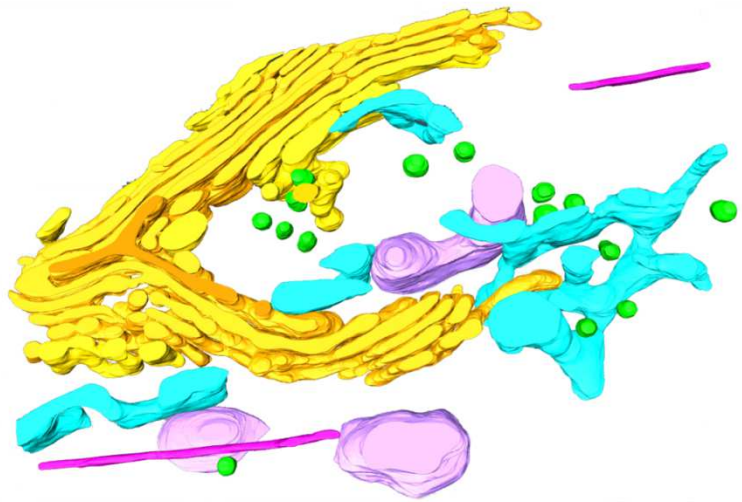
Importantly, experiments based on specific lipid inhibitors suggest that PA specifically generated by PLD2 is necessary for the recruitment of ArfGAP1 to membranes. ArfGAP1 binds membranes containing lipids with spontaneous negative curvature because of its ability to sense packing defects of the membrane, for instance, when conical shaped lipids are incorporated into membranes made of cylindrical lipids. DAG and PA have conical forms and induce spontaneous negative curvature. DAG also seems to be necessary for this recruitment. It is possible that DAG and PA are needed simultaneously for this process, as described previously for other proteins. It is interesting that PLD1-generated PA is not involved in the binding of ArfGAP1 to Golgi

membranes, as was demonstrated by the use of a specific inhibitor. In vitro analysis showed that both isoforms elaborate the same PA species. However, this may not be the case in vivo due to the specific lipidic environment of cellular membranes.

The relationship between COPI coats and lipid composition during transport carrier formation has recently been demonstrated. The coordinated action of LPA acyltransferase type γ and cytosolic phospholipase A2 type α acting on COPI coats facilitates the formation of vesicles or tubules, respectively. PA generated by PLD2 has been seen to be involved in the late steps of COPI-coated vesicle formation, more specifically in the scission of budding vesicles. PLD2 inhibition affects COPI retrograde transport but not anterograde intra-Golgi transport. Our EM images support that PLD2 is associated with COPI coats, confirming previous results on the role of this isoform in retrograde transport. Our depletion studies support a role for this enzyme in the fission of a specific set of transport carriers. Conversely, the different results obtained with or without pre-treatment suggest that PA is important in an early step of tubule formation. Thus, as described for DAG, this lipid may be involved in different steps of carrier biogenesis.

Our results suggest that Golgi membranes are able to generate different types of tubules of varied composition, as it has been postulated for COPI vesicles. Our findings also reveal for the first time that PA generated via PLD2 activity was important for the formation of Golgi tubules. Lipid-generating enzymes such as LPA acyltransferase, phospholipase A, DAG kinase and LPP are key regulators of this process. PLD2 must be included in this list. When PLD2 enzymatic activity is enhanced or the enzyme is recruited to certain Golgi areas, the PA generated is able to bend the membrane and to recruit ArfGAP1, which might be necessary for the recruitment of resident enzymes. Conversely, when its activity is inhibited, there is an accumulation of DAG or LPA, which might generate another type of tubule containing matrix proteins. It can be speculated that some Golgi tubules may be involved in retrograde intra-Golgi traffic, whereas others keep the architecture of the Golgi ribbon or anterograde intra-Golgi transport. Thus, new experiments are needed to shed light on the fine tuning of tubular regulation.

I INTRODUCCIÓN



El aparato o complejo de Golgi tiene un papel central en la ruta secretora, dado que recibe las proteínas y lípidos recién sintetizados en el retículo endoplasmático (RE) y los envía a su destino final en la célula. Los intermediarios de transporte (ITs) son los responsables del flujo de proteínas y lípidos hacia y desde el complejo de Golgi. El flujo de membranas a través del complejo de Golgi está mediado por ITs de estructura vesicular, tubular y otras morfologías heterogéneas. Hay mucha información disponible sobre la composición y la maquinaria molecular implicada en la formación y la fusión con la membrana diana correspondiente de las vesículas revestidas tipo COPI, COPII y clatrina. Por ejemplo, se sabe que complejos multiproteicos de cubierta, factores de aproximación y proteínas Rab y SNARE juegan un papel clave en estos procesos (Bonifacino y Glick, 2004; Klumperman, 2011; Martínez-Menárguez, 2013). Más recientemente, los lípidos y enzimas modificadores de lípidos se han añadido a esta lista de moléculas reguladoras necesarias para la deformación de la membrana durante los procesos de gemación y fisión. Sin embargo, a pesar de ser elementos comunes de la vía secretora (y endocítica), se conoce poco sobre los mecanismos que regulan la formación de los ITs tubulares (Bonifacino y Glick, 2004; Klumperman, 2011; Martínez-Menárguez, 2013).

Los primeros estudios sobre la maquinaria molecular implicada en la formación de túbulos se realizaron con la toxina fúngica brefeldina A (BFA), que induce una extensa tubulación de las membranas del complejo de Golgi, seguida de la fusión de éstas con las membranas del RE. La principal diana de BFA es GBF1, un factor intercambiador de GTP (*GTP exchange factor*, GEF) de Arf1 (García-Mata et al., 2003). La interacción BFA-GBF1 impide la activación de la Arf1 y la subsecuente formación de las vesículas COPI. Los túbulos inducidos por BFA podrían representar a los ITs que median el transporte retrógrado Golgi-RE independiente de COPI.

Otra condición experimental que induce la formación de túbulos es la incubación a baja temperatura (15°C). Al contrario que los túbulos inducidos por BFA, estos túbulos están enriquecidos en algunas moléculas (enzimas residentes del complejo de Golgi) pero no otras (carga retrógrado y anterógrado o proteínas de la matriz del complejo de Golgi) (Martínez-Alonso et al., 2005). Posteriores estudios han demostrado la presencia en los túbulos inducidos a baja temperatura de proteínas Rab y SNARE específicas del transporte intra-Golgi, pero no del transporte RE-Golgi (Martínez-Alonso et al., 2007). Así, los túbulos inducidos a baja temperatura podrían representar a los ITs que operan en el tráfico intra-Golgi, concretamente en el reciclado de las enzimas residentes del complejo de Golgi (Martínez-Alonso et al., 2013). Al igual que se ha descrito para los túbulos inducidos por BFA, la formación de

los túbulos inducidos a baja temperatura podrían también ser dependiente de la maquinaria COPI.

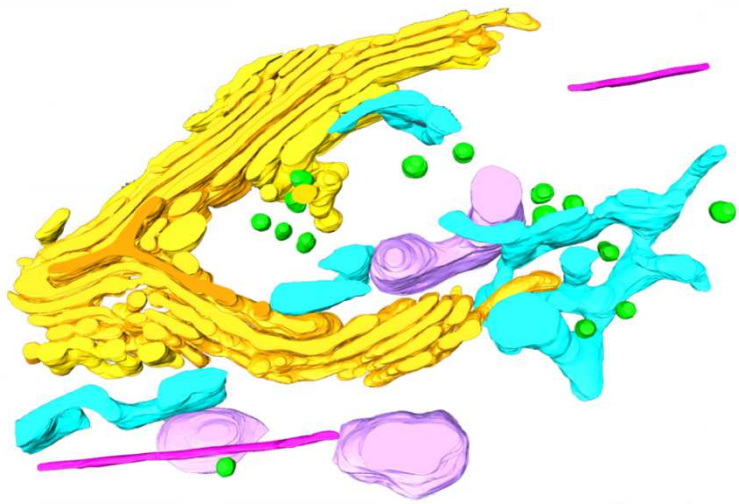
Para la formación de un túbulo es necesaria la deformación y posterior elongación de la membrana del complejo de Golgi. Este proceso puede requerir una composición específica de lípidos de membrana (Polishchuk et al., 2009). Glicerolípidos como ácido lisofosfatídico (LPA), ácido fosfatídico (PA) o dialciliglicerol (DAG) pueden tener un papel importante en la formación de túbulos mediante el reclutamiento de proteínas en la membrana, modulando la función de proteínas o afectando directamente a la curvatura de la membrana (Zimmerberg y Kozlov, 2006; Haucke y Di Paolo, 2007; Graham y Kozlov, 2010). De ahí que enzimas que intervienen en el metabolismo de estos lípidos, como fosfolipasas, aciltransferasas y cinasas, puedan jugar un papel importante en la formación de túbulos.

Se sabe, por ejemplo, que el LPA generado por la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) está involucrado en el transporte retrogrado desde el complejo de Golgi hacia el RE mediado por túbulos (de Figueiredo et al., 2000; Brown et al., 2003). Estudios realizados con el alcohol propranolol han indicado que DAG está implicado en la formación y/o fisión de vesículas y túbulos (Fernández-Ulibarri et al., 2007; Asp y Kartberg, 2009). Además, estudios recientes han indicado que la fosfatasa de lípidos fosfato 3 (LPP3), la cual genera DAG a partir de PA, está también involucrada en el transporte retrógrado mediado por túbulos (Gutiérrez-Martínez et al., 2013). El PA generado por la enzima fosfolipasa D2 (PLD2), en cooperación con la proteína BARS, está involucrada en la fisión de los ITs del complejo de Golgi (Yang et al., 2011). Se ha demostrado la acción coordinada de las enzimas modificadoras de lípidos LPAAT γ (aciltransferasa del ácido lisofosfatídico γ) y cPLA2 α (fosfolipasa A2 α citosólica) en la biogénesis de vesículas y túbulos (Yang et al., 2011). Curiosamente, estas enzimas promueven o inhiben la fisión de las vesículas COPI, respectivamente. La asociación de los componentes de la maquinaria COPI con las membranas depende de una composición específica de lípidos, como es el caso de Arf1 (Krauss et al. 2008) y ArfGAP1 (Antonny et al., 1997; Bigay et al., 2003; Fernández-Ulibarri et al., 2007).

El objetivo del presente estudio fue ampliar el conocimiento sobre la maquinaria molecular involucrada en la formación de túbulos. Concretamente, analizamos el papel de glicerolípidos y de enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico en la generación y/o mantenimiento de túbulos derivados del complejo de Golgi, además de su relación con la maquinaria COPI. Nuestros resultados mostraron por primera vez que el PA generado por la vía PLD2 juega un papel importante en la formación de

túbulos derivados del complejo de Golgi y que la actividad enzimática de PLD2 está implicada en el reclutamiento de ArfGAP1 a las membranas del complejo de Golgi.

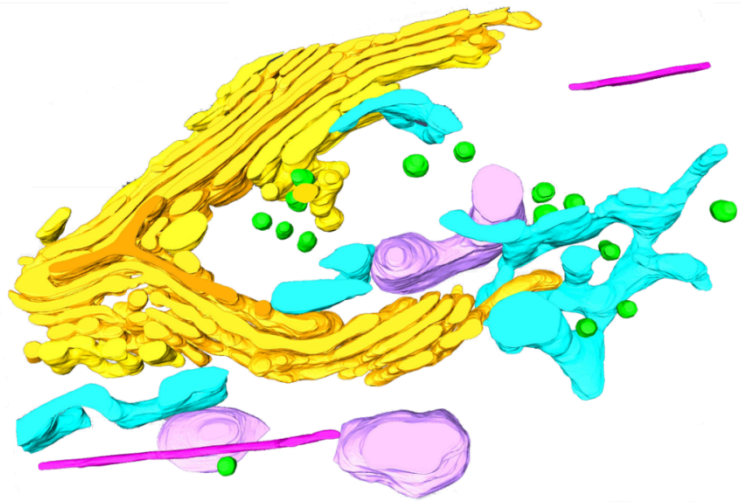
II OBJETIVOS



De acuerdo con lo expuesto anteriormente, los túbulos son ITs con funciones específicas dentro de la vía secretora y, posiblemente, con mecanismos de formación y regulación diferentes según el proceso de transporte en el que estén implicados. Según nuestra hipótesis de trabajo los lípidos de membrana junto con proteínas específicas juegan un papel decisivo en la formación y regulación de los ITs de naturaleza tubular. El objetivo general de esta tesis doctoral es el de avanzar en el conocimiento sobre el papel de los túbulos como ITs en la vía secretora temprana e identificar mecanismos moleculares y de regulación involucrados en el proceso de tubulación, específicamente el papel de glicerolípidos y enzimas modificadoras de lípidos y de las cubiertas tipo COPI. Por ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Comparar el papel de diferentes glicerolípidos en el proceso de formación de ITs tubulares inducidos a baja temperatura (15°C) y con BFA.
2. Identificar las enzimas modificadoras de lípidos involucradas en la formación y regulación de los túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos a baja temperatura.
3. Analizar mediante técnicas morfológicas, de sobreexpresión y silenciamiento génico las posibles enzimas halladas implicadas en la formación de túbulos, para dilucidar su función en la organización del complejo de Golgi.
4. Estudiar la relación de la maquinaria molecular COPI en los procesos de formación y/o regulación de las estructuras tubulares, así como su participación en los diferentes tipos de túbulos.
5. Analizar el papel de diferentes glicerolípidos y enzimas modificadoras de lípidos sobre la maquinaria molecular COPI.

III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



1 Transporte intracelular

La célula eucariota ha desarrollado a lo largo de la evolución compartimentos intracelulares que organizan y optimizan su metabolismo. Estos compartimentos u orgánulos están rodeados por membranas y cada uno de ellos tiene su propia composición, estructura y función. Sin embargo, estos elementos no están completamente aislados porque entre ellos se produce un flujo continuo de componentes. Las vías de transporte endocítica y secretora permiten la entrada y salida de moléculas necesarias para mantener la integridad y la función celular. Estas vías de transporte se encargan de llevar lo que se conoce como carga y que comprende (glico) proteínas, (glico) lípidos y moléculas inorgánicas, de un compartimento a otro. El transporte se realiza a través de ITs, que pueden tener forma vesicular, tubular o túbulovesicular. Los ITs se mueven mediante proteínas motoras utilizando los elementos del citoesqueleto como soporte estructural para su desplazamiento.

El transporte de proteínas y lípidos asociado a membranas a través de las vías secretora y endocítica es un proceso complejo que se divide en múltiples pasos, como son la generación de los ITs con una carga definida, el movimiento de éstos entre los distintos compartimentos y la fusión específica de estos transportadores con su correspondiente membrana diana. Todos estos variados procesos requieren una compleja interacción entre proteínas y lípidos.

2 Compartimentos de la vía secretora

El transporte de las proteínas y lípidos recién sintetizados desde su lugar de origen, el RE, hacia el medio extracelular, la membrana plasmática u otros orgánulos (complejo de Golgi, endosomas, lisosomas) constituye la vía secretora o exocítica (Palade, 1975) (Figura 1). El tráfico de membranas dentro de este sistema fluye a través de rutas altamente organizadas de naturaleza bidireccional. Llamamos transporte anterógrado al que va desde el origen de síntesis (RE) hasta su destino final (complejo de Golgi, membrana plasmática, etc.) y transporte retrógrado al que va en sentido contrario, de manera que devuelve al compartimento de origen determinadas proteínas y lípidos.

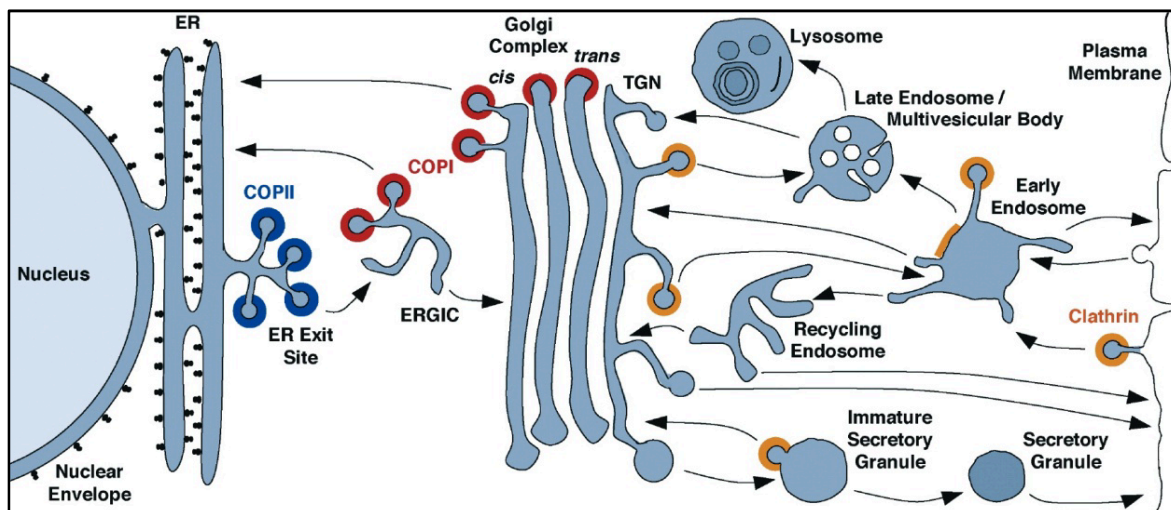


Figura 1. Esquema de las vías de transporte intracelular. Este esquema representa los compartimentos de las vías secretora y endocítica. La dirección de los diferentes pasos del transporte se indica mediante flechas. Los colores indican la localización de las cubiertas tipo COPII (azul), COPI (rojo), y clatrina (naranja). (Bonifacino y Glick, 2004).

2.1 Retículo endoplasmático

El RE está formado por un conjunto de cisternas y membranas tubulares conectadas entre sí y con la envoltura nuclear, distribuidas por todo el citoplasma (English y Voeltz, 2013). Las membranas del RE se dividen en rugosas (retículo endoplasmático rugoso) y lisas (retículo endoplasmático liso) según tengan o no ribosomas asociados a su cara citoplasmática (Palade, 1956).

El RE es el punto de partida de la vía secretora. Las proteínas que son sintetizadas en los ribosomas son translocadas hasta el lumen del mismo. Allí, con la ayuda de diversas proteínas como las chaperonas, se producirá su correcto plegamiento y estarán dispuestas para ser transportadas hasta su destino. Además, el RE está implicado en diversas funciones como la N-glicosilación, el control de la calidad del plegamiento de proteínas, el metabolismo de lípidos, la detoxificación, la regulación del gradiente del calcio y el transporte de membranas.

Tras el correcto plegamiento y oligomerización de las proteínas, aquellas que van a seguir la vía secretora son separadas selectivamente de las proteínas residentes del RE. Esto ocurre en sitios especializados del RE desprovistos de ribosomas y con evaginaciones llamados elementos transicionales o sitios de salida del RE (ERES, de sus siglas en inglés *ER exit sites*) (Palade, 1956). Las evaginaciones de los ERES son dominios especializados en los que se produce el ensamblaje de las proteínas de cubierta tipo COPII (Schekman y Orci, 1996). Dan lugar así a ITs, bien de naturaleza

vesicular (Bannykh et al., 1996; Orci et al., 1991; Pagano et al., 1999) o tubular (Clermont et al., 1994; Krijnse-Locker et al., 1994; Mironov et al., 2003).

2.2 Compartimento intermedio

El compartimento intermedio entre el RE y el complejo de Golgi o ERGIC (de sus siglas en inglés *ER-Golgi Intermediate Compartment*) es un sistema túbulovesicular de membranas situado entre el RE y el complejo de Golgi. Este compartimiento se identificó inicialmente en células incubadas a baja temperatura (15°C), condición experimental que induce la acumulación de la carga en estos elementos (Saraste y Kuismanen, 1984; Schweizer et al., 1990). Este compartimento está formado por estructuras túbulovesiculares y se localiza mayoritariamente adyacente a la cara *cis* del complejo de Golgi pero también en la periferia de la célula. Se forma mediante la fusión homotípica de las membranas provenientes de los ERES (Xu y Hay, 2004). El compartimento intermedio tiene dos funciones principales: por un lado, concentra la carga que sale del RE y por otro lado, funciona como un sitio de clasificación de la carga para el transporte anterógrado o bien retrogrado de vuelta al RE (Aridor et al., 1995; Martínez-Menárguez et al., 1999). Se han descrito otras funciones como son la degradación de proteínas, glicosilación y control de calidad (Hauri y Schweizer, 1992). Algunos autores han propuesto que el ERGIC es un vehículo de transporte dinámico y transitorio hasta el complejo de Golgi y no un compartimento estable. Así, este compartimento se movería en bloque desde los ERES hasta el complejo de Golgi utilizando para ello la red de microtúbulos. Se ha propuesto que es un elemento activo, en el cual se producen múltiples eventos de clasificación y transporte de la carga anterógrada y retrógrada (Ben-Tekaya et al., 2005). No obstante, el proceso por el cual surge y tiene lugar su transporte y fusión con el complejo de Golgi no está claro todavía. Desde el compartimento intermedio se produce el transporte retrógrado de proteínas residentes del RE y de proteínas que se encuentran ciclando mediante la formación de vesículas revestidas tipo COPI (Tang et al., 1995; Klumperman et al., 1998), así como, el transporte anterógrado de la carga hacia la cisterna *cis* del complejo de Golgi (Warren y Mellman, 1999). Se ha descrito que ambos movimientos anterógrado y retrógrado en el compartimento intermedio son dependientes de microtúbulos (Presley et al., 1997; Scales et al., 1997; Ben-Tekaya et al., 2005). Contrariamente, estudios *in vivo* han apuntado que el ERGIC podría ser un compartimento estable e inmóvil desde donde se originarían ITs de pequeño tamaño (Ben-Tekaya et al., 2005).

2.3 El complejo de Golgi

La característica organización del complejo de Golgi es fácilmente reconocible. Su estructura básica consiste en un apilamiento de cisternas aplanadas llamado dictiosoma. El número de cisternas varía entre diferentes tipos celulares y especies, encontrándose normalmente en un rango entre 3-8 cisternas (Farquhar, 1985). En la mayoría de los organismos, el complejo de Golgi está formado por varios dictiosomas conectados entre sí, dando lugar a lo que se conoce como la cinta del Golgi. Se localiza en una región del citoplasma libre de ribosomas, conocida como matriz del complejo del Golgi, junto al centrosoma, ya que interacciona con los microtúbulos y las proteínas asociados a estos (Ríos y Bornens, 2003). Utilizando técnicas de inmunofluorescencia aparece generalmente en la zona perinuclear como una estructura única e individual cuya morfología depende del tipo celular.

El complejo de Golgi presenta una gran complejidad funcional que se ve reflejada a nivel morfológico y molecular. El contenido de enzimas residentes del complejo de Golgi es heterogéneo en cada una de las cisternas. Muchas de estas enzimas, glicosidasas y glicosiltransferasas residentes del complejo de Golgi, están implicadas en el procesamiento de los residuos N-glicosídicos (unidos a asparragina) y O-glicosídicos (unidos a serina o treonina) de glicoproteínas y en la glicosilación de lípidos. Debido a su distribución polarizada estas enzimas son a menudo utilizadas como marcadores de cada uno de los subcompartimentos del complejo de Golgi. Así, se puede distinguir una cara *cis*, cuyas cisternas reciben el aporte de la carga procedente del RE; una cara *trans*, en la que tiene lugar la salida de la carga procesada y, un conjunto de cisternas intermedias, muy compactadas, que constituyen la parte media del complejo de Golgi. Cada apilamiento de cisternas se encuentra flanqueado en sus extremos por unas redes de estructuras túbulovesiculares altamente dinámicas que actúan como una interfase entre el complejo de Golgi y otros compartimentos de la vía secretora. Así, se describe una red del *cis*-Golgi (CGN, *cis-Golgi network*) entre el RE y la cara *cis* del Golgi y una red del *trans*-Golgi (TGN, *trans-Golgi network*) entre la cara *trans* del Golgi y la membrana plasmática o compartimentos endosomales.

En el complejo de Golgi residen tres funciones básicas para el funcionamiento celular. La primera es la recepción y clasificación de los productos solubles y de membrana provenientes del RE que llegan a la cara *cis*. La segunda es la modificación de la carga mediante su paso a través de las cisternas. El complejo de Golgi es el orgánulo responsable de la mayor parte de las modificaciones postraduccionales de

lípidos y proteínas. Así, dentro de sus cisternas tienen lugar los procesos de glicosilación y otras modificaciones como fosforilación, sulfatación y proteólisis (Farquhar y Palade, 1998). Por último, la tercera función es la clasificación y empaquetamiento de la carga y su transporte desde el TGN hasta su destino final (Mellman y Simons, 1992).

2.4 Red del trans-Golgi

La red del *trans*-Golgi o TGN está situada en la cara *trans* del complejo de Golgi y es morfológica y funcionalmente diferente del conjunto de cisternas que forman el complejo de Golgi. Se describió inicialmente en células incubadas a 20°C como una red en la cara *trans* del complejo de Golgi donde la carga se acumulaba y se le llamó *trans reticulum* (Griffiths, 1985). Aunque, el TGN y el complejo de Golgi están conectados funcional y estructuralmente, son compartimentos diferentes, como se demuestra en células tratadas con BFA. Este metabolito fúngico induce la tubulación de ambos compartimentos, fusionándose el complejo de Golgi con el RE, mientras que el TGN se fusiona con el sistema endosomal (Klausner et al., 1992). La morfología del TGN depende del tipo celular. Normalmente, el TGN está formada por una red de membranas túbulovesicular conectada a una o dos cisternas *trans*, además, en las células secretoras el TGN contiene gránulos secretores inmaduros. En células con un sistema lisosomal bien desarrollado el componente tubular del TGN es muy extenso, mientras que es reducido en células secretoras (Clermont et al., 1995).

El TGN es el sitio principal de clasificación y transporte de la carga hacia diversos destinos post-Golgi (Griffiths y Simons, 1986; Mellman y Simons, 1992; Traub y Kornfeld, 1997; De Matteis y Luini, 2008). Las rutas de salida anterógrada del TGN son hacia la membrana plasmática apical y basolateral de células polarizadas, endosomas (de reciclaje, tempranos y tardíos) y compartimentos especializados, tales como gránulos de secreción (De Matteis y Luini, 2008). Además, se produce el transporte retrógrado desde el TGN a compartimentos anteriores de la vía secretora. (Sandvig et al., 2004; Johannes y Popoff, 2008). En células secretoras, es a partir del TGN donde se produce la formación de los gránulos de secreción. También recibe material de la vía endocítica (Farquhar y Palade, 1981; Simons y van Meer, 1988). En el TGN se producen modificaciones postraduccionales como sialización, sulfatación y proteólisis (Mellman y Simons, 1992). En sus membranas tiene lugar la formación de un tipo de cubierta diferente a las que se hallan en compartimentos anteriores, se trata de las cubiertas de tipo clatrina. Los gránulos secretores y las vesículas recubiertas de

clatrina son el distintivo morfológico que determina la localización del TGN. Como hemos visto, el TGN es un compartimento altamente dinámico donde para cada destino se puede utilizar un tipo de ITs distinto (Traub y Kornfeld 1997).

3 Intermediarios de transporte

Cómo ya se ha mencionado, el transporte en la vía secretora requiere la formación de ITs que pueden tener forma vesicular, tubular o heterogénea. La formación de los ITs, ya sean vesículas o túbulos, presenta características comunes, independientemente de cómo y dónde tengan lugar. Los lípidos y las proteínas solubles o de membrana a transportar se clasifican en el compartimento inicial (compartimento donador) antes de entrar en el IT, después estos se separan y viajan a través del citoplasma, para finalmente fusionarse con el compartimento de destino (compartimento receptor o diana) liberando su contenido.

3.1 Vesículas

Las vesículas representan los ITs mejor conocidos; así, hay mucha información disponible sobre su composición y sobre la maquinaria molecular implicada en la formación, acoplamiento y fusión con la membrana diana (Bonifacino y Glick, 2004; Faini et al., 2013). La formación de vesículas de transporte está regulada por proteínas citosólicas conocidas como proteínas formadoras de cubiertas. Estas proteínas se unen entre sí formando complejos capaces de seleccionar la carga y de deformar la membrana de un compartimento de forma simultánea, dando lugar a los diferentes tipos de vesículas revestidas conocidos: COPI, COPII y clatrina (Faini et al., 2013).

La formación de una vesícula de transporte se inicia por la activación de una pequeña GTPasa de la familia Arf1/Sar1, estimulada por factores intercambiadores de guanina específicos, GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factor*). La pequeña GTPasa se ancla a la cara externa de la membrana en su estado GTP-unido, entonces recluta las diversas proteínas que formarán la cubierta. Esto causa la deformación de la membrana y posterior formación de la vesícula. Después, la vesícula pierde la cubierta y es dirigida hasta la membrana diana donde se produce la fusión. Este último proceso es resultado de la actuación de varias familias de proteínas como son las proteínas SNARE (*Soluble NSF Attachment protein Receptors*), Rab (GTPasas) y un grupo diverso de proteínas conocidas como proteínas de aproximación (Figura 2).

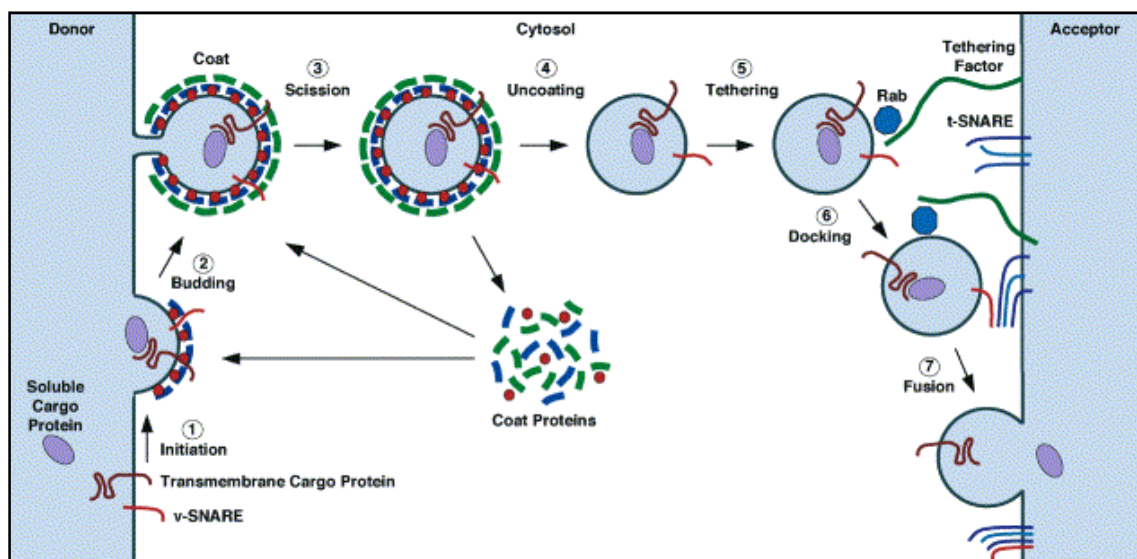


Figura 2. Proceso de formación y fusión de los intermediarios del transporte. 1. Activación de una GTPasa por GEFs. 2. Reclutamiento de la cubierta y deformación de la membrana. 3. Fisión de la vesícula. 4. Desacoplamiento de la cubierta. 5. Aproximación a la membrana diana. 6. Unión de la vesícula a la membrana. 7. Fusión de la vesícula. (Bonifacino y Glick, 2004).

En la cara *trans* del complejo de Golgi las vesículas tienen un diámetro de unos 100 nm, con cubiertas de clatrina de 18 nm de espesor. El monómero de clatrina está formado por tres cadenas ligeras y tres pesadas que se ensamblan para hacer una estructura de cesta, compuesta de pentágonos y hexágonos. Esta estructura se denomina *triskelion* (Schmid, 1997). Estas vesículas están involucradas en el transporte desde el TGN y desde la membrana plasmática hacia los endosomas (Pearse y Robinson, 1990; Kirchhausen et al., 2014). La asociación de clatrina con las membranas se realiza a través de unos complejos heterotetraméricos llamados complejos de proteínas adaptadoras o adaptinas (AP1-4), que actúan seleccionando la carga mediante secuencias señales y reclutando proteínas accesorias que regulan la formación de la vesícula (Robinson y Bonifacino, 2001). El complejo AP1 forma parte de las vesículas que se forman en el TGN, mientras que el complejo AP2 en las que se forman en la membrana plasmática. Los complejos AP3 y AP4 podrían estar implicados en el tráfico que se produce en el sistema endosomal-lisosomal (Robinson y Bonifacino, 2001). El complejo de cubierta tipo COPII interviene exclusivamente en la biogénesis de ITs (vesículas y túbulos) formados en las membranas del RE que se encuentran en los ERES (Kaiser y Schekman, 1990; Rexach et al., 1994). Este complejo de cubierta está formado por cinco proteínas solubles, que son dos heterodímeros Sec23p/24p y Sec13p/31p (Barlowe et al., 1994) y una proteína de unión a GTP llamada Sar1p (una GTPasa de la familia de las proteínas ARF), la cual

es activada por Sec12p, una proteína integral de membrana del RE que cataliza el intercambio de GDP por GTP (GEF) (Barlowe et al., 1994 y Kirchhausen, 2007). Las vesículas tipo COPI se han descrito en casi todos los pasos de la ruta secretora. Podemos encontrar vesículas tipo COPI en el ERGIC, en el complejo de Golgi y en los laterales de los dictiosomas (Oprins et al., 1993). Incluso, se han localizado a nivel del TGN (Martínez-Menárguez et al., 1996). El complejo COPI media tanto en el transporte intra-Golgi como en el transporte desde el complejo de Golgi hacia el RE. El complejo multiproteico COPI está formado por un coatómero compuesto por siete subunidades (α , β , β' , γ , δ , ϵ y ζ -COP) y una proteína de unión a GTP, Arf1 (Malhotra et al., 1989; Waters et al., 1991). Tanto las vesículas COPI como COPII son de pequeño tamaño (50-60 nm) y tienen una cubierta proteica de 10 nm de espesor (Szul y Sztul, 2011). Estos dos tipos de vesículas tienen funciones diferentes, pero son indistinguibles morfológicamente sin la ayuda de técnicas inmunocitoquímicas (Martínez-Menárguez et al., 1999). Las cubiertas COPI juegan diversos papeles en la interfaz entre el RE y el complejo de Golgi, así como en el transporte a través del complejo de Golgi (Beck et al., 2009b). A continuación se describe con detalle el mecanismo de formación de las vesículas de transporte COPI.

- Mecanismo de formación de las vesículas COPI

En primer lugar, se produce el reclutamiento de la GTPasa Arf1 a las membranas del complejo de Golgi (Figura 3). La forma Arf1-GDP interacciona con la membrana mediante la unión a la cola citoplasmática del dímero formado por proteínas de membrana de la familia p24 (Gommel et al., 2001; Aguilera-Romero et al., 2008). Se inicia el ensamblaje de la cubierta cuando se activa Arf1, proceso regulado por una proteína GEF. GBF1 es el único GEF localizado en el *cis*-Golgi y regula el tráfico de proteínas entre el RE y el *cis*-Golgi (Claude, et al., 1999, Kawamoto et al., 2002). El intercambio de GDP por GTP induce un cambio conformacional en Arf1 que le permite exponer un ácido mirístico en su extremo N-terminal para anclarse en las membranas del complejo de Golgi. Una vez activada en la membrana, Arf1 induce el reclutamiento en bloque del complejo COPI preformado en el citoplasma, el denominado coatómero. A continuación, se produce el reclutamiento de la carga. Muchas proteínas transmembrana transportadas en vesículas COPI tienen motivos dilisina en su extremo C-terminal (Letourneur et al., 1994), entre las que se incluye la proteína ERGIC-53 (Schindler et al., 1993). Las subunidades del coatómero α - y β' -COP se unen a esta señal directamente (Jackson et al., 2012). La familia de las

proteínas p24 es reclutada por la interacción directa de su cola citosólica, las cuales contienen señales de fenilalanina y dilisina (KKxx o KxKxx), con γ -COP (Nickel et al., 1997, Béthune et al., 2006). No toda la carga que se incorpora en las vesículas COPI contienen estas señales de clasificación, así que la carga puede requerir de adaptadores. Este es el caso de las enzimas de glicosilación (Popoff et al., 2011). Un ejemplo de un adaptador para proteínas solubles es el receptor KDEL (KDELr), una proteína transmembrana que está presente sobre todo en el *cis*-Golgi y el compartimento intermedio, el cual interactúa con el coatómero a través de la señal de dilisina en su cola citosólica, mientras que la parte luminal interactúa con las proteínas solubles que llevan una secuencia señal KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), la cual poseen muchas proteínas residentes del RE (Semenza et al., 1990; Majoul et al., 2001). De esta manera se recuperan las proteínas solubles que se han escapado del RE. En cuanto a la gemación, tanto el dímero de Arf1-GTP (Beck et al., 2008) como el coatómero (Antonny, 2006) son capaces de curvar la membrana e iniciar la formación de una gema. Posteriormente, se produce la escisión de la vesícula recubierta de la membrana del complejo de Golgi. Por último, el desacoplamiento de la cubierta ocurre cuando ArfGAP1 (*GTPase-activating protein for Arf1*) activa la hidrólisis del GTP unido a Arf1. ArfGAP1 contiene un motivo ALPS (de sus siglas en inglés ArfGAP1 *Lipid Packing Sensor*) que actúa como sensor de la curvatura de membrana (Bigay et al., 2005). Se ha observado que cuando ArfGAP1 está unida a membranas con curvatura positiva se produce un aumento de su actividad (Bigay et al., 2003 y Liu et al., 2005). Como resultado, se hidroliza el GTP y Arf1-GDP se libera de las membranas (Bigay et al., 2003; Reinhard et al., 2003), desencadenando la liberación del coatómero. Todos los componentes vuelven al citosol y quedan libres para poder reutilizarse en un nuevo ciclo de formación de las cubiertas COPI.

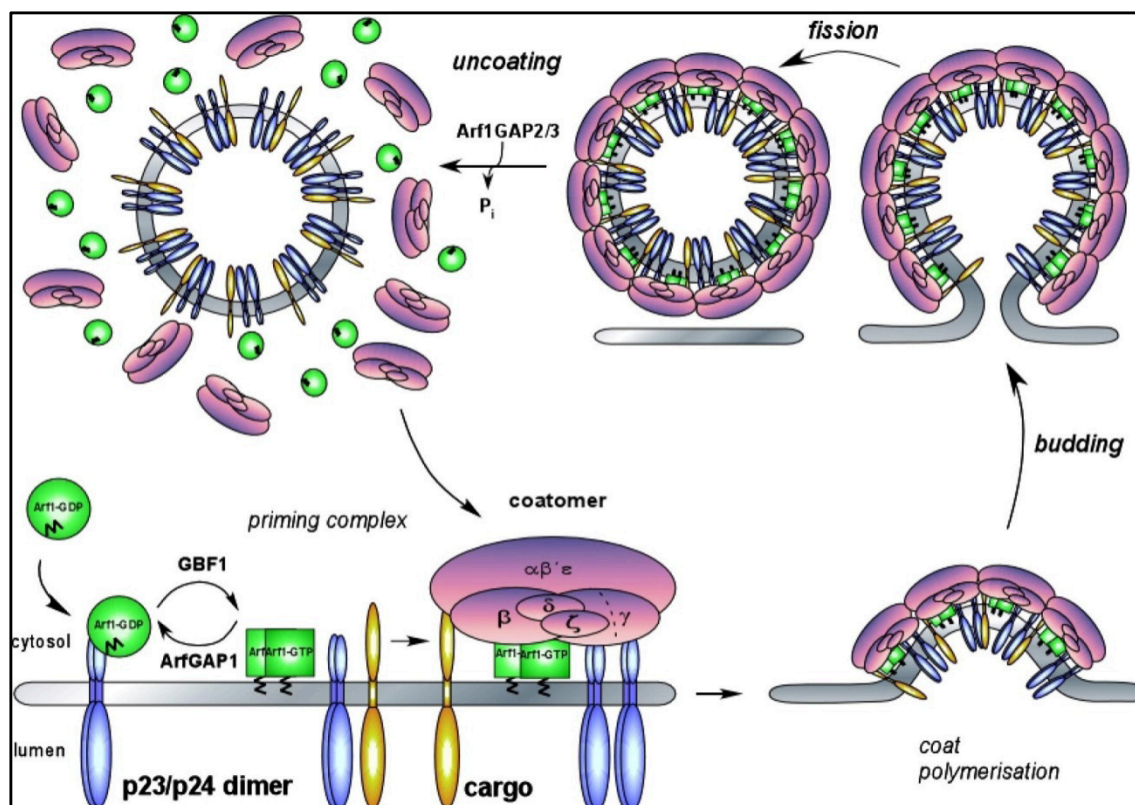


Figura 3. Etapas de formación de las vesículas COPI. El ensamblaje del coatómero se activa por reclutamiento de Arf1 a las membranas del complejo de Golgi. Seguidamente, Arf1 permite la unión del coatómero formando un complejo Arf1-COPI que favorece la unión de ArfGAP1 al mismo tiempo que se recluta la carga. A continuación, se deforma la membrana y comienza la gemación. Después, se escinde la nueva vesícula y se libera. Finalmente, se desacopla la cubierta COPI al inactivarse Arf1 (Arf-GDP). (Popoff et al., 2011)

3.2 Túbulos

Durante mucho tiempo se ha asumido que el tráfico de membranas está mediado por vesículas cubiertas. Sin embargo, estas vesículas cubiertas pueden representar solamente una parte de los transportadores que operan dentro de la vía secretora (Glick, 2000).

La existencia de estructuras tubulares relacionadas con el complejo de Golgi ya se observó en los primeros trabajos de microscopía electrónica (Dalton y Felix, 1956) y han sido cuidadosamente descritos en excelentes estudios morfológicos, los cuales demuestran que los túbulos son elementos comunes del complejo de Golgi (Mollenhauer y Morré, 1998). Sin embargo, desde un punto de vista fisiológico, los túbulos han estado relegados al olvido durante mucho tiempo. Algunas de las razones para su olvido pueden ser que los túbulos son difíciles de visualizar en imágenes bidimensionales de microscopía electrónica, ya que según el plano de corte no son reconocidos (solamente cortados longitudinalmente pueden ser claramente

Los túbulos son una característica común en toda la vía secretora (y endocítica) y se han asociados a todos los niveles de transporte (Mollenhauer y Morré 1998) (Figura 4). Estudios en la década de los 70 pusieron de manifiesto la existencia de túbulos que se extendían desde el complejo de Golgi y del TGN, bien conectando las cisternas del complejo de Golgi o bien dirigiéndose hacia el citoplasma celular (Rambourg et al., 1974; Rambourg et al., 1979). Estos estudios se vieron reforzados muy posteriormente mediante trabajos de tomografía electrónica en los que se observó que del complejo de Golgi derivaban no solo vesículas o perfiles vesiculares sino también túbulos (Ladinsky et al., 1994). El RE, por ejemplo, puede adoptar una configuración de red tubular, proceso que está regulado por varias familias de proteínas (Goyal y Blackstone, 2013). Las gemas COPII en los sitios de salida del RE y los elementos libres de cubiertas COPII también pueden adoptar forma tubular (Zeuschner et al., 2006). Se ha descrito que la estructura de la cubierta COPII es flexible, de modo que puede adaptar su conformación para incorporar una amplia gama de carga voluminosa (Stagg et al., 2008). Así, TANGO 1, una proteína adaptadora, ayuda a las prefibrillas de colágeno VII a entrar en los ITs (Saito et al., 2009, 2011) (Figura 5). Esta proteína recluta a la proteína Sedl y la interacción entre ambas regula el ciclo eficiente de la GTPasa Sar1, evitando la fisión prematura de los ITs nacientes (Venditti et al., 2012). También, la ubiquitinación del componente Sec31 de COPII regula la formación de grandes ITs COPII para el transporte de colágeno (Jin et al., 2012).

Los túbulos son también elementos del compartimento intermedio. Se han descrito túbulos de gran longitud que miden hasta 0,5 μm (Fan et al., 2003). Experimentos *in vivo* han mostrado que el 20% de los ITs entre el RE y el complejo de Golgi son tubulares (Simpson et al., 2006). Se ha observado que algunas proteínas mal plegadas se acumulan en los componentes tubulares de las membranas pre-Golgi, lo que sugiere que los túbulos desempeñan un papel en el control de calidad de las proteínas (Zuber et al., 2004; Fan et al., 2007). La tubulación del ERGIC está regulada, además de por la carga, por las cubiertas COPI, proteínas motoras y el citoesqueleto (Tomás et al., 2010)

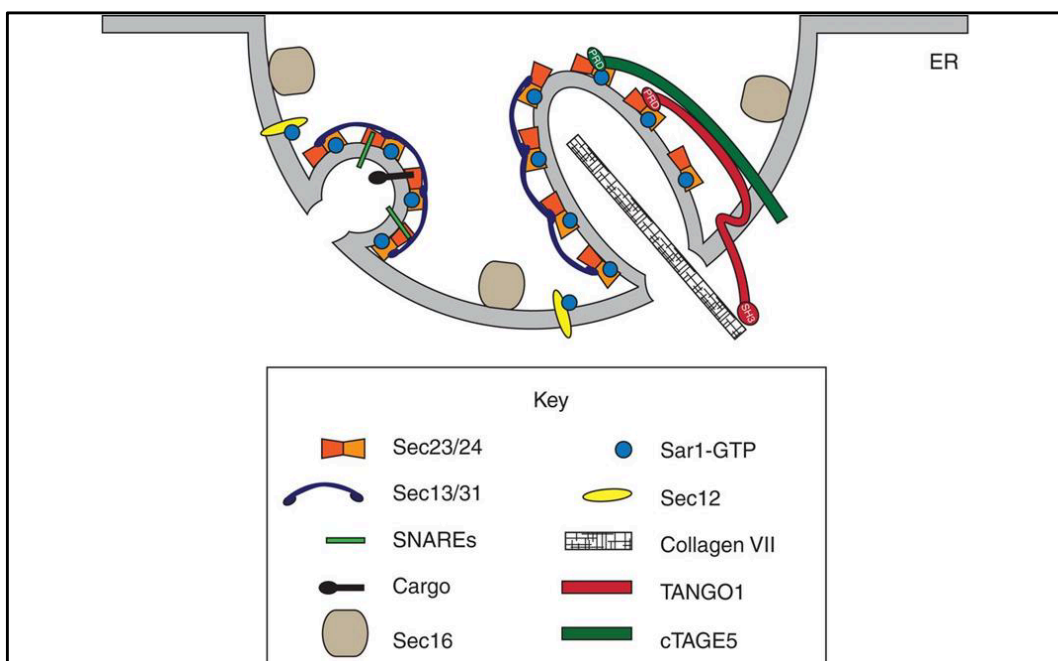


Figura 5. Esquema de la estructura vesicular y tubular de las gemas COPII. Algunas cargas voluminosas como el colágeno no pueden entrar en las vesículas COPII. La proteína adaptadora TANGO 1 y su homólogo CTAGE5 se unen a la cubierta COPII para generar un IT con el tamaño necesario (Lord et al., 2013).

Los túbulos asociados al complejo de Golgi se han descrito en muchos tipos celulares, desde levaduras hasta células de mamífero, aunque su nivel de desarrollo es muy variable. Están muy bien desarrollados en algunos tipos celulares (Mollenhauer y Morré, 1998), como es el caso de las espermátidas, cuya morfología ha sido extensamente descrita (Clermont et al., 1994) y cuantitativamente analizada (Vivero-Salmerón et al., 2008). Curiosamente, el parásito intracelular microsporidia no muestra ni vesículas ni un complejo de Golgi típico, pero contiene túbulos con las características de un complejo de Golgi (Beznoussenko et al., 2007). Además, se ha visto que los túbulos participan en el proceso de reciclaje de las enzimas de glicosilación residentes del complejo de Golgi en condiciones de baja temperatura y en condiciones fisiológicas (Martínez-Alonso et al., 2005, 2007).

Las caras *cis* y *trans* de los dictiosomas están flanqueadas por redes tubulares, el CGN y el TGN, las cuales representan los sitios de entrada y de salida a los dictiosomas, respectivamente. Los túbulos del CGN y del TGN están conectados a la primera y última cisterna del dictiosoma, respectivamente (Rambourg y Clermont, 1997, Ladinsky et al., 1999). El TGN es principalmente tubular en células no secretoras especializadas en la síntesis de lisosomas (Clermont et al., 1995). Los túbulos que emergen de los laterales de los dictiosomas a menudo conectan distintos

dictiosomas formando la llamada cinta del Golgi. Sin embargo, la cinta del Golgi no es necesaria para la mayoría de las funciones del complejo de Golgi, pero se asocia a funciones celulares avanzadas como la polarización de la secreción, la motilidad celular, los puntos de control mitóticos y la señalización (Wei y Semanns, 2010; Mironov y Beznoussenko, 2011). La importancia de los túbulos en los laterales del complejo de Golgi se pone de relieve en el hecho de que la integridad de la cinta del Golgi está relacionada con un punto de control del ciclo celular. De esta manera, la fosforilación de un subconjunto de proteínas del complejo de Golgi por diferentes cinasas promueve la desunión de la cinta del Golgi específica de la fase G2 (Rabouille y Kondylis, 2007).

4 Transporte en la vía secretora

La vía secretora es la ruta que sigue la carga después de sintetizarse en el RE para transportarse a su destino final, que incluye los compartimentos intracelulares, la membrana plasmática o el medio extracelular. Existe una gran diversidad de rutas de transporte dentro de la vía secretora. Los mecanismos que operan en cada una de estas rutas permiten el transporte de una carga específica hacia un destino determinado a la vez que mantiene la identidad del compartimento donador.

4.1 Transporte entre el RE y el complejo de Golgi

El transporte de membranas entre el RE y el complejo de Golgi se caracteriza por ser un transporte bidireccional. Los ITs formados en el RE transportan la carga al ERGIC y éste madura hasta convertirse en y/o fusionarse con el *cis*-Golgi. Esta vía de transporte anterógrada se equilibra con una ruta de transporte retrógrado que recicla la maquinaria molecular de transporte de nuevo hacia el RE y devuelve al RE proteínas que se han escapado de éste (Figura 6). De esta manera, se coordina el transporte en sentido anterógrado y retrógrado para mantener la estructura y la funcionalidad de los compartimentos de la vía secretora temprana (Lorente-Rodríguez y Barlowe, 2011).

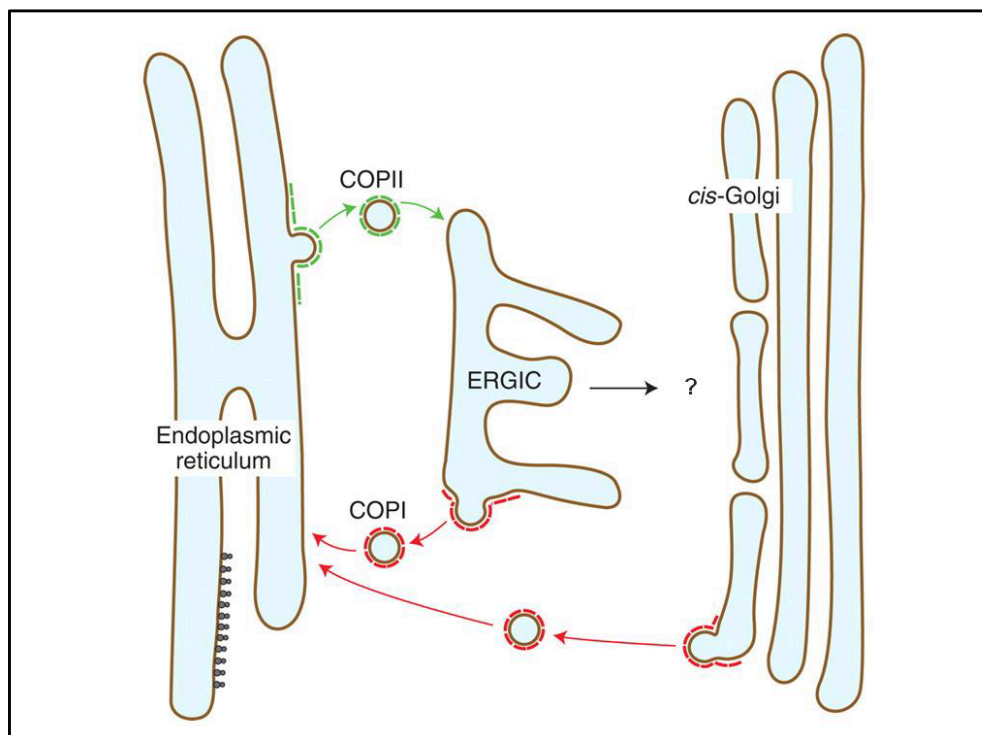


Figura 6. Rutas de transporte en la vía secretora temprana. En este modelo simplificado se pueden ver las rutas de transporte bidireccional entre el RE, el ERGIC y el *cis*-Golgi. Las vesículas COPII nacen del RE y transporta la carga en sentido anterógrado hasta fusionarse con el ERGIC. El ERGIC madura en la red del *cis*-Golgi (CGN) y/o se fusiona con el *cis*-Golgi. Las vésiculas COPI se forman en el ERGIC y el *cis*-Golgi y reciclan la maquinaria del transporte de nuevo al RE en una ruta de transporte retrógrado. (Lorente-Rodríguez y Barlowe, 2011)

- Transporte del RE al complejo de Golgi

Las proteínas y lípidos recién sintetizados en el RE entran en la vía secretora y se dirigen al complejo de Golgi para ser modificados. La salida de la carga del RE es un proceso dependiente de las cubiertas proteicas tipo COPII, bien formando vesículas revestidas (Barlowe, 1994; Barlow y Miller, 2013), o bien, mediante la formación de estructuras tubulares dependientes también de COPII (Mironov et al., 2003; Zeuschner et al., 2006).

Una vez que se forma la gema con cubierta COPII en la membrana del RE, ésta se separa de la membrana donadora dando lugar a una vesícula libre que se desprende la cubierta inmediatamente después de su fisión (Lord et al., 2013). Las vesículas libres de cubiertas se fusionan unas con otras para formar el ERGIC (Hauri y Schweizer et al., 1992). En el ERGIC, la carga anterógrada se separa y se concentra. No está claro si el ERGIC es un compartimento estable y estático o si por el contrario actúa como un IT (Ben-Takaya et al., 2005). En cualquier caso, elementos procedentes del ERGIC se transportan hasta el área del complejo de Golgi y, una vez

allí, pueden fusionarse unos con otros para formar el CGN o por el contrario, fusionarse con una cisterna preexistente (Presley et al., 1997).

- Transporte del complejo de Golgi al RE

Se han descrito dos rutas de transporte retrógrado desde el complejo de Golgi hacia el RE, una dependiente y otra independiente de COPI. Estas vías funcionan en paralelo para reciclar proteínas y lípidos entre el RE y el complejo de Golgi. Esta recuperación es parte de la homeostasis necesaria para mantener la identidad del RE y del complejo de Golgi (Spang, 2013).

La vía COPI-dependiente, como su nombre indica, es dependiente de la formación de este tipo de cubiertas proteicas. Se ha visto que este transporte opera principalmente desde la cara *cis* del complejo de Golgi pero no exclusivamente, pudiendo darse desde subcompartimentos más tardíos incluida la cara *trans* (Martínez-Menárguez et al., 1999). Se utiliza para reciclar las proteínas solubles y de membrana residentes del RE que se han escapado y un conjunto de proteínas que en condiciones normales se encuentran ciclando entre el RE, el ERGIC y el aparato de Golgi (ERGIC-53, KDELR, proteínas SNARE) (Beck et al., 2009b, Popoff et al., 2011). La mayoría de las proteínas solubles residentes del RE poseen la secuencia de aminoácidos KDEL en su extremo C-terminal. Esta secuencia es reconocida por el KDELR, una proteína transmembrana del ERGIC y del *cis*-Golgi que cicla constantemente entre el RE y el complejo de Golgi. La unión del KDELR a una proteína con la secuencia KDEL permite el transporte retrógrado del complejo proteína-receptor vía vesículas COPI (Lewis y Pelham, 1990). Las proteínas de membrana tienen secuencias señal citosólicas que son reconocidas por los componentes de la cubierta COPI. Por ejemplo, la secuencia de dilisina KKXX que se encuentra en el extremo C-terminal de varias proteínas residentes del RE (Letourneur et al., 1994) y en proteínas que ciclan en la interfaz RE-Golgi, como ERGIC-53 (Schindler et al., 1993).

Aunque la vía principal de transporte retrógrado es dependiente de COPI, existen proteínas que viajan desde el complejo de Golgi al RE a través de ITs que no contienen cubiertas. No está clara la funcionalidad de esta ruta de transporte, se ha sugerido como una vía de reciclaje de lípidos. Dentro de esta vía se incluyen las enzimas de glicosilación residentes del complejo de Golgi o la toxina bacteriana Shiga, que no posee la secuencia señal tipo KDEL (Girod et al., 1999; White et al., 1999). Esta vía es regulada por Rab6 (Martínez et al., 1997) y no se ve afectada por los

agentes que impiden la activación de COPI. Rab6 es una GTPasa cuyo ciclo funcional es similar al de otras GTPasa, ciclando entre un estado GTP activo y un estado GDP inactivo. Existen diversas isoformas de Rab6. Se ha postulado que la vía independiente de COPI está regulada específicamente por la isoforma Rab6A (Del Nery et al., 2006).

4.2 Transporte intra-Golgi

Desde que se descubrió el complejo de Golgi existe un gran debate sobre cómo proteínas y lípidos se transportan a su través. El modelo de transporte a través del complejo de Golgi está bajo exhaustiva investigación pero permanece sin resolverse. Existen varios modelos que intentan explicar cómo una vez que la carga llega a la cara *cis* del complejo de Golgi, atraviesa las distintas cisternas para modificarse antes de alcanzar el TGN. Clásicamente se han postulado dos teorías que han dominado el campo durante décadas, el modelo de maduración de cisternas y el modelo de transporte mediado por vesículas. Como indican sus nombres, estos modelos apoyan la idea de que cisternas y vesículas, respectivamente, son los ITs que operan a este nivel. Recientemente, se han propuesto nuevas teorías y una combinación de estos dos modelos. Sin embargo, la mayoría de estas teorías pasan por alto el papel de los túbulos como ITs. Los puntos débiles y fuertes de estos modelos se han descrito en excelentes revisiones (ver por ejemplo Glick y Luini, 2011). A continuación, se describen los modelos de transporte intra-Golgi postulados hasta la fecha y se discute el papel de los túbulos en el marco de estos modelos.

El **modelo vesicular** fue postulado por Palade en 1975 y propone que las cisternas del complejo de Golgi son estructuras estables donde el flujo de membrana tiene lugar mediante pequeñas vesículas revestidas tipo COPI que transportan la carga anterógrada. Las vesículas se desplazan lateralmente por los extremos de las cisternas y la carga pasa secuencialmente a través de todas las cisternas desde las *cis*-, *media*- y *trans*- hasta llegar al TGN (Figura 7). Sin embargo, el descubrimiento del papel de estos complejos de cubierta en el transporte retrógrado condujo a la reconsideración de este modelo (Cosson y Letourneur, 1994; Letourneur et al., 1994). Así que se ha postulado la existencia de dos tipos de vesículas COPI específicas para el transporte anterógrado y retrógrado de la carga. Este modelo, aunque originariamente fue diseñado para vesículas, puede ser adaptado para túbulos. Los túbulos podrían facilitar el transporte anterógrado cuando hay un exceso de carga. En este caso, los túbulos podrían establecer conexiones homotópicas o heterotópicas entre

cisternas pertenecientes al mismo o a diferentes dictiosomas (Martínez-Alonso et al., 2013). En este contexto, los túbulos podrían acelerar el transporte en un dictiosoma o incluso equilibrar el trabajo extra en diferentes dictiosomas de la cinta del Golgi. Estas conexiones pueden tener una vida corta o incluso no estar presentes en muchas células, sin embargo, podrían tener una vida larga e incluso ser permanentes en células secretoras especializadas. Se ha descrito la existencia de conexiones tubulares entre cisternas del complejo de Golgi en células donde se han inducido altos niveles de expresión de proteína secretora. Se forman conexiones tubulares entre las diferentes cisternas, desapareciendo cuando la carga ha atravesado todo el conjunto de cisternas del complejo de Golgi (Marsh et al., 2004; Trucco et al., 2004). Que el exceso de carga induzca la formación de conexiones entre cisternas, estaría de acuerdo con este modelo de transporte vesicular. Por lo tanto, los túbulos podrían remplazar a las vesículas como ITs en casos en los que hay un exceso de carga. Es más, el complejo de Golgi de espermátidas, las cuales están especializadas en la formación del acrosoma, un tipo especializado de gránulo secretor de gran tamaño, muestra numerosas conexiones tubulares (Vivero-Salmerón et al., 2008). Una hipótesis exagerada para el papel de los túbulos sería considerar que todos los compartimentos de la vía secretora están conectados por túbulos. En este caso, la carga podría moverse anterógradamente cómo lo hace la comida a través del tubo digestivo (Griffiths, 2000). De hecho, se han descrito conexiones tubulares a lo largo de todos los compartimentos de la vía secretora (Vivero-Salmerón et al., 2008). También se ha descrito que un complejo de Golgi puede estar formado por una única cisterna dispuesta helicoidalmente (Tanaka y Fukudome, 1991). El principal problema del modelo vesicular es cómo explicar el transporte de carga de gran tamaño, como es el caso del procolágeno. La existencia de megavesículas capaces de transportar esta carga tan voluminosa solo ha sido descrita en sistemas artificiales (Volchuk et al., 2000). Obviamente, los túbulos no están implicados en el transporte de este tipo de carga de gran tamaño. En este modelo, los túbulos no intervendrían en el transporte retrógrado intra-Golgi pero podrían estar involucrados en el transporte desde el Golgi hasta el RE, por ejemplo, ayudando a la vesículas retrógradas COPI a reciclar proteínas que se han escapado del RE.

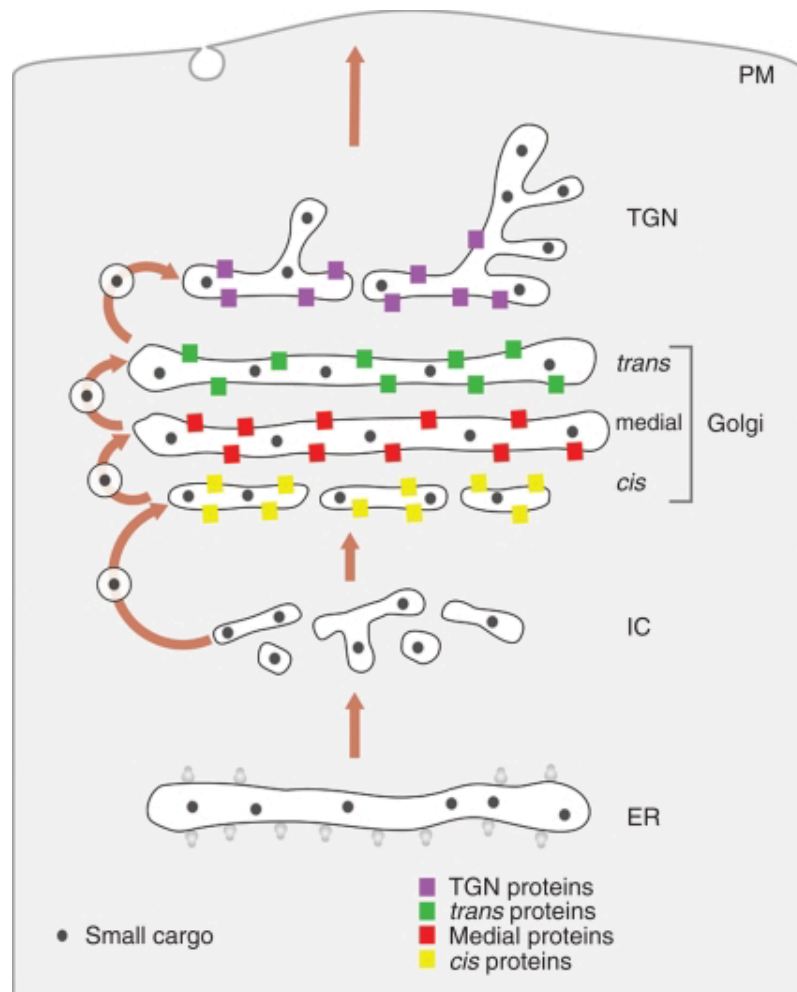


Figura 7. Esquema del modelo de transporte vesicular. Cada cisterna permanece estática y la carga se mueve a través del dictiosoma mediante vesículas COPI que brotan desde la primera cisterna y se fusionan con la siguiente, mientras que las enzimas residentes del complejo de Golgi permanecen en su correspondiente compartimento (Glick y Luini, 2011).

El **modelo de maduración de cisternas** es más antiguo que el anterior y fue formulado a partir de estudios de microscopía electrónica (Grassé, 1957) y posteriormente redefinido por Morré en 1987. De acuerdo con este modelo, las cisternas son unidades dinámicas que maduran y progresan en dirección *cis-trans*, siendo responsables del transporte anterógrado, mientras que las vesículas COPI están involucradas en el transporte retrógrado intra-Golgi de las enzimas residentes del complejo de Golgi (Martínez-Menárguez et al., 2001). En este modelo, las vesículas tipo COPI sólo transportan la carga en sentido retrógrado para mantener y preservar la identidad y la polaridad del complejo de Golgi (Figura 8). En este modelo, los túbulos podrían ayudar a las vesículas COPI en esta tarea, especialmente cuando hay mucho tráfico. De esta manera, los túbulos podrían establecer conexiones heterotípicas facilitando el reciclado de enzimas del complejo de Golgi en condiciones

especiales, por ejemplo, cuando hay una alta actividad sintética. En este caso, el alto flujo en sentido anterógrado debe ser acompañado por un alto grado de reciclaje retrógrado. De esta manera, las células con una alta actividad secretora podrían tener un extenso sistema de conexiones inter-cisternas, como ocurre en el caso de las espermatidas (Vivero-Salmerón et al., 2008). Sin embargo, estas extensas conexiones no se han observado en las células secretoras más importantes de los mamíferos, las células pancreáticas exocrinas (Sesso et al., 1994). Esta diferencia entre células pancreáticas y espermatidas podría explicarse por el hecho de que las espermatidas producen un único gránulo secretor de gran tamaño, de manera que es necesario reciclar una gran cantidad de membranas. Por otro lado, las conexiones homotípicas podrían ayudar a equilibrar la distribución de las enzimas entre dictiosomas. En este modelo de maduración de cisternas no se ha podido identificar ningún papel para los túbulos en el transporte anterógrado. Una demostración directa de este modelo ha sido descrita en levaduras (Losev et al., 2006; Matsuura-Tokita et al., 2006), las cuales no tienen cisternas empaquetadas, así que la evolución de cada cisterna individual se puede visualizar en células vivas. Las cisternas que contienen marcadores de la cara *cis* del Golgi progresivamente van adquiriendo marcadores de la cara *trans*, convirtiéndose finalmente en una cisterna *trans*. Curiosamente, el silenciamiento génico de las cubiertas COPI no inhibe por completo esta maduración (Matsuura-Tokita et al., 2006) lo que sugiere que los túbulos podrían tener un papel en este proceso.

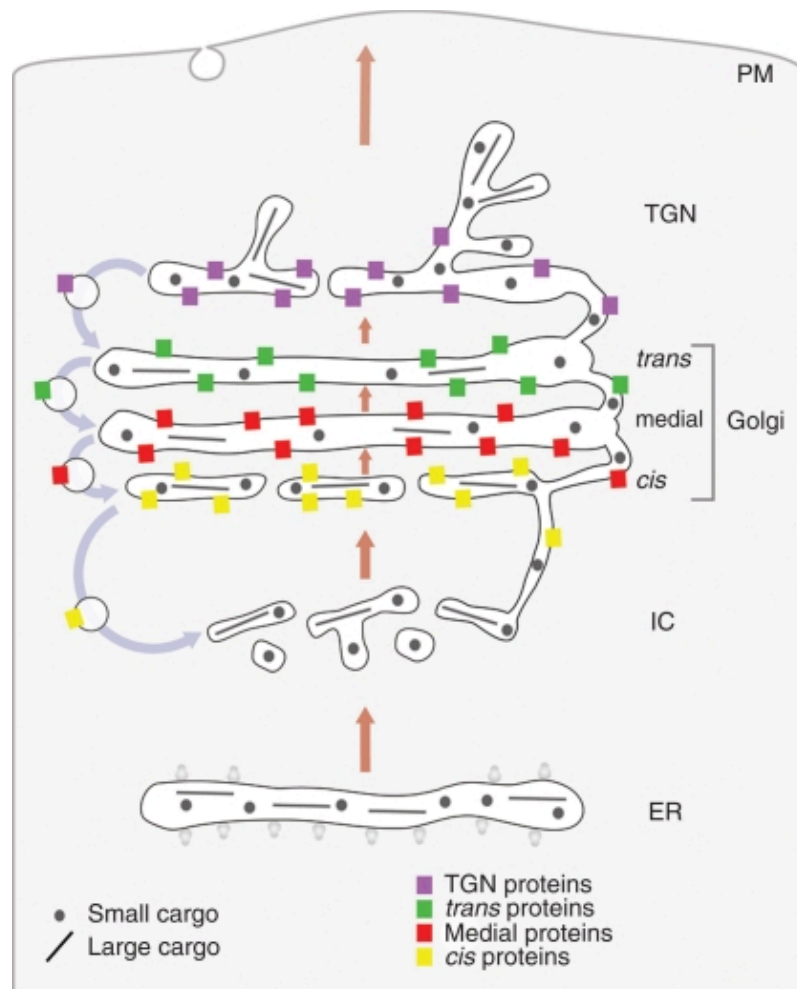


Figura 8. Esquema del modelo de maduración de cisternas. Cuando una nueva cisterna se ha formado viaja en dirección *cis-trans*, va madurando acumulando enzimas típicas de la cara *media* y *trans* gracias a vesículas que se mueven desde la última cisterna hasta la más temprana. Mientras la cisterna progresa a través del dictiosoma transporta carga de pequeño y gran tamaño. Las cisternas dentro de un dictiosoma pueden estar conectadas por conexiones tubulares a través de las cuales la carga secretora de pequeño tamaño y las enzimas residentes Golgi pueden difundir. También pueden existir conexiones tubulares heterotípicas entre cisternas de dictiosomas adyacentes (Glick y Luini, 2011).

Se han postulado otros modelos que intentan explicar el transporte a través del complejo de Golgi. El **modelo dual** propone una coexistencia de los modelos clásicos. El modelo vesicular y el de maduración de cisternas podrían ser utilizados por la célula en un modo rápido y lento de transporte intra-Golgi, respectivamente (Pelham y Rothman, 2000). Diferentes tipos de túbulos especializados en transporte anterógrado o retrógrado podrían existir en este modelo dual.

Un modelo más reciente, el **modelo de partición rápida**, propone que el complejo de Golgi funciona como un único compartimento pero que contiene unos dominios que procesan la carga (dominios procesadores) y otros que la exportan (dominios exportadores) (Patterson et al., 2008). Cuando la carga procedente del RE

alcanza al complejo de Golgi se asocia a estos dos dominios y después abandona este orgánulo hacia su destino final desde cualquier cisterna del dictiosoma (Figura 9). Es difícil para este último punto explicar muchos de los datos que se disponen del transporte en el complejo de Golgi. Por ejemplo, la salida de proteínas lisosomales se produce en vesículas de clatrina cuya formación está restringida a la última cisterna. Solo bajo ciertas condiciones (incubación a 20°C para inducir el bloqueo del transporte a nivel del *trans*-Golgi) se han observado en cisternas anteriores a la última cisterna *trans* (Ladinsky et al., 2002). En este modelo, los túbulos podrían representar dominios exportadores, como se ha descrito para los endosomas. Dado que los túbulos están presentes en todos los niveles de los dictiosomas, la carga podría estar recluida en túbulos (dominios exportadores) después de su glicosilación en las cisternas (dominios procesadores). La escisión de estos túbulos podría generar ITs que se dirigirían a la membrana plasmática.

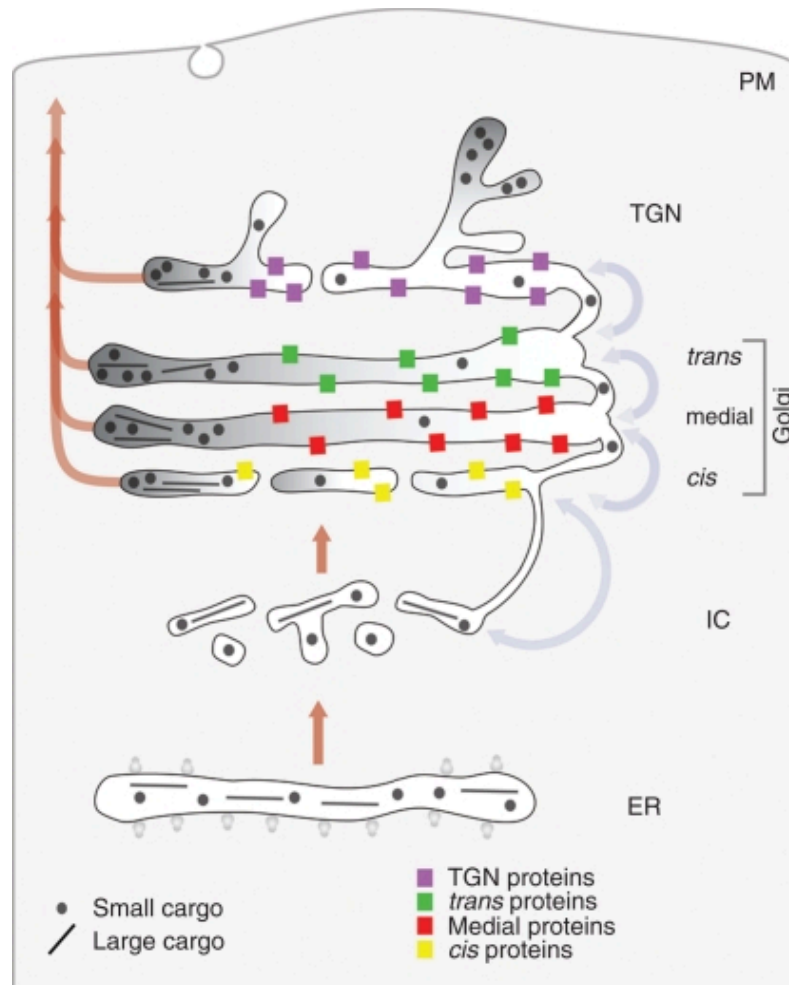


Figura 9. Esquema del modelo de partición rápida. Tan pronto como la carga entra en el complejo de Golgi, se distribuye a través del dictiosoma mediante conexiones tubulares. La carga se asocia a dominios procesadores, que tienen enzimas residentes y dominios exportadores. La carga puede salir del complejo de Golgi desde cualquier cisterna (Glick y Luini, 2011).

El **modelo de la cisterna progenitora** propone que el complejo de Golgi está compuesto por compartimentos estables (los progenitores) que son capaces de generar nuevos compartimentos sin ser consumidos, un proceso parecido a la maduración endosomal (Pfeffer, 2010). En este modelo, cada compartimento está determinado por una proteína Rab específica que recluta otra proteína Rab generando un nuevo dominio en el compartimento estable. El reclutamiento secuencial de otras proteínas Rab es un proceso conocido como la cascada de Rabs. La fisión de estos nuevos dominios y su fusión posterior con un compartimento estable adyacente (pero que contiene la misma Rab GTPasa) permitirá el transporte de la carga, mientras que las glicosiltransferasas quedan retenidas en dominios Rab específicos, así que no tienen que ser reclutadas en vesículas retrógradas (Figura 10). En este modelo, los túbulos (continuidades inter-cisterna) podrían representar una imagen instantánea de

los procesos de fusión entre dominios homotípicos a diferentes niveles del dictiosoma. Así, una conexión aparentemente heterotípica entre una cisterna *cis* y otra *media* del complejo de Golgi, representaría la fusión homotípica entre membranas que contienen la misma proteína Rab.

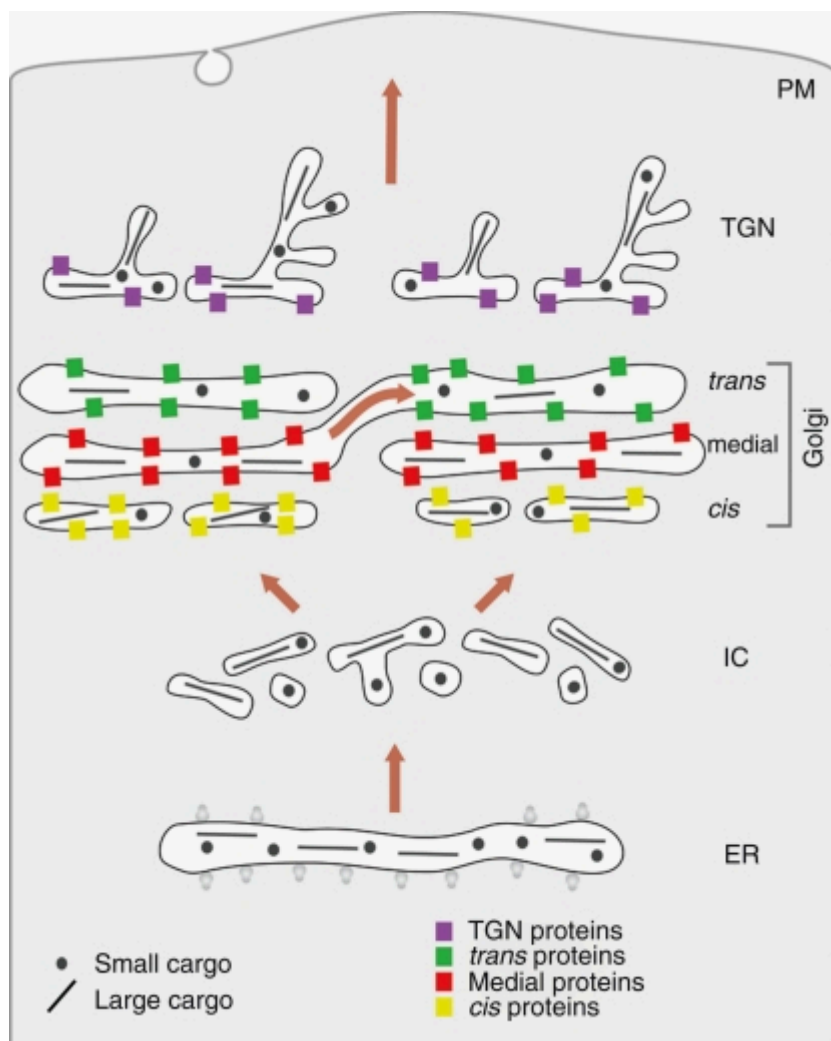


Figura 10. Esquema del modelo de la cisterna progenitora. Los compartimentos del complejo de Golgi son estables y bioquímicamente distintos. Las cisternas pueden generar nuevos compartimentos tras una cascada de Rabs. Un dominio en una cisterna *cis* sufre una conversión Rab y adquiere carácter *media*, lo que resulta en una fusión transitoria “homotípica” con una cisterna *media* en un dictiosoma adyacente. De esta manera la carga va avanzando a través de estas conexiones homotípicas (Glick y Luini, 2011).

Las conexiones tubulares son elementos clave del modelo de transporte intra-Golgi denominado **besar y correr** “Kiss-and-run” (Mironov y Beznoussenko, 2012). Este modelo, basado en el proceso descrito para vesículas sinápticas y la formación de lisosomas, propone que las cisternas podrían conectar su contenido

transitoriamente a través de túbulos permitiendo el tránsito de carga antes de separarse (Figura 11). En este modelo, los túbulos actúan como puentes estrechos y transitorios entre cisternas a través de los cuales se transporta la carga. Sin embargo, aún queda por demostrar la existencia de estos túbulos estrechos. De hecho, la mayoría de los túbulos son más gruesos que las cisternas.

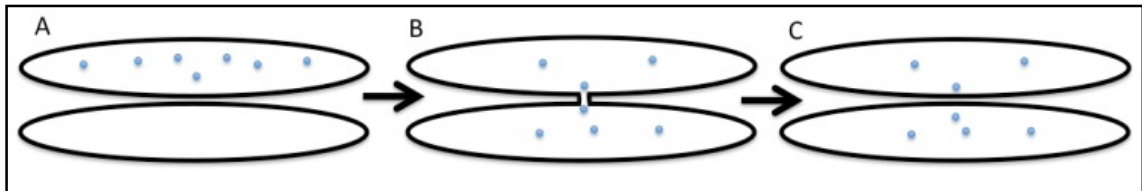


Figura 11. Esquema del modelo de transporte besar y correr. A) La carga (puntos azules) está presente en la cisterna superior. B) Se produce una conexión transitoria entre las dos cisternas y la carga difunde a la cisternas inferior. C) Se produce la fisión de la conexión quedando la carga distribuida entre las dos cisternas (Mironov y Beznoussenko, 2012).

4.3 Transporte post-Golgi

Una vez que la carga alcanza el TGN es clasificada para ser transportada a su destino final. Existen diferentes tipos de ITs que emergen desde el TGN y se dirigen a la membrana plasmática (membrana apical o basolateral en células polarizadas, membrana dendrítica o axonal en las neuronas), a elementos del sistema endosomal/lisosomal y a compartimentos anteriores mediante el transporte retrógrado.

Las vesículas recubiertas de clatrina son los ITs mejor caracterizados del TGN. Las vesículas de clatrina transportan a los endosomas enzimas lisosomales unidas a la señal manosa-6-fosfato utilizando para ello el receptor de manosa-6-fosfato. Después de liberar la carga en los endosomas el receptor de manosa-6-fosfato vuelve al TGN para un nuevo ciclo de transporte (Kornfeld y Mellman, 1989; Pearse y Robinson, 1990; van Meel y Klumperman, 2008; Braulke y Bonifacio, 2009). En la membrana plasmática las vesículas de clatrina también internalizan la carga (solutos, fluidos, y componentes de membrana) procedente de la ruta endocítica clásica. La selección de la carga para la internalización mediada por clatrina implica el reconocimiento de las señales endocíticas de los dominios citosólicos de la carga proteica por moléculas adaptadoras situados en la capa interna de la cubierta de clatrina. La interacción señal-adaptador conduce a la concentración de las proteínas transmembrana dentro de evaginaciones revestidas de clatrina que eventualmente brotan en el citoplasma como vesículas revestidas de clatrina. Las proteínas

transmembrana que tienen señales endocíticas se transportan rápidamente a los endosomas, mientras que las que carecen de señales permanecen en la membrana plasmática (Pfeffer, 2011; Traub y Bonifacino, 2013; Kirchhausen et al., 2014).

Otro tipo de ITs son los gránulos de secreción, los cuales son responsables de la secreción regulada en células especializadas. Los gránulos secretores pueden tener un tamaño considerable y se acumulan en el citoplasma hasta que se fusionan con la membrana plasmática. La secreción constitutiva se pensaba que ocurría exclusivamente mediante la formación de vesículas (Rothman y Wieland, 1996; Schekman y Orci, 1996). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que una gran variedad de carga es transportada hacia la membrana plasmática en grandes estructuras túbulovesiculares denominadas estructuras pleiomórficas (Hirschberg et al., 1998; Toomre et al., 1999; Polishchuk et al., 2003). Estos ITs se mueven a lo largo de microtúbulos y durante su proceso de formación y transporte interaccionan con los filamentos de actina (Gleeson et al., 2004).

Los mecanismos que intervienen en estos procesos son bastante diferentes y en algunos casos se ha visto que son dependientes de secuencias señal (Keller y Simons, 1997; Rodríguez-Boulán y Müsch, 2005). Las proteínas que no tienen una secuencia señal específica se empaquetan en ITs y viajan hasta la membrana plasmática en la ruta constitutiva (Mellman y Simons, 1992; De Matteis y Luini, 2008). En las células polarizadas, hay rutas específicas que dirigen la carga a la membrana apical o basolateral (Bennett et al., 1988; Dotti y Simons, 1990; Wandinger-Ness et al., 1990).

No existe un modelo claro de cómo tiene lugar el transporte de carga desde el TGN. Un primer modelo postula que en las membranas del TGN se produce todo el proceso de segregación y clasificación de la carga y su posterior incorporación a las diferentes rutas post-Golgi. Un segundo modelo sería aquel en que este proceso de clasificación tendría lugar en las estructuras túbulovesiculares que emergen del TGN. Un tercer modelo postula que la carga secretora va desde el TGN hasta el sistema endosomal donde tiene lugar su clasificación final (membrana plasmática, lisosomas) (Rodríguez-Boulán y Müsch, 2005).

5 Maquinaria molecular responsable de la formación de túbulos

Poco se conoce sobre la maquinaria molecular implicada en la formación de túbulos, la cual está empezando a ser dilucidada. El uso de moléculas, fármacos y condiciones experimentales que estimulan o inhiben la formación de túbulos está proporcionando importantes pistas sobre la función y los mecanismos de formación de estos ITs.

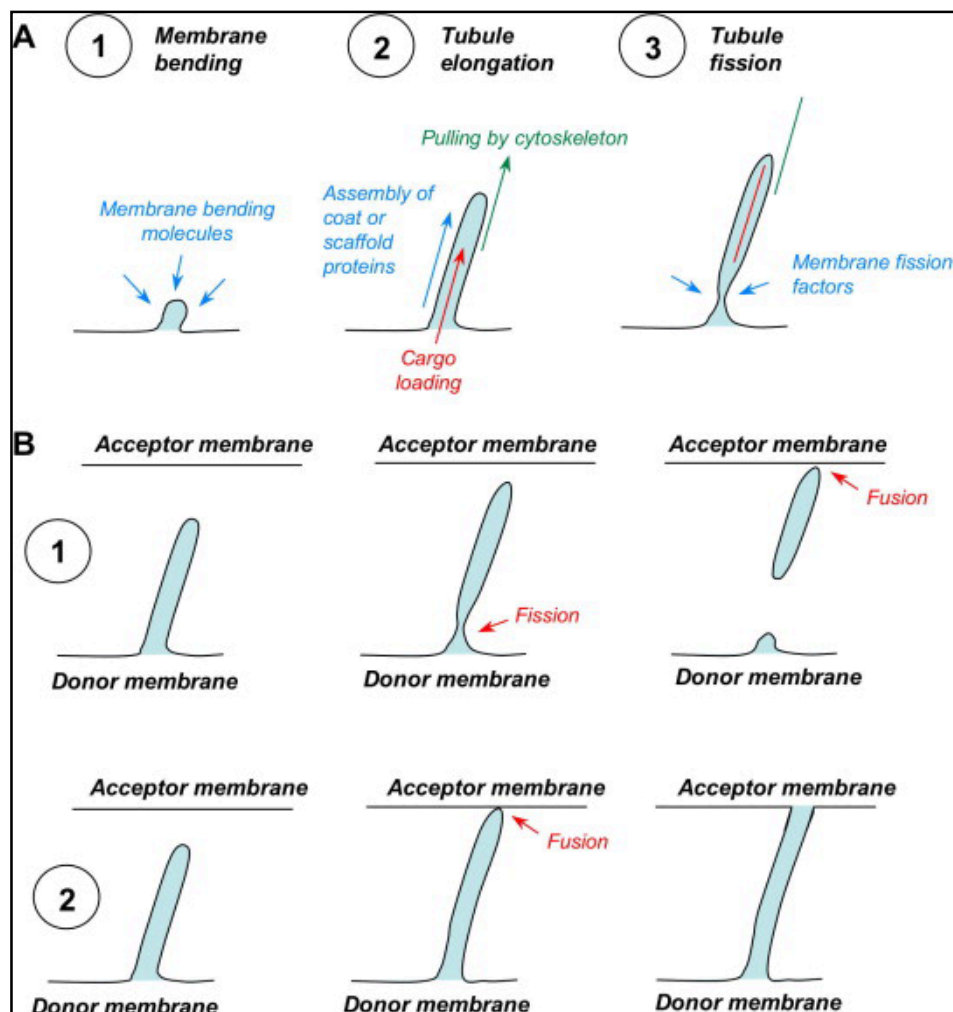


Figura 12. Mecanismo de formación de un IT tubular. A. Principales etapas de formación. 1) Deformación de la membrana donadora mediante moléculas que curvan la membrana. 2) Elongación del tubo mediado por componentes del citoesqueleto y por proteínas de cubierta a la vez que se recluta la carga. 3) Desprendimiento del tubo de la membrana donadora mediante factores de fisión. **B. Formación de dos tipos de ITs tubulares.** 1) Formación de un tubo disociativo, cuando el proceso de fisión se anticipa al de fusión. 2) Formación de una conexión entre membranas, cuando la fusión se produce mientras el IT está unido a la membrana donadora. Este evento de fusión conecta las membranas de dos compartimentos a través de un canal tubular (estable o transitorio), que puede ser utilizado para el intercambio tanto de proteínas como de lípidos. (Polishchuk et al., 2009).

Se sabe que la formación de un IT tubular debe ir acompañada del reclutamiento de la carga que va a transportar. De hecho, las conexiones tubulares inter-cisternas, que en condiciones normales son escasas, se ven incrementadas cuando se estimula la actividad secretora (Marsh et al., 2004; Trucco et al., 2004; San Pietro et al., 2009), apoyando la idea de que la carga puede estimular la formación de túbulos.

La deformación de la membrana para formar túbulos puede requerir de una composición específica de lípidos de membrana o la participación de proteínas generadoras de curvatura de membrana (Figura 12). Dichas proteínas pueden ser usadas como andamiaje/cubierta o pueden inducir la deformación de la membrana mediante la inserción de una hélice anfipática en la bicapa (ver apartado 7). Sólo algunas proteínas generadoras de curvatura por el mecanismo del andamiaje pueden generar curvatura por sí mismas (proteínas que tienen el dominio BARS y dinamina). Para las otras proteínas generadoras de curvatura, parece que tendrían que operar junto con otros mecanismos (Zimmerberg y Kozlov, 2006). Así, por ejemplo, las proteínas relacionadas con la formación, mantenimiento y desacoplamiento de las cubiertas COPI se han relacionado con la formación de estructuras tubulares en las membranas del complejo de Golgi (Kreis, 1992). En el *cis*-Golgi, la oligomerización de las proteínas del coatómero COPI es capaz de doblar la membrana e iniciar la formación de un túbulo. De hecho, se han observado en los extremos de algunos túbulos del CGN cubiertas de tipo COPI (Weidman et al., 1993; Martínez-Alonso et al., 2013).

Los primeros indicios sobre la maquinaria molecular implicada en la formación de túbulos provienen de estudios con BFA (Klausner et al., 1992). En presencia de esta droga fúngica todos los subcompartimentos del complejo de Golgi se ven afectados, incluido el TGN. Los túbulos inducidos por BFA median la fusión de las membranas del complejo de Golgi con las del RE y las del TGN con las de los endosomas. Estos túbulos contienen proteínas de la matriz a los 2-3 minutos de que se inicie la formación de túbulos y a continuación (3-10 minutos) proteínas transmembrana (Mardones et al., 2006). Después de un intenso análisis de la acción de BFA sólo ha sido aclarado parcialmente el mecanismo por el que induce tubulación. Se sabe que esta toxina induce el desacoplamiento de las membranas de las cubiertas COPI (Klausner et al., 1992). La principal diana de esta droga es la proteína GBF1, el factor intercambiador de GTP de Arf1 (García-Mata et al., 2003). Así, la interacción entre BFA y GBF1 impide la activación de la GTPasa Arf1 y por tanto la posterior formación de vesículas COPI. Además, BFA causa la ADP-ribosilación de

CtBP/Bars50 (Mironov et al., 1997). CtBP/Bars50 es una enzima implicada en la transferencia de palmitato procedente de palmitoil CoA a LPA. Este evento de ADP-ribosilación podría contribuir a la formación de los túbulos de BFA, por un mecanismo que implica cambios en la curvatura de la membrana, debido a la reducción en la actividad CtBP/Bars50 (Weigert et al., 1999). Aunque este sistema es artificial, se cree que los túbulos inducidos por BFA representan una exageración de los túbulos que de forma natural median el transporte retrógrado entre el complejo de Golgi y el RE. Por tanto, esta droga podría exagerar un mecanismo que opera en la célula en condiciones fisiológicas. En general, los experimentos con BFA sugieren que la generación de túbulos parece ser una característica de las membranas del complejo de Golgi y que las cubiertas COPI regulan esta formación (Klausner et al., 1992; Kreis, 1992; Lowe y Kreis, 1998). Sin embargo, los túbulos inducidos por BFA se forman en membranas desprovistas de COPI, por lo que los túbulos inducidos por BFA podrían ser representativos de rutas de transporte retrógrado Golgi-RE independientes de COPI. El transporte de la toxina Shiga y de las enzimas de glicosilación del Golgi es otro ejemplo de transporte retrógrado que no requiere cubiertas COPI, sino que es dependiente de Rab6 (White et al., 1999; Liu y Storrie, 2012).

Muchos datos experimentales apoyan la idea de que la maquinaria molecular relacionada con las cubiertas COPI está involucrada en la formación de túbulos. La forma activa de Arf1 unida a GTP es capaz de inducir túbulos en liposomas enriquecidos en PI(4P) (fosfatidilinositol-4-fosfato) o PI(4,5)P (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), debido a la inserción de la hélice anfipática de su extremo amino-terminal (Krauss et al., 2008). El compuesto químico Exo1 induce una tubulación masiva del complejo de Golgi y su posterior fusión con el RE. Este compuesto químico, al igual que BFA, modifica la actividad GTPasa de Arf1, pero por un mecanismo distinto que no requiere de la ADP-ribosilación de CtBP/Bars50 (Feng et al., 2003). Por otro lado, el silenciamiento génico de GBF1 induce una extensa tubulación del *cis*-Golgi, el cual conecta con elementos periféricos del ERGIC (Szul et al., 2007). La tubulación del complejo de Golgi también se observa en células donde el reclutamiento de COPI ha sido inhibido mediante el silenciamiento de Arf1 y Arf4 (Volpicelli-Daley et al., 2005). También, el cultivo celular en condiciones hipoosmóticas, que inhibe las funciones de COPI, induce la tubulación del ERGIC y del *cis*-Golgi (Lee y Linstedt, 1999). Otro caso en el que COPI está involucrado en la formación de túbulos es la incubación de complejos de Golgi aislados con una fracción citosólica que contiene niveles de ATP reducidos. En esta condición experimental, las cubiertas COPI se despegan de las membranas, lo que induce una tubulación dependiente de energía (Cluett et al., 1993).

Por último, la sobreexpresión del KDELR, el cual está implicado en el reciclaje de proteínas dependiente de COPI desde el complejo de Golgi hasta el RE, induce el mismo efecto que BFA, incluyendo la redistribución de las cubiertas COPI y la tubulación del complejo de Golgi (Hsu et al., 1992).

Otra condición experimental que induce tubulación de las membranas del complejo de Golgi es la baja temperatura. La utilización de diferentes temperaturas de incubación de las células en cultivo es una herramienta de trabajo ampliamente utilizada en estudios sobre el transporte en la vía secretora. Diferentes temperaturas de incubación inducen el bloqueo del transporte a diferentes niveles. Así, cuando las células son incubadas a 4°C la carga se ve bloqueada en su salida del RE, el cultivo a 15°C induce el bloqueo a nivel del ERGIC mientras que a 20°C se produce a nivel del TGN. De esta manera, cuando las células son incubadas a 15°C se induce el bloqueo del transporte a nivel del compartimento intermedio, de manera que la salida de la carga desde el ERGIC se ve inhibida a la vez que existe un transporte ralentizado entre el RE y el ERGIC (Martínez-Alonso et al., 2013). Curiosamente, este proceso induce una extensa tubulación de las membranas del complejo Golgi (Figura 13). En contraste con los túbulos inducidos por BFA, estos túbulos están enriquecidos en unas moléculas (enzimas residentes de Golgi) pero no en otras (carga anterógrada y retrógrada y proteínas de matriz) (Martínez-Alonso et al., 2005). Además, en estos túbulos están presentes proteínas Rab y SNARE específicas del transporte intra-Golgi, pero no del transporte entre el RE y el complejo de Golgi (Martínez-Alonso et al., 2007). Estos datos apoyan la idea de que los túbulos inducidos a baja temperatura podrían ser representativos de aquellos intermediarios que operan a nivel intra-Golgi. Tal y cómo se ha descrito para BFA, la formación de estos túbulos podría depender también del desacoplamiento de las cubiertas COPI de las membranas. Sin embargo, la liberación de COPI a baja temperatura es un proceso muy lento en comparación con el tratamiento con BFA, el cual solo dura unos segundos, por lo que una mayor investigación es necesaria para clarificar este punto.

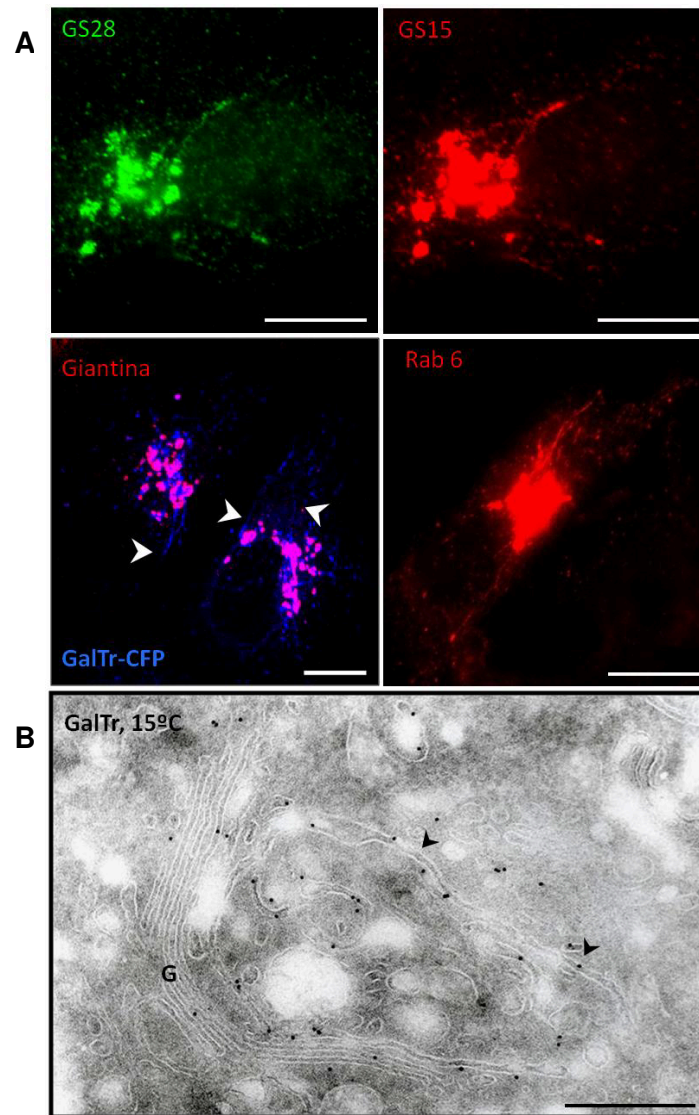


Figura 13. Túbulo inducidos a baja temperatura. A) Imágenes de inmunofluorescencia donde se muestra el contenido de los túbulo inducidos a baja temperatura (15°C). Estos contienen las proteínas SNARE GS28, GS15 y la proteína Rab6, implicadas en el transporte intra-Golgi. Además, contienen la enzima residente del Golgi galactosaminil transferasa pero no la proteína de matriz giantina. **B)** En la imagen de criomicroscopía electrónica se muestra la enzima galactosaminil transferasa inmunomarcada con oro coloidal. Barra de calibrado A) 20 μm y B) 200 nm. (Modificado de Martínez-Alonso et al., 2007 y Martínez-Alonso et al., 2013).

Al contrario que las vesículas, los túbulo requieren de una extensa elongación de la membrana, la cual depende del citoesqueleto. De esta manera, se ha visto que los túbulo inducidos por BFA son dependientes de microtúbulo (Lippincott-Schwartz et al., 1990), mientras que los túbulo inducidos a baja temperatura además necesitan actina (Martínez-Alonso et al., 2005). De hecho, las proteínas motoras asociadas a microtúbulo son suficientes para inducir la tubulación de las membranas del complejo de Golgi (Roux et al., 2002). También se ha demostrado que el ensamblaje lateral de los dictiosomas mediado por túbulo producido tras la fragmentación de la cinta del

Golgi en mini-dictiosomas, es dependiente del transporte de microtúbulos mediado por dineína (Judson y Brown, 2009).

Se sabe que los ITs de naturaleza tubular relacionados con el tráfico RE-Golgi y post-Golgi requieren de la fisión y el desprendimiento del compartimento donador y la posterior fusión con la membrana diana. Los túbulos involucrados en el transporte intra-Golgi podrían operar de la misma forma. En este caso, los eventos de fisión deben ocurrir en la cisterna donadora. Los túbulos también podrían establecer conexiones permanentes entre cisternas, no siendo necesario ningún proceso de fisión, o bien establecer conexiones transitorias entre cisternas. Así, un túbulo podría crecer desde una cisterna y fusionarse transitoriamente con la cisterna diana antes de que la fisión tenga lugar (Figura 12B). Se podría especular que este es el caso de los túbulos que operan en el transporte intra-Golgi. Curiosamente, la mayoría de los túbulos inducidos a baja temperatura crecen y luego disminuyen sin haberse desprendido de las membranas del complejo de Golgi (Martínez-Alonso et al., 2007). Cabe decir que este mismo comportamiento se ha observado en los túbulos que se producen en condiciones fisiológicas.

6 Papel de los lípidos en la estructura y dinámica de las membranas

La bicapa lipídica representa el elemento fundamental de la estructura y las propiedades generales de todas las membranas celulares (Polishchuk et al., 2009). Durante las diferentes etapas de la biogénesis de un IT, es necesario deformar esta membrana. La membrana adquiere diferentes tipos de curvatura que vienen determinados por las propiedades de la propia membrana. Los lípidos de membrana juegan un papel importante en este proceso de formación de un IT, ya que además de afectar la curvatura de la membrana pueden reclutar proteínas en la membrana y modular las funciones de estas.

Existen múltiples especies lipídicas en las biomembranas eucariotas debido a la gran variedad de cabezas polares y cadenas alifáticas existentes. Los lípidos de membrana pueden clasificarse en tres grupos: glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides (Holthuis y Levine, 2005; van Meer et al., 2008) (Figura 14). La estructura básica de los glicerolípidos consta de una molécula de glicerol con dos ácidos grasos unidos al carbono sn-1 y sn-2, formando DAG. Las cadenas de ácidos grasos pueden presentar uno o varios dobles enlaces *cis*. A esta estructura básica se le puede unir un grupo fosfato en el carbono sn-3 del glicerol, formando PA y, a este fosfato una molécula 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)). Los esfingolípidos, cuya porción hidrofóbica es la ceramida, presentan sólo una cadena saturada de ácido graso y también se le pueden unir un grupo fosfato y un grupo como la colina para formar la esfingomielina. A la ceramida también se le pueden unir grupos de azúcares para formar la glucosilceramida o la galactosilceramida. Por último, los esteroides, cuya porción hidrofóbica es un anillo esteroide plano, siendo el más abundante de ellos el colesterol. La hidrólisis de los fosfolípidos estructurales produce lípidos biológicamente activos como la lisofosfatidilcolina, el ácido lisofosfatídico (LPA), PA y DAG que derivan de los glicerolípidos y como la esfingosilfosforilcolina, la esfingosina, la esfingosina-1-fosfato, la ceramida-1-fosfato y la ceramida que derivan de los esfingolípidos.

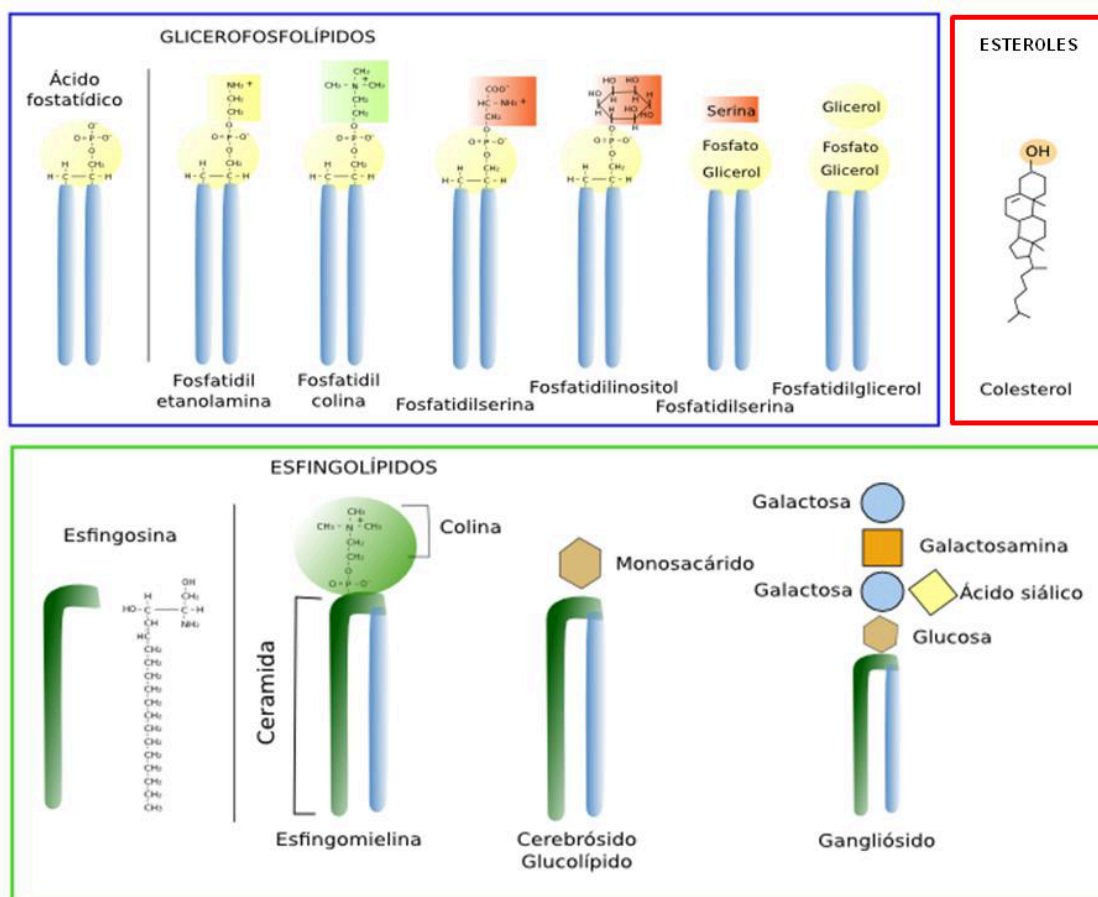


Figura 14. Principales lípidos presentes en las membranas celulares. Estructura y ejemplos de los glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides cuya molécula básica es el glicerol, la esfingosina y el anillo plano, respectivamente. (Modificado de <http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/imagenes/membrana-lipidos.png>)

Los lípidos de membrana, debido a su carácter anfipático, forman bicapas en las que las cabezas hidrofílicas se exponen al medio exterior (hacia el medio acuoso) mientras que las colas hidrofóbicas se orientan hacia el interior. Esta distribución lipídica genera una estructura estable y dinámica que se deforma ajustándose a las necesidades celulares. De esta manera, los lípidos proporcionan a las membranas la capacidad de gemación, tubulación, fisión y fusión, propiedades que son esenciales para el movimiento celular, la división celular y el tráfico de membranas intracelular (Voet y Voet, 1995). Los lípidos, en función del tamaño de las regiones polar y apolar, adaptan su contorno a una forma geométrica similar a un cilindro, un cono o un cono invertido (Figura 15). De este modo, los lípidos con una cabeza polar que ocupa la misma área que las cadenas hidrocarbonadas se denominan lípidos cilíndricos. Los lípidos con una cabeza polar grande que ocupa más área que las cadenas hidrocarbonadas son los lípidos conos invertidos que forman estructuras convexas (Figura 15). Los lípidos con una cabeza polar pequeña que ocupa menos que el área de las cadenas hidrocarbonadas son los lípidos cónicos y forman estructuras cóncavas (Figura 15). Además, la forma final que adquiere un lípido también depende de la longitud y grado de saturación de los ácidos grasos, de las interacciones intramoleculares con lípidos vecinos y de otros factores como la temperatura y el pH. Finalmente, la suma de estos lípidos determina el nivel de empaquetamiento de las membranas, considerándose “membrana muy empaquetada” (la membrana es compacta y rígida) cuanto más abundante es en número de lípidos cilíndricos y “membrana poco empaquetada” (la membrana es más flexible y fluida) cuando está compuesta principalmente de lípidos cónicos o lípidos cónicos invertidos.

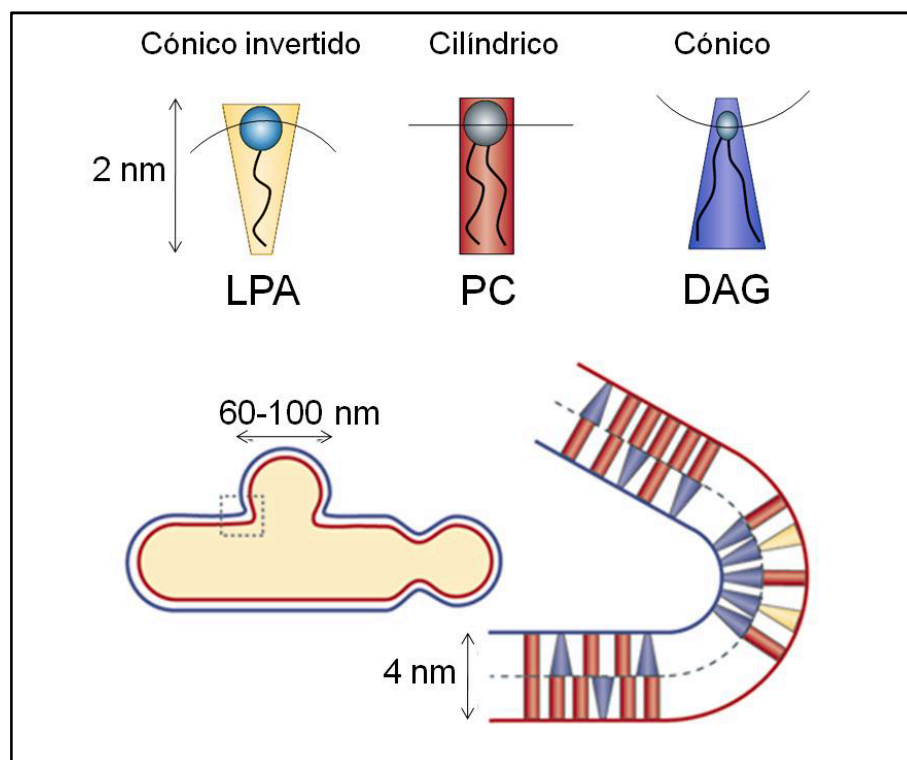


Figura 15. Lípidos y curvatura. Según su fórmula molecular los lípidos pueden generar curvatura en las membranas biológicas. Los lípidos cilíndricos (rojo), como la fosfatidilcolina (PC), generan membranas planas; los lípidos cónicos (azul), como diacilglicerol (DAG) generan curvatura negativa; y los lípidos cónicos invertidos (amarillo), como ácido lisofosfatídico (LPA), inducen curvatura positiva. La línea continua simboliza la curvatura de la membrana que genera cada tipo de lípido. La membrana es compacta en microdominios ricos en lípidos estructurales y, es poco compacta en microdominios ricos en lípidos cónicos y cónicos invertidos. (Modificado de Sprong et al., 2001).

7 Conceptos de curvatura y mecanismos de deformación de membrana

Se define como curvatura positiva a aquella en la que la membrana se curva hacia el citoplasma; curvatura negativa en la que se curva hacia el lumen y curvatura cero es aquella en la que la membrana se mantiene plana (Figura 16). Los lípidos con forma de cono invertido generan curvatura positiva en la membrana, como DAG y PA; mientras que los lípidos con forma de cono inducen curvatura negativa, como LPA. Los lípidos con forma de cilindro, como PC, forman membranas planas y compactas (Figura 15). En las primeras etapas de la gemación, la curvatura de la membrana es positiva. Sin embargo, en las etapas tardías coexisten diferentes tipos de curvatura siendo positiva en el cuerpo de la vesícula, negativa en el cuello y la interfase de la membrana donadora y cero en la zona más invaginada (McMahon y Gallop, 2005). Estos tipos de curvatura se forman y rompen constantemente por la interconexión entre lípidos y proteínas.

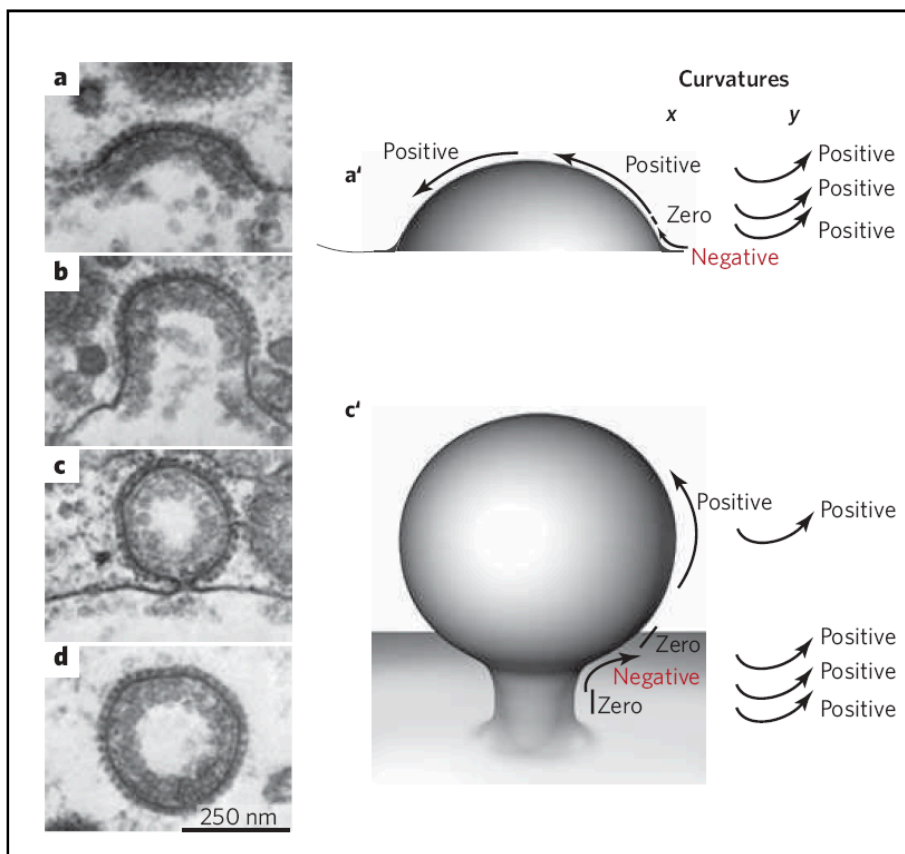


Figura 16. Curvaturas de membrana. Las diferentes etapas en la formación de vesículas con cubierta (a-d) muestran la progresión de la invaginación y las correspondientes curvaturas (a'-c') de membrana (McMahon y Gallop, 2005).

En la membrana existen unas zonas específicas o microdominios que son susceptibles de deformarse. En estos microdominios actúan dos mecanismos complementarios que facilitan la generación de curvatura positiva y/o negativa: las fuerzas extrínsecas mediadas por el citoesqueleto y las fuerzas intrínsecas generadas por proteínas y lípidos (Farsad y De Camilli, 2003; Lippincott-Schwartz y Liu, 2003; Antonny, 2006; Gallop et al., 2006; Zimmerberg y Kozlov, 2006).

-Fuerzas extrínsecas

Los elementos del citoesqueleto intervienen directamente en la deformación de las membranas ya que una de las propiedades características de las bicapas lipídicas es que al aplicar una fuerza externa focalizada resulta en la formación de túbulos. Por ejemplo, se ha descrito que la deformación de la membrana para la formación de las vesículas COPI depende tanto de microtúbulos como de filamentos de actina (Rodríguez-Boulán et al., 2005). Mediante experimentos *in vivo* se sabe que los

microtúbulos, posiblemente en cooperación con otros factores citosólicos, regulan la dinámica de los túbulos en el complejo de Golgi después del tratamiento con BFA (Lippincott-Schwartz et al., 1990).

- Fuerzas intrínsecas

Existen tres mecanismos por el que proteínas citosólicas reclutadas en la membrana inducen curvatura en la bicapa. Uno de los mecanismos es la oligomerización de proteínas de cubierta tales como clatrina, COPI y COPII que promueven la gemación al imponer la deformación de la membrana (Lippincott-Schwartz y Liu, 2003; Antonny, 2006). Los otros dos mecanismos de deformación consisten en la inserción de una hélice anfipática en la bicapa o en la absorción de proteínas con forma cóncava (Figura 17). Se piensa que todos estos mecanismos no son excluyentes entre sí, sino que existe una interacción y cooperación entre ellos para asegurar la deformación. Por otro lado, los lípidos también favorecen la deformación de la bicapa. Uno de los mecanismos es la redistribución de éstos en el plano de la bicapa, ya que ello induce un cambio en la curvatura de la membrana. También se ha postulado que la transferencia selectiva de un determinado lípido de una hemimembrana a la otra (movimiento *flip-flop*) sería un mecanismo que facilita la gemación (Farge y Devaux, 1992). Además, ciertas especies lipídicas favorecen la curvatura por sus propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, la acumulación selectiva de DAG y PA facilita la deformación de la membrana necesaria para generar los ITs en el TGN (Baron y Malhotra, 2002; Bard y Malhotra, 2006; Yang et al., 2008). Por último, cambios en la composición lipídica mediante la acción de enzimas que generan lípidos con forma de cono o cono invertido cuya geometría facilita también la deformación de la membrana. Así, por ejemplo, en membranas con dominios enriquecidos en LPA se generarían gemas. DAG se concentraría en el cuello de la vesícula naciente y estabilizaría la geometría del cuello evitando la fisión (Shemesh et al., 2003). La rápida conversión de DAG en un lípido que promueve la fisión, como PA y/o LPA sería el último paso para romper el cuello de la membrana y liberar el IT (Kozlovsky y Kozlov, 2003). La sincronización de la conversión de DAG en PA y/o LPA podría usarse para regular las dimensiones de los ITs (Malhotra y Campelo, 2011). Es importante tener en cuenta que el metabolismo lipídico puede modificar la estructura de la bicapa de manera directa a través de la geometría de los lípidos o indirecta a través de la regulación espaciotemporal de las proteínas que forman la membrana.

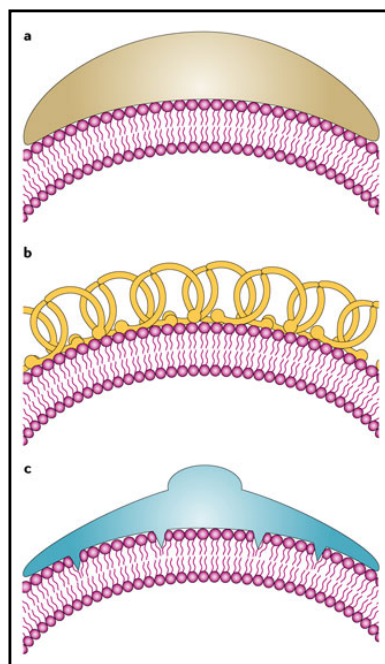


Figura 17. Mecanismos proteicos de generación de curvatura de membrana. a) Mecanismo de andamiaje. Una proteína rígida o un dominio con curvatura intrínseca (p. ej. el dominio BARS) se une a la membrana doblándola. b) Mecanismo de polimerización de proteína de cubierta (p. ej. Clatrina, COPI y COPII). c) Mecanismo de inserción de un dominio anfipático (p. ej. la hélice α anfipática de Sar1) entre las cabezas polares de los lípidos de membrana. (Zimmerberg and Kozlov 2006).

8 Glicerolípidos y enzimas modificadoras de lípidos

Los glicerolípidos más abundantes en las células son PC y PE, teniendo fundamentalmente una función estructural como componentes de las membranas celulares. A los lípidos que se encuentran presentes en bajas cantidades se les atribuyen además propiedades reguladoras. Entre estos se incluyen fosfolípidos aniónicos (como PI, PA y PS), además de DAG, el cual no tiene carga (van Meer y Sprong, 2004; Stace y Ktistakis, 2006; Di Paolo y De Camilli, 2006). Bajo condiciones normales y en una variedad de membranas biológicas, muchos, sino todos estos lípidos, se concentran en la cara citoplasmática, donde pueden controlar la interfase membrana-citosol. La cantidad relativa de cada lípido varía de un compartimento a otro y pueden estar significativamente enriquecidos en un orgánulo en particular (Stace y Ktistakis, 2006; Di Paolo y De Camilli, 2006).

Algunos glicerolípidos, como PA, LPA y DAG, son capaces de generar curvatura de membrana. LPA produce una curvatura espontánea positiva, mientras que PA tiene curvatura negativa (Kooijman et al., 2005). DAG se caracteriza por tener una fuerte curvatura negativa y por lo tanto, tiene el potencial de generar una pronunciada curvatura de la membrana (Zimmerberg and Kozlov, 2006). Como

mencionamos anteriormente, la acumulación selectiva de diferentes lípidos en las membranas con forma de cono (DAG, PA) o de cono-invertido (LPA) facilita la deformación de la membrana necesaria para iniciar la formación de un ITs (Corda et al., 2002). Así, cambios en la composición lipídica mediante la acción de enzimas, como fosfolipasas, aciltransferasas y cinasas de lípidos, pueden jugar un papel clave en la formación de túbulos.

8.1 Diacilglicerol

DAG es un lípido pequeño, sin carga, con una forma de cono muy pronunciada. La curvatura espontánea que genera en las membranas varía dependiendo de la longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada de sus dos ácidos grasos (Szule et al., 2002). De hecho, DAG es el lípido con la curvatura espontánea más negativa medido hasta el momento. Entre todos los lípidos de membrana se considera que DAG es clave para regular el transporte asociado al complejo de Golgi. Entre otras funciones, es necesario para el transporte de proteínas desde el complejo de Golgi a la membrana plasmática, tanto en levaduras (Bankaitis et al., 1990) como en mamíferos (Baron y Maholtra, 2002). En estos últimos, la proteína cinasa D (PKD) regula la fisión de los ITs destinados específicamente a la superficie celular, siendo su unión a las membranas del TGN dependiente de DAG (Baron y Maholtra, 2002). Estudios realizados usando el compuesto propranolol (inhibidor de la cinasa de DAG (DGK)) han indicado que DAG participa en el transporte retrógrado, estando relacionado con pasos tempranos (formación) y tardíos (fisión) de la formación de vesículas y túbulos (Fernández-Ulibarri et al., 2007, Asp et al., 2009). Recientes estudios indican que LPP3, una enzima asociada al complejo de Golgi que genera DAG a partir de PA, está implicada en el transporte retrógrado Golgi-RE mediado por túbulos (Gutiérrez-Martínez et al., 2013).

8.2 Ácido lisofosfatídico

Este lípido tiene una forma efectiva de cono invertido con curvatura espontánea positiva. La conversión de LPA en PA por la acción de la fosfolipasa A (PLA), resulta en la transformación de la forma de la molécula desde cono invertido a cono, y por lo tanto, en un cambio en la curvatura molecular espontánea de positiva a negativa. Se sabe que LPA puede aumentar la curvatura positiva en la cara citosólica de las membranas de orgánulos, produciendo la formación de túbulos (Brown et al., 2003).

Las enzimas PLA2 constituyen una extensa superfamilia de enzimas que catalizan la hidrólisis de glicerolípidos generando LPA y un ácido graso. Estas enzimas se clasifican en diferentes clases en función de su dependencia o independencia de calcio (Burke y Dennis, 2009). Activadores de la isoforma PLA2, como el polipéptido citotóxico de abeja (melitina) o el péptido activador de PLA2 (PLAP), acentúan la tubulación (Polizotto et al., 1999). Un miembro citosólico de esta familia enzimática, la cPLA2 α está involucrada en la formación de conexiones tubulares heterotípicas entre cisternas (San Pietro et al., 2009). Curiosamente, la actividad de esta enzima es necesaria para el mantenimiento del transporte intra-Golgi. El complejo PAFAH 1b (acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas 1b), que contiene cPLA2, regula la formación de túbulos de membrana y el movimiento de estos a lo largo de microtúbulos (Bechler et al., 2010). LPA generado por la enzima PLA2 se ha relacionado también con el ensamblaje lateral de los dictiosomas mediado por túbulos (Judson y Brown, 2009). Además, se ha visto que la actividad de la enzima PLA2 es necesaria para la iniciación de la formación de ITs tubulares en el TGN (Schmidt et al., 2010). LPA generado por la PLA2 se ha relacionado en el transporte retrógrado desde el complejo de Golgi hasta el RE. Así, la adición de un inhibidor de la PLA2, que impide la formación de LPA a partir de PA, inhibe el transporte retrógrado entre el complejo de Golgi y el RE (de Figueiredo et al., 2000). El compuesto CI976, un antagonista (efecto inhibidor) de la enzima aciltransferasa de lisofosfolípidos (LPAT) asociada al complejo de Golgi que incrementan los niveles de LPA, induce tubulación de las membranas del complejo de Golgi y la fusión de estas con el RE (Drecktrah et al., 2003).

8.3 Ácido fosfatídico

Este lípido constituye aproximadamente entre el 1 y el 5% del total de los lípidos celulares (Athenstaedt y Daum, 1999; Stace y Ktistakis, 2006). A pH fisiológico y mezclado con otros lípidos, PA presenta una forma cónica con una curvatura espontánea moderadamente negativa (Fuller y Rand, 2001). Se producen cambios en la forma de la membrana cuando la cantidad de PA es superior al ~0,2% del total de lípidos en la membrana, produciendo un efecto máximo a un nivel de ~0,6% (Kooijman et al., 2005). Es un fosfolípido iónico cargado negativamente capaz de reclutar a las membranas proteínas cargadas positivamente. Así, sirve como sitio de unión de proteínas que tienen regiones ricas en aminoácidos básicos, y además, puede actuar como un regulador alostérico de las proteínas reclutadas. Hasta el momento, se han

encontrado 58 proteínas y 5 lípidos con los que PA es capaz de interactuar (Jang et al., 2012).

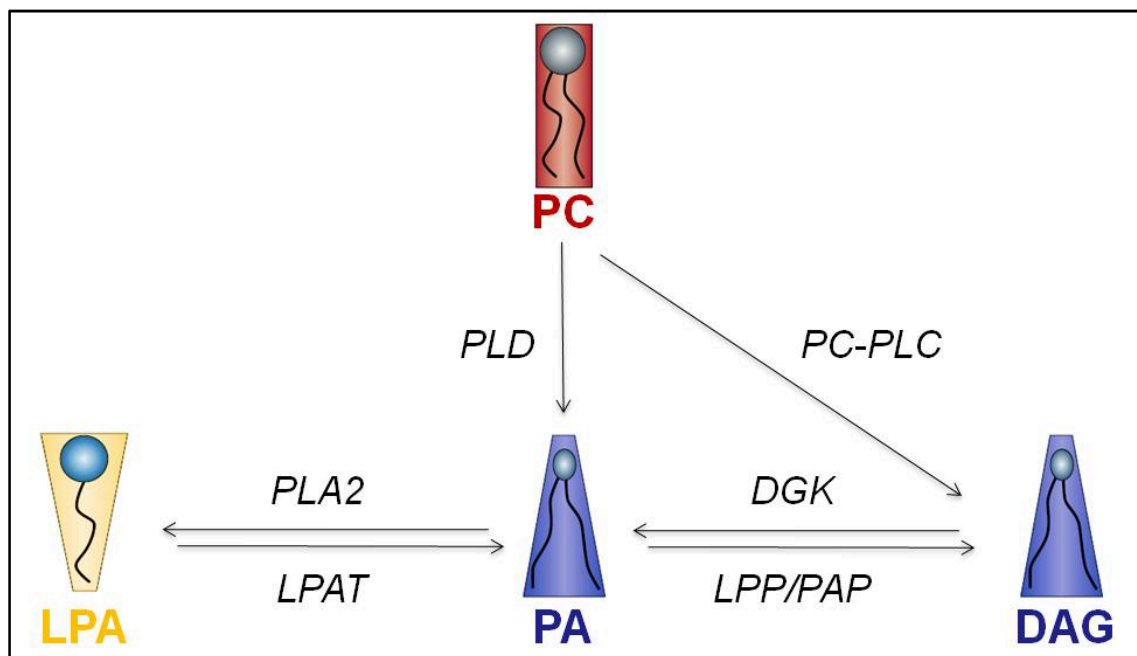


Figura 18. Vías de síntesis de glicerolípidos en el complejo de Golgi. PC, fosfatidilcolina; LPA, ácido lisofosfatídico; PA, ácido fosfatídico; DAG, diacilglicerol; PLD, fosfolipasa D; LPAT, transferasa de LPA; PLA, fosfolipasa A; DGK, cinasa de DAG; LPP/PAP, fosfatasa de lípidos fosfato/ fosfatasa de PA; PC-PLC, fosfolipasa C específica de PC.

Existen diferentes vías alternativas por las que se puede generar PA (Figura 18). La vía de síntesis de la especie molecular de PA más relevante para el tráfico de membranas tiene que ver con la enzima PLD, la cual, hidroliza PC para producir PA (Jenkins y Frohman, 2005). En general se acepta que PA tiene una vida media muy corta en las membranas intracelulares, ya que rápidamente es desfosforilado por la enzima LPP/PAP (fosfatasa de lípidos fosfato/ fosfatasa de PA) para formar DAG (Nanjundan y Possmayer, 2003). Una vía alternativa para la generación de PA es a partir de DAG por la acción de la enzima DGK (Topham, 2006). Aunque no hay claras evidencias del papel de la DGK en el tráfico de membranas, dada la implicación tanto de DAG como de PA en estos procesos, su participación es muy probable.

PA es un lípido intracelular mediador de muchas de las funciones biológicas atribuidas a PLD. PA está directa o indirectamente implicado en el tráfico de vesículas y procesos de secreción y endocitosis en varios tipos celulares. Puede estar involucrado en múltiples aspectos de la fusión y fisión de membranas, ya que puede

actuar como efector de proteínas y modificar las propiedades biofísicas de las membranas (Jenkins y Frohman, 2005). La hidrólisis de PC por la vía de la enzima PLD, da lugar a la transformación de un lípido cilíndrico en otro cónico que favorece la curvatura negativa de la membrana (van Meer y Sprong, 2004; Jenkins y Frohman, 2005). La ruptura de PA por lipasas da origen a LPA (con forma de cono invertido) que puede contribuir a disminuir la energía requerida para la formación de una gema y/o la fusión de membranas. Además, se ha visto que PA generado por PLD2, en cooperación con la proteína BARS induce la curvatura de membrana necesaria para la fisión de las vesículas COPI del complejo de Golgi (Yang et al., 2008).

8.2 Fosfolipasa D

La enzima PLD (EC 3.1.4.4) cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster de fosfolípidos estructurales (PC, PE, etc.) generando PA y componentes de bajo peso molecular solubles en agua de tipo colina o etanolamina. Esta enzima modificadora de lípidos está implicada en muchas funciones celulares, como la supervivencia celular, proliferación, organización del citoesqueleto, endocitosis y exocitosis, diferenciación y defensa (Wang et al., 2006; Selvy et al., 2011; Jang et al., 2012). Las alteraciones en la expresión de PLD se han asociado con varias enfermedades como cáncer y neurodegeneración (Peng y Frohman, 2012).

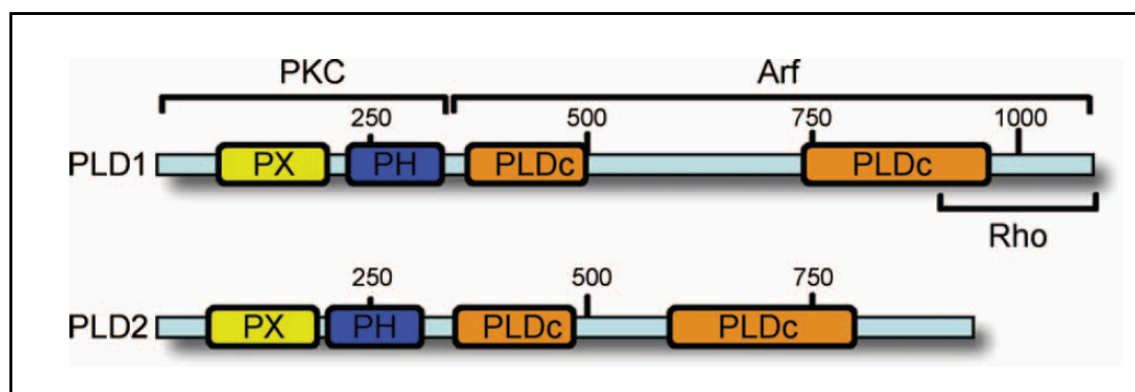


Figura 19. Organización de los dominios de las isoformas de la fosfolipasa D. PLD1 y PLD2 contienen el dominio N-terminal PX seguido de cerca del dominio PH y por uno de los dominios catalíticos, PLDc. El dominio PX une fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. El dominio PH une PI(4,5)P₂ que modula la actividad de la enzima. Una secuencia básica en el segundo dominio PLDc une PI(4,5)P₂ que modula la actividad de la enzima. Ambas PLDs son activadas por PKC, Arfs y Rho. (Roth, 2008).

En mamíferos, los miembros de esta familia son PLD1 (Hammond et al., 1995) y PLD2 (Colley et al., 1997). Más recientemente, se ha descrito una PLD atípica en la membrana externa de las mitocondrias, conocida como mitoPLD, que hidroliza cardiolipina para generar PA. Esta enzima interviene en procesos de fusión de las mitocondrias (Choi et al., 2006). PLD1 y PLD2 están ampliamente expresados (Kim et al., 2007) y comparten el 50% de homología (Colley et al., 1997). Estas isoformas comparten la misma organización básica de dominios (Figura 19). Poseen los dominios de unión a lípidos PX (*phox homology domain*) y PH (*pleckstrin homology domain*) en el extremo amino terminal, seguidos de dos secuencias con el motivo catalítico HKD, los cuales dimerizan constituyendo el centro activo (Kolesnikov et al., 2012). El dominio PX contiene dos sitios de unión a fosfolípidos de membrana: uno de ellos es altamente específico para PI(3)P, PI(5)P, PI(3,4,5)P₃ y otros fosfoinosítidos, mientras que el otro sitio de unión también se une a PA, PS y otros lípidos cargados negativamente. La unión simultánea de fosfolípidos con los sitios de unión mencionados aumenta sinérgicamente la afinidad del dominio PX con las membranas (Baron y Malhotra, 2002). El dominio PX de PLD1 se une selectivamente a PI(5)P, promoviendo la translocación de la enzima a las membranas de vesículas endocíticas (Liu et al., 2007). El dominio PH es importante para la localización de PLD en las membranas. Este dominio se une a PI(4,5)P₂ (Hodgkin et al., 2000; Sciorra et al., 2002; Sugars et al., 2002). Una secuencia básica localizada en el dominio catalítico HKD de PLD se une fuertemente a PI(4,5)P₂ y esto aumenta la actividad catalítica (Du et al., 2003). Así, PI(4,5)P₂ tiene una doble función en la regulación de PLD, por un lado la localización subcelular de PLD por la unión al dominio PH, y por otro la regulación de la actividad de PLD por la estimulación de la catálisis por el motivo polibásico del dominio catalítico HKD (Sciorra et al., 2002).

Existe controversia en cuanto a la localización subcelular de las isoformas de PLD. En experimentos de sobreexpresión se ha localizado a PLD1 en el RE y el complejo de Golgi (Colley et al., 1997), endosomas y lisosomas (Brown et al., 1998; Tocla et al., 1999) y en gránulos secretores (Brown et al., 1998). PLD2 exógena se ha encontrado en la membrana plásmática y vesículas endocíticas (Colley et al., 1997). Las isoformas endógenas son poco abundantes y su localización parece ser dinámica y cambiar de compartimento subcelular en respuesta a estímulos (Jang et al., 2012). La distribución de estas isoformas también varía según el tipo celular (Meier et al., 1999; Gibbs y Meier, 2000). PLD1 y PLD2 tienen localizaciones diferentes en la célula en general y en el complejo de Golgi en particular. Se ha demostrado mediante microscopía electrónica y fraccionamiento subcelular que el 25-30% de PLD1

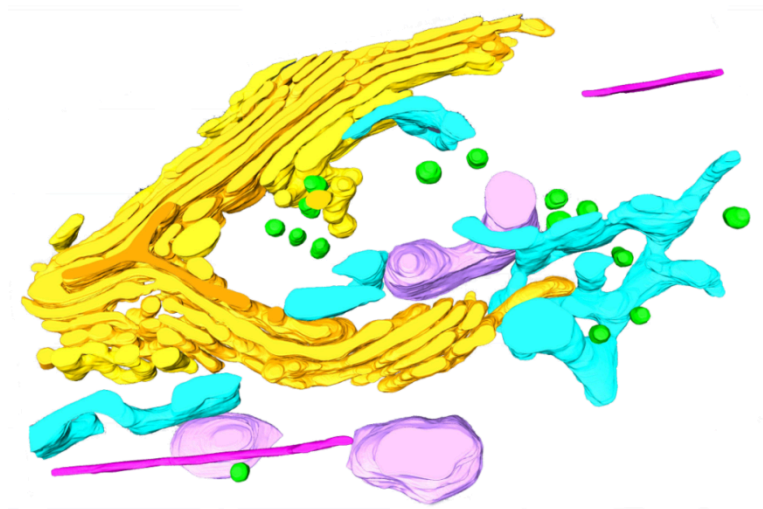
endógena se localiza en el complejo de Golgi. PLD2 endógena está presente en la membrana plasmática, en la región del complejo de Golgi y en el citosol (Freyberg et al., 2002). Se ha demostrado que PLD2 está presente casi exclusivamente en los extremos de las cisternas del complejo de Golgi en células GH3 de pituitaria, estando 80 veces enriquecidas en los extremos de las cisternas respecto a las cisternas (Freyberg et al., 2002).

Ambas isoformas requieren para su actividad PI(4,5)P₂ como cofactor. Sin embargo, PLD1 y PLD2 exhiben propiedades reguladoras bastante diferentes. PLD1 presenta baja actividad basal, y es activada fuerte y sinérgicamente por miembros de la superfamilia de las Ras GTPasas (Arf, Rho y Rac) (Cockcroft, 2001). Arf1 activa a PLD1 (Hammond et al., 1995; Kim et al., 1998) y PLD2, aunque el efecto de Arf1 en PLD2 es débil (López et al., 1998; Sung et al., 1999). Parece que la isoforma PLD2 es insensible a los activadores de PLD1 y no se conocen en detalle los mecanismos que regulan su actividad. Se sabe que PLD2 sobreexpresada heterológamente presenta una alta actividad basal, mientras que en la enzima endógena esta actividad es baja. Se cree que PLD2 es constitutivamente activa y estaría regulada *in vivo* por proteínas inhibitoras que disminuyen su actividad basal (Colley et al., 1997; Jenco et al., 1998; Cockcroft et al., 2002). PLD puede ser fosforilada por PKC (proteína cinasa C), EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), Src (proteína tirosina cinasa) y JAK3 (Janus cinasa 3) (Henkels et al., 2010; Gómez-Cambronero, 2011). Sin embargo, el papel de la fosforilación de PLD por PKC, EGFR o Src es controvertido y no está bien definido (Jang et al., 2012). Se sabe que PLD1 puede ser activada por PKC α y PKC β . Las proteínas estructurales actina, tubulina y caveolina también interactúan con PLD, en la mayoría de los casos inhibiendo su actividad (Jang et al., 2012).

Estudios iniciales de la función de PLD asociada al tráfico de membranas han demostrado que esta enzima interviene en la regulación del tráfico de vesículas desde el complejo de Golgi (Ktistakis et al., 1996; Chen et al., 1997; Tüscher et al., 1997). La enzima PLD y su producto están implicados en la vía endocítica (Padrón et al., 2006). Así, se ha sugerido que PLD actúa como una proteína GAP, a través de su dominio PX, activando dinamina y permitiendo la fisión de las vesículas de clatrina de la membrana plasmática (Lee et al., 2006). También participa en la secreción en células endocrinas (Siddhanta et al., 2000), en procesos de fagocitosis (Corrotte et al., 2006), en procesos de fusión de membranas (Nakanishi et al., 2006; Vicogne et al., 2006; Choi et al., 2006), y es importante para la formación de los ITs en el TGN (Bard y Malhotra, 2006). También se ha sugerido que la unión PKD-Arf en el TGN activa a PLD en un modo dependiente de Arf, de manera que PLD genera PA a partir de PC, y

este PA es convertido en LPA por la acción de PLA2 siendo este LPA necesario para la fisión de ITs en el TGN (Malhotra y Campelo, 2011).

IV MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES

A continuación se especifican los diferentes tipos de materiales usados en el desarrollo de esta tesis doctoral.

1 Reactivos

En la siguiente tabla se especifican los reactivos utilizados en este trabajo. Los reactivos no especificados se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Tabla 1. Reactivos generales usados en este trabajo.

Reactivo	Procedencia
Acetato de uranilo	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, EEUU)
Acetona	Probus (Badalona, España)
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
Alcohol absoluto	Panreac (Barcelona, España)
Azida sódica	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
Brefeldina A	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
BSA-acetilada	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
Cacodilato sódico	Fluka (Buchs, Suiza)
Cloroformo	Panreac (Barcelona, España)
Cloruro Sódico	Panreac (Barcelona, España)
Cóctel inhibidor de proteasas	Roche (Mannheim, Alemania)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco®-Thermo Fisher Scientific (California, EEUU)
Ferricianuro potásico	Merck (Darmstadt, Alemania)
Formvar	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, EEUU)
Gelatina	Merck (Darmstadt, Alemania)
Glicina	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
Glutaraldehido	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, EEUU)
Igepal	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
Medio de montaje para fluorescencia	DAKO (Glostrup, Dinamarca)

Metanol 99,5 % PS	Panreac (Barcelona, España)
Metil celulosa	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
Oxalato sódico	Probus (Badalona, España)
Paraformaldehído	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, EEUU)
PBS	Gibco®-Thermo Fisher Scientific (California, EEUU)
Proteína A-oro 10 nm	Departamento Biología Celular. Universidad de Utrecht, Holanda
Sacarosa	Probus (Badalona, España)
Saponina	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
Tetróxido de Osmio	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
Tris-HCl	Panreac (Barcelona, España)
Tween®20	Panreac (Barcelona, España)

2 Anticuerpos

En las siguientes tablas se muestran los anticuerpos empleados para las técnicas inmunofluorescencia, Western blot o croimnunomicroscopía electrónica, indicando si son monoclonales (ratón) o policlonales (conejo, cabra, burro o pollo), la dilución de trabajo y su procedencia.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Procedencia
Anti-AGPAT3/ LPAAT3	Conejo	1:10	Biorbyt (Cambridge, Reino Unido)
Anti-ArfGAP1	Conejo	1:20	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
Anti-BARS	Ratón	1:50	BD Transduction Laboratories (Erembodegem, Belgica)
Anti-BGF1	Ratón	1:5	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU)

Anti-COP II (sec23)	Conejo	1:50	Affinity BioReagents, (EEUU)
Anti-cPLA2	Conejo	1:5	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU)
Anti-GalNAcTr (T2)	Ratón	1:1	Dr. H. Clausen. University of Copenhagen, Dinamarca
Anti-Giantina	Ratón	1:500	Alexis® Biochemicals (California, Estados Unidos)
Anti-GM130	Ratón	1:200	BD Transduction Laboratories (Erembodegem, Belgica)
Anti-GRASP65	Conejo	1:400	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Anti-GS15	Ratón	1:50	BD Transduction Laboratories (Erembodegem, Belgica)
Anti-GS27 (Membrina)	Ratón	1:20	Stressgen Bioreagents (Victoria, Canada)
Anti-GS28	Ratón	1:400	BD Transduction Laboratories (Erembodegem, Belgica)
Anti-PC-PLD1	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU)
Anti-PC-PLD2	Conejo	1:20	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU)
Anti-PLD2	Ratón	1:150	No comercial. Abmart (Shanghai, China)
Anti-Rab 1A	Ratón	1:20	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU)
Anti-Rab 6	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU)
Anti-TGN46	Conejo	1:200	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Anti-YKT6p	Cabra	1:20	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU)
Anti-β'-COP	Ratón	1:100	Dr. A.A. Mironov. Mario Negri Sud, Italia

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en Western blot.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Procedencia
Anti-ArfGAP1	Conejo	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EEUU)
Anti-PLD2	Ratón	1:50	Abmart (Shanghai, China)
Anti-Rab 6	Ratón	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU)

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en croinmunomicroscopía electrónica.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Procedencia
Anti-GM130	Ratón	1:40	BD Transduction Laboratories (Erembodegem, Belgica)
Anti-PLD2	Ratón	1:70	Abmart (Shanghai, China)
Anti-Ig de ratón	Conejo	1:200	DAKO (Glostrup, Dinamarca)

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunofluorescencia y western blot.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Procedencia
Anti-cabra IgG Alexa® 488	Burro	1:400	Molecular Probes®-Thermo Fisher Scientific (California, EEUU)
Anti-conejo- IgG Alexa® 488	Pollo	1:400	Molecular Probes®-Thermo Fisher Scientific (California, EEUU)
Anti-conejo IgG Alexa® 568	Cabra	1:400	Molecular Probes®-Thermo Fisher Scientific (California, EEUU)
Anti-conejo IgG Alexa® 568	Burro	1:400	Molecular Probes®-Thermo Fisher Scientific (California, EEUU)
Anti-conejo IgG Alexa® 594	Cabra	1:400	Molecular Probes®-Thermo Fisher Scientific (California, EEUU)
Anti-ratón- IgG Alexa® 488	Cabra	1:400	Molecular Probes®-Thermo Fisher Scientific (California, EEUU)
Anti-ratón IgG Alexa® 568	Cabra	1:400	Molecular Probes®-Thermo Fisher Scientific (California, EEUU)

3 Inhibidores

En la siguiente tabla se muestran los compuestos que se han utilizado para bloquear o inhibir la actividad de enzimas modificadoras de lípidos en células con tubulación inducida.

Tabla 6. Inhibidores.

Inhibidor (nombre IUPAC)	Descripción	Concentración	Bibliografía	Procedencia
1-Butanol Butan-1-ol	Alcohol primario que bloquea fosfolipasa D	0,3% v/v	Rizzo et al., 1999	Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU)
2-Butanol 2-Methylpropan-2-ol	Alcohol usado como control de 1-butanol	0,3% v/v	Pathre et al., 2003	Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU)
CI-976 2,2-Dimethyl-N-(2,4,6-trimethoxyphenyl) dodecanamide	Inhibidor de la aciltransferasa del ácido lisofosfatídico	20 μ M	Drecktrah et al., 2003	Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU)
Propranolol (RS)-1-(isopropilamino)-3-(naftalen-1-iloxi) propan-2-ol	Inhibidor de la fosfolipasa del ácido fosfatídico	60 μ M	Fernández-Ulibarri et al, 2007	Calbiochem (San Diego, EEUU)
R59022 6-{2-[4-[(p-Fluorophenyl)phenylmethylene]-1-piperidiny]ethyl}-7-methyl-5H-thiazolo(3,2-a)pyrimidine-5-one	Inhibidor de la cinasa del diacilglicerol	20 μ M	López-Andreo et al., 2003	Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU)

VU0359595 (1R,2R)-N-([S]-1-{4-[5-bromo-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo (d) imidazol-1-yl]piperidin-1-yl}propan-2-yl)-2-phenylcyclopropanecarboxamide	Inhibidor de PLD1	10 μ M	Lewis et al., 2009	Avanti Polar Lipids (Alabaster, EEUU)
VU0364739 N-[2-[1-(3-Fluorophenyl)-4-oxo-1,3,8-triazaspiro [4.5]dec-8-yl] ethyl]-2-naphthalenecarboxamid	Inhibidor de PLD2	10 μ M	Lavieri et al., 2010	Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido)

4 Plásmidos y siRNA

En la siguiente tabla se muestra el ADN y ARN con el que se han transfectado transitoriamente las células HeLa.

Tabla 7. Plásmidos y siRNA.

Producto	Resistencia	Vector	Procedencia
PLD2	Ampicilina	pCMV6-AC-GFP	OriGene Technologies (Rockville, EEUU)
Arf1	Ampicilina	pCMV6-AC-GFP	OriGene Technologies (Rockville, EEUU)
siRNA-PLD2	-	-	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU)
Control-siRNA-A-FITC	-	-	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU)

MÉTODOS

5 Cultivo celular y tratamientos

5.1 Cultivo celular

Este trabajo se ha desarrollado utilizando células HeLa (ATTC CRM-CCL-2) en cultivo como modelo celular. Se trata de una línea celular humana procedente de un carcinoma epitelial de cérvix. Las células fueron cultivadas en monocapa en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal inactivado (56°C durante 30 min), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Las células se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm² y 25 cm² y se incubaron a 37°C en una incubadora al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Para llevar a cabo los diferentes experimentos, las células se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm² y 25 cm² (BD Falcon) o sobre cubreobjetos de vidrio estériles dentro de placas Petri estériles.

5.2 Inducción de túbulos derivados del complejo de Golgi

Para inducir la formación de túbulos derivados del complejo de Golgi las células se sometieron a los siguientes tratamientos.

Brefeldina A

Para inducir la formación de túbulos derivados del aparato de Golgi las células se trataron con 1 µg/ml de BFA recién preparada diluido en DMEM a 37°C. Como paso previo, se determinó el tiempo óptimo al cual se produce una mayor tubulación de las membranas del complejo de Golgi antes de que comience a fusionarse con las del RE. Tras estudiar distintos tiempos de tratamiento (2, 4, 6, 8 y 10 min), se determinó que a 4 min se produce la mayor tubulación, utilizándose, por tanto, este intervalo de tiempo para los ensayos.

Cultivo a baja temperatura (15°C)

Las células HeLa se incubaron en una estufa (Ing. CLIMAS, EC/E 160) a 15°C durante 45 min para inducir la formación de túbulos en el complejo de Golgi. En estos

ensayos se cuantificó el porcentaje de células con túbulos y el número medio de túbulos por célula. Cuando se analizó el cambio en la distribución de marcadores, además del cultivo a 15°C durante 45 min, las células también se cultivaron durante 3 horas, ya que tras este intervalo de tiempo el cambio en la distribución de los marcadores se puede ver acentuado (Martínez-Alonso et al, 2005).

5.3 Tratamientos farmacológicos

5.3.1 Tratamientos farmacológicos sobre células con tubulación inducida

Hemos usado diferentes inhibidores de enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos de membrana para ver el efecto que producen sobre los túbulos inducidos a partir del cultivo a baja temperatura y del tratamiento con BFA (Tabla 6). Antes de cada experimento, se crecieron las células en cubreobjetos de vidrio estériles y se incubaron con el correspondiente inhibidor recién preparado diluido en DMEM. Las concentraciones de trabajo fueron obtenidas de la bibliografía (Tabla 6), excepto en el caso de 1-butanol para el que se estableció la concentración de tratamiento óptima. Las concentraciones de trabajo utilizadas, así como la información detallada para cada inhibidor enzimático se especifican en la Tabla 6.

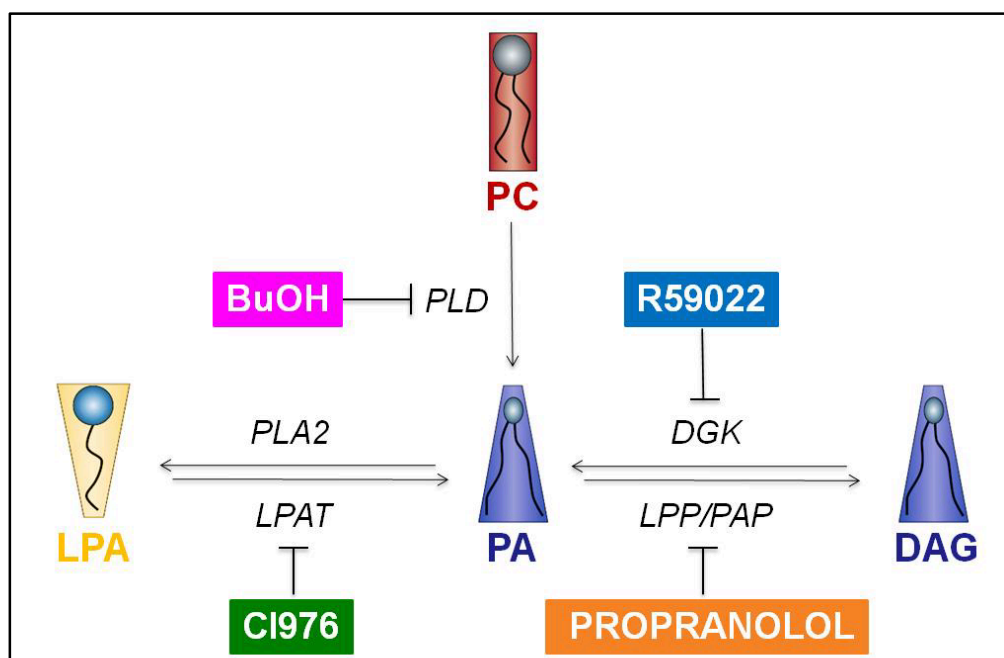


Figura 20. Enzimas involucradas en la producción de PA y DAG y los inhibidores usados en este estudio. PC, fosfatidilcolina; LPA, ácido lisofosfatídico; PA, ácido fosfatídico; DAG, diacilglicerol; PLD, fosfolipasa D; PLA2, fosfolipasa A2; LPAT, aciltransferasa de lisofosfolípidos; DGK, cinasa del DAG; LPP, fosfato fosfatasa; PAP, fosfatasa del ácido fosfatídico.

Todos estos compuestos afectan a la formación de dos lípidos biológicamente activos, como son PA y DAG (Figura 20). Los inhibidores 1-butanol, CI976 y R59022 disminuyen los niveles de PA, mientras que propranolol disminuye el nivel de DAG. Los compuestos 1-butanol y propranolol fueron utilizados en ensayos sobre células con tubulación inducida por BFA y 15°C, mientras que CI976 y R59022 fueron utilizados sobre células con tubulación inducida a 15°C.

Los experimentos se realizaron en paralelo con dos metodologías diferentes. Por un lado, la adición de la droga y la inducción de tubulación se realizaron al mismo tiempo (tratamiento simultáneo) y, por otro, las células se incubaron con el agente farmacológico durante 15 min a 37°C antes de la inducción de la formación de túbulos (pre-tratamiento). Las concentraciones de los reactivos utilizados se muestran en la Tabla 6.

5.3.2 Inhibición específica de las isoformas de la enzima PLD

Para analizar con más detalle la actividad de las distintas isoformas de PLD hemos utilizado unos compuestos recientemente desarrollados y comercializados que inhiben selectivamente las distintas isoformas de PLD humana, el inhibidor de PLD2 (VU0364739) y el inhibidor de PLD1 (VU0359595). (Figura 21).

Se prepararon solución de stock 10 nM en DMSO de los compuestos VU0359595 y VU0364739 y se almacenaron a 4°C. Inmediatamente antes de cada experimento, se prepararon a una concentración de 10 nM en DMEM.

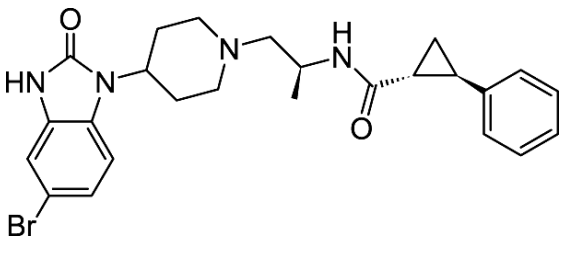
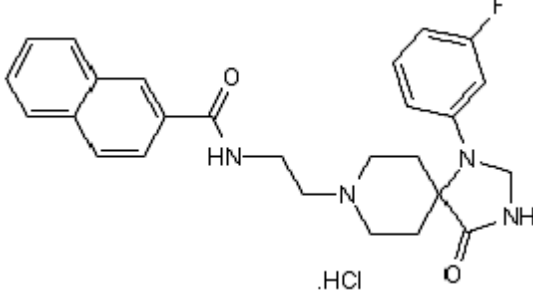
Inhibidor PLD1, VU 059595	Inhibidor PLD2, VU 0364739
	

Figura 21. Estructura molecular de los inhibidores específicos de las isoformas de la enzima fosfolipasa D.

6 Técnicas morfológicas

6.1 Inmunofluorescencia

Las técnicas inmunocitoquímicas se realizaron sobre una monocapa de células sembradas sobre cubreobjetos de vidrio estériles y crecidas hasta alcanzar un grado de confluencia del 50-70%. En primer lugar, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 min. En los experimentos de baja temperatura el fijador fue previamente atemperado a 15°C. Seguidamente, las células se lavaron con PBS durante 15 min y se bloquearon los grupos aldehído mediante una solución de PBS-Glicina 0,02 M durante 15-20 min. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con saponina 0,1% en PBS con BSA al 0,1% durante 10 min. Tras permeabilizar las células, éstas fueron incubadas con el anticuerpo primario (Tabla 2) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos fueron diluidos a la concentración de trabajo en una solución de BSA-acetilada 0,1%, glicina 0,02 M en PBS. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las células fueron lavadas con PBS durante 15 min e incubadas durante 30-40 min en oscuridad y a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 567 (Tabla 5). Por último, los cubreobjetos se lavaron con PBS durante 15 min y se montaron en un medio de montaje especial para fluorescencia (DAKO). Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot acoplado a una cámara digital (Leica DC 500). Las imágenes obtenidas fueron ajustadas mediante el empleo del software informático Adobe Photoshop CS5 Extended.

6.2 Cuantificación de complejos de Golgi tubulados y número de túbulos

En los ensayos de inmunofluorescencia, para la cuantificación de la tubulación se utilizó como marcador del complejo de Golgi la enzima N-acetilgalactosaminiltransferasa T2. Cada experimento se realizó por triplicado y se contaron al menos 100 células para cada una de las condiciones ensayadas, por tanto, se analizaron 300 células por tratamiento. El criterio seguido para la cuantificación fue considerar como célula tubulada aquella que presentaba sin ambigüedad al menos un túbulo fino conectado al complejo de Golgi (región perinuclear) sin estar fragmentado. Además, en el caso de los ensayos a 15°C, se cuantificó el número de túbulos derivados del complejo de Golgi presentes en las células, determinándose el número medio de túbulos por célula para cada condición ensayada.

En cuanto al análisis estadístico, se aplicó la prueba paramétrica del test t de Student para el estudio comparativo entre diferentes grupos. Se utilizaron valores de $P < 0,05$ para determinar la significancia estadística.

6.3. Microscopía electrónica convencional

Preparación de bloques

Las células HeLa control (no transfectadas), transfectadas con PLD2-GFP o bien transfectadas con siRNA-PLD2 fueron sembradas en frascos de cultivo de 75 cm² al 70% de confluencia y mantenidas de acuerdo a las condiciones de rutina. Tras un lavado rápido con tampón PBS previamente atemperado a 37°C, fueron fijadas con glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato 0,2M durante 2h. Seguidamente se levantaron del interior del frasco mediante la ayuda de un rascador de células en un medio soluble de PBS-Glicina 0,02M y gelatina al 1%. Estas muestras fueron centrifugadas y el precipitado celular obtenido se post-fijó con una mezcla de tetraóxido de osmio al 2% y ferricianuro potásico al 3% en una relación (1:1) durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas en tampón cacodilato 0,2M y procesadas para su posterior inclusión en Epon-812. Para ello, se contrastaron con acetato de uranilo veronal a 0°C durante 1 hora, se deshidrataron mediante concentraciones crecientes de etanol durante 10 min en cada solución y se bañaron en alcohol absoluto y sulfato de cobre, durante 10 min en cada paso. Tras esto, las muestras fueron tratadas con óxido de propileno durante 15 min. Por último, se incluyeron en una mezcla de Epon y óxido de propileno (1:1) durante 1 hora y en la misma mezcla pero en proporción (2:1) una hora adicional, para finalmente ser incluidas en resina Epon 812 toda la noche a 60°C. Al día siguiente se elaboraron los bloques en el Servicio de Microscopía de la Universidad de Murcia.

Obtención de secciones ultrafinas

Las secciones ultrafinas de 50-60 nm fueron obtenidas en un ultramicrotomo (Ultracut Reichert Jung) y depositadas en rejillas de cobre, que se contrastaron posteriormente con acetato de uranilo al 2% durante 4 min y citrato de plomo al 2,6% durante 1 min. La observación de las secciones se realizó en un microscopio de transmisión JEOL 1011 operando a 80 kV y conectado a una cámara CCD Gatan

BioScan 792 o en el microscopio Philips Tecnai 12 acoplado a cámara MegaView III del Servicio de Microscopía de la Universidad de Murcia.

6.4 Crioultramicroscopía

Obtención de criosecciones ultrafinas

Las células se fijaron durante 2 horas en una mezcla de paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% o en una solución de paraformaldehído al 4% diluidas en tampón fosfato 0,1 M y pH 7,4. Tras lavar suavemente con PBS, las células se levantaron en un medio soluble de PBS-Glicina 0,02 M y gelatina al 1%, con la ayuda de un rascador de células. El precipitado de células obtenido mediante centrifugación se incluyó en una solución acuosa de gelatina al 10% que se enfrió a 4°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 min a 1 hora para que la gelatina se solidificara. Con la ayuda de un bisturí, bajo la lupa y en un ambiente frío se cortó el precipitado de células hasta obtener bloques de 1 mm³ aproximadamente. Estos bloques se crioprotegieron sumergiéndolos en una solución de sacarosa 2,3 M al menos durante 2 horas a 4°C. Finalmente, los bloques se montaron sobre portamuestras (*pins*) especiales para crioultramicrotomía y se congelaron en nitrógeno líquido donde permanecieron almacenados hasta que fueron cortados en un crioultramicrotomo (Leica Ultracut T/FCS) a -120°C con cuchilla de diamante (Druker). Se obtuvieron cortes ultrafinos de aproximadamente 50 nm. La recogida de cortes se realizó con un asa impregnada en una mezcla 1:1 de metilcelulosa 2% y sacarosa 2,3 M siguiendo las recomendaciones descritas por Liou y colaboradores (1996). Las criosecciones fueron depositadas sobre rejillas de cobre recubiertas con una película de formvar y carbón (Carbon Coater CC7650).

Crioinmunocitoquímica

Para la inmunolocalización ultraestructural, las criosecciones se procesaron para técnicas inmunocitoquímicas de tres capas, ya que los anticuerpos primario utilizados que reconocen PLD2 y GM130 son monoclonales. Inicialmente, las rejillas se trataron con PBS-Glicina 0,02 M durante 5 min. Tras bloquear los posibles puntos de unión inespecífica del anticuerpo con PBS-BSA 0,1% durante 5 min, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario durante 30 min. Los anticuerpos fueron diluidos a la concentración de trabajo en una solución de BSA-acetilada 0,1% y glicina

0,02 M en PBS. Tras esta incubación, las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS y se volvieron a incubar 5 min con PBS-BSA 0,1%. Se incubó con un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón y se volvió a tratar las muestras con PBS-BSA 0,1% durante 5 min. Seguidamente, se incubaron con proteína A-oro (10 nm) durante 20 min. Tras lavar las muestras exhaustivamente con PBS, se fijaron con glutaraldehído al 1% durante 5 min. Posteriormente, se lavaron las muestras en agua durante 20 min y finalmente las secciones fueron contrastadas con acetato de uranilo a pH 7,0 durante 5 min y protegidas con una película de metilcelulosa y acetato de uranilo a pH 4,0 (9:1) (Slot et al, 1991; Martínez-Menárguez et al, 1999). La observación de las secciones se realizó en un microscopio de transmisión JEOL 1011 operando a 80 kV y conectado a una cámara CCD Gatan BioScan 792 o en el microscopio Philips Tecnai 12 acoplado a cámara MegaView III del Servicio de Microscopía de la Universidad de Murcia.

Análisis cuantitativo ultraestructural

Para establecer la distribución relativa de la enzima PLD2 en la región del complejo de Golgi de células HeLa, se seleccionaron al azar 15 complejos de Golgi de diferentes células inmunomarcadas para PLD2. Se cuantificó la presencia de partículas de oro coloidal, claramente asociadas a membranas, y se atribuyeron a una de las siguientes categorías: i) laterales del complejo de Golgi; definida como la zona lateral de las cisternas que muestran una dilatación terminal característica, ii) región central del complejo de Golgi, definida como la zona más delgada de las cisternas apiladas y iii) elementos tubulovesiculares; definidos como perfiles de membrana situados en las proximidades del complejo de Golgi. Estos últimos se diferenciaron por el tipo de cubierta. Las vesículas revestidas tipo COPI y clatrina se identificaron por sus características cubiertas de 10 y 18 nm de espesor, respectivamente. El número de partículas de oro asignado a cada categoría se expresa como el porcentaje obtenido respecto al total de partículas de oro cuantificadas en el complejo de Golgi.

7 Técnicas bioquímicas y de biología molecular

7.1 Transformación y amplificación de células competentes

Para la amplificación de los plásmidos codificantes de PLD2 y Arf1 unidos a la proteína verde fluorescente, GFP (*Green Fluorescent Protein*) en el extremo C-terminal, se transformaron bacterias *E. coli* DH5- α mediante choque térmico a 42°C

durante 45 segundos, utilizando una mezcla de 20 μ l de bacterias y 2,5 ng de plásmido. Después, se sembraron en placas de LB-agar con ampicilina (1 μ l/ml) y se incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente se realizaron mini-cultivos de 4 ml por colonia en medio SOB con ampicilina (1 μ l/ml) para la amplificación de las bacterias transformadas, incubando en agitación a 250 rpm y 37°C toda la noche. Posteriormente, se realizaron maxi-cultivos agregando 1,5 ml de mini-cultivo a 150 ml del medio SOB con 1 μ l/ml de ampicilina.

7.2 Purificación de ADN plasmídico

La purificación de cada plásmido se realizó mediante el uso del kit comercial GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit (Sigma-Aldrich) siguiendo el manual de instrucciones dado por la casa comercial. La concentración y la pureza de los plásmidos se determinaron con un espectrofotómetro cuantificador de ADN/ARN Gene Quant II (Pharmacia Biotech) midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm y el cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm respectivamente. El valor de concentración promedio arrojado fue para el plásmido de PLD2-GFP de 600 ng/ μ l y para el plásmido de Arf1-GFP de 1070 ng/ μ l.

7.3 Transfección transitoria de vectores de expresión

Para las transfecciones transitorias de las células HeLa con el vector de expresión codificante para PLD2-GFP se utilizó el reactivo comercial de quimiotransfección Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen™, Life Technologies). Para ello, las células se sembraron el día anterior a una confluencia entre el 40 y 60% en cubreobjetos estériles o en placas Petri estériles. Se optimizaron las condiciones de transfección siguiendo las recomendaciones sugeridas por la casa comercial. Se prepararon los complejos de transfección usando un ratio de 1:2 de DNA (μ g) y Lipofectamine® 2000. La mezcla final de transfección se preparó a partir de dos mezclas iniciales (solución A y solución B). Para preparar la solución A se añadió ADN al medio Opti-MEM (según las proporciones indicadas). Paralelamente, la solución B se preparó añadiendo Lipofectamine® 2000 al medio Opti-MEM (según las proporciones indicadas). Tanto la solución A como la solución B se incubaron por separado durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Durante la incubación, se lavaron las células con PBS y se cambió el medio por medio Opti-MEM sin antibióticos.

Finalmente, se añadió la mezcla con los complejos de transfección a las células. Al cabo de 5 horas, se cambió el medio de transfección por DMEM complementado fresco. Los experimentos de inmunofluorescencia, microscopía electrónica o Western blot se realizaron 18 horas después de la transfección.

Recipiente	ADN	Lipofectamine 2000	Volumen dilución	Volumen en placa
p 35mm ²	1 µg	5 µl	250 µl	2 ml
p 25cm ²	5 µg	12,5 µl	500 µl	4 ml
p 75cm ²	15 µg	37,5 µl	1500 µl	12 ml

En el caso del vector que codifica Arf1-GFP se utilizó el reactivo comercial Effectene Transfection Reagent (Quiagen). Las células se dejaron crecer hasta alcanzar un 60-80% de confluencia. La transfección se realizó siguiendo el protocolo que recomienda la casa comercial. La transfección se realiza en dos pasos, en un primer paso se mezcla 0,2 µg de ADN con 1,6 µl de Enhancer en 60 µl de tampón durante 2-5 min a temperatura ambiente y en un segundo paso se añaden 5 µl de reactivo Effectene y la mezcla se incuba durante 5-10 min para que se formen los complejos entre el lípido catiónico y el ADN. Después de 6-8 horas de incubación con las células, se retiraran los complejos de transfección y se añade medio fresco a las mismas. Los experimentos se realizaron 24 horas después de la transfección.

7.4 Transfección transitoria de ARN de interferencia de pequeño tamaño

Para el silenciamiento de la expresión del gen para PLD2 las células se transfectaron transitoriamente con ARN de interferencia de pequeño tamaño (siRNA). Los siRNAs son moléculas de ARN mensajero (ARNm) con una longitud de 20-25 nucleótidos que silencian la expresión de genes promoviendo la hidrólisis de ARNm cuyas secuencias son exactamente complementarias. Cada molécula de siRNA es incorporada a un complejo multiproteico conocido como RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN), que separa las dos hebras de la molécula de siRNA, quedándose una de ellas incorporada en el complejo. Esta hebra es usada como molde para reconocer a la molécula de ARNm, lo que posteriormente conduce a

su degradación por RISC. El mecanismo de siRNAs suprime la expresión génica a nivel post-transcripcional (puesto que la molécula diana es el ARNm), pudiendo producir una reducción significativa (*knock-down*) pero no completa (*knock-out*) de los niveles de la proteína diana.

La transfección transitoria de siRNA se realizó usando Lipofectamine® 2000 como reactivo de transfección. Las células fueron sembradas en frascos de cultivo de 75 cm², 25 cm² o en placas p35mm sobre cubreobjetos de vidrio estériles hasta alcanzar un 40-60% de confluencia.

Recipiente	siRNA	Lipofectamine 2000	Volumen dilución	Volumen en placa
p 35mm ²	0,5 µg	5 µl	250 µl	2 ml
p 25cm ²	1 µg	10 µl	500 µl	4 ml
p 75cm ²	3 µg	30 µl	1500 µl	12 ml

Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se optimizaron las condiciones de transfección. En todos los experimentos con siRNA-PLD2 se usaron 0,5 µg de siRNA-PLD2 por cada 5 µl de Lipofectamine® 2000. El medio de transfección fue reemplazado por medio de cultivo nuevo después de 5 horas para evitar efectos tóxicos en las células. Tras 48 horas en total desde la transfección, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia, microscopía electrónica o Western blot. Como control negativo se utilizó siRNA-A conjugado con fluoresceína, FITC (SC-36869; Santa Cruz Biotechnology), este control es una mezcla de secuencias de ARN que no conduce a la degradación específica de ningún ARNm celular conocido.

7.5 Extracción, purificación y cuantificación de ARN

La extracción de ARN en células HeLa control y células transfectadas con siRNA-PLD2 se realizó utilizando el kit comercial RNAqueous® (Life Technologies) que es un sistema de purificación basado en filtros. Las células cultivadas en un frasco de cultivo de 75 cm² fueron lisadas con 200 µl de tampón de lisis en hielo. Después, se pasó la muestra por una aguja de 25G x 5/8" tras lo cual se diluyó en 200 µl de etanol al 64%. Esta mezcla se pasó a columnas de retención de sílice y se centrifugó durante

1 min. Se eliminó el filtrado y se pasó 700 µl de solución de lavado 1 del kit, centrifugando durante 1 min. La misma operación se repitió con 500 µl de solución de lavado 2/3 del kit. Para la elución del ARN retenido en el filtro se añadieron 40 µl de solución de elución incubando a 70°C y se centrifugó durante 2 min. Finalmente, la disolución de ARN se congeló a -80°C tras la determinación de la concentración de ARN.

La concentración de ARN aislado se determinó mediante la lectura de absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, EEUU). La pureza del ARN se determinó mediante la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm. Finalmente, se obtuvieron 621 ng/µl de la muestra control y 951 ng/µl de la muestra transfectada con siRNA-PLD2.

7.6 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADN complementario (ADNc) por RT-PCR se realizó utilizando el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™, Life Technologies), según el protocolo descrito por el fabricante. La reacción se realizó en un volumen total de 10 µl, sobre un molde de 5 µg de ARN al que se le añadió 1 µl de oligo DT 50 µM y 1 µl de dNTPs Mix 10 mM. La mezcla resultante se incubó durante 5 min a 65°C para la desnaturalización del ARN. A continuación, la mezcla se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente y tras lo cual se le añadió 4 µl de tampón RT 10x, 8 µl de MgCl₂ 25 mM, 4 µl de DTT (ditiotreitól) 0,1M, 2 µl RNAsa OUT (inhibidor de RNAsas) y 2 µl de transcriptasa inversa Supper Script III. La síntesis de ADNc tuvo lugar a 50°C durante 50 min. Posteriormente, la mezcla se incubó a 85°C durante 5 min para desnaturalizar la enzima. Para hidrolizar el ARN molde, tras enfriar la mezcla en hielo, se le añadió 1 µl de RNAsa H y se incubó a 37°C durante 20 min. Finalmente, la disolución de ADNc resultante se congeló a -20°C.

7.7 RT-PCR a tiempo real

La reacción de PCR se realizó en placas de 96 pocillos en un equipo 7500 Real Time PCR de Applied Biosystems. La composición por pocillo fue la siguiente: 2 µl de ADNc, 2 µl de mezcla de cebadores 50 nM, 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix y 6 µl de agua libre de nucleasas (volumen total de 20 µl por pocillo). El protocolo usado para la PCR fue el siguiente: 1 ciclo a 95°C durante 10 min; 40 ciclos a 95°C durante 5

s y 60°C durante 1 min. La recogida de datos de fluorescencia se realizó en cada ciclo y el análisis de estos datos se efectuó con la aplicación 7500 System SDS versión 2.0.5 Software de Applied Biosystems.

La cuantificación relativa de la expresión de PLD2 en muestras silenciadas respecto a muestras control se realizó mediante el método de los incrementos de Ct o $\Delta\Delta Ct$ (*Comparative Ct Method for Relative Quantification*) mediante el cual, en un primer paso se normaliza respecto al endógeno ($Ct_{PLD2\ gene} - Ct_{GAPDH\ gene} = \Delta Ct$), en un segundo paso se normaliza respecto al control ($\Delta Ct_{siRNA\ sample} - \Delta Ct_{Control\ sample} = \Delta\Delta Ct$) y por último se aplica la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este método fue validado mediante diluciones seriadas de las muestras para descartar que las diferencias en la expresión del gen de interés fueran debidas en realidad a diferencias en las eficiencias de los distintos procesos de PCR. Además, para descartar posibles amplificaciones múltiples con las mismas parejas de cebadores se realizó una curva de disociación. La existencia de un solo pico en esta curva excluye la posibilidad de dos productos amplificados con distinta temperatura de fusión.

Los cebadores para PLD2 se adquirieron de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology (PC-PLD2 siRNA (h): cs-44001), mientras que los cebadores usados para el gen control endógeno, GAPDH se diseñaron para amplificar una secuencia de 149 pb situada entre dos exones, hibridando el cebador “forward” en la zona de unión de los exones 4 y 5 para evitar la amplificación de un posible ADN genómico contaminante.

La secuencia de los cebadores usados para RT-PCR a tiempo real en esta tesis se muestran en la siguiente tabla.

Gen	<i>Primer Forward (5'→3')</i>	<i>Primer Reverse (5'→3')</i>
PLD2	ACACAAAGUCUUGAUGAGUCtt	GACUCAUCAAGACUUUGUGUtt
GAPDH	GGTGAAGGTCGGAGTCAACG	TGAAGGGGTCATTGATGGCA

7.8 Inmunodetección de proteínas por *Western blot*

Extractos celulares

Los extractos celulares se obtuvieron a partir de cultivos de células HeLa sembradas en frascos de 75 cm² no transfectadas o bien transfectadas transitoriamente con el plásmido para PLD2-GFP o con siRNA-PLD2. Las células se lavaron suavemente con una solución de PBS estéril atemperada a 4°C y seguidamente, fueron raspadas del interior del frasco y solubilizadas en 250 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8,8, EDTA 1 mM pH 8,0, Igepal 1% v/v, NaCl 150 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas según la concentración especificada por el fabricante). Posteriormente, las muestras se incubaron en agitación vigorosa a 4°C durante 2 horas. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior utilización.

La concentración de proteína de las muestras se determinó utilizando el método colorimétrico del ácido bicínico-BCATM mediante un kit comercial Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Como patrón para obtener la recta de calibrado se utilizó albúmina de suero bovino (BSA). Para la detección colorimétrica de las muestras se utilizó el espectrofotómetro S-22 UV/Vis BOECO y la cuantificación se realizó con el programa GraphPad Prism® versión 4.0 (Graph Software).

Electroforesis

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida se realizó en condiciones desnaturalizantes en un equipo de electroforesis XCell SureLock® Mini-Cell (InvitrogenTM, Life Technologies) siguiendo el protocolo especificado en la guía técnica de NuPAGE® versión E del 2003 (InvitrogenTM, Life Technologies). Al extracto celular se añadió tampón de carga LDS, el agente reductor y en su caso agua desionizada, siguiendo las proporciones indicadas por el fabricante. A continuación, las muestras fueron desnaturalizadas a 70 °C en termobloque durante 10 min. Se cargó entre 15-60 µg de proteína en geles Bis-Tris 4 –12% de 1,0 mm de grosor o Tris-Acetato 3-8% de 1,0 mm de grosor (NuPAGE® Novex®) acorde al peso molecular de la proteína de interés. Se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos (marcador SeeBlueplus® 2 para los geles de Bis-tris y marcador HiMark® para los geles de Tris-Acetato). Para la electroforesis se utilizó tampón MOPS SDS para los geles 4-12% Bis-Tris y tampón Tris-Acetato SDS para los geles de 3-8% Tris-Acetato.

En la cámara interna de la cubeta se adicionaron 500 µl de antioxidante para mantener las proteínas en forma reducida mientras migran a través del gel durante la electroforesis. Seguidamente se sometió a electroforesis, 200 voltios y 50 min para el sistema de Bis-Tris y 150 voltios y 1 hora para el sistema de Tris-Acetato.

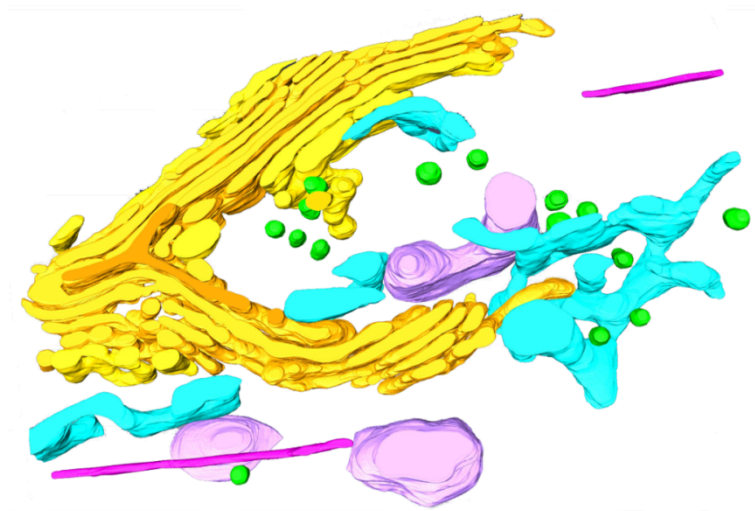
Transferencia

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con poro de 0,45µm siguiendo el protocolo estandarizado recomendado por el fabricante. Para ello, las membranas de PVDF se activaron durante 30 segundos en metanol, se lavaron en agua y se mantuvieron en tampón de transferencia NuPAGE®. La transferencia se realizó a 30 voltios durante 1 hora en tampón de transferencia NuPAGE® con 500 µl de antioxidante a la cámara interna de la cubeta de electroforesis. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas en una solución salina de TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) conteniendo 2% de albumina sérica bovina durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave.

Inmunodetección

Una vez bloqueadas, las membranas se incubaron durante toda la noche en agitación suave con el anticuerpo primario (Tabla 3). Todos los anticuerpos usados en esta técnica fueron diluidos en TBS-T. Al día siguiente, y tras varios lavados con TBS-T durante 20 min, la membrana se incubó con el respectivo anticuerpo secundario durante 60 min a temperatura ambiente, en agitación suave y protegidas de la luz (Tabla 5). La detección de las proteínas inmunomarcadas se realizó en el detector Typhoon 9410 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences). La cuantificación específica de cada una de las bandas (intensidad de marcaje relativo) se llevo a cabo a través del programa ImageQuant TL.

V RESULTADOS



1 Análisis del papel de glicerolípidos en células con tubulación inducida.

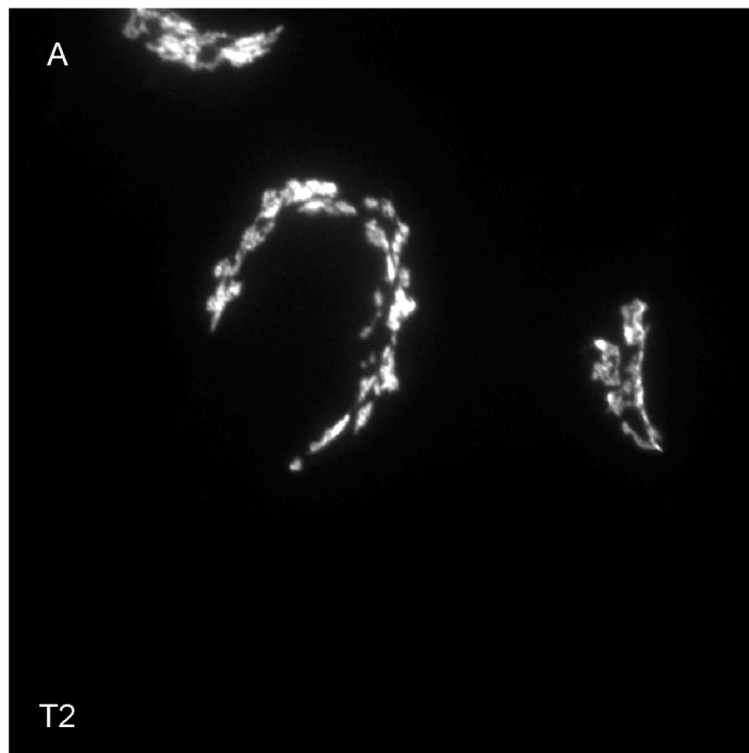
Nuestro primer objetivo fue analizar el papel de diferentes lípidos y enzimas modificadoras de lípidos en el proceso de formación de ITs de naturaleza tubular. Utilizamos como modelo células HeLa en cultivo bajo condiciones que estimulan la formación de túbulos en las membranas del complejo de Golgi. Para ello, llevamos a cabo diversos tratamientos farmacológicos cuyos efectos fueron visualizados mediante la realización de ensayos de inmunofluorescencia, utilizando como marcador de este orgánulo el anticuerpo contra la enzima N-acetil-galactosaminiltransferasa T2 (en adelante T2). Esta es una enzima de glicosilación residente del complejo de Golgi que a 37°C muestra un patrón de marcaje perinuclear típico de la tinción de este orgánulo en inmunofluorescencia (Figura 22A). A continuación se presentan los resultados del efecto de diferentes inhibidores de enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos de membrana, sobre los túbulos inducidos a partir de los tratamientos con baja temperatura (15°C) y BFA.

1.1 Tubulación inducida a baja temperatura.

Estudios previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que el cultivo de células a 15°C induce la formación de túbulos derivados del complejo de Golgi en varias líneas celulares, que tienen una composición diferente a los túbulos inducidos por BFA (Martínez-Alonso et al., 2005 y 2007).

Utilizamos varios inhibidores enzimáticos para caracterizar el requerimiento lipídico necesario para la formación de túbulos en este modelo. Para ver cómo afectaban estos compuestos a la formación de estos túbulos, se comparó el porcentaje de tubulación en células incubadas a 15°C durante 45 min en presencia (tratamiento simultáneo y pre-tratamiento) y ausencia de estos compuestos. En células incubadas a baja temperatura se aprecia el marcaje perinuclear típico de la tinción del complejo de Golgi y la formación de túbulos que se extienden hacia la periferia (Figura 22B).

Control 37°C



[15°C] 45min

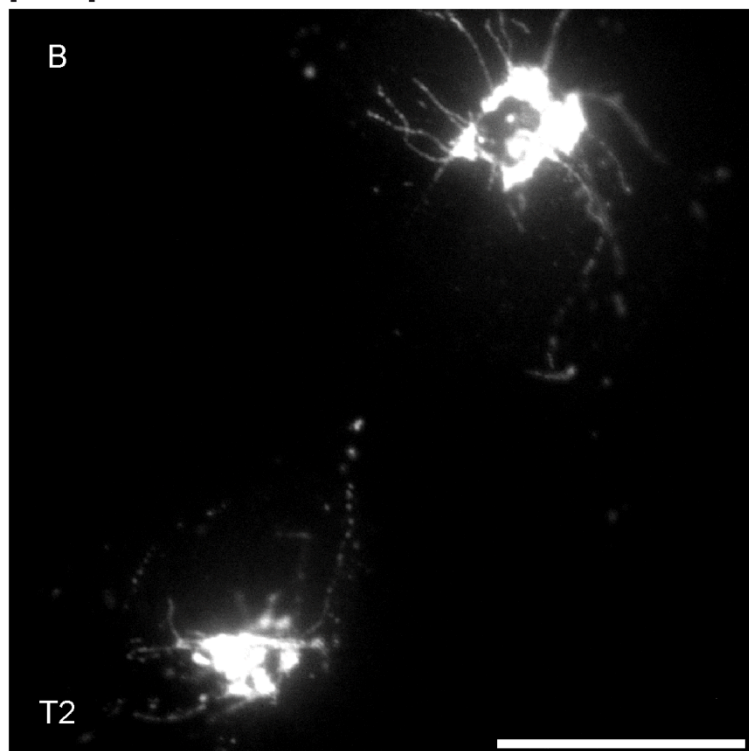


Figura 22. A) Patrón de marcaje perinuclear típico de la tinción del complejo de Golgi a 37°C usando como marcador T2. B) Efecto de la incubación a 15°C durante 45 min sobre la morfología del complejo de Golgi. A 15°C la enzima de glicosilación muestra el típico patrón de marcaje perinuclear del complejo de Golgi y se aprecian túbulos que nacen del complejo de Golgi y se extienden hacia la periferia celular. Barra de calibrado 20 μ m.

1.1.1 Efecto de propranolol sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi en condiciones de baja temperatura.

El compuesto propranolol inhibe la formación de DAG producto de la desfosforilación de PA (Figura 20), reacción catalizada por la enzima LPP/PAP (Koul y Hauser, 1987). Tanto en el tratamiento simultáneo (incubación a 15°C con propranolol durante 45 min) como en el pre-tratamiento (incubación a 37°C durante 15 min con propranolol, seguida de la incubación a 15°C durante 45 min), los túbulos derivados del complejo de Golgi fueron muy numerosos y de morfología similar a los túbulos observados en las células no tratadas con el inhibidor (Figura 24). Los datos cuantitativos mostraron que, comparando con el cultivo sin propranolol (80,7% de complejos de Golgi tubulados) tanto al incubar las células a la vez o previamente con propranolol, el porcentaje de células con tubulación aumentó a un 91,7% y 85%, respectivamente (Figura 23A). El número medio de túbulos por célula aumentó ligeramente en comparación con la incubación a 15°C sin propranolol (Figura 23B). Estos resultados sugieren que DAG no es necesario para la formación de los túbulos inducidos a 15°C.

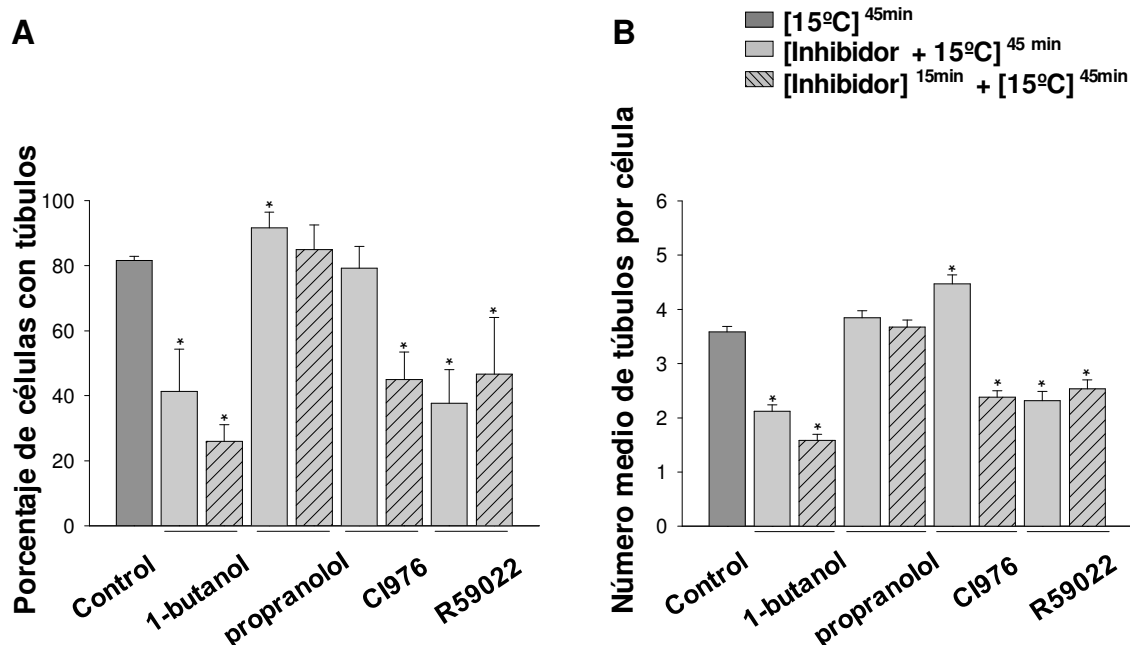
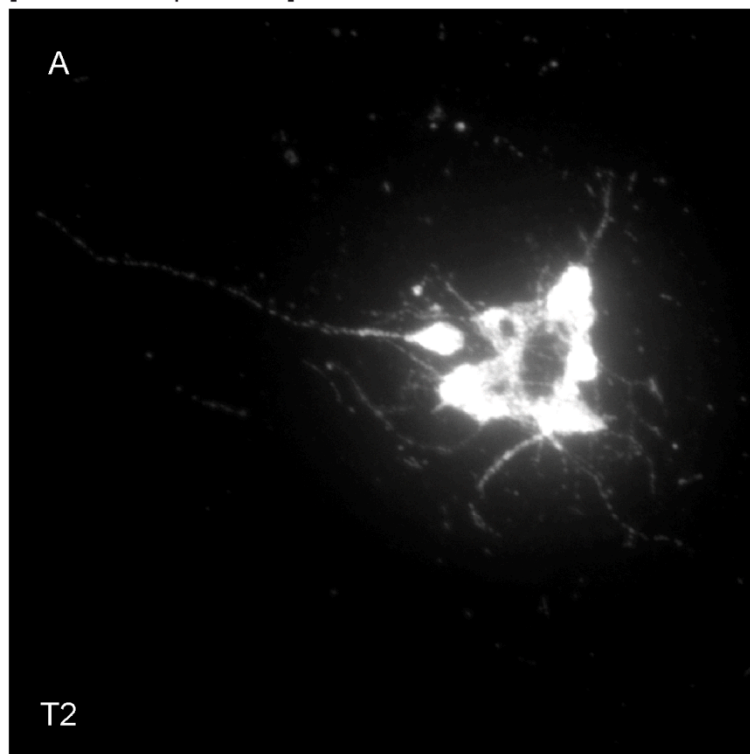


Figura 23. Cuantificación del efecto de agentes farmacológicos sobre la formación de túbulos inducidos a baja temperatura. A) Porcentaje de células con túbulos. B) Número medio de túbulos por célula. Los cambios estadísticamente significativos se muestran con un asterisco ($p \leq 0,05$).

[15°C + Propranolol] 45min



[Propranolol] 15min + [15°C] 45min

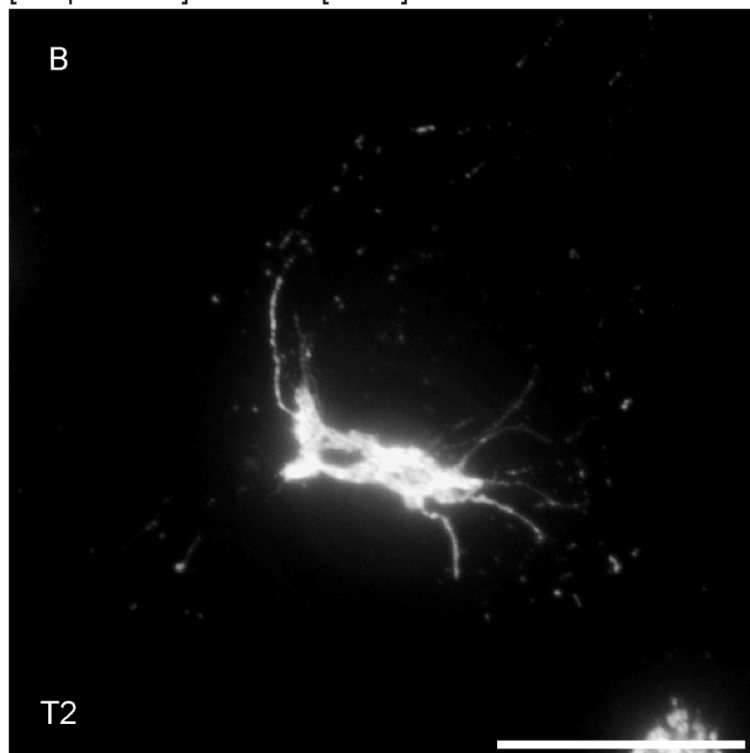


Figura 24. Efecto de propranolol sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos a baja temperatura. A) Tratamiento simultáneo. B) Pre-tratamiento. En ambos casos se pueden ver claramente los túbulos que emergen del complejo de Golgi. Barra de calibrado 20 μm .

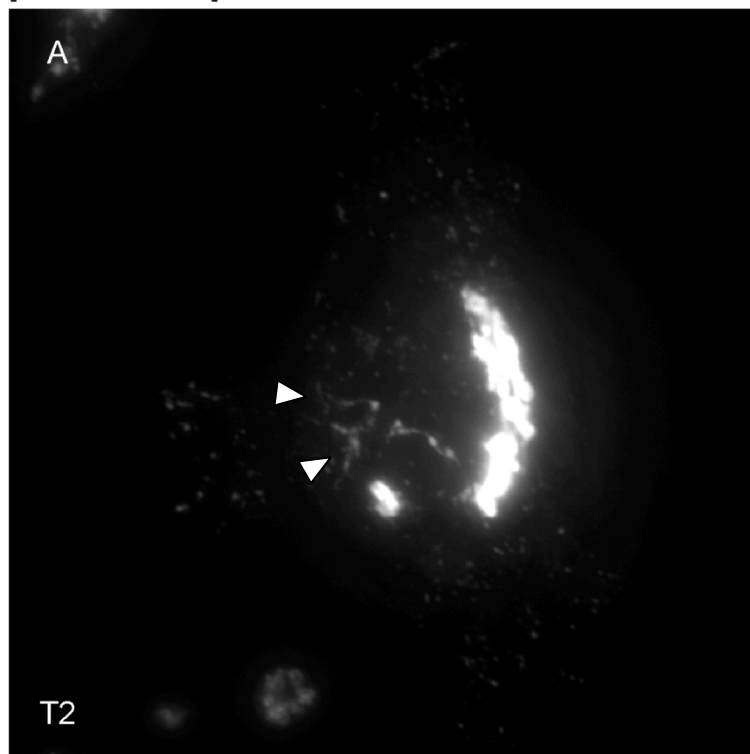
1.1.2 Efecto de 1-butanol sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi en condiciones de baja temperatura.

En presencia de 1-butanol, la hidrólisis de PC por la acción de PLD produce fosfatidil-1-butanol en lugar de PA (Figura 20), una reacción conocida como transfosfatidilación (Selvy et al., 2011). Se ha visto que 1-butanol, a concentraciones superiores al 1%, produce la fragmentación del complejo de Golgi (Siddhanta et al., 2000). Por este motivo, hicimos ensayos dosis/respuesta con objeto de determinar la concentración a la cual la morfología del complejo de Golgi no se veía alterada, estableciendo la concentración de trabajo en 0,3% v/v (usada también en Rizzo et al., 1999).

A diferencia de propranolol, el tratamiento simultáneo con 1-butanol y 15°C indujo la disminución del número de túbulos y, además, los túbulos aparecieron fragmentados (Figura 25A). Por otro lado, al pre-tratar las células con 1-butanol se repitió este efecto inhibitorio sobre la formación de túbulos, e incluso se vio acentuado (Figura 25B). La cuantificación de estos experimentos mostró que en ausencia del compuesto, el 81% de las células mostraron tubulación, presentando 3,6 túbulos por célula de media, mientras que, en el tratamiento simultáneo, el porcentaje de células con túbulos disminuyó al 41,3% y el número de túbulos por célula disminuyó a 1,9. Cuando las células fueron pre-tratadas, el porcentaje de células tubuladas disminuyó de manera considerable, en este caso, a un 26%. Además, el número medio de túbulos por célula también disminuyó siendo de 1,6 (Figura 23). Estos resultados sugieren que PA es necesario para la formación de este tipo de túbulos.

Adicionalmente, en los análisis con 1-butanol, se usó como control del efecto sobre la morfología del complejo de Golgi su isómero 2-butanol, con el que no se observó una disminución significativa de la tubulación. El alcohol 2-butanol es peor sustrato de la enzima PLD que 1-butanol y, por tanto, la inhibición de la enzima es menor.

[15°C + BuOH] 45min



[BuOH] 15min + [15°C] 45min

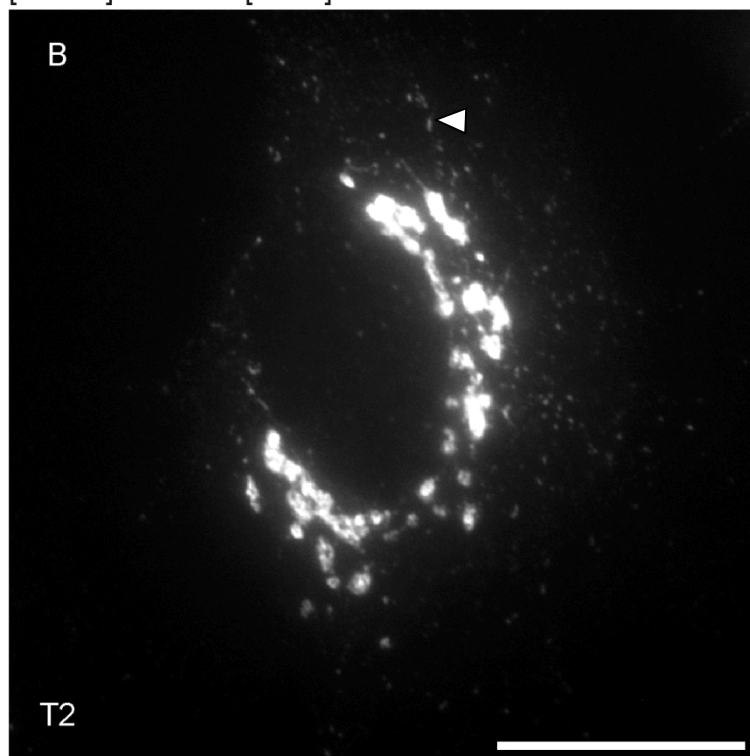


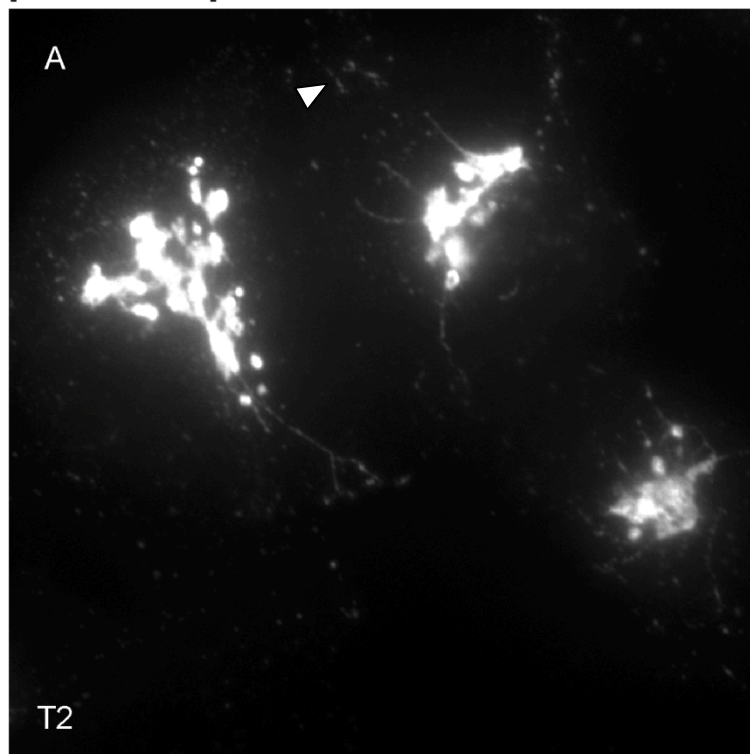
Figura 25. Efecto de 1-butanol sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos a baja temperatura. A) Tratamiento simultáneo. B) Pre-tratamiento. En ambos casos la formación de túbulos se ve altamente inhibida e incluso se observan túbulos fragmentados (punta de flecha) Barra de calibrado 20 μ m.

1.1.3 Efecto de CI976 sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi en condiciones de baja temperatura.

Vimos que, a 15°C, 1-butanol afectó a la formación de túbulos derivados del complejo de Golgi. Este compuesto provocó la disminución de los niveles de PA al afectar la actividad de la enzima PLD. El siguiente paso en nuestro estudio fue analizar el efecto de otros inhibidores que también reducen los niveles de PA, como es el caso del compuesto CI976 (Figura 20), que inhibe LPAT (Drecktrah et al., 2003; Brown et al., 2008).

En las células tratadas con CI976 se observaron túbulos con la morfología típica del cultivo a 15°C. También se encontraron fragmentos de túbulos por el citoplasma (Figura 26A). En el caso del pre-tratamiento con este compuesto se observaron menos túbulos emerger de las membranas del complejo de Golgi (Figura 26B). En este ensayo, en ausencia de CI976, el porcentaje de células que presentó tubulación fue de un 82% y el número medio de túbulos fue 3,6. En ambos tratamientos con el inhibidor, el porcentaje de células con túbulos disminuyó respecto a la incubación a 15°C, siendo este efecto mucho más acentuado en el caso del pre-tratamiento, donde sólo el 44% de las células presentaron tubulación y tuvieron 1,7 túbulos de media (Figura 23). Al igual que ocurre con 1-butanol, en el caso de CI976 el efecto del inhibidor sobre los túbulos también fue mayor cuando las células fueron pre-tratadas.

[15°C + CI976] 45min



[CI976] 15min + [15°C] 45min

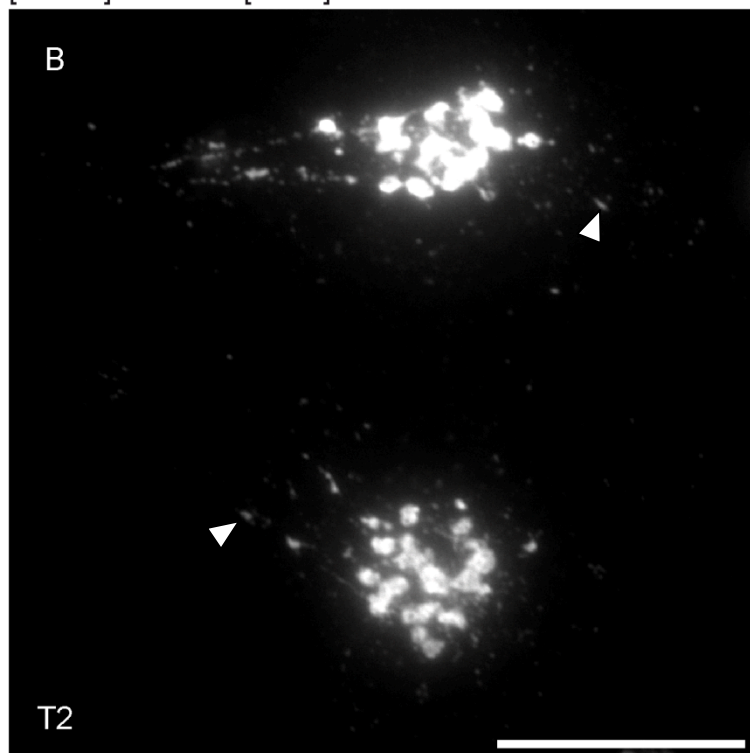


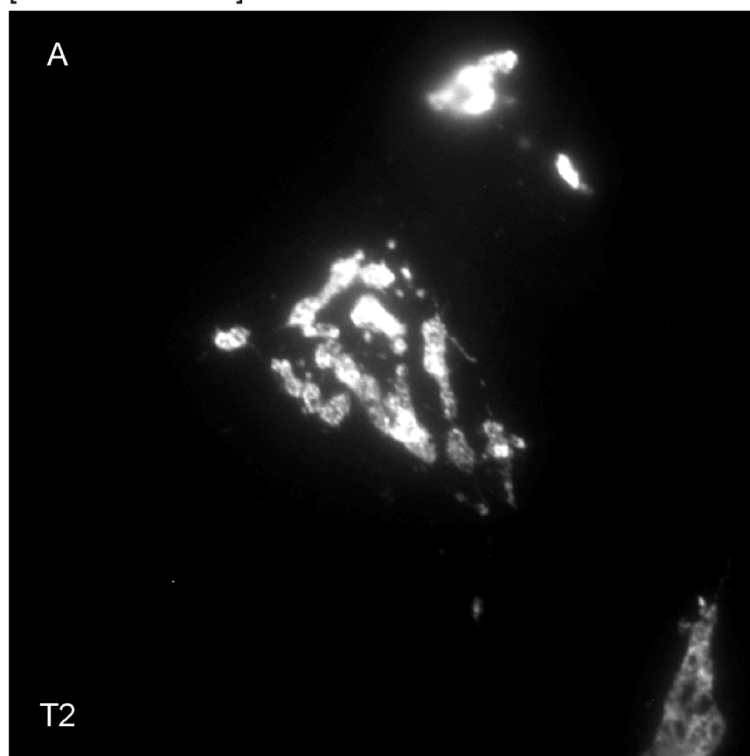
Figura 26. Efecto de CI976 sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos a baja temperatura. A) Tratamiento simultáneo. B) Pre-tratamiento. En ambos casos se observa una disminución de número de túbulos, aunque más acentuado en el caso del pre-tratamiento (B). Se pueden observar fragmentos de túbulos (punta de flecha). Barra de calibrado 20 μ m.

1.1.4 Efecto de R59022 sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi en condiciones de baja temperatura.

El compuesto R59022, es el inhibidor de la enzima DGK (Figura 20), el cual tiene el efecto contrario al propranolol, inhibiendo la formación de PA a partir de DAG (de Chaffoy de Courcelles et al., 1985; López-Andreo et al., 2003).

Cuando las células se trataron con R59022 antes y a la vez que se incubaron a baja temperatura, se observó la disminución del porcentaje de células con complejos de Golgi tubulados. Además, los túbulos fueron más cortos que en las células no tratadas. (Figura 27A y B), aunque no se observaron fragmentos de túbulos por el citoplasma. El análisis cuantitativo mostró que, comparando con el cultivo a baja temperatura (81% de tubulación y 3,2 túbulos de media por célula), tanto al cultivar las células simultáneamente, como haciendo el pre-tratamiento con R59022, el porcentaje de células con túbulos y el número de estos disminuyó, siendo del 37,7% y 2,2, y 46,7% y 2,3 respectivamente (Figura 23).

[15°C + R59022] 45min



[R59022] 15min + [15°C] 45min

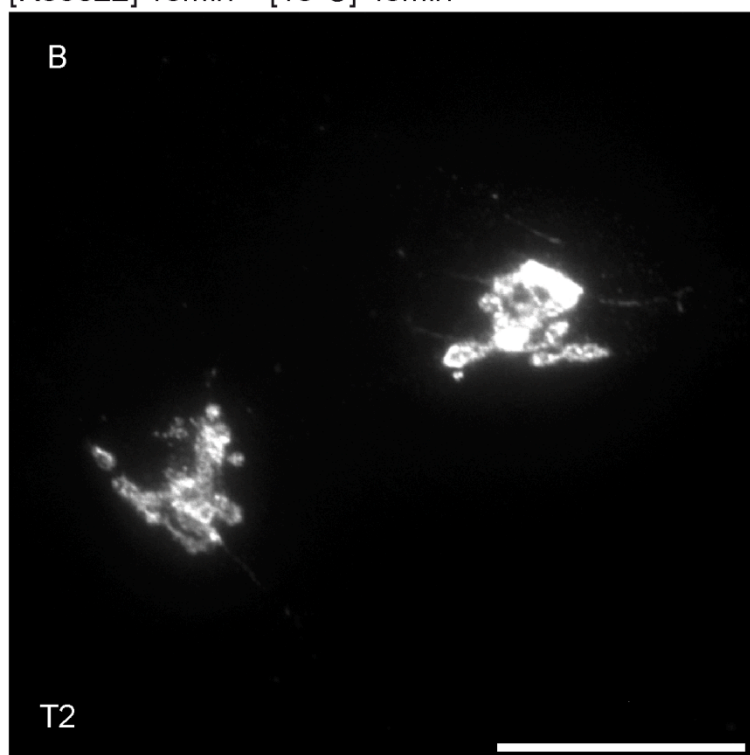


Figura 27. Efecto de R59022 sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos a baja temperatura. A) Tratamiento simultáneo. B) Pre-tratamiento. Se observan túbulos cortos y no se aprecian fragmentos de túbulos. Barra de calibrado 20 μ m.

1.2 Tubulación inducida por brefeldina A.

BFA es una herramienta muy útil para estudiar el flujo retrógrado de membrana desde el complejo de Golgi al RE. La incubación de las células HeLa a 37°C durante 4 min con BFA induce la tubulación del complejo de Golgi sin que las membranas de éste se lleguen a fusionar con las del RE (Figura 28).

[BFA] 4min

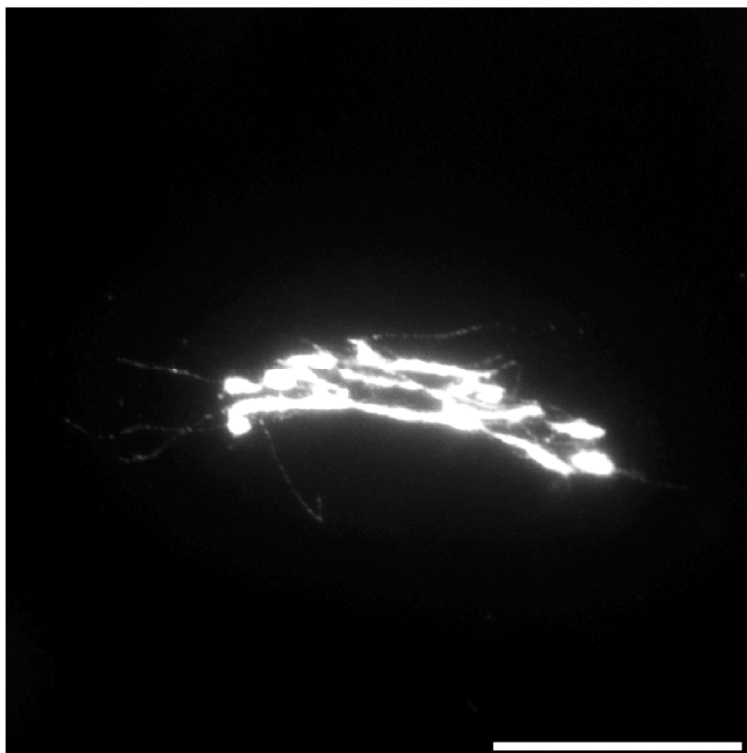


Figura 28. Efecto del tratamiento con BFA durante 4 min a 37°C sobre la morfología del complejo de Golgi. Se observan túbulos que crecen desde el complejo de Golgi. Barra de calibrado 20 μm .

1.2.1 Efecto de propranolol sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos por brefeldina A.

Estudios previos en los que se ha usado propranolol muestran que DAG es necesario para la formación de túbulos inducidos por BFA (Fernández-Ulibarri et al., 2007). Tal y como se describió en estos estudios previos, vimos que al incubar las células HeLa a 37°C durante 4 min con BFA y propranolol, se formaron escasos túbulos y además con una morfología totalmente diferente a la típica observada en las células tratadas sólo con BFA, ya que los túbulos observados fueron mucho más cortos y gruesos (Figura 30A).

La cuantificación del porcentaje de células que presentó complejos de Golgi tubulados mostró que el 90% de las células tratadas durante 4 min con BFA presentaba tubulación. Cuando las células se incubaron simultáneamente con BFA y propranolol, el porcentaje de tubulación descendió significativamente (Figura 29).

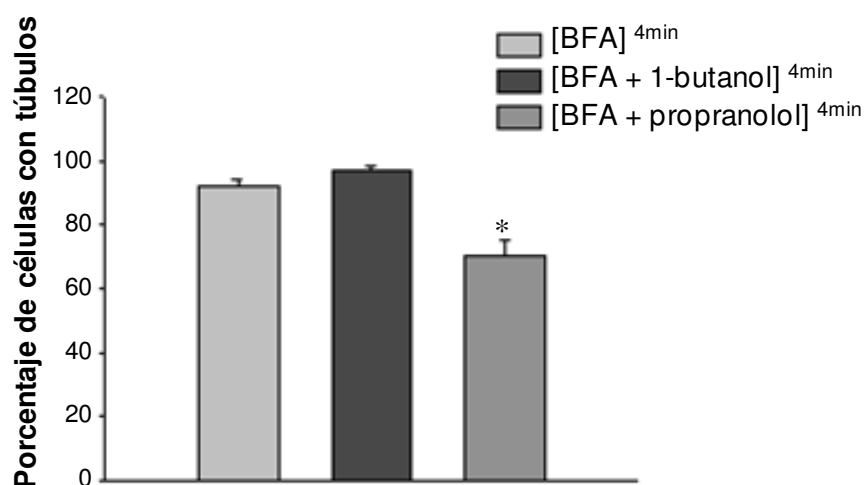
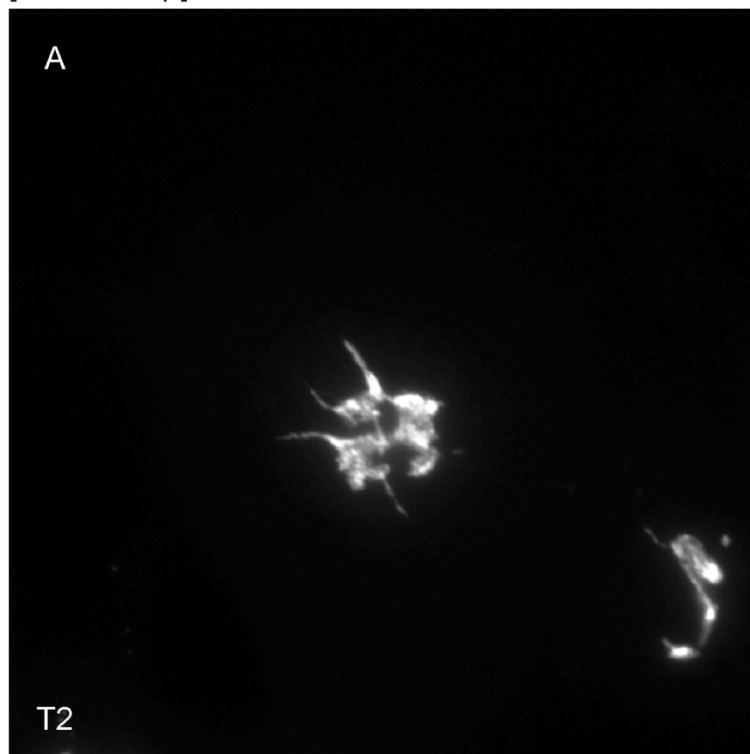


Figura 29. Cuantificación del efecto de 1-butanol y propranolol sobre la formación de túbulos derivados del complejo de Golgi en células tratadas con BFA durante 4 min. Los cambios estadísticamente significativos se muestran con un asterisco ($p \leq 0,05$).

[BFA + Prop] 4min



[BFA + BuOH] 4min

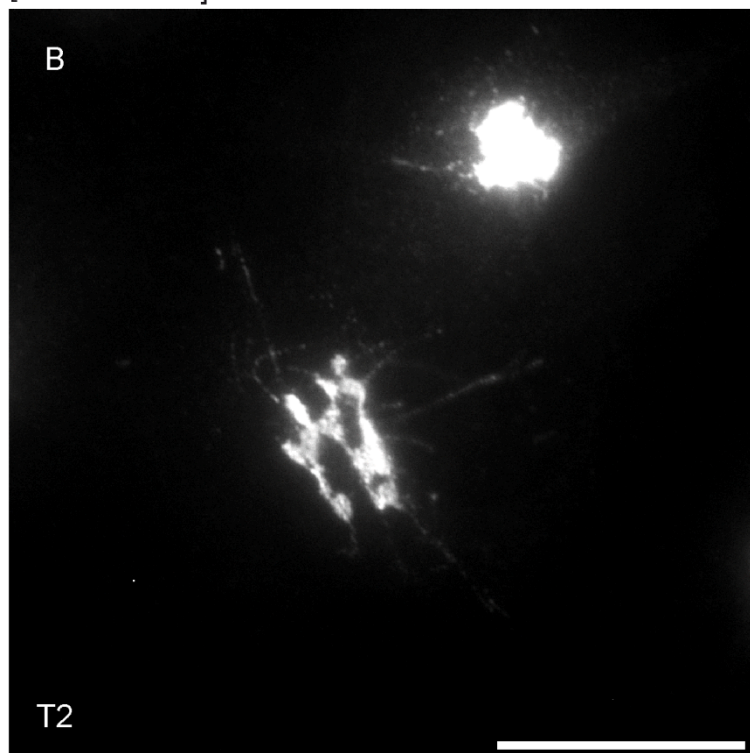


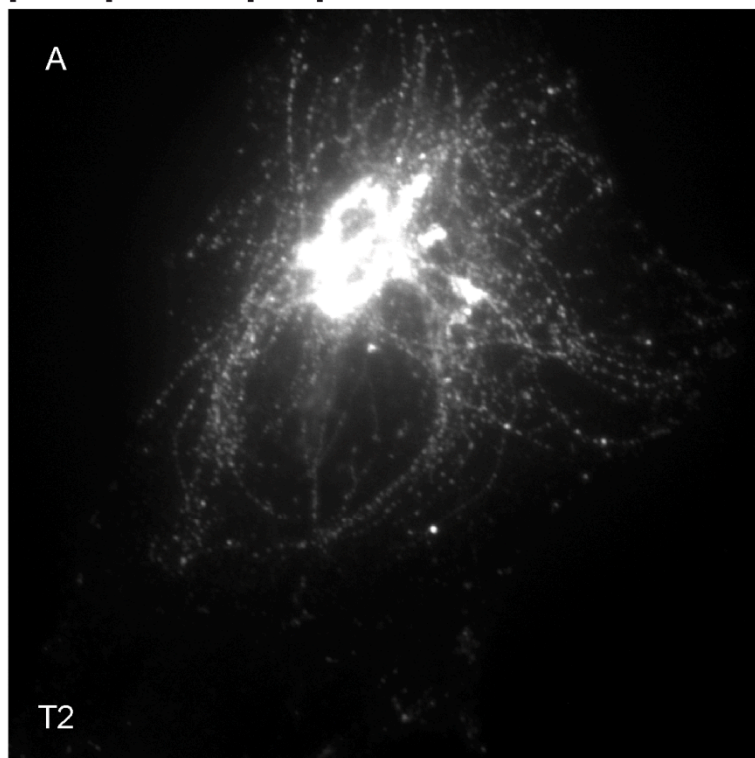
Figura 30. Efecto de propranolol (A) y 1-butanol (B) sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos por BFA. A) Se observan túbulos cortos, gruesos y poco numerosos. B) Se observan túbulos largos, finos y numerosos. Barra de calibrado 20 μm .

1.2.2 Efecto de 1-butanol sobre los túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos por brefeldina A.

Para ver cómo afectaba la variación en la producción de PA sobre los túbulos inducidos por BFA, se estudió el efecto del tratamiento simultáneo de 1-butanol con BFA. A diferencia de lo que sucedió en el tratamiento con propranolol, cuando las células se trataron con 1-butanol a la vez que con BFA durante 4 min, se produjo un aumento de la tubulación. Además, los túbulos derivados del complejo de Golgi fueron muy similares a los observados sin inhibidor, es decir, túbulos finos y largos que se extienden desde el complejo de Golgi hacia la periferia (Figura 30B).

Además del tratamiento simultáneo con 1-butanol y BFA, analizamos el efecto del pre-tratamiento con el inhibidor antes de inducir la tubulación con BFA. El pre-tratamiento aceleró el efecto de BFA sobre las membranas del aparato Golgi, ya que, con sólo 4 min de tratamiento con BFA el 70% de las células presentó una tubulación extrema (Figura 31A), mientras que, en el 30% restante se distribuyó por todo el citoplasma indicando que las membranas del complejo de Golgi se habían fusionado con las membranas del RE (Figura 31B).

[BuOH] 15min + [BFA]4min



[BuOH] 15min + [BFA]4min

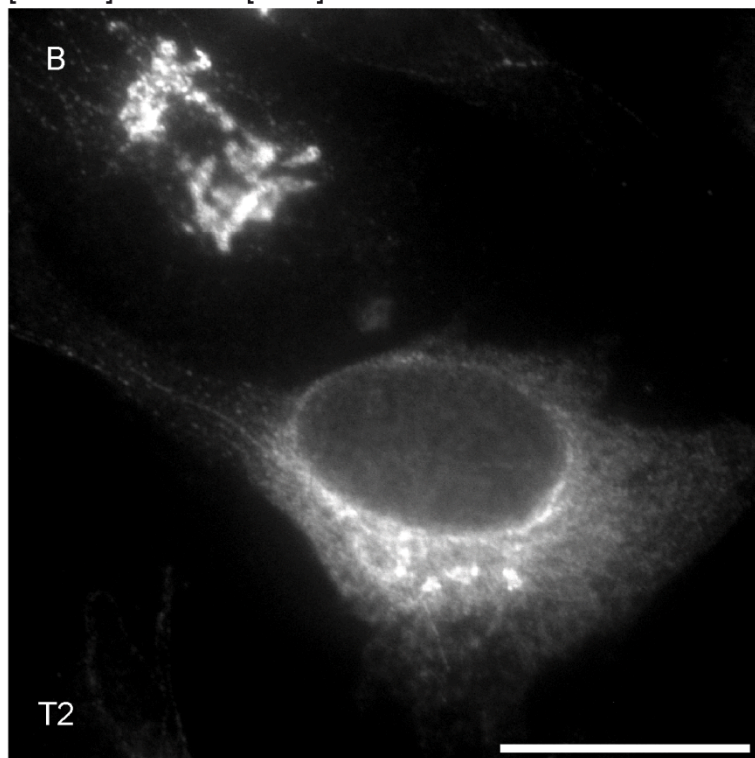


Figura 31. Efecto del pre-tratamiento durante 15 min con 1-butanol sobre la morfología del complejo de Golgi en células tratadas con BFA durante 4 min. A) Célula mostrando una tubulación extrema. B) Células que muestra el típico patrón de marcaje de RE tras la fusión del complejo de Golgi con el RE. Barra de calibrado 20 μ m.

2 Papel de las isoformas de PLD en la morfología del complejo de Golgi.

De los experimentos anteriores se deduce que PA es necesario para la formación de túbulos derivados del complejo de Golgi a baja temperatura pero no para los inducidos por BFA. La mayoría de PA producido en la célula se genera a partir de PC por la acción de la enzima PLD (Wang et al., 2006). Además, la mayor inhibición de la formación de túbulos se obtuvo con 1-butanol, lo que sugiere que esta vía es la más importante para la formación y el mantenimiento de este tipo de túbulos. En mamíferos hay dos isoformas de PLD, llamadas PLD1 y PLD2.

2.1 Distribución de las isoformas PLD1 y PLD2 en células con tubulación inducida a 15°C y BFA.

El siguiente paso en nuestro estudio fue analizar la participación de estas isoformas en la formación de los túbulos, ya que, era posible que una o ambas de estas isoformas estuvieran involucradas en la formación del PA necesario para la formación de túbulos derivados del complejo Golgi a baja temperatura. Para explorar esta hipótesis, analizamos el efecto de la incubación a baja temperatura y el tratamiento con BFA sobre la distribución de ambas isoformas mediante inmunofluorescencia.

En condiciones fisiológicas, PLD1 se localizó en puntos distribuidos por todo el citoplasma y también se observó en el núcleo (Figura 32). No se observó colocalización de esta isoforma con el marcador del complejo de Golgi T2 (Figura 33). A 15°C, la enzima se localizó también en el núcleo y en el citoplasma, observándose el mismo patrón que a 37°C. En cuanto a la distribución en células tratadas con BFA durante 4 min no se observó ningún cambio evidente en la localización de PLD1 con respecto a las células no tratadas (Figura 32).

Por otro lado, PLD2 a 37°C mostró el típico patrón de marcaje citoplasmático con una ligera mayor densidad en la región perinuclear (Figura 32). Mediante experimentos de inmunofluorescencia de doble marcaje se confirmó la localización de PLD2 en el complejo de Golgi. Así, se observó colocalización de PLD2 con las proteínas de matriz GM130 y GRASP65, con la proteína SNARE GS28 y con las proteínas Rab1 y Rab6 (Figura 33). Además, se observó PLD2 en puntos inmunorreactivos para Rab 1 distribuidos por el citoplasma (recuadro en la figura 34), lo que indica la presencia de esta enzima en elementos del ERGIC. En condiciones de

cultivo de 15°C durante 45 min, PLD2 se redistribuyó desde el citoplasma hacia la zona del complejo de Golgi, observándose una concentración del marcaje sobre la región perinuclear (Figura 32). Esta concentración se vio aún más acentuada cuando las células se cultivan a baja temperatura durante un periodo de tiempo de 3 horas (Figura 32). Por otro lado, PLD2 no mostró cambios en su distribución con el tratamiento de BFA durante 4 min (Figura 32), al igual que tampoco se observaron túbulos inmunorreactivos para PLD2.

Se han descrito varias enzimas modificadoras de lípidos implicadas en la formación de túbulos, tales como cPLA2 del grupo IV que transforma PA en LPA (San Pietro et al., 2009) y la aciltransferasa LPAAT3 o AGPAT3 que convierte LPA en PA (Gutiérrez-Martínez et al., 2013). Analizamos el efecto de la incubación a baja temperatura y el tratamiento con BFA sobre la distribución de ambas enzimas. No se observaron cambios en la localización de estas enzimas ni a 15°C ni con BFA (Figura 34).

Estos resultados sugieren que PLD2 es la isoforma involucrada en la formación de los túbulos inducidos a baja temperatura.

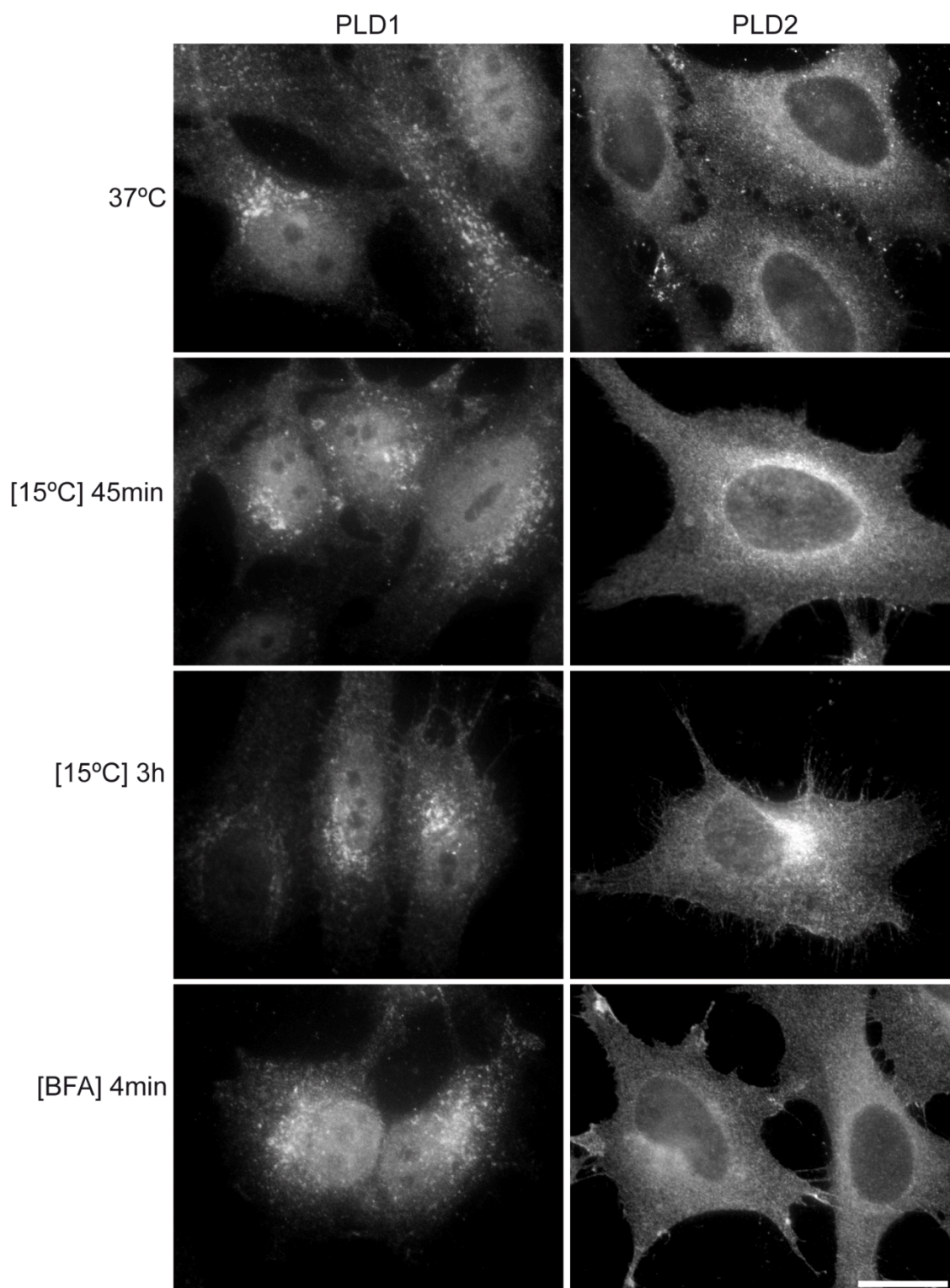


Figura 32. Distribución de PLD1 y PLD2 en células incubadas a 37°C, 15°C durante 45 min y 3 horas y tratadas con BFA durante 4 min. PLD1 no sufre ninguna variación en su distribución con ninguno de los tratamientos. PLD2 se concentra en la región perinuclear bajo condiciones de baja temperatura; sin embargo, su distribución no sufre ningún cambio con el tratamiento de BFA. Barra de calibrado 20 μ m.

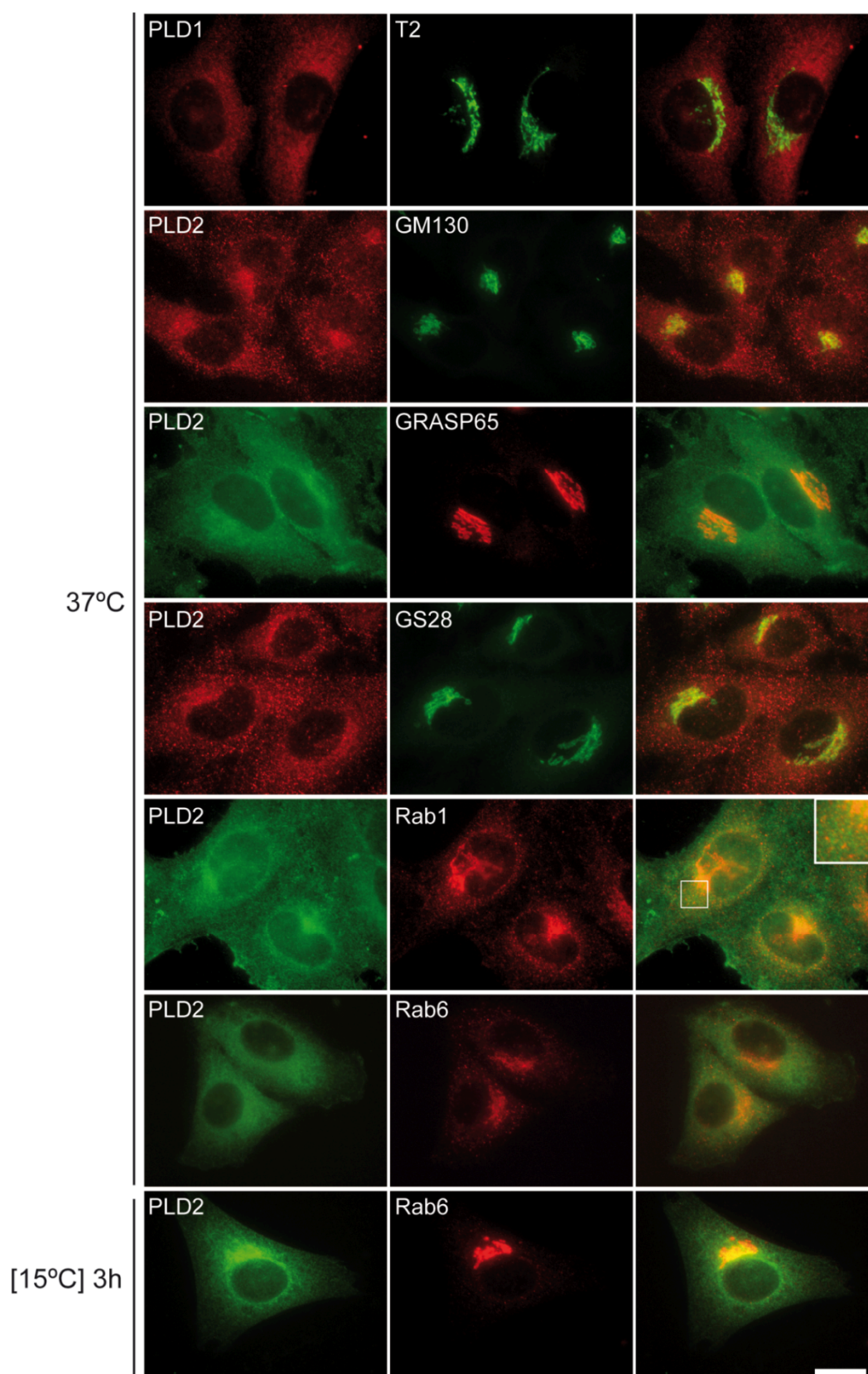


Figura 33. Inmunofluorescencia de doble marcaje para PLD1 y PLD2 con marcadores del complejo de Golgi en células incubadas a 37°C y a 15°C durante 3 horas. Se observa colocalización de PLD2 con diferentes marcadores del complejo de Golgi en condiciones control y de baja temperatura. Sin embargo, no se observa colocalización entre PLD1 y marcadores de Golgi como T2. Barra de calibrado 20 μm.

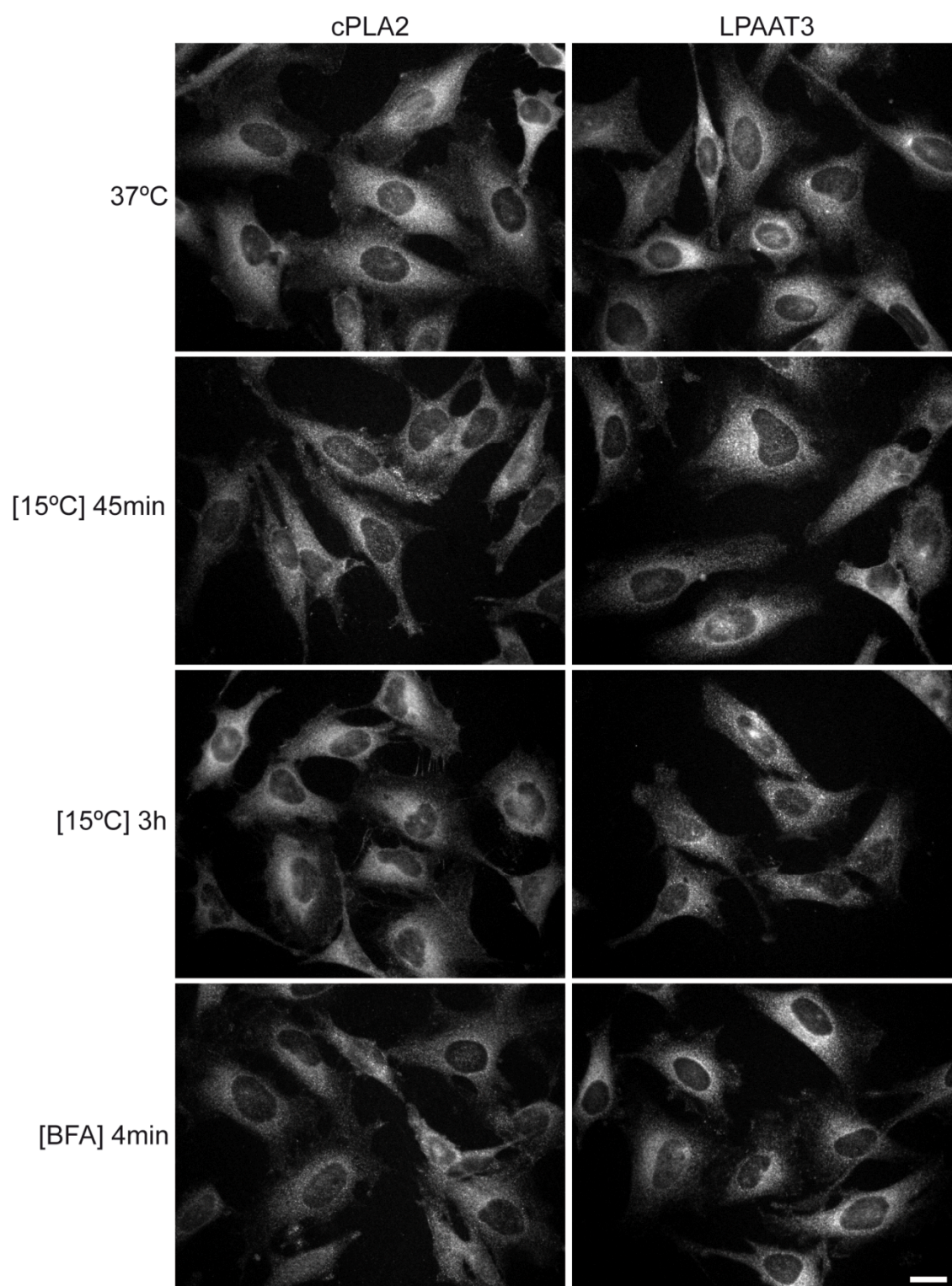


Figura 34. Distribución de cPLA2 y LPAAT3 en células incubadas a 37°C, 15°C durante 45 min y 3 horas y tratadas con BFA durante 4 min. No se observa ningún cambio en la distribución de estas enzimas en ningún caso. Barra de calibrado 20 μ m.

2.2 Efecto del silenciamiento génico de PLD2 en células con tubulación inducida a 15°C y BFA.

Hemos visto que a 15°C la enzima PLD2, pero no PLD1, se concentra en la región del complejo de Golgi. Estos datos sugieren que PLD2 es la isoforma involucrada en la formación de túbulos inducidos a 15°C. El siguiente paso en nuestro estudio fue analizar el efecto del silenciamiento génico de PLD2 sobre los túbulos inducidos a 15°C y con BFA. Para ello, las células HeLa fueron transfectadas con siRNA específico para PLD2. Tras 48 horas desde la transfección, a las células se les indujo tubulación, siendo posteriormente procesadas para su análisis mediante inmunofluorescencia.

Para cuantificar el grado de silenciamiento utilizamos dos aproximaciones técnicas: análisis Western y RT-PCR a tiempo real. Desafortunadamente, con los anticuerpos comerciales disponibles no fuimos capaces de detectar la enzima endógena en condiciones normales con Western blot. Solo fue posible detectar una banda en el caso del lisado de células con PLD2 sobreexpresada. Por este motivo, se midió el silenciamiento en células que sobreexpresaban PLD2-GFP. En estas condiciones experimentales observamos una disminución de la proteína PLD2 del 30-40% tras 18 horas desde la transfección y del 100% tras 24 horas. El control de carga se realizó mediante incubación con el anticuerpo anti-Rab6. (Figura 35). Mediante RT-PCR a tiempo real cuantificamos la cantidad de ARNm de PLD2 endógena presente en las células tras la transfección con siRNA-PLD2. Obtuvimos que la expresión de PLD2 descendió hasta un 43% después de 48 horas desde la transfección.

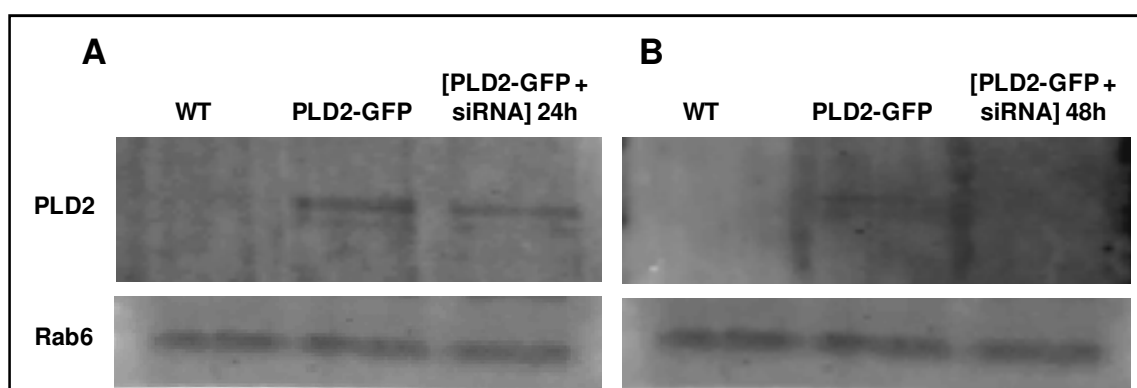


Figura 35. Electroforesis de extractos de células HeLa. A) control (WT), transfección con el plásmido para PLD2-GFP y transfección durante 24 horas con el plásmido para PLD2-GFP a la vez que con siRNA-PLD2. B) control (WT), transfección con el plásmido para PLD2-GFP y transfección durante 48 horas con el plásmido para PLD2-GFP a la vez que con siRNA-PLD2.

Observamos que la típica localización perinuclear del complejo de Golgi se conservaba en células transfectadas con siRNA-PLD2 (Figura 37). A 15°C, las células con PLD2 silenciada mostraron el típico patrón de marcaje perinuclear de la enzima T2; sin embargo, apenas mostraron tubulación (Figuras 38 y 39). Contrariamente, las células transfectadas con siRNA-PLD2 y tratadas con BFA no mostraron ninguna alteración aparente en la tubulación. La cuantificación de estos experimentos reveló que el porcentaje de células tubuladas en condiciones de baja temperatura durante 45 min o 3 horas disminuyó significativamente de un 80-90% a 55-60% en células silenciadas (Figura 36). Por el contrario, el silenciamiento no alteró el porcentaje de tubulación inducido por BFA (Figura 40).

En conjunto, nuestros resultados muestran que PLD2 es necesaria para la formación de los túbulos inducidos a baja temperatura pero no para los inducidos por BFA, una nueva diferencia que consolida la hipótesis de la existencia de dos tipos de túbulos en el complejo de Golgi, con diferentes mecanismos de formación, y probablemente, diferentes funciones (ver discusión).

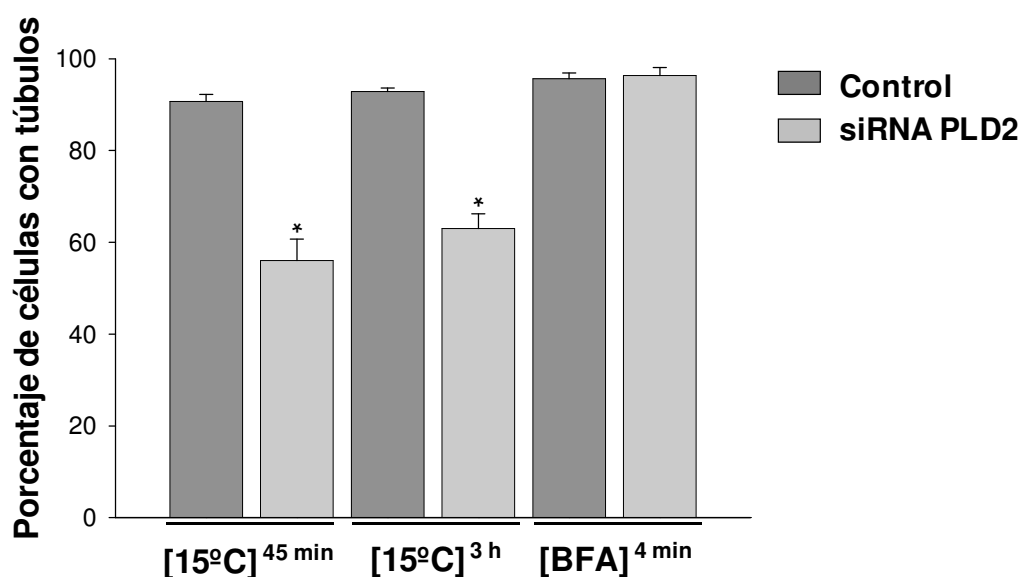
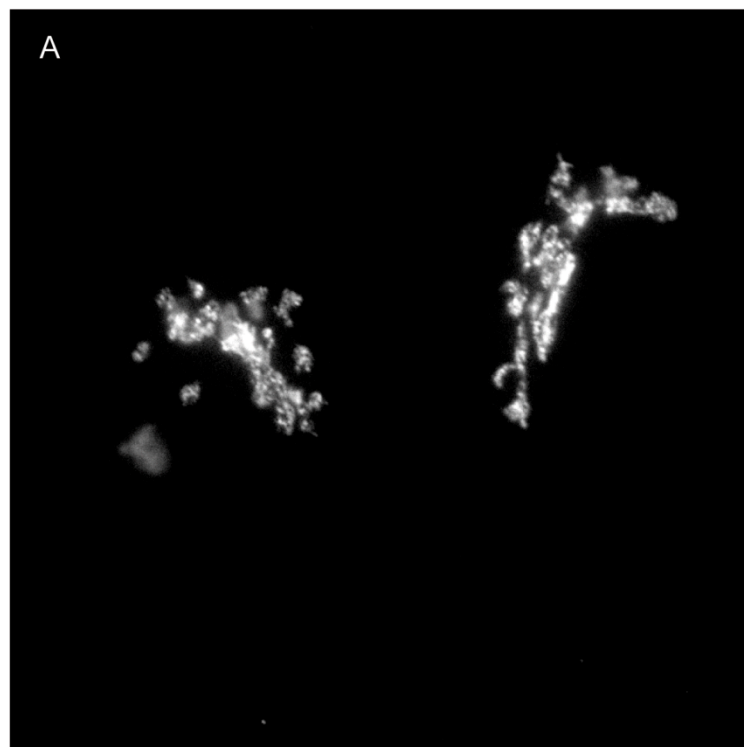


Figura 36. Cuantificación del efecto del tratamiento con siRNA-PLD2 sobre la formación de túbulos derivados del complejo de Golgi inducidos a baja temperatura y BFA. Los cambios estadísticamente significativos se muestran con un asterisco ($p \leq 0,05$).

[37°C]



siRNA-PLD2 [37°C]

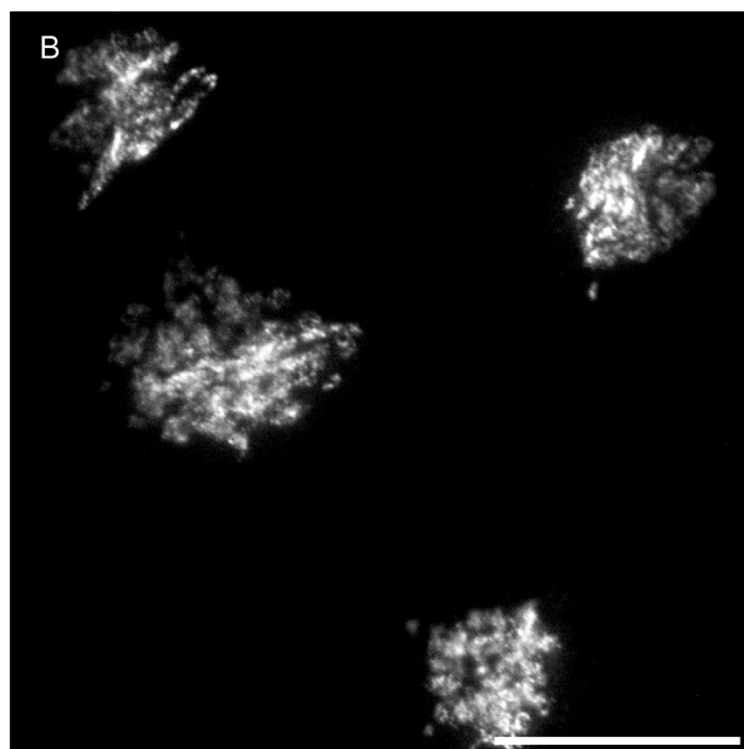
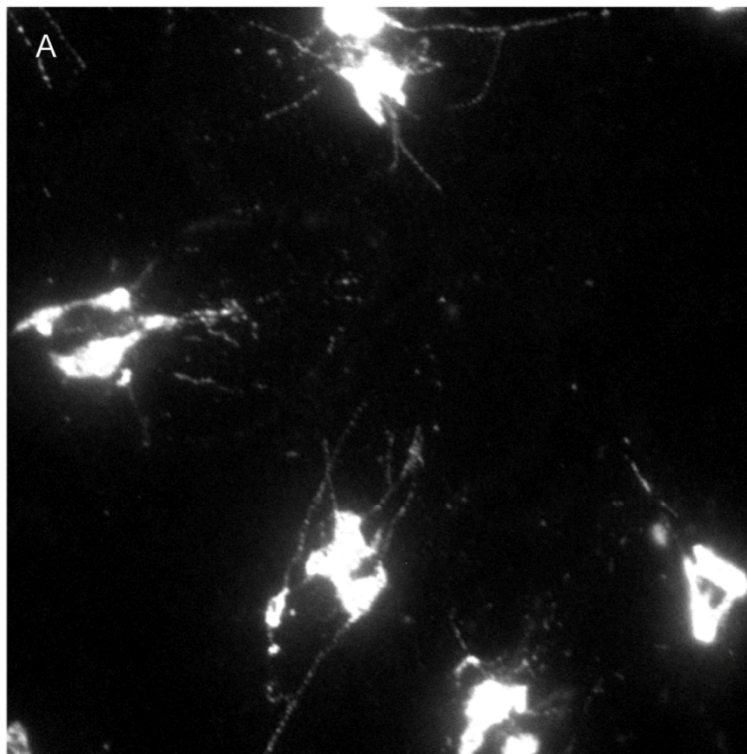


Figura 37. Inmunofluorescencia de células HeLa cultivadas a 37°C y marcadas con T2. A) Condiciones control (37°C). B) Células transfectadas con siRNA-PLD2. Se observa el marcaje típico de la tinción del complejo de Golgi en ambos casos. Barra de calibrado 20 μm .

[15°C] 45min



[15°C] 45min + siRNA-PLD2

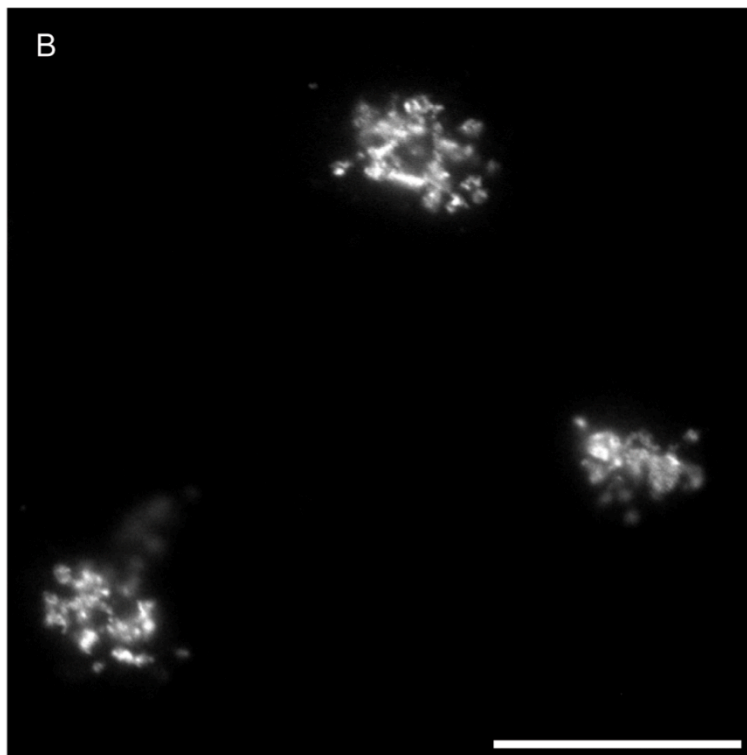
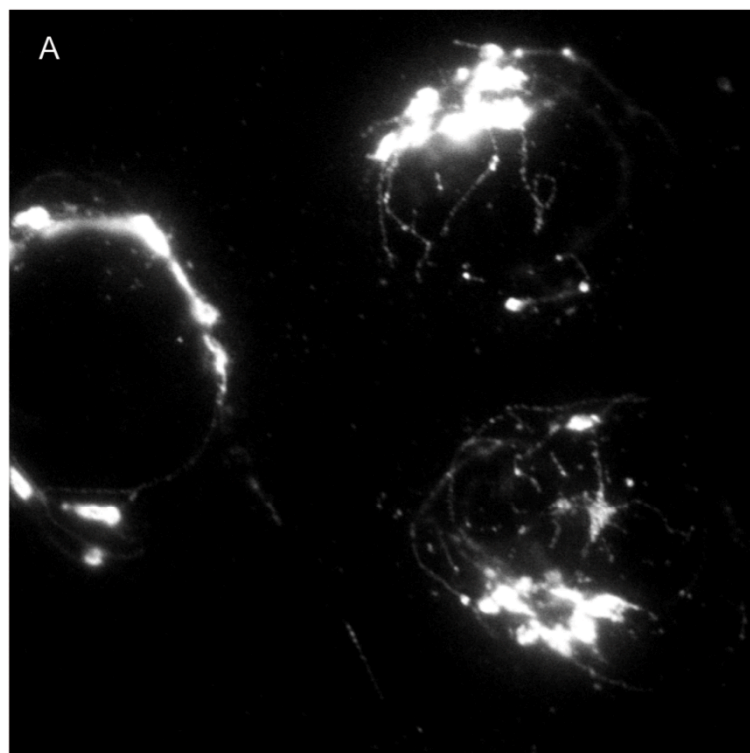


Figura 38. Inmunofluorescencia de células HeLa cultivadas a 15°C durante 45 min y marcadas con T2. A) Condiciones control. B) Células transfectadas con siRNA-PLD2. Se puede observar la típica tubulación en condiciones de baja temperatura, mientras que en células transfectadas con siRNA se bloquea la formación de túbulos. Barra de calibrado 20 μ m.

[15°C] 3h



[15°C] 3h + siRNA-PLD2

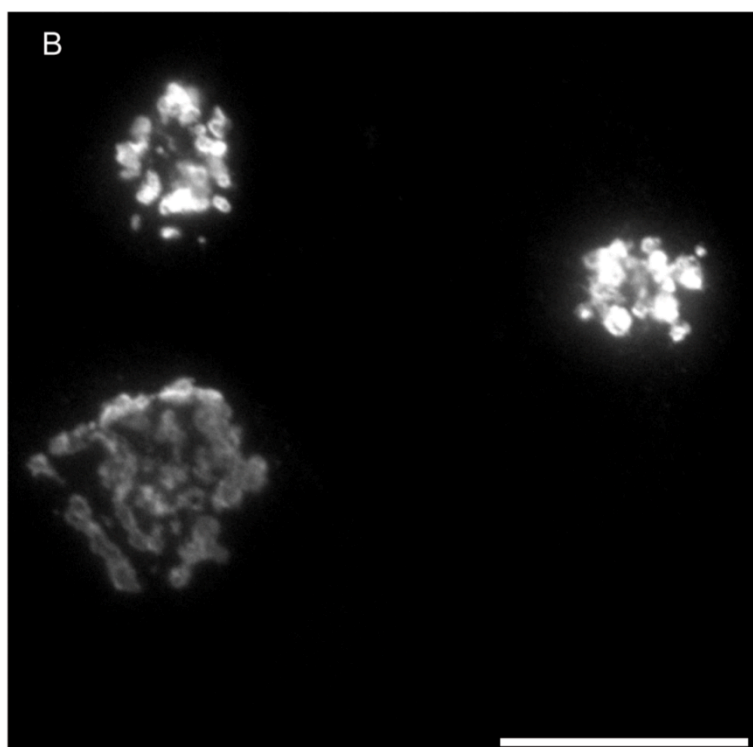
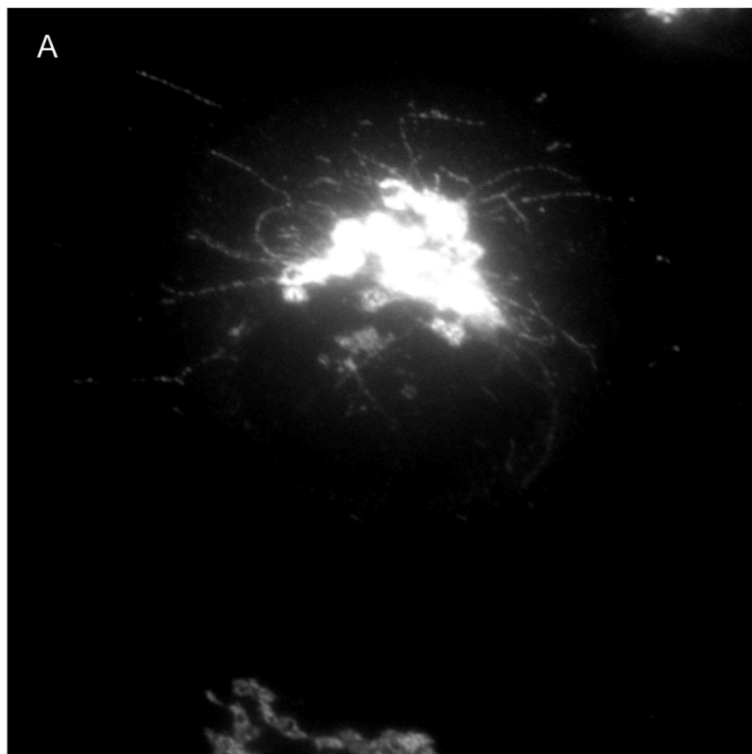


Figura 39. Inmunofluorescencia de células HeLa cultivadas a 15°C durante 3 horas y marcadas con T2. A) Condiciones control. B) Células transfectadas con siRNA-PLD2. Se observan los túbulos emergiendo del complejo de Golgi en condiciones de baja temperatura, mientras que no se observan en células silenciadas. Barra de calibrado 20 μm .

[BFA] 4min



[BFA] 4min + siRNA-PLD2

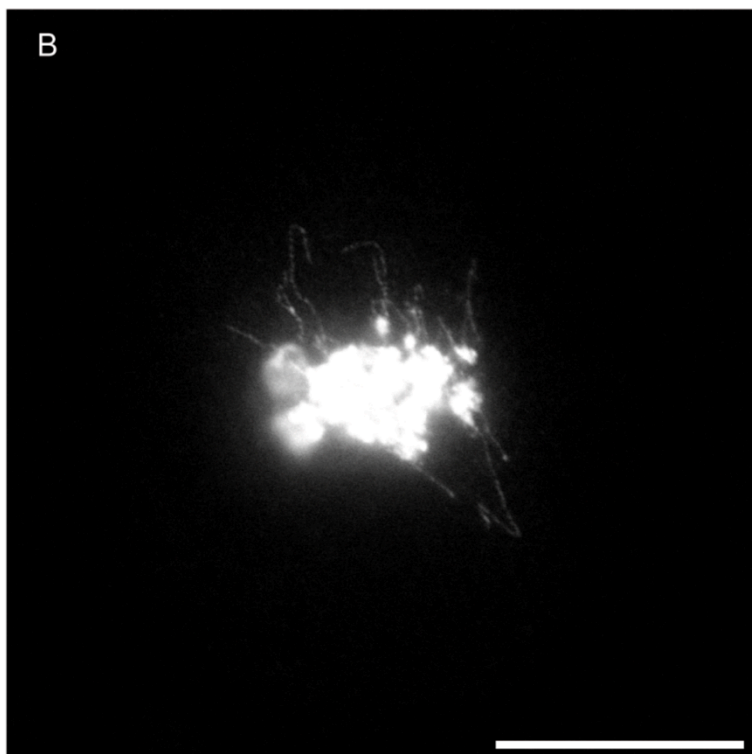


Figura 40. Inmunofluorescencia de células HeLa tratadas con BFA durante 4 min y marcadas con T2. A) Condiciones control. B) Células transfectadas con siRNA-PLD2. En ambos casos se observa la tubulación típica inducida por BFA. Barra de calibrado 20 μ m.

3 Papel de PLD2 en el complejo de Golgi en condiciones fisiológicas.

Los experimentos a baja temperatura apoyan el papel de PLD2 en la formación de túbulos derivados del complejo de Golgi. Para confirmar esta relación exploramos el papel de esta enzima en condiciones fisiológicas (37°C) usando diferentes aproximaciones: (i) analizando su distribución en las membranas del complejo de Golgi a nivel ultraestructural, (ii) disminuyendo su nivel de expresión mediante siRNA, (iii) bloqueando su actividad por un inhibidor específico, y finalmente, (iv) sobreexpresando la enzima.

3.1 Localización ultraestructural de PLD2.

En el trabajo de Freyberg y colaboradores (2002) realizado en la línea celular de pituitaria de rata, GH3 se demostró que la enzima PLD2 se encuentra en los laterales de las cisternas del complejo de Golgi, tal y como cabría esperar si la enzima juega un papel en la formación de túbulos. Para evaluar si sucede lo mismo en nuestro modelo celular y obtener información detallada sobre su distribución, utilizamos técnicas de crioinmunocitoquímica ultraestructural. El anticuerpo comercial para PLD2 no presentó buenos resultados en esta técnica. Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre la localización y funcionalidad de PLD2 en el complejo de Golgi, necesitábamos una herramienta mejor, por lo que obtuvimos un nuevo anticuerpo diseñado por una empresa especializada. Este nuevo anticuerpo dio muy buenos resultados en inmunofluorescencia, Wester Blot e inmunomicroscopía electrónica. En esta última técnica, las secciones ultrafinas fueron marcadas utilizando este anticuerpo no comercial contra PLD2 y se observó un marcaje específico sobre las membranas del complejo de Golgi. Encontramos que la enzima se localizó en un 61% en las cisternas del complejo de Golgi, y en un 39% en elementos túbulovesiculares en la región peri-Golgi (Figura 41). Un análisis más detallado demostró que PLD2 se encuentra en los laterales y zonas dilatadas de las cisternas (flechas en la figura 41A, B y E), incluido en gemas de cubiertas con COPI (Figura 41C). La mayoría de las vesículas inmunorreactivas para PLD2 eran no revestidas (80% de las vesículas marcadas) (Figura 41D) aunque también encontramos vesículas revestida de clatrina (12%) y COPI (7%). Con estos resultados se confirma la presencia específica de la enzima sobre los laterales de las cisternas y en la región peri-Golgi, regiones en las que se produce la formación de túbulos.

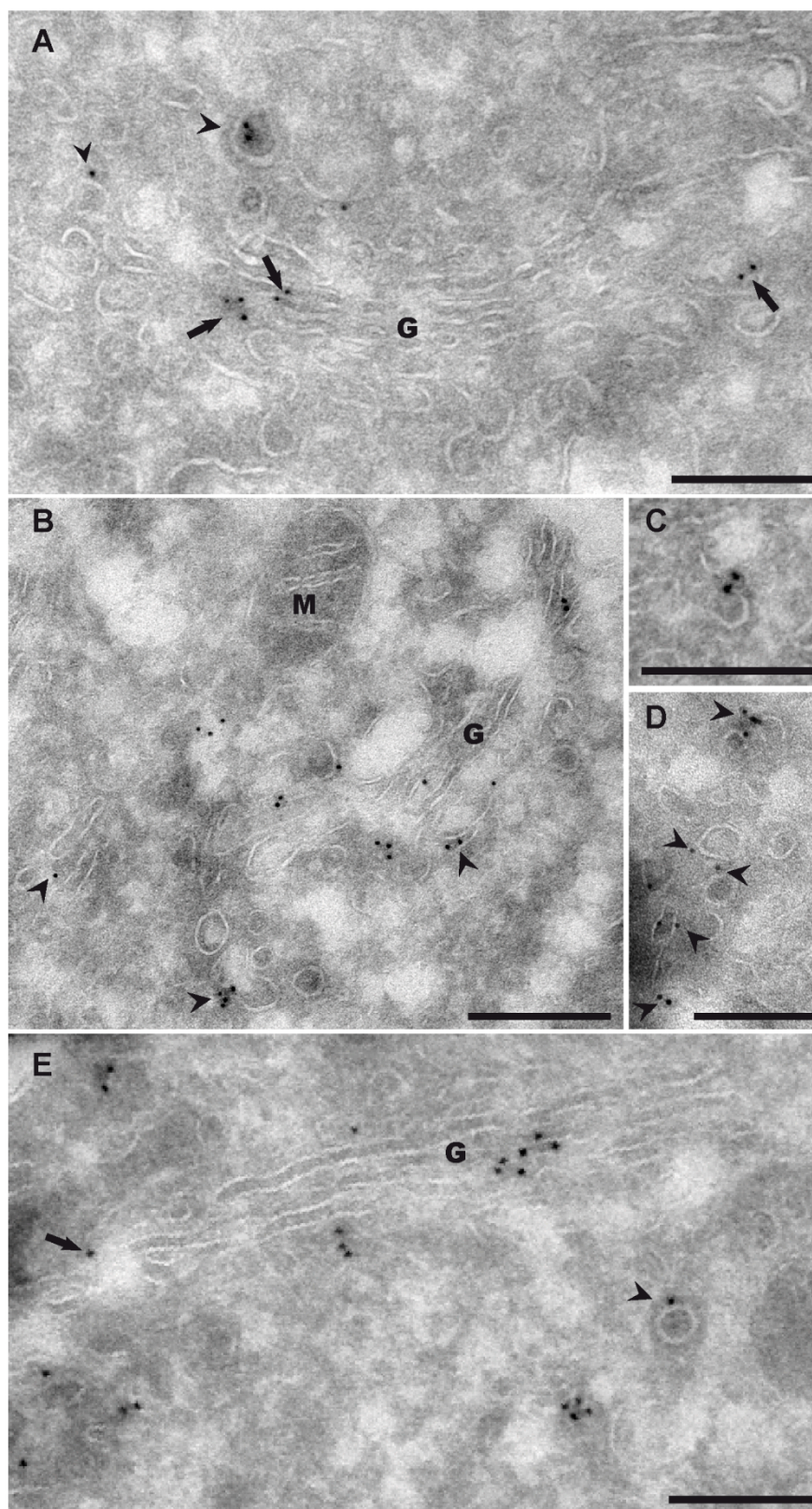


Figura 41. Localización ultraestructural de PLD2. Criosecciones ultrafinas de células HeLa inmunomarcadas con PLD2 y oro coloidal conjugado a la proteína A-oro. A, B y E) La enzima se localiza en cisternas del complejo de Golgi (G), en los laterales de las cisternas (flechas) y en estructuras tubulovesiculares peri-Golgi con y sin cubiertas (puntas de flecha). C) brote revestido de cubiertas COPI en el lateral de una cisterna. M, mitocondria. Barra de calibrado 0,2 μ m.

3.2 Efecto del silenciamiento de PLD2.

Para analizar el papel de esta enzima se examinó cómo su silenciamiento génico podía afectar en la morfología del complejo de Golgi. En primer lugar, se estudió la morfología del complejo de Golgi en células transfectadas con siRNA-PLD2 mediante ensayos de inmunofluorescencia. Para ello, se utilizaron un gran número de marcadores específicos de este orgánulo, como son la enzima de glicosilación T2, proteínas Rab (Rab1), SNARE (GS28), proteínas de matriz (GM130, GRASP65, TGN46) y proteínas implicadas en la formación de las cubiertas COPI (COPI, GBF1, ARFGAP1). Para la detección de ArfGAP1 endógeno en los ensayos de inmunofluorescencia, utilizamos un anticuerpo policlonal comercial que es específico para esta proteína, y que no reconoce a las isoformas ArfGAP2/3. Para corroborar estos datos se realizó una transferencia Western de un lisado de células HeLa cultivadas a 37°C y detectamos ArfGAP1 a la altura de su peso molecular correspondiente (44,67 KDa), pero no ArfGAP2 ni ArfGAP3, cuyos pesos moleculares son mayores 56,72 KDa y 56,93 KDa, respectivamente (Figura 42).

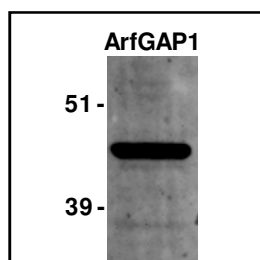


Figura 42. Electroforesis y transferencia Western de extractos de células HeLa e incubación con el anticuerpo primario anti-ArfGAP1 seguido de un anticuerpo secundario fluorescente.

En las células con la expresión de PLD2 silenciada observamos que la localización del complejo de Golgi se mantiene inalterada, mostrando el marcaje típico perinuclear, y su morfología no presentó cambios significativos (Figuras 43 y 44). Sin embargo, observamos que el silenciamiento de PLD2 indujo la formación de túbulos que contienen proteínas de la matriz del complejo de Golgi GM130 y GRASP65 (Figura 45). Cabe mencionar que no observamos esta tubulación en el caso de marcadores de la cara cis/media del complejo de Golgi tales como Rab 1 o T2 (Figuras 43 y 45).

Mediante microscopía electrónica se confirmó que la morfología del complejo de Golgi en células silenciadas era normal (Figura 46). Aunque las estructuras tubulares son difíciles de observar en imágenes bidimensionales, se pudieron observar

algunos túbulos emergiendo de los laterales del complejo de Golgi y de las cisternas cis. Ocasionalmente, se observaron túbulos con constricciones o estrechamientos en toda su longitud (Figura 46A), lo que sugiere que el proceso de fisión podría estar inhibido.

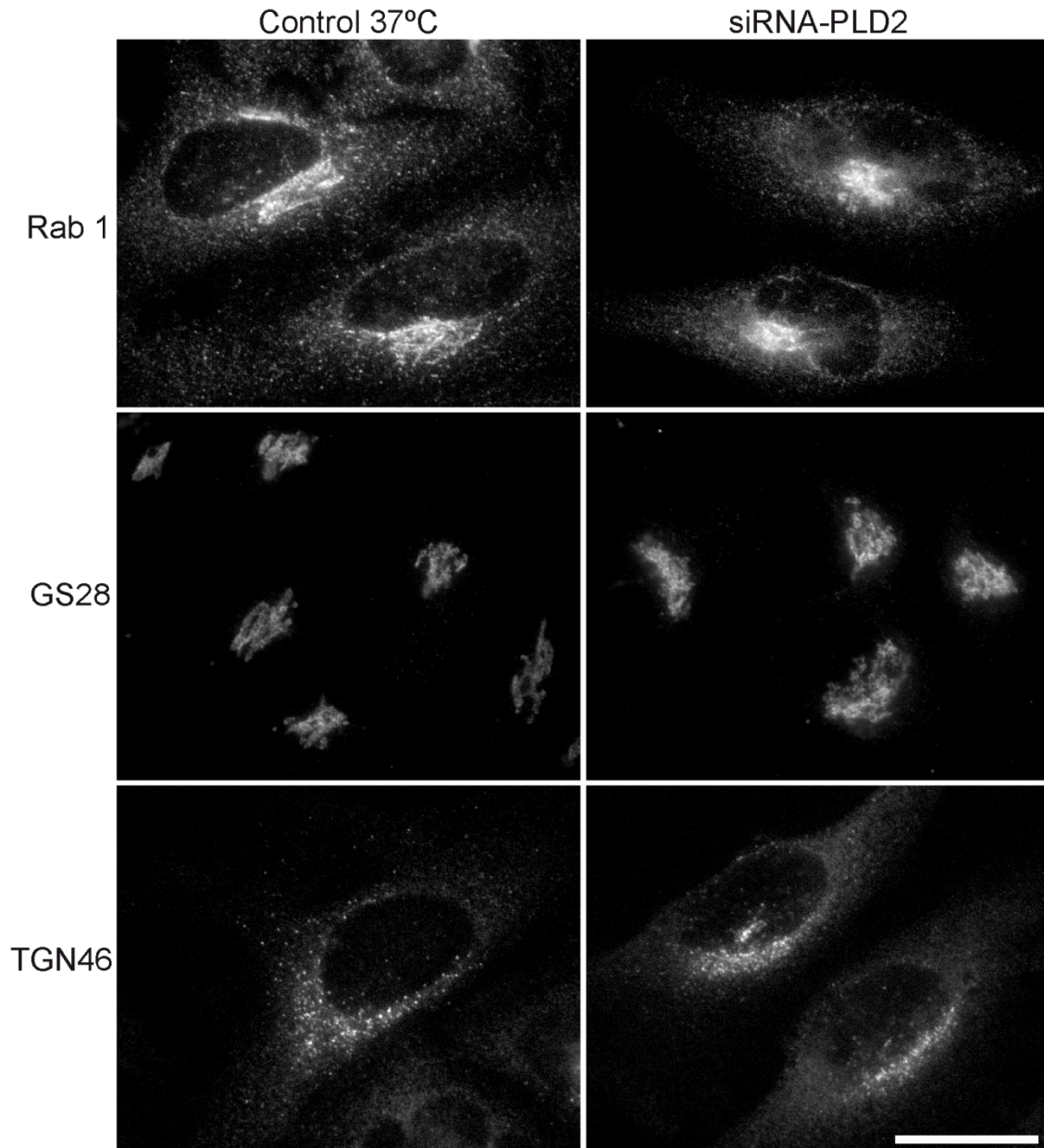


Figura 43. Efecto del silenciamiento génico de PLD2 sobre la morfología del complejo de Golgi. Inmunofluorescencia de células HeLa cultivadas a 37°C y transfectadas con siRNA-PLD2 e inmunomarcadas para Rab1, GS28 y TGN46. No se observan modificaciones en los patrones de distribución. Barra de calibrado 20 μ m.

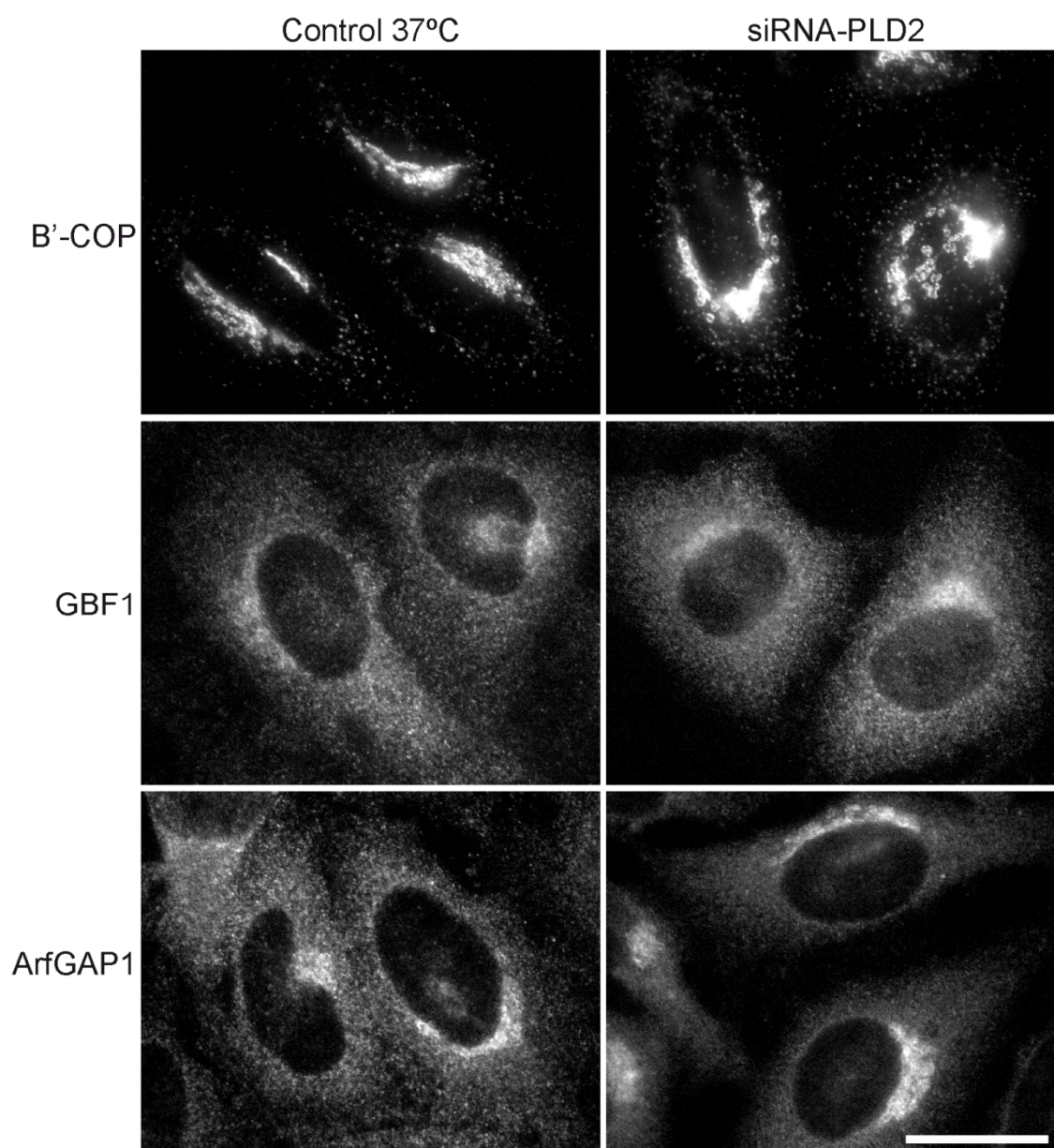


Figura 44. Efecto del silenciamiento génico de PLD2 sobre la morfología del complejo de Golgi. Inmunofluorescencia de células HeLa cultivadas a 37°C y transfectadas con siRNA-PLD2 e inmunomarcadas para β' -COP, GBF1 y ArfGAP1. No se observan modificaciones en los patrones de distribución. Barra de calibrado 20 μ m.

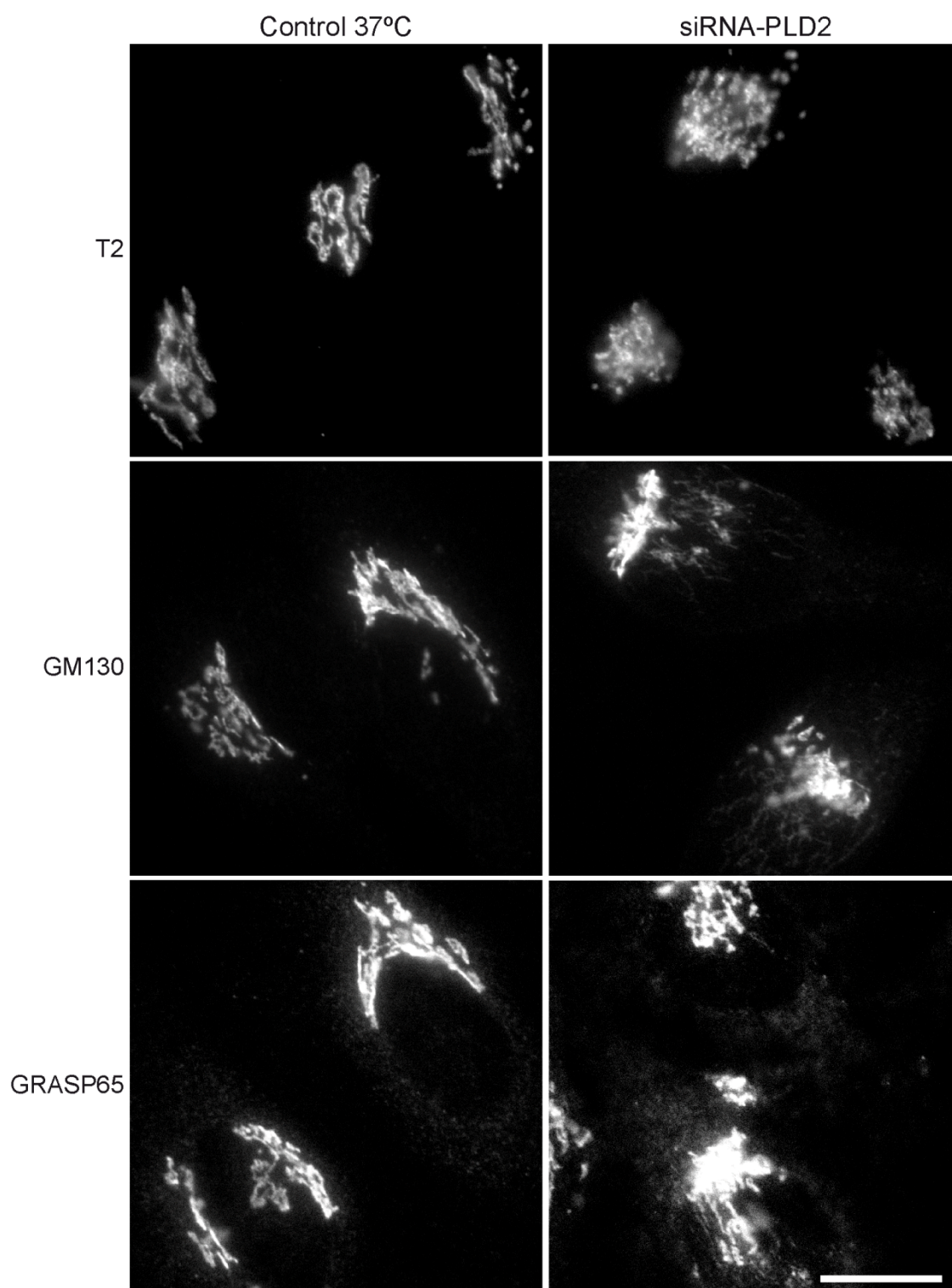


Figura 45. Efecto del silenciamiento génico de PLD2 sobre la morfología del complejo de Golgi. Inmunofluorescencia de células HeLa cultivadas a 37°C y transfectadas con siRNA-PLD2 e inmunomarcadas para T2, GM130 y GRASP65. En ambas condiciones no se aprecian diferencias en el marcaje con T2, mientras que, con GM130 y GRASP65 se observan túbulos emergiendo del complejo de Golgi en las células con PLD2 silenciada. Barra de calibrado 20 μ m.

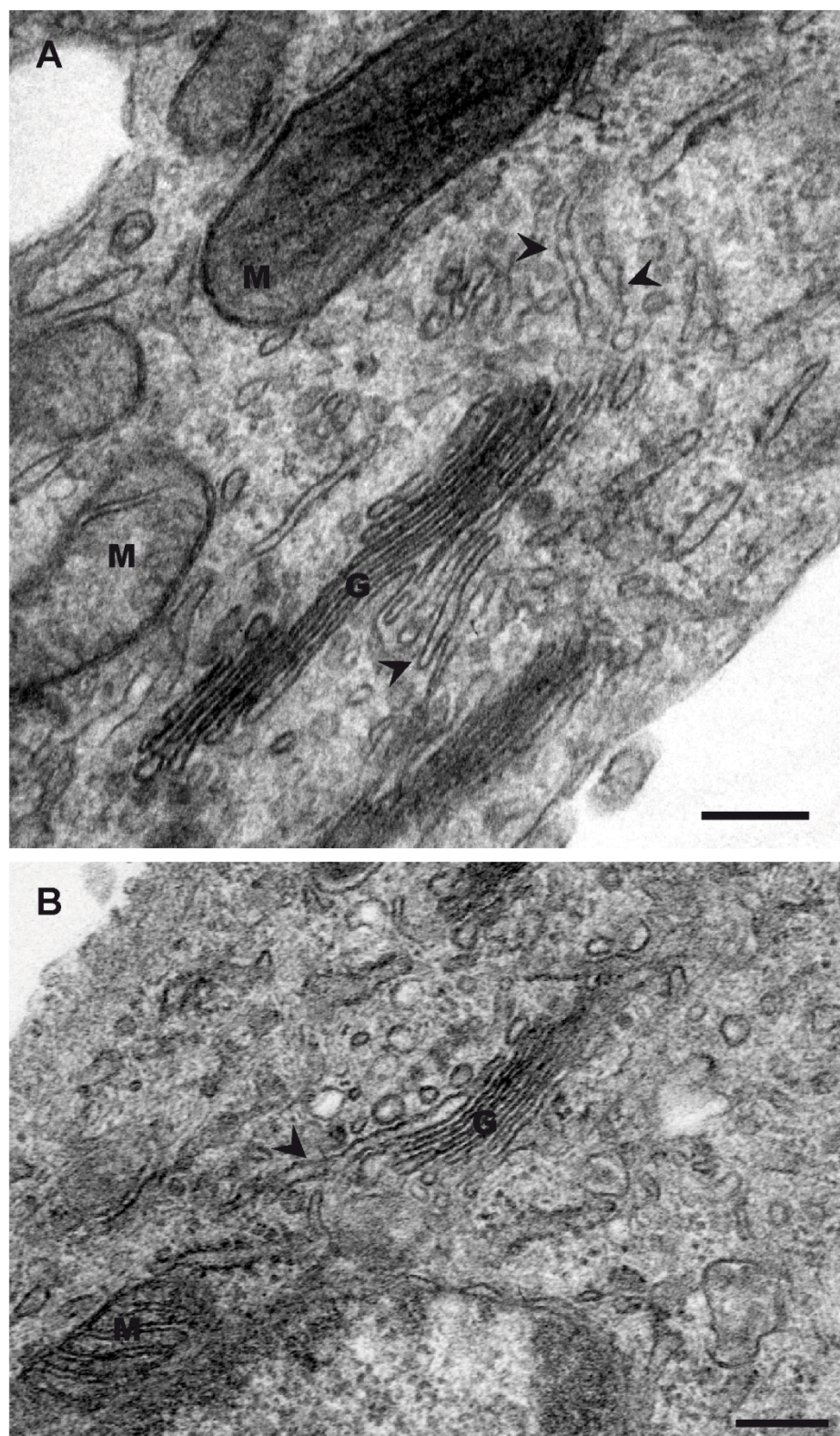


Figura 46. Efecto del silenciamiento génico de PLD2 sobre la morfología del complejo de Golgi. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión. Las puntas de flecha señalan túbulos emergiendo de los laterales de las cisternas del complejo de Golgi. G, complejo de Golgi; M, mitocondria. Barra de calibrado 0,2 μm .

3.3 Efecto de inhibidores específicos de las isoformas PLD1 y PLD2.

Las herramientas disponibles para inhibir la actividad de la enzima PLD son limitadas, incluyendo el compuesto 1-butanol, el cual no es un inhibidor de PLD, sino que bloquea la producción de PA compitiendo con el agua como nucleófilo, causando la formación de fosfatidil-1-butanol. Para comprobar si la tubulación en células silenciadas está específicamente relacionada con la actividad enzimática de PLD2, realizamos ensayos de inhibición con unos nuevos compuestos altamente selectivos para cada isoforma. El compuesto VU0364739 (Lavieri et al., 2010), es hasta la fecha el inhibidor selectivo más potente de PLD2, el cual muestra una constante de inhibición media (IC_{50}) de 20 nM y posee una selectividad 75 veces mayor que para PLD1 en ensayos *in vivo*, mientras que VU0359595 (Lewis et al., 2009) inhibe la isoforma PLD1 con una IC_{50} de 3,7 nM y una selectividad de 1700 veces respecto a PLD2.

Mediante análisis de inmunofluorescencia, observamos que en células tratadas con el inhibidor selectivo para PLD2 el complejo de Golgi mostró una morfología normal como se observó con el marcador T2 (Figura 47). Sin embargo, tal y como ocurría en las células transfectadas con siRNA-PLD2, se observaron túbulos inmunorreactivos para GM130 y GRASP65 (Figura 47). De hecho, se observó un nivel mucho mayor de tubulación con este inhibidor que el observado en células con PLD2 silenciada.

Por el contrario, en el caso de las células tratadas con el inhibidor de PLD1, no observamos tubulación para ninguno de los marcadores analizados y la morfología del complejo de Golgi se mantuvo intacta (Figura 47), lo que confirma que la disminución de los niveles de PA generado por PLD2, pero no por PLD1, en las membranas del complejo de Golgi genera este tipo de tubulación.

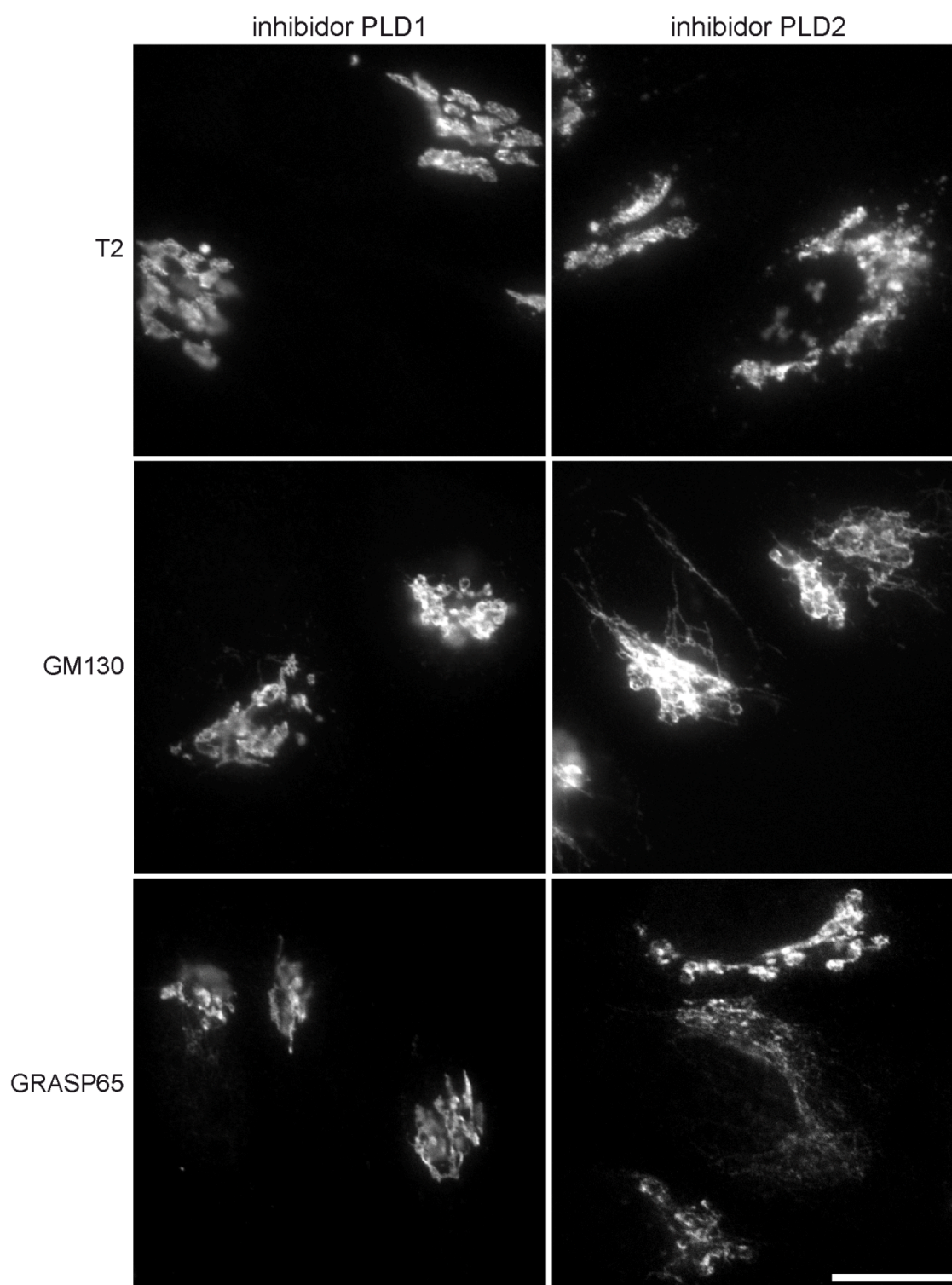


Figura 47. Efecto de la inhibición selectiva de la actividad enzimática de PLD1 y PLD2 sobre la morfología del complejo de Golgi. Células inmunomarcadas para T2, GM130 y GRASP65. Se observa tubulación en células con PLD2 inhibida e inmunomarcadas con los anticuerpos contra GM130 y GRASP65. Barra de calibrado 20 μm .

3.4 Análisis morfológico del complejo de Golgi en células transfectadas con PLD2-GFP.

Para analizar cómo la sobreexpresión de PLD2 podía afectar la morfología del complejo de Golgi, transfectamos las células con un plásmido portador de la secuencia del gen de PLD2 unida a GFP en el extremo C-terminal. En ensayos de inmunofluorescencia, la enzima unida a GFP mostró una distribución celular similar a la enzima endógena, es decir, apareció en la membrana plasmática y en el citoplasma con una concentración de la señal en la región perinuclear. Para estudiar el estado del complejo de Golgi en estas condiciones de sobreexpresión, realizamos estudios de doble marcaje con diferentes marcadores del complejo de Golgi (T2, GM130, ArfGAP1, COPI (β '-COP) y COPII). En las técnicas de transfección, la cantidad de proteína expresada por célula es variable, de manera que se pueden observar células que no expresan PLD2-GFP, es decir, células no transfectadas, células que expresan débilmente y células que sobreexpresan PLD2-GFP (Figura 48). En células que no expresan PLD2-GFP, se observó que el patrón de marcaje del complejo de Golgi es el típico marcaje perinuclear. Sin embargo, en células con marcaje débil para PLD2-GFP, el complejo de Golgi se mostró desorganizado (Figura 48). En las células que expresan PLD2-GFP no aparecía marcada la región perinuclear, sugiriendo que el complejo de Golgi estaba totalmente desorganizado (Figura 48). Por el contrario, en células transfectadas con este plásmido pero sin el gen para PLD2, la morfología del complejo de Golgi permanece intacta. Esto induce a pensar que la arquitectura del complejo de Golgi se ha visto afectada por la sobreexpresión de PLD2, sugiriendo un papel de la enzima en el mantenimiento de la morfología de este orgánulo.

Para analizar en profundidad qué estaba ocurriendo con el complejo de Golgi realizamos un análisis ultraestructural en células que sobreexpresaban PLD2-GFP. Al igual que se observó con inmunofluorescencia, encontramos complejos de Golgi con diferentes niveles de desorganización. Así, pudimos observar complejos totalmente desorganizados, de modo que en lugar de dictiosomas con cisternas apiladas, encontramos una extensa red tubular (Figura 49A). En secciones de crioinmunomicroscopía electrónica también observamos complejos de Golgi marcados contra GM130 que comienzan a desorganizarse, probablemente se trate de células que sobreexpresan bajos niveles de PLD2-GFP y, además, observamos numerosos túbulos que emergen de sus membranas (Figura 49B). Estos resultados demuestran que PLD2 regula la morfología del complejo de Golgi.

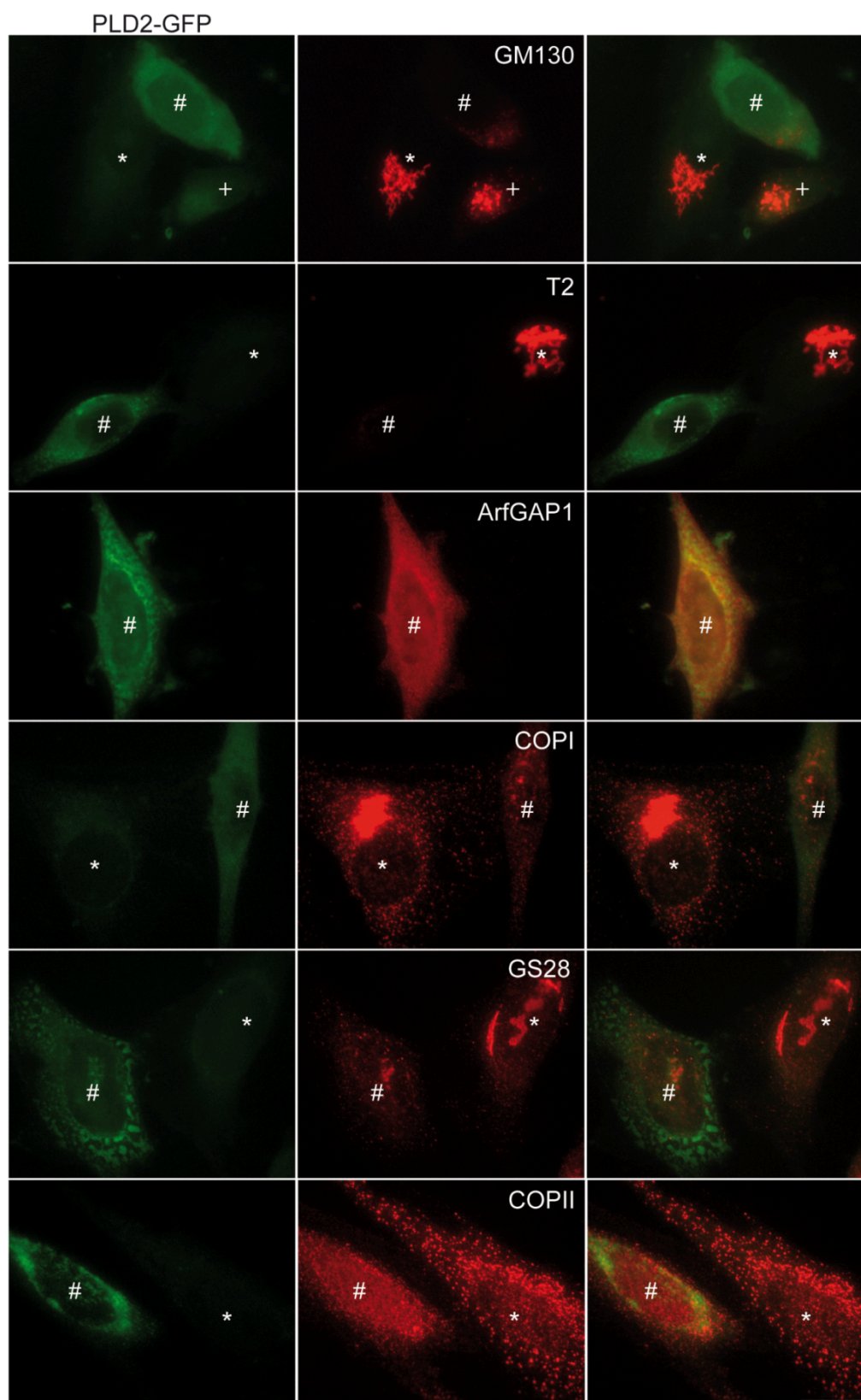


Figura 48. Efecto de la sobreexpresión de PLD2 en la morfología del complejo de Golgi. Inmunofluorescencia de células transfectadas transitoriamente con PLD2-GFP. Las células que sobreexpresan altos niveles de PLD2-GFP (#) aparentemente pierden el marcaje de Golgi. La morfología del complejo de Golgi en células que expresan niveles bajos de PLD2 (+) se ve alterada en comparación con las células no transfectadas (*). Barra de calibrado 20 μ m.

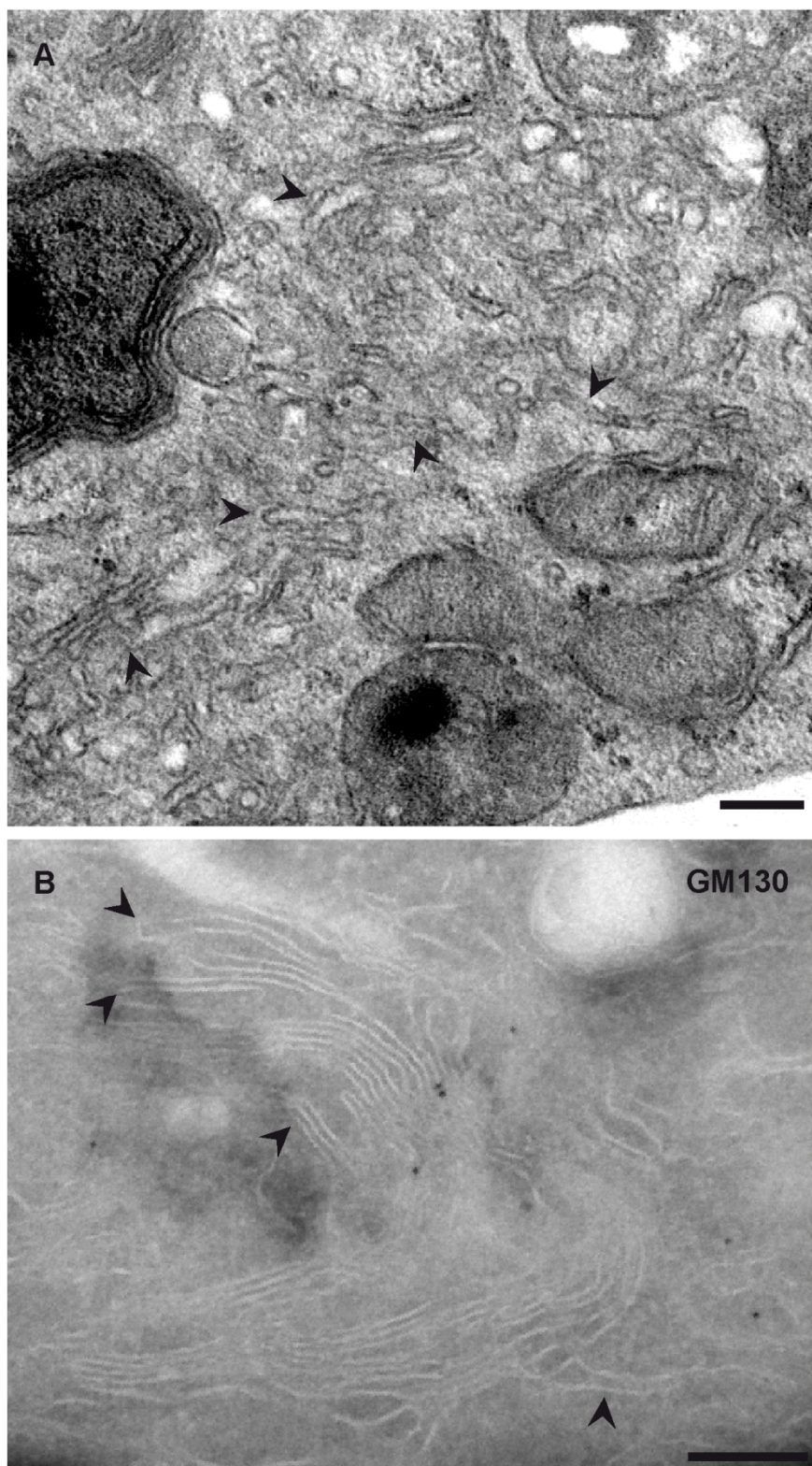


Figura 49. Efecto de la sobreexpresión de PLD2 sobre la morfología del complejo de Golgi. A) Microscopía electrónica de transmisión. El complejo de Golgi aparece desorganizado. Las puntas de flechas señalan estructuras tubulares. B) Crio-secciones ultrafinas inmunomarcadas con GM130 y oro coloidal conjugado a la proteína A-oro. Se observan túbulos emergiendo del complejo de Golgi (punta de flecha) y un marcaje débil de GM130. Barra de calibrado 0,2 μm .

4 Distribución de proteínas relacionadas con la formación de las cubiertas COPI en células con tubulación inducida.

El proceso de deformación de la membrana para formar túbulos, además de una composición lipídica específica, puede requerir de la participación de proteínas que deformen la membrana, como las cubiertas COPI (ver apartado de Revisión Bibliográfica). Tal y cómo se ha descrito para los túbulos de BFA, la formación de los túbulos inducidos a baja temperatura podría también estar relacionada con la maquinaria molecular implicada en la formación de las cubiertas COPI. Para comprobar esta hipótesis, se analizó mediante ensayos de inmunofluorescencia el efecto que produce el tratamiento con BFA y el cultivo a baja temperatura sobre la distribución en la célula y su asociación con las membranas del complejo de Golgi de las cubiertas COPI (β' -COP) y de las proteínas que regulan su formación GBF1, Arf1, ArfGAP1 y BARS (Figura 50).

La subunidad coatomérica β' -COP, en condiciones fisiológicas, se localizó sobre la zona perinuclear (marcaje del complejo de Golgi) y por el citoplasma en forma de un punteado (Figura 50). Tanto con BFA como a baja temperatura el marcaje de la zona perinuclear disminuyó ligeramente y aumentó el marcaje citoplasmático.

El factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) de Arf, GBF1 se localizó en el citoplasma en forma de un fino punteado concentrándose el marcaje sobre la zona perinuclear (Figura 50). En condiciones de cultivo de 15°C, el marcaje de la zona perinuclear fue similar al obtenido en condiciones control, sin embargo el punteado citoplasmático aumentó de tamaño, como es de esperar debido al bloqueo del transporte en la salida del ERGIC. Por otro lado, tras el tratamiento con BFA, GBF1 se concentró en la región del complejo de Golgi.

La GTPasa Arf1, en condiciones fisiológicas, mostró un patrón perinuclear típico del marcaje del complejo de Golgi (Figura 50). En condiciones de baja temperatura, no se observó alteración en su distribución ni a 45 min ni a 3 horas de incubación. Sin embargo, los túbulos inducidos por la baja temperatura fueron inmunorreactivos. Tras el tratamiento con BFA se observó un patrón citosólico, lo que indica que Arf1 no se encontraba asociada a las membranas del complejo de Golgi.

En trabajos previos (Yang et al., 2008) se ha descrito que la proteína BARS induce la deformación de la membrana, y para esto se requiere de la participación de PA generado por PLD2. A 37°C, se observó marcaje de BARS en el núcleo y muy

débilmente en la región perinuclear. Sin embargo, ni BFA ni la baja temperatura afectaron a la distribución de esta proteína (Figura 50).

En células incubadas a 37°C, ArfGAP1 (proteína activadora de la actividad GTPasa de Arf1) se localizó en la zona perinuclear y de forma dispersa por el citoplasma (Figura 50). BFA alteró esta distribución ya que indujo la liberación de ArfGAP1 de las membranas del complejo de Golgi, tal y como se ha descrito previamente (Lippincott-Schwartz & Liu 2006). Por el contrario, a 15°C se produjo el efecto contrario, esto es el reclutamiento de ArfGAP1 en la región perinuclear. Esta redistribución desde el citosol hasta la zona del área del complejo de Golgi se incrementa con el tiempo de incubación a baja temperatura.

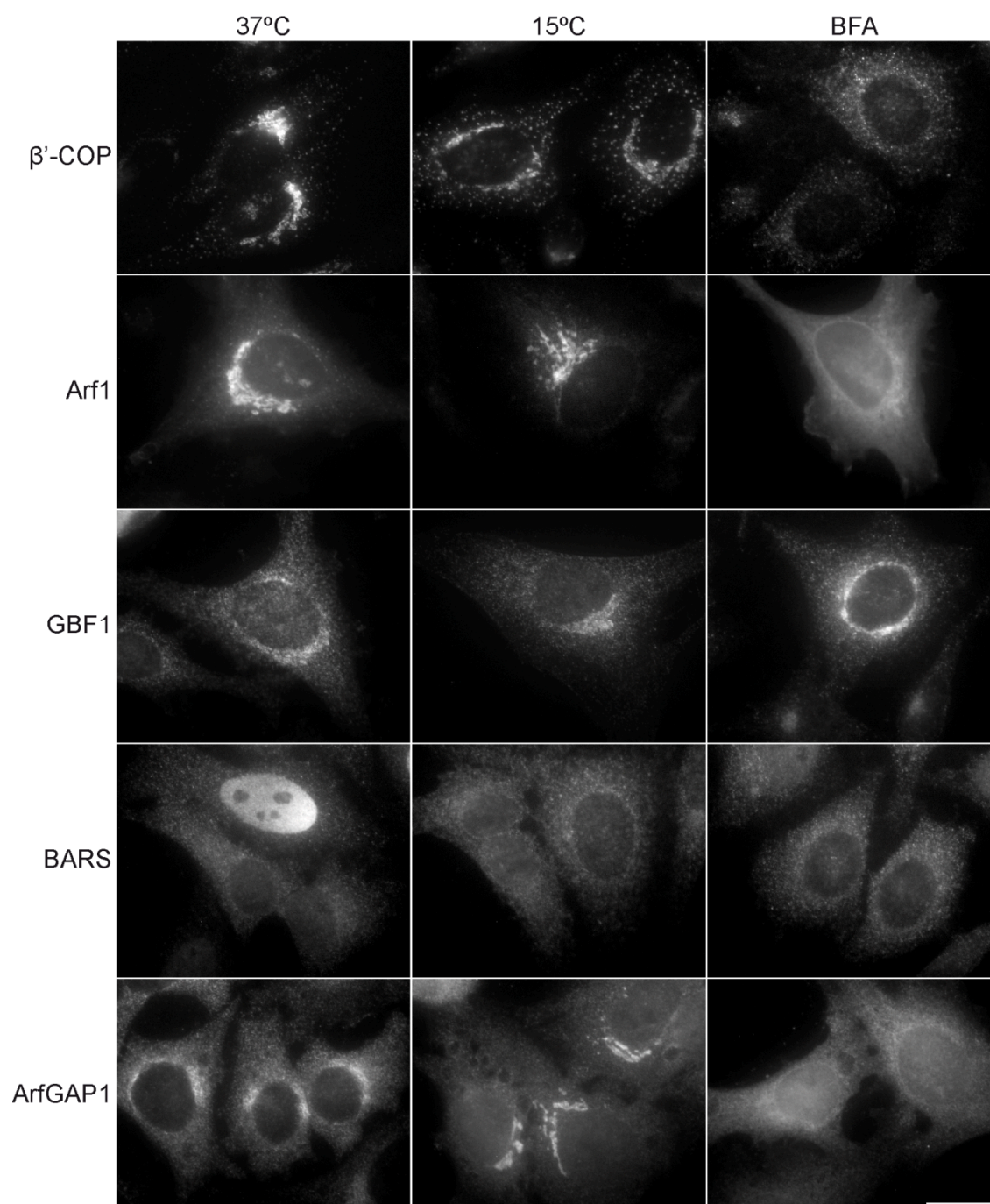


Figura 50. Efecto de la baja temperatura y de BFA sobre la distribución de la maquinaria reguladora de la formación de cubiertas COPI. Inmunofluorescencia de células cultivadas a 37°C, 15°C durante 3 horas o tratadas con BFA. β' -COP disminuye el marcaje en la zona perinuclear con 15°C y BFA, siendo este efecto más pronunciado con BFA. Arf1 el positivo en los túbulos inducidos a 15°C mientras que se redistribuye al citosol con BFA. GBF1 se concentra en el área del complejo de Golgi en células tratadas con BFA. BARS no sufre ningún cambio con ningún tratamiento. ArfGAP1 se concentra en el área del complejo de Golgi a 15°C mientras que se va al citosol con BFA. Barra de calibrado 20 μ m.

5 Caracterización del papel de glicerolípidos en el reclutamiento de ArfGAP1 en el complejo de Golgi.

En el apartado anterior hemos visto que ArfGAP1 se recluta en la región perinuclear a 15°C igual que lo hace PLD2. Además, mediante croinmunomicroscopía electrónica vimos que una parte de PLD2 se encuentra asociada a cubiertas tipo COPI. También se ha descrito que para la asociación de ArfGAP1 a las membranas del complejo de Golgi es necesaria la presencia del glicerolípido DAG (Fernández-Ulibarri et al., 2007). El siguiente objetivo en nuestro estudio fue analizar si existe alguna relación entre PA generado por PLD2 y la asociación de ArfGAP1 a las membranas del complejo de Golgi. Para ello, analizamos el efecto de los compuestos farmacológicos 1-butanol, propranolol, CI976, R59022, VU0364739 y VU0359595, sobre la distribución de ArfGAP1. En células tratadas con 1-butanol, CI976, R59022 y el inhibidor de PLD1, no se produjo ningún cambio en su distribución, observándose el típico marcaje de ArfGAP1 a 37°C, es decir, concentrado en la región del complejo de Golgi y disperso por el citosol (Figura 51). Como esperábamos, con propranolol se produjo la redistribución de ArfGAP1 de las membranas del complejo de Golgi al citosol, observándose un marcaje fluorescente disperso. El resultado más interesante se obtuvo con el inhibidor específico de PLD2 (VU0364739), que alteró la distribución de ArfGAP1 liberándolo al citosol, produciendo una redistribución similar a la observada con propranolol. Estos datos sugieren que ArfGAP1 interactúa con el DAG y/o PA generado por PLD2 durante la formación de distintos tipos de túbulos derivados del complejo de Golgi.

En cuanto a los demás componentes de las cubiertas COPI, también analizamos el efecto de estos compuestos sobre su distribución. No se observó que ninguno de estos agentes farmacológicos afectara la distribución del componente del coatómero β' -COP o del regulador de la formación de las cubiertas GBF1 (Figuras 52 y 53).

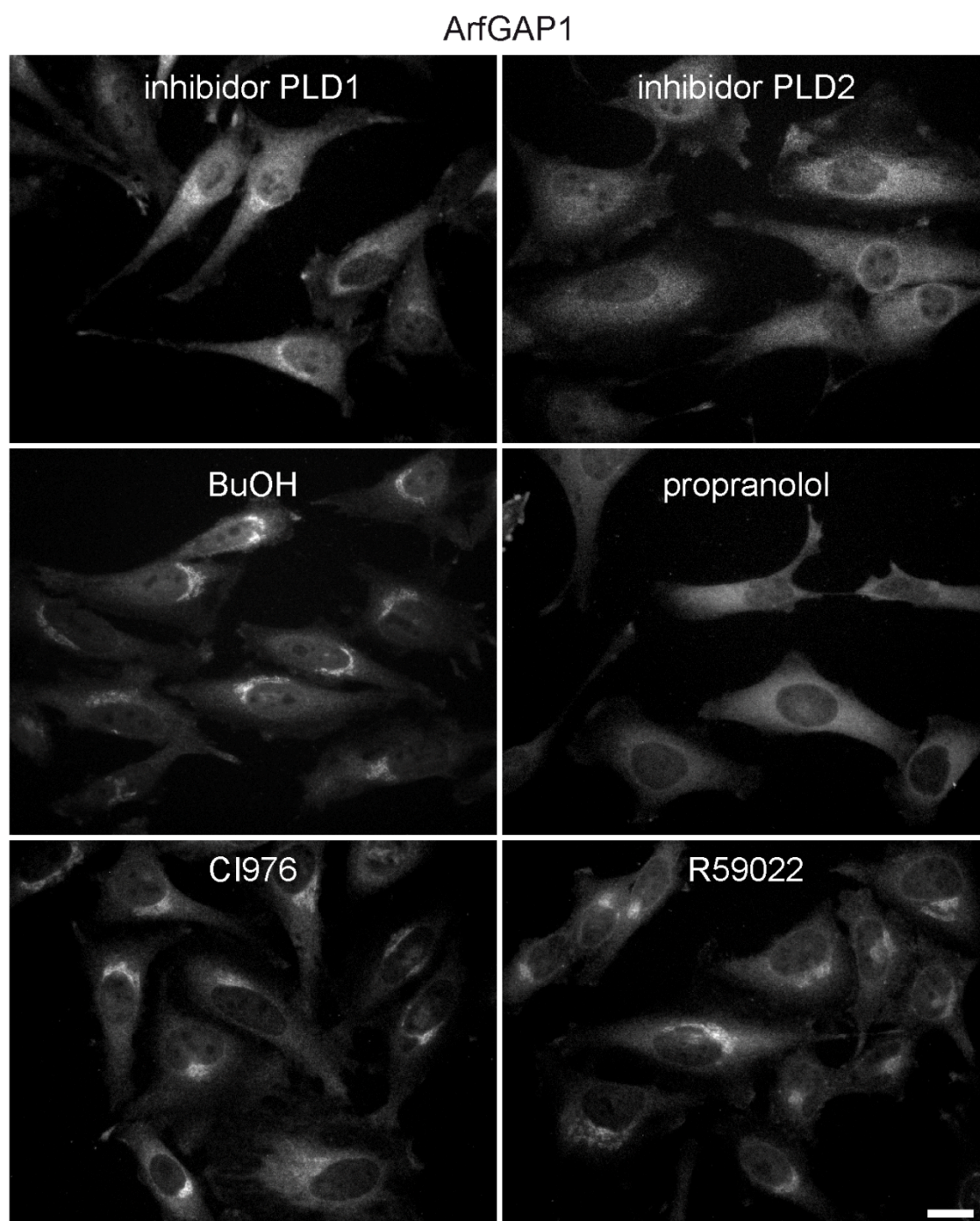


Figura 51. Efecto farmacológico sobre la distribución de la proteína ArfGAP1. Solamente con el inhibidor de PLD2 y propranolol se observa como ArfGAP1 altera su distribución perdiéndose el marcaje en la región perinuclear. Barra de calibrado 20 μ m.

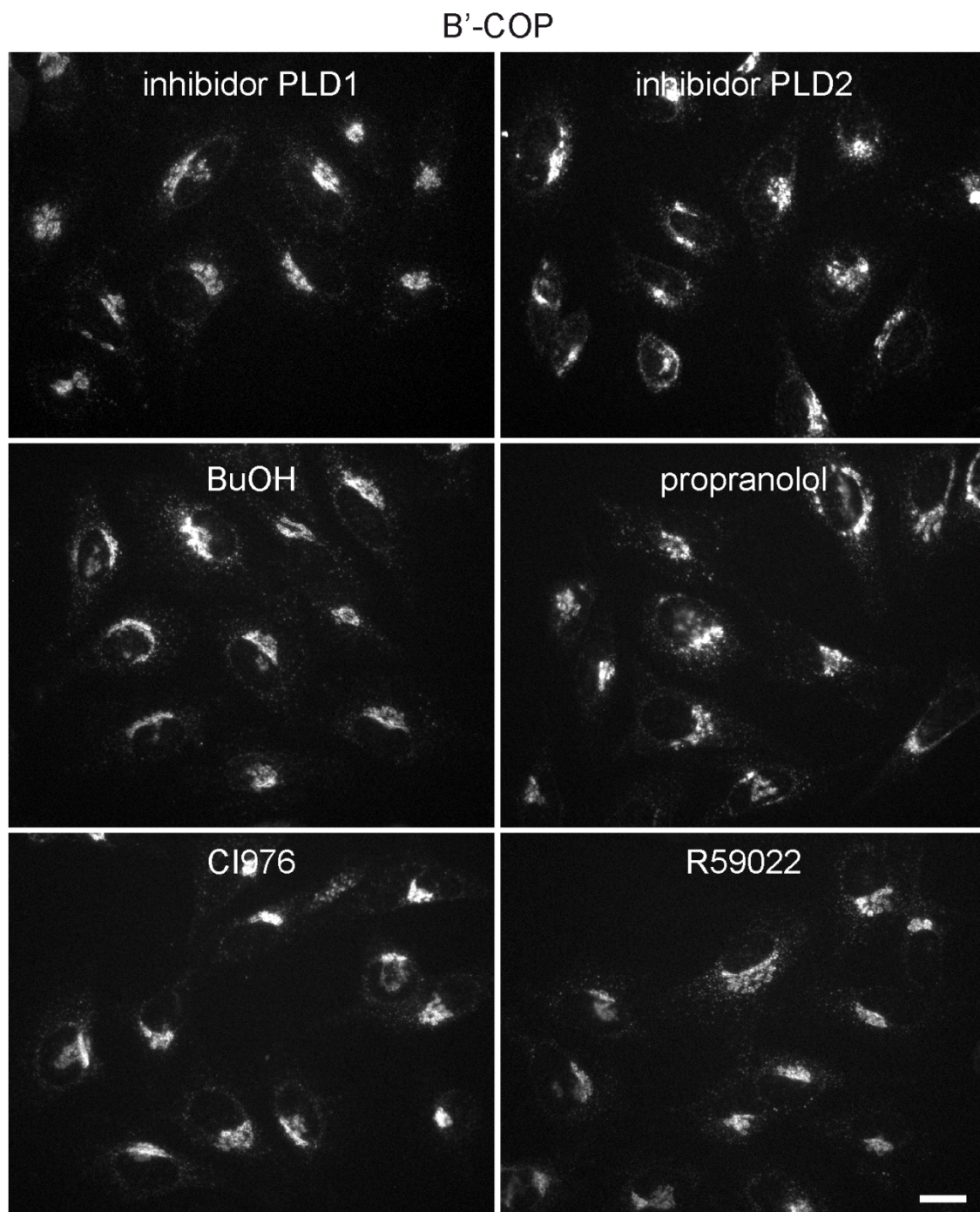


Figura 52. Efecto farmacológico sobre la distribución de la proteína β' -COP. No se observa alteración en la distribución de β' -COP en ningún tratamiento. Barra de calibrado 20 μm .

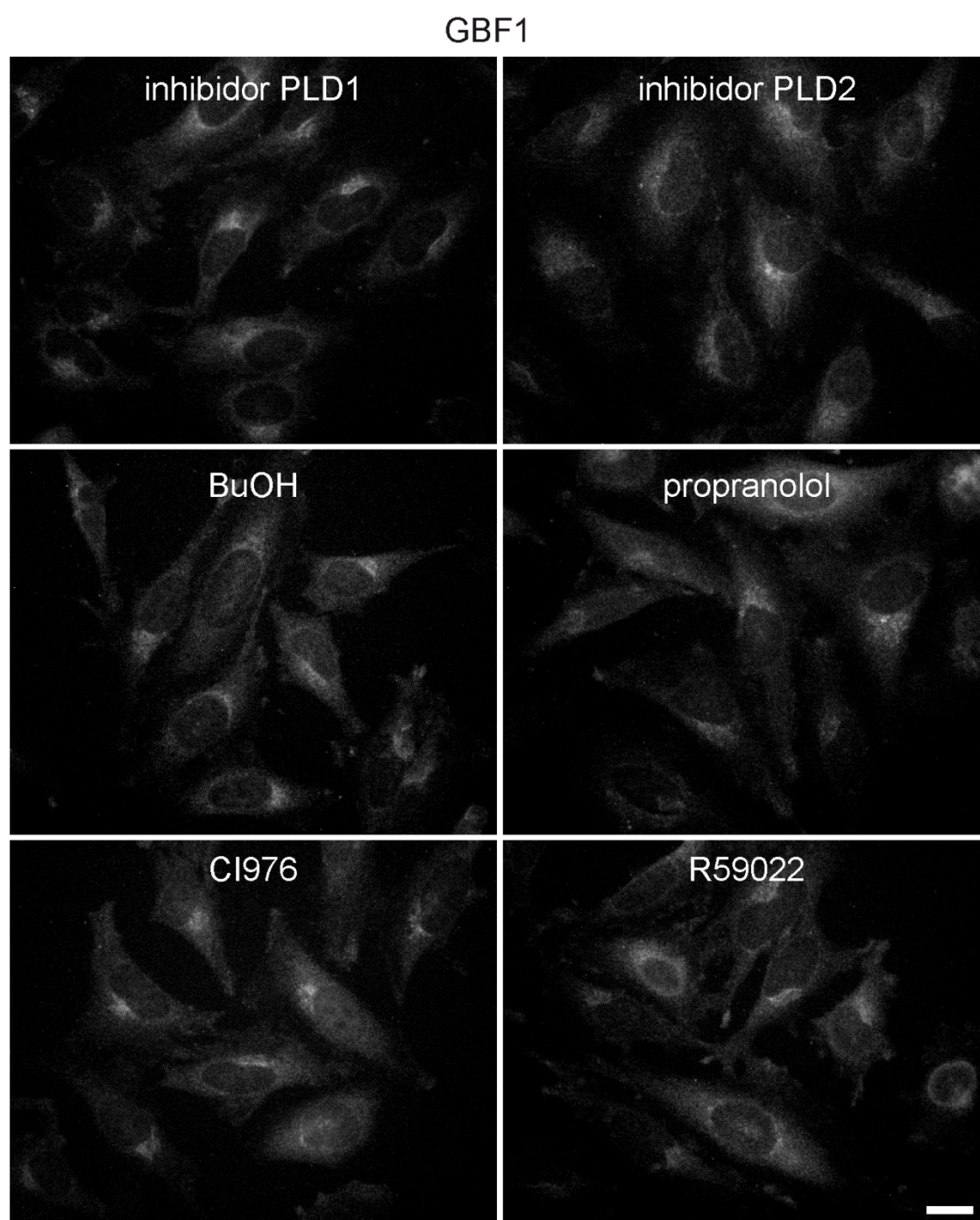
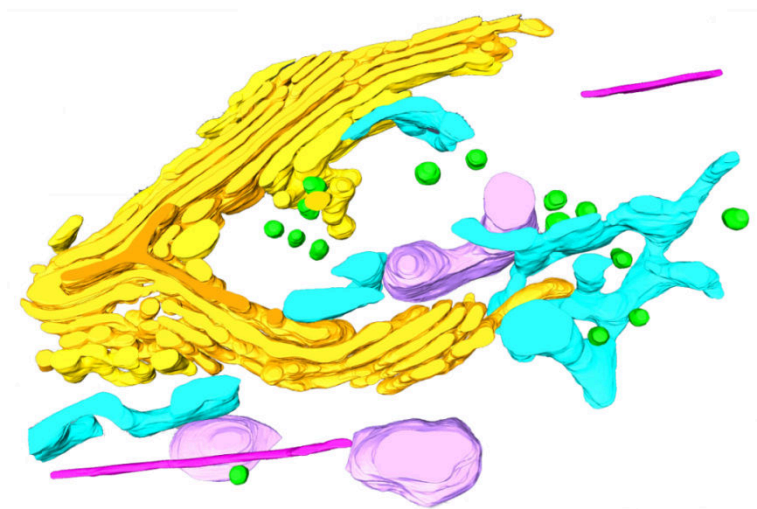


Figura 53. Efecto farmacológico sobre la distribución de la proteína GBF1. No se observa alteración en la distribución de GBF1 en ningún tratamiento. Barra de calibrado 20 μm .

VI DISCUSIÓN



El ácido fosfatídico es necesario en la formación de túbulos inducidos a baja temperatura.

La presente tesis doctoral forma parte de un estudio más amplio de nuestro grupo de investigación sobre la estructura, composición y regulación molecular de los túbulos asociados al complejo de Golgi. El estudio de las conexiones tubulares a nivel del complejo de Golgi se ve dificultado por los problemas técnicos que existen a la hora de visualizar estas estructuras inequívocamente (estructuras lábiles y transitorias, plano de corte en imágenes bidimensionales, etc). Por ello, se hace necesario alterar este orgánulo para poder estudiar estos elementos. En el presente trabajo hemos utilizado dos métodos para estimular la tubulación del complejo de Golgi, como son la incubación de las células con BFA y 15°C. En estos dos modelos de tubulación hemos estudiado la implicación de diferentes enzimas modificadoras de lípidos y sus productos en la formación de túbulos. Nuestros resultados muestran importantes diferencias en el requerimiento lipídico específico en la formación de los túbulos dependiendo del método de tubulación utilizado.

Nuestros resultados demuestran que los túbulos inducidos por la baja temperatura requieren PA. Este lípido puede ser generado por la acción de las enzimas LPAT, DGK y PLD a partir de LPA, DAG y PC, respectivamente. Con todos los compuestos utilizados que afectan la actividad de estas enzimas se produjo una disminución en la tubulación a 15°C. Por tanto, todas las rutas que regulan la cantidad de PA en las membranas del complejo de Golgi contribuyen a la formación de estos túbulos. El hecho de que los inhibidores 1-butanol, CI976, y R59022 (Drecktrah et al., 2003; López-Andreo et al., 2003, Selvy et al., 2011) afecten a diferentes rutas y por tanto que reduzcan los niveles de diferentes especies moleculares de PA, explica por qué estos compuestos no producen el mismo grado de inhibición en la formación de túbulos. El alcohol 1-butanol es el que produce un efecto mayor, lo que sugiere que la especie molecular de PA procedente de PC, es la más importante para la formación y mantenimiento de los túbulos inducidos a 15°C. La enzima que cataliza esta ruta es PLD. En estos ensayos a baja temperatura la tubulación aumenta al tratar las células con propranolol. Este efecto se podría deber a que al inhibir la enzima DGK se produce la disminución del nivel de DAG y la consecuente acumulación de PA. Así, los ensayos con este inhibidor también apoyan que PA es el responsable de la formación de túbulos a baja temperatura.

Encontramos diferencias en el porcentaje de células con tubulación en los ensayos en los que se realizó pre-tratamiento con el inhibidor antes de inducir la

tubulación y en los que el inhibidor se utilizó simultáneamente a la baja temperatura, siendo en general los efectos más acusados en el primer caso. Esta diferencia podría indicar en qué fase de la tubulación es necesario PA. Así, en los ensayos en los que se realiza el pre-tratamiento con los compuestos, podemos obtener información acerca del papel de los lípidos en un paso temprano de formación del túbulo, mientras que con el tratamiento simultáneo podemos ver el efecto en la elongación y mantenimiento del túbulo. Por tanto, los resultados obtenidos con y sin pre-tratamiento de los distintos compuestos inhibidores en el modelo de baja temperatura indican que PA generado por PLD es necesario tanto en un paso temprano en la formación de los túbulos como durante su elongación.

En el caso de la tubulación inducida por BFA, hemos visto que 1-butanol, al contrario que en el modelo de baja temperatura, produce un ligero aumento en el porcentaje de células tubuladas. Propranolol produce el efecto contrario, el porcentaje de tubulación descende significativamente, siendo los túbulos escasos y más cortos. Estos datos sugieren que DAG, pero no PA, es necesario para la formación de túbulos inducidos por BFA. Estos resultados apoyan trabajos anteriores que sugieren que este lípido participa en el transporte retrógrado desde el complejo de Golgi hasta el RE, estando relacionado con pasos tempranos (formación) y tardíos (fisión) de la formación de vesículas y túbulos (Fernández-Ulibarri et al., 2007, Asp et al., 2009). Estudios recientes indican que LPP3 (fosfolipasa 3 de lípidos fosfato), una enzima asociada al complejo de Golgi que genera DAG a partir de PA, está implicada en el transporte retrógrado Golgi-RE mediado por túbulos (Gutiérrez-Martínez et al., 2013).

Una explicación alternativa a los resultados anteriores podría ser que la tubulación fuera una cualidad inespecífica de las membranas del complejo de Golgi. Así, este orgánulo podría ser muy sensible a la composición lipídica, y cualquier ligero cambio en su composición podría alterar la curvatura de la membrana y su arquitectura, generando túbulos de manera aleatoria. Sin embargo, nuestros resultados argumentan en contra de esta idea y nos indican que estos túbulos no son artefactos o estructuras inespecíficas, sino que tienen un papel regulado y específico en el complejo de Golgi. Así, estudios previos de nuestro laboratorio muestran que los túbulos inducidos a baja temperatura poseen una composición específica. Contienen enzimas de glicosilación residentes del complejo de Golgi y proteínas reguladoras implicadas exclusivamente en el transporte intra-Golgi, como son las proteínas SNARE GS28 y GS15 y la proteína Rab6. Sin embargo, no contienen proteínas de matriz (GM130, GRASP65), carga anterógrada o retrógrada y tampoco contienen proteínas que regulan el transporte entre el RE y el complejo de Golgi (Martínez-Alonso et al.,

2005, 2007). Nuestros resultados proporcionan más evidencias que apoyan la especificidad y la regulación de este tipo de ITs, como es el distinto requerimiento lipídico para la formación de túbulos inducidos a 15°C y por BFA. Los ensayos con los distintos compuestos inhibidores en los modelos de tubulación con BFA y 15°C hemos visto que PA es necesario para la tubulación a 15°C mientras que DAG lo es para tubulación inducida por BFA.

En conjunto, los resultados obtenidos tras el tratamiento con los distintos compuestos muestran que PA generado por PLD, pero no DAG ni LPA, es necesario para la formación y mantenimiento de túbulos inducidos a baja temperatura, mientras que DAG lo es para los inducidos por BFA.

Fosfolipasa D2 regula la biogénesis de túbulos y mantienen la estructura del complejo de Golgi.

Hemos visto como PA es necesario para la formación de túbulos derivados del complejo de Golgi a baja temperatura y que la vía más importante para la formación y el mantenimiento de este tipo de túbulos es a partir de PC por la acción de la enzima PLD. Cuando analizamos el efecto de la baja temperatura y BFA sobre la distribución de las isoformas PLD1 y PLD2 mediante inmunofluorescencia, observamos que la baja temperatura induce una redistribución de la isoforma PLD2, pero no la de PLD1, desde el citoplasma hacia el área del complejo de Golgi. Este resultado sugiere que la isoforma PLD2, pero no PLD1, es la que está implicada de manera específica en la tubulación de las membranas del complejo de Golgi a baja temperatura. Este resultado se confirmó con los experimentos de siRNA-PLD2, donde la tubulación en condiciones de baja temperatura disminuyó drásticamente, mientras que la tubulación inducida por BFA no se vio afectada. En cuanto a la posible pérdida de actividad enzimática debido a la baja temperatura, cabe mencionar que PLD de mamíferos mantiene una alta actividad enzimática a temperaturas alrededor de 15°C (Chalifour y Kanfer, 1982), por lo que en los experimentos a baja temperatura la enzima no disminuyó su capacidad de generar PA.

Nuestro estudio, en condiciones fisiológicas de temperatura, confirma el papel de PA y PLD2 en la formación de túbulos del complejo de Golgi. En primer lugar, la enzima endógena se localiza en los laterales de las cisternas del complejo de Golgi (este estudio y Freyberg et al., 2002) desde dónde crecen los túbulos. Por otro lado, la sobreexpresión de la enzima induce cambios significativos en la morfología del

complejo de Golgi. En células con bajos niveles de sobreexpresión de la enzima heteróloga, se observaron complejos de Golgi desorganizados y con numerosos túbulos que emergen de sus membranas. En células con altos niveles de sobreexpresión, observamos complejos de Golgi totalmente desorganizados, de modo que en lugar de dictiosomas con cisternas apiladas, encontramos una extensa red tubular. Este resultado concuerda con el papel de lípidos cónicos que condicionan la flexibilidad y curvatura de las membranas. Como hemos mencionado anteriormente en el apartado de revisión bibliográfica, PA presenta una forma cónica generando una curvatura espontánea considerablemente negativa en las membranas dónde se encuentra (Kooijman et al., 2005). El aumento de PA por la sobreexpresión de PLD2 podría aumentar la flexibilidad y la curvatura de las membranas del complejo de Golgi. El estrés elástico generado podría ser relajado mediante la formación de túbulos lo que conduciría a la desorganización del complejo de Golgi. Podemos concluir que esta isoforma, y por consiguiente su producto, son reguladores clave del mantenimiento de la unidad estructural del complejo de Golgi y de la formación de túbulos.

En contraste con nuestros resultados, estudios previos no han hallado ningún papel de PLD2 en la formación de túbulos (Yang et al., 2008, 2011). Esta discrepancia se debe, probablemente, al modelo de estudio utilizado, ya que en los trabajos mencionados anteriormente analizaron la tubulación en células tratadas con BFA, pero tal y como hemos encontrado, PLD2 no está involucrada en este tipo de tubulación. Por otro lado, estos autores analizaron la morfología del complejo de Golgi después del silenciamiento génico de PLD2, pero no analizaron la distribución de las proteínas de matriz, por lo que no pudieron detectar los túbulos que describimos en la presente tesis doctoral. En nuestro estudio mostramos que esta enzima y su producto, PA, son reguladores clave en la formación de túbulos derivados del complejo de Golgi, al menos de una variedad de ellos (ver más adelante).

Asociación de fosfolipasa D2 con las membranas golgianas.

No se conocen los mecanismos detallados que rigen la localización de PLD en los diferentes orgánulos. El aumento en el marcaje de PLD2 observado en el área perinuclear a 15°C podría ser debido al reclutamiento en las membranas del complejo de Golgi de la enzima que se encuentra soluble en el citosol. En la secuencia de PLD se ha descrito la presencia de un dominio PX y un dominio PH con afinidad por fosfoinosítidos (Figura 19). Los fosfoinosítidos se distribuyen específicamente en las membranas celulares. Así, se encuentra principalmente PI(4)P en el complejo de

Golgi, PI(3)P en endosomas y PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática (Di Paolo y De Camilli, 2006). Los dominios PX y PH poseen mayor afinidad por PI(4,5)P₂, sin embargo, tienen baja afinidad por el tipo de fosfoinosítidos asociados al complejo de Golgi (Kolesnikov et al., 2012), por lo que no parece que la capacidad de unión a lípidos de membrana de estos dominios sea la causa del reclutamiento de PLD2 al complejo de Golgi. Los dominios PH y PX, además de a lípidos, también se pueden unir a proteínas (Riebeling et al., 2009). Se sabe que ambas isoformas cambian de compartimento subcelular en respuesta a estímulos (Jang et al., 2012). Sin embargo, no se conoce cuál o cuáles pueden ser los estímulos que reclutan la enzima al complejo de Golgi. Otra explicación al incremento en el marcaje perinuclear de PLD2 podría ser el hecho de que un efecto del cultivo a 15°C es la acumulación de la carga en el compartimento intermedio y el movimiento de elementos periféricos del ERGIC a la cercanía del complejo de Golgi (Klumperman et al., 1998). De hecho, hemos visto en experimentos de inmunofluorescencia de doble marcaje la colocalización de PLD2 y Rab1 en estructuras dispersas por el citoplasma, lo que indica la presencia de esta enzima en elementos del ERGIC. También, hemos observado elementos túbulovesiculares peri-Golgi inmunorreactivos para PLD2 en criosecciones ultrafinas. El movimiento hacia la zona del complejo de Golgi de estos elementos del ERGIC podría ser el causante de la concentración de PLD2 observada a 15°C. También, es posible que la baja temperatura afecte la disociación de la enzima de las membranas, de manera que PLD2 no pueda volver al citosol y permanezca reclutada en las membranas del ERGIC y del complejo de Golgi acumulándose. La unión específica a membranas y la localización intracelular de PLD también depende de la palmitoilación en su dominio PH (Kolesnikov et al., 2012). Si la baja temperatura afecta al mecanismo que despalmitoila la enzima, está quedaría unida a las membranas de forma permanente.

Evidencias de distintos tipos de túbulos asociados al complejo de Golgi.

En células tratadas con el inhibidor específico de PLD2 (VU0364739) y en células transfectadas con siRNA-PLD2 se observó que la morfología del complejo de Golgi fue normal, aunque, sin embargo, presentaban túbulos que contenían una composición específica. Contenían las proteínas de la matriz del complejo de Golgi GM130 y GRASP65 pero no la enzima de glicosilación N-acetilgalactosaminiltransferasa T2. Se observó un nivel mucho mayor de tubulación con este inhibidor que el observado en células con PLD2 silenciada. Este mayor efecto se

debe probablemente a que en las células silenciadas se produce una reducción en los niveles de expresión de la proteína, mientras que con el inhibidor selectivo, a la concentración de trabajo (10 nM), se inhibe por completo la actividad enzimática. La composición de estos túbulos contrasta con la de los túbulos inducidos a baja temperatura que contienen enzimas residentes pero no proteínas de matriz. Estudios previos y nuestros resultados nos llevan a pensar que los glicerolípidos que favorecen curvatura de membrana (PA, DAG o LPA) son necesarios para formar diferentes tipos de túbulos. PLD2 estaría relacionada con la formación de túbulos que contienen enzimas de glicosilación. Sin embargo, cuando no hay actividad de PLD2, los glicerolípidos DAG o LPA podrían generar otro tipo de IT tubular que contiene proteínas de matriz. Hemos visto que para la formación de túbulos a baja temperatura es necesario PA y para formar los túbulos inducidos por BFA es necesario DAG. Aunque nuestros resultados muestran que LPA no es importante para la formación de túbulos inducidos a baja temperatura, sí podría tener relación con la formación de otro tipo de IT de naturaleza tubular. Se ha determinado que LPA aumenta la curvatura positiva en la cara citosólica de las membranas del complejo de Golgi y de endosomas, produciendo la formación de túbulos (Brown et al., 2003). LPA generado por PLA2 también es necesario para la iniciación de la formación de ITs tubulares en el TGN (Schmidt et al., 2010). Además, recientes estudios indican que la acción opuesta de las enzimas cPLA2 y LPAATy, proceso en el que se convierte PA en LPA y viceversa, promovería la formación de túbulos o vesículas en el complejo de Golgi, respectivamente (Ha et al., 2012). El hecho de que DAG y LPA estén también involucrados en la formación de túbulos nos lleva a pensar que podrían regular la formación de diferentes tipos de túbulos cuando no hay actividad PLD2.

La enzima PLD2 también podría estar implicada en la fisión de un tipo específico de túbulos. Se ha relacionado PA generado por PLD2 en procesos de fisión (Lee et al., 2006; Yang 2008; Malhotra y Campelo, 2011). Algunos de nuestros resultados apoyan esta idea. En la figura 46A, se pueden observar túbulos con constricciones, como si los túbulos estuvieran formados por una hilera de vesículas que no se hubieran podido escindir. El silenciamiento génico de PLD2 conlleva una disminución de PA, el cual sería necesario en un paso final que promueva la fisión de la membrana y la liberación del IT. Al no estar presente PA en el cuello del IT que se va a escindir, este podría seguir creciendo, permaneciendo unido a la membrana sin escindirse. Así, tal y como se ha descrito para DAG (Fernández-Ulibarri et al., 2007; Asp y Kartberg, 2009), PA podría estar involucrado en diferentes pasos de la biogénesis de transportadores. De manera que podría ser necesario en un paso

temprano de la formación de túbulos que reciclan enzimas residentes y además en un paso final de fisión de ITs.

Nuestros resultados muestran que las membranas del complejo de Golgi son capaces de generar distintos tipos de túbulos con una composición específica. La activación o la inhibición de PLD2 induciría la formación de túbulos específicos que contendrían enzimas residentes o proteínas de la matriz, respectivamente. Estos túbulos tendrían funciones específicas en el transporte. Así, los túbulos inducidos por PA podrían ser responsable del transporte intra-Golgi encargado del reciclaje de las enzimas de glicosilación (Martínez-Alonso et al., 2005, 2007), mientras que los túbulos inducidos por DAG estarían implicados en el transporte retrógrado Golgi-RE (Fernández-Ulibarri et al., 2007, Asp et al., 2009; Gutiérrez-Martínez et al., 2013). Se podría especular que los túbulos que se producen cuando no hay actividad PLD2 podrían mantener una distribución homogénea de estas proteínas en los diferentes dictiosomas que forman la cinta del Golgi. De esta manera, los cambios en el metabolismo de esta enzima y su producto deben estar altamente regulados espacial y temporalmente en las membranas del complejo de Golgi. Sería necesaria una investigación en profundidad sobre los efectores de PLD2 y PA en el complejo de Golgi para conocer con detalle su función exacta.

Relación de las proteínas de cubierta COPI con la formación de túbulos.

Además de la composición específica de lípidos, las proteínas de cubierta también pueden estar relacionadas con la formación de túbulos. De hecho, es bien conocido que el desacoplamiento de las cubiertas COPI inducido por BFA genera una tubulación masiva y que otros factores que liberan las cubiertas COPI de las membranas también inducen tubulación (ver el apartado de Revisión Bibliográfica). Los resultados obtenidos muestran que la baja temperatura y BFA afectan a los componentes de las cubiertas COPI y sus moléculas reguladoras de una forma muy diferente. Aunque la baja temperatura también induce el desacoplamiento de los componentes del coatómero COPI, este proceso es mucho más lento comparado con BFA (Martínez-Alonso et al., 2005). Las diferencias entre estos dos tratamientos son evidentes con Arf1, el cual se recluta en los túbulos a baja temperatura, mientras que se libera de las membranas del complejo de Golgi con BFA. Esta GTPasa estimula la actividad de PLD, aunque en mayor medida en el caso de la isoforma PLD1 (Selvy et al., 2011). La diferencia más significativa e interesante entre el tratamiento con BFA y la incubación a baja temperatura la encontramos en el caso de ArfGAP1, que se

recluta y acumula en las membranas del complejo de Golgi a baja temperatura, mientras que se libera de las membranas del complejo de Golgi poco después de la adición de la droga fúngica. El hecho de que ArfGAP1 se reclute específicamente en el área del complejo de Golgi a baja temperatura sugiere que este fenómeno podría estar relacionado con la formación de túbulos. De hecho, en células transfectadas con siRNA para ArfGAP1 decrece el número de túbulos (Asp y Kartberg 2009).

La relación entre las cubiertas COPI y la composición de lípidos durante la formación de ITs se ha demostrado recientemente. La acción de la enzima LPAATy actúa en las cubiertas COPI facilitando la formación de vesículas que participan en el transporte retrógrado, mientras que la acción de la enzima cPLA2 α mantiene la cinta del Golgi y actúa en las cubiertas COPI facilitando la formación de túbulos implicados en el transporte anterógrado intra-Golgi (Yang et al., 2011). Nuestras imágenes de microscopía electrónica apoyan que PLD2 está asociada con las cubiertas COPI, lo que corrobora estudios previos sobre el papel de esta isoforma en el transporte retrógrado mediado por COPI. Este mismo estudio sugiere que PA, generado por PLD2, está involucrado en el último paso de la formación de las vesículas revestidas tipo COPI, concretamente en el proceso de fisión (Yang et al., 2005, 2008). También se ha visto que la inhibición de PLD2 afecta al transporte retrógrado mediado por COPI, pero no altera el transporte anterógrado intra-Golgi (Yang et al., 2011).

El ácido fosfatídico generado por fosfolipasa D2 recluta ArfGAP1 a las membranas de complejo de Golgi.

El reclutamiento de PLD2 y ArfGAP1 en las membranas del complejo de Golgi podría estar relacionado. Cuando las células se incuban a 15°C se observa el mismo efecto en ambas proteínas, se acumulan en la región perinuclear. Nuestros experimentos basados en la inhibición específica de enzimas modificadoras de lípidos sugieren que PA, generado específicamente por PLD2, pero no PLD1, es necesario para el reclutamiento de ArfGAP1 a las membranas del complejo de Golgi. Sin embargo, hemos visto que ArfGAP1 permanece en las membranas del complejo de Golgi en células con la síntesis de PLD2 silenciada. Esto probablemente se deba a que la disminución de PA en estas células silenciadas no es tan alta como en las células tratadas con el inhibidor específico de PLD2. También es posible que el efecto del silenciamiento génico esté limitado por la posibilidad de un mecanismo compensatorio. En nuestro estudio, el tiempo requerido para la reducción de la enzima

por siRNA fue de dos días, lo que permite a las células activar mecanismos para compensar la pérdida de una proteína mediante el aumento de la expresión de otra u otras que permitan la asociación de ArfGAP1 a las membranas del complejo de Golgi.

Se ha determinado que el propranolol disminuye la cantidad de ArfGAP1 que se une a las membranas del complejo de Golgi, sugiriendo que DAG derivado de PA es crítico para el reclutamiento de ArfGAP1 (nuestros resultados y el trabajo de Fernández-Ulibarri et al., 2007). Ya hemos visto como DAG no interviene en la formación de túbulos derivados del complejo de Golgi en células incubadas a baja temperatura, y sin embargo, ArfGAP1 se recluta en este orgánulo. ArfGAP1 se une a las membranas enriquecidas en DAG con cadenas hidrocarbonas monoinsaturadas, el tipo de DAG que resulta de la hidrólisis de PA por PLD. Sin embargo, el dominio ALPS (*ArfGAP lipid-patching sensor*) de ArfGAP1 no reconoce los lípidos *per se* ni la geometría curva de la membrana, sino que reconoce el grado de empaquetamiento de ésta (Levi et al., 2008). Así pues, ArfGAP1 se une a membranas que contienen lípidos con curvatura negativa debido a su capacidad de detectar defectos de empaquetamiento de la membrana, por ejemplo, cuando lípidos con forma cónica se incorporan en membranas constituidas con lípidos cilíndricos (González-Rubio et al., 2011). Por tanto, ArfGAP1 también debe ser capaz de insertar sus residuos hidrofóbicos en las membranas enriquecidas en PA, ya que este lípido reduce el grado de empaquetamiento de la membrana. Así, a 15°C, PLD2 es reclutada en el complejo de Golgi, donde generaría PA, disminuyendo así el empaquetamiento de las membranas. Esto permitiría a ArfGAP1 insertar su dominio ALPS y unirse a las membranas. También es posible que ambos lípidos sean necesarios simultáneamente para el reclutamiento de ArfGAP1, como ha sido descrito previamente para la localización y activación de PKC ϵ en la membrana plasmática por PA y DAG (López-Andreo et al., 2003).

También, se ha visto que el PA generado por PLD2, en cooperación con la proteína BARS induce curvatura de membrana necesaria para la fisión de las vesículas COPI del complejo de Golgi (Yang et al., 2008). ArfGAP1 y BARS interactúan directamente y la interacción entre ambas es necesaria para que se produzca la fisión de las vesículas COPI (Beck et al., 2009a). Se podría pensar que la interacción entre ArfGAP1 y PLD2 podría ser indirecta a través de la proteína BARS (Yang et al., 2008), pero esto es improbable ya que esta proteína, al contrario que ArfGAP1, no se recluta en las membranas del complejo de Golgi en nuestro modelo de tubulación. Por otro lado, PA interactúa con los miembros de la familia GAP, incluyendo AGAP1 (Nie et al., 2002) y Rho-GAP (Kurooka et al., 2011), aunque, esta

interacción no ha sido descrita para ArfGAP1. Es interesante que el PA generado por PLD1 no está relacionado con la unión de ArfGAP1 a las membranas del Golgi. En los ensayos en los que las células se trataron con el inhibidor específico de PLD1 vimos que ArfGAP1 permaneció en la región perinuclear. PLD1 se asocia a zonas aplanadas del Golgi (Freyberg et al., 2001, 2002), mientras que PLD2 se localiza en los bordes curvados de los laterales de las cisternas, donde ArfGAP1 puede unirse por el dominio ALPS. Análisis *in vitro* muestran que ambas isoformas producen las mismas especies de PA (Pettitt et al., 2001). Sin embargo, puede que éste no sea el caso *in vivo* debido a que estas isoformas se localizan en diferentes membranas celulares con un ambiente lipídico específico.

Papel de ArfGAP1 en la formación de túbulos.

El papel de ArfGAP1 en el tráfico de membranas es controvertido (East y Kahn, 2011; Shiba y Randazzo, 2012). Clásicamente, se pensaba que la función principal de ArfGAP1 era inducir el desacoplamiento de la cubierta COPI de la vesícula ya formada a través de la inactivación de Arf1 al hidrolizar GTP (Bigay et al 2003; Reinhard et al, 2003). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la proteína ArfGAP1 no sólo se comporta como un regulador de Arf1, sino que también podría estar relacionada con la polimerización del coatómero, promoviendo la formación de vesículas. Su papel en el reclutamiento de la carga está también bajo discusión (Shiba y Randazzo, 2012). Una modificación del modelo clásico propone que ArfGAP1 actúa en dos pasos. En ausencia de carga, ArfGAP1 rápidamente inactiva a Arf1 evitando la formación de una vesícula vacía, mientras que en presencia de carga, la hidrólisis de GTP por ArfGAP1 es lenta, permitiendo que Arf1-GTP reclute al coatómero y se forme la vesícula. En un paso final, ArfGAP1 hidroliza GTP unido a Arf1 y se inicia el desacoplamiento de la cubierta (Shiba y Randazzo, 2012). Diferentes estudios apoyan que ArfGAP1 tiene un papel en el reclutamiento de la carga de las vesículas COPI (Goldberg, 2000; Lanoix et al., 2001; Lee et al., 2005). Las enzimas de glicosilación son proteínas de membrana que se reciclan mediante transporte retrógrado mediado por vesículas COPI. Todas las glicosiltransferasas residentes en el complejo de Golgi son proteínas de membrana con una corta cola citosólica que contribuye a su localización. Estas enzimas no poseen señales de reconocimiento de COPI, así que necesitan de proteínas adaptadoras para incorporarse a las vesículas (Popoff et al., 2011). Estudios recientes indican que la proteína vps75p se une a las colas citosólicas de las enzimas de glicosilación determinando su localización en el orgánulo. Esta

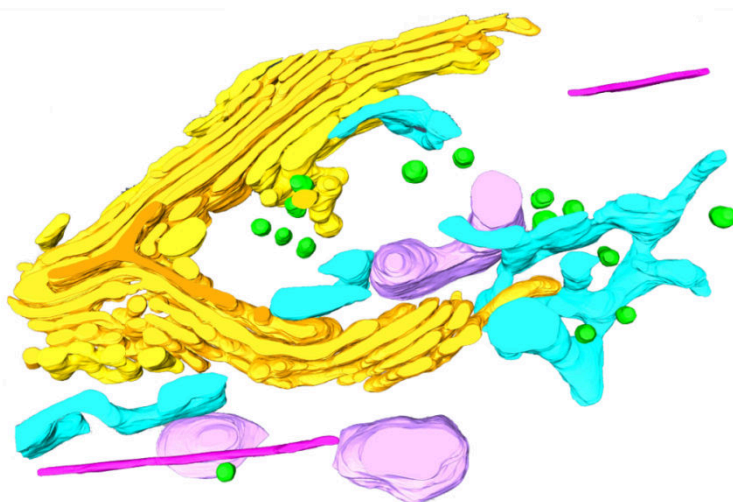
proteína actúa también como una proteína adaptadora para el reclutamiento de las enzimas de glicosilación por las vesículas COPI (Schmitz et al., 2008; Tu et al., 2008). Nuestros resultados sugieren que ArfGAP1 podría actuar reclutando las enzimas residentes del complejo de Golgi al interior de ITs tubulares, los cuales serían los responsables de su reciclaje en el complejo de Golgi.

Epílogo.

El objetivo general de la presente tesis doctoral es profundizar en nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares que participan en la formación de ITs tubulares. Nuestro estudio ha permitido conocer el papel de diferentes glicerolípidos y la actividad enzimática relacionada con los mismos, en la generación y/o mantenimiento de los túbulos del complejo de Golgi, así como su relación con la maquinaria COPI. Estos resultados revelan por primera vez que PA, generado por la vía de la enzima PLD2, juega un papel activo en la formación de estos túbulos, en el reclutamiento de ArfGAP1 a las membranas de este orgánulo y en el mantenimiento de la organización del complejo de Golgi.

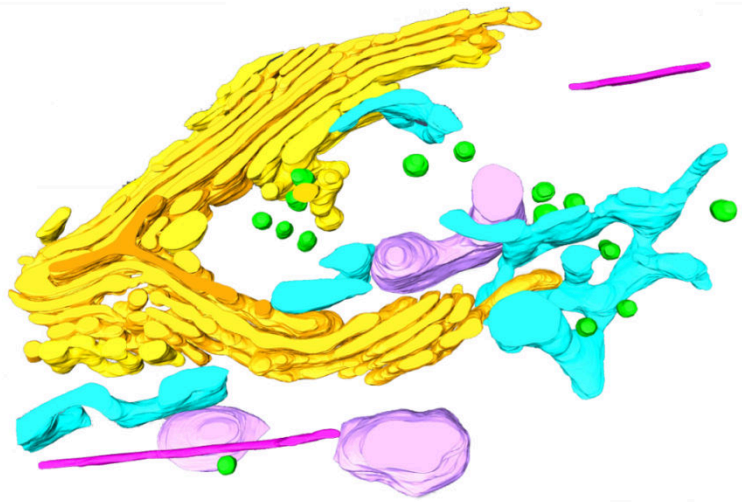
Nuestros resultados demuestran que las membranas del complejo de Golgi son capaces de generar distintos tipos de túbulos con una composición específica, tal y como ha sido postulado para las vesículas COPI (Moelleken et al., 2007). Estudios previos indican que enzimas modificadoras de lípidos como LPAT, PLA, DGK y LPP/PAP son reguladores claves de estos procesos. PLD2 debe ser incluida en esta lista. Cuando su actividad enzimática se ve potenciada o cuando la enzima se recluta en ciertas regiones del complejo de Golgi, el PA generado favorece la curvatura local de la membrana reclutando a ArfGAP1, el cual, a su vez, podría ser necesario para el reclutamiento de enzimas residentes (Lanoix et al., 2001). Por el contrario, cuando su actividad es inhibida, DAG o LPA podrían generar otro tipo de túbulos que contienen proteínas de matriz. Se podría especular que algunos túbulos del complejo de Golgi podrían estar relacionados con el transporte retrógrado intra-Golgi (Martínez-Alonso et al., 2005, Trucco et al., 2004), mientras que otros mantienen la arquitectura de la cinta del Golgi (Trucco et al., 2004) o bien intervienen en el transporte anterógrado intra-Golgi (Beznoussenko et al., 2014). Son necesarios nuevos estudios en esta área para determinar en detalle los mecanismos moleculares responsables de esta regulación fina en la formación de túbulos.

VII CONCLUSIONS



1. Hela cells cultured at low temperature (15°C) are a useful model to study the role of glycerolipids and lipid modified enzymes in the formation of Golgi tubules.
2. Phosphatidic acid and diacylglycerol are needed for the formation and maintenance of low temperature- and BFA-induced Golgi tubules, respectively.
3. Phosphatidic acid generated by phospholipase D is the most important pathway for the formation of low temperature-induced Golgi tubules. This glycerolipid may be involved in an early step of the budding process as well as in the tubule elongation.
4. Phospholipase D2, but not phospholipase D1, is the enzyme responsible for the formation of phosphatidic acid needed in the low temperature model of Golgi tubulation. This enzyme is associated to Golgi membranes and is involved in the maintenance of the architecture of this organelle.
5. The reduction of the levels of the phosphatidic acid generated by phospholipase D2 induces the formation of a specific set of Golgi tubules containing matrix proteins.
6. ArfGAP1 recruitment to the Golgi membranes depends on the presence of the phosphatidic acid generated by phospholipase D2. This GTPase activating protein might be a component of the molecular machinery involved in cargo recruitment into Golgi tubules.
7. Golgi membranes are able to generate different types of tubules of varied composition. When phospholipase D2 enzymatic activity is enhanced or the enzyme is recruited to certain Golgi areas, the phosphatidic acid generated is able to bend the membrane and to recruit ArfGAP1, which might be necessary for the recruitment of resident enzymes. Conversely, when its activity is inhibited, there is an accumulation of diacylglycerol or lysophosphatidic acid, which might generate another type of tubule containing matrix proteins. It can be speculated that some Golgi tubules may be involved in retrograde intra-Golgi traffic, whereas others keep the architecture of the Golgi ribbon or anterograde intra-Golgi transport.

VIII BIBLIOGRAFÍA



- Aguilera-Romero A, Kaminska J, Spang A, Riezman H, Muñiz M (2008) The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 180: 713–720.
- Antonny B (2006) Membrane deformation by protein coats. *Curr Opin Cell Biol* 18: 386–394.
- Antonny B, Huber I, Paris S, Chabre M, Cassel D (1997) Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem* 272: 30848–30851.
- Aridor M, Bannykh SI, Rowe T, Balch WE (1995) Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol* 131: 875–893.
- Asp L, Kartberg F (2009) Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol Biol Cell* 20: 780–790.
- Athenstaedt K, Daum G (1999) Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur J Biochem* 266: 1–16.
- Bankaitis VA, Aitken JR, Cleves AE, Dowhan W (1990) An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* 347: 561–562.
- Bannykh SI, Rowe T, Balch WE (1996) The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol* 135: 19–35.
- Bard F, Malhotra V (2006) The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 439–455.
- Barlowe C (1994) COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77: 895–907.
- Barlowe C, Miller EA (2013) Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* 193: 383–410.
- Baron CL, Malhotra V (2002) Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* 295: 325–328.

- Bechler ME, Doody AM, Racoosin E, Lin L, Lee KH, et al. (2010) The phospholipase complex PAFAH 1b regulates the functional organization of the Golgi complex. *J Cell Biol* 190: 45–53.
- Beck R, Adolf F, Weimer C, Brügger B, Wieland FT (2009a) ArfGAP1 activity and COPI vesicle biogenesis. *Traffic* 10: 307–315.
- Beck R, Ravet M, Wieland FT, Cassel D (2009b) The COPI system: Molecular mechanisms and function. *FEBS Lett* 583: 2701–2709.
- Beck R, Sun Z, Adolf F, Rutz C, Bassler J, et al. (2008) Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 11731–11736.
- Bennett JA, Peters JH, Chudacoff R, McKneally MF (1988) Endogenous production of cytotoxic factors in serum of BCG-primed mice by monophosphoryl lipid A, a detoxified form of endotoxin. *J Biol Response Mod* 7: 65–76.
- Ben-Tekaya H, Miura K, Pepperkok R, Hauri H-P (2005) Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC. *J Cell Sci* 118: 357–367.
- Béthune J, Kol M, Hoffmann J, Reckmann I, Brügger B, et al. (2006) Coatamer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins. *Mol Cell Biol* 26: 8011–8021.
- Beznoussenko G V, Dolgikh V V, Seliverstova E V, Semenov PB, Tokarev YS, et al. (2007) Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function. *J Cell Sci* 120: 1288–1298.
- Beznoussenko G V., Parashuraman S, Rizzo R, Polishchuk R, Martella O, et al. (2014) Transport of soluble proteins through the Golgi occurs by diffusion via continuities across cisternae. *eLife* 2014.
- Bigay J, Casella J-F, Drin G, Mesmin B, Antonny B (2005) ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J* 24: 2244–2253.

- Bigay J, Gounon P, Robineau S, Antonny B (2003) Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* 426: 563–566.
- Bonifacino J, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153–166.
- Braulke T, Bonifacino JS (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1793: 605–614.
- Brown FD, Thompson N, Saqib KM, Clark JM, Powner D, et al. (1998) Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. *Curr Biol* 8: 835–838.
- Brown WJ, Chambers K, Doody AM (2003) Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* 4: 214–221.
- Brown WJ, Plutner H, Drecktrah D, Judson BL, Balch WE (2008) The lysophospholipid acyltransferase antagonist CI-976 inhibits a late step in COPII vesicle budding. *Traffic* 9: 786–797.
- Burke JE, Dennis EA (2009) Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 50 Suppl: S237–S242.
- Chalifour R, Kanfer JN (1982) Fatty acid activation and temperature perturbation of rat brain microsomal phospholipase D. *J Neurochem* 39: 299–305.
- Chen YG, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung TC, et al. (1997) Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 138: 495–504.
- Choi S-Y, Huang P, Jenkins GM, Chan DC, Schiller J, et al. (2006) A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* 8: 1255–1262.
- Claude A, Zhao BP, Kuziemyky CE, Dahan S, Berger SJ, et al. (1999) GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol* 146: 71–84.

- Clermont Y, Rambourg A, Hermo L (1994) Connections between the various elements of the cis- and mid-compartments of the Golgi apparatus of early rat spermatids. *Anat Rec* 240: 469–480.
- Clermont Y, Rambourg A, Hermo L (1995) Trans-Golgi network (TGN) of different cell types: Three-dimensional structural characteristics and variability. *Anat Rec* 242: 289–301
- Cluett EB, Wood SA, Banta M, Brown WJ (1993) Tubulation of Golgi membranes in vivo and in vitro in the absence of brefeldin A. *J Cell Biol* 120: 15–24.
- Cockcroft S (2001) Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2. *Cell Mol Life Sci* 58: 1674–1687.
- Cockcroft S, Way G, O’Luanaigh N, Pardo R, Sarri E, et al. (2002) Signalling role for ARF and phospholipase D in mast cell exocytosis stimulated by crosslinking of the high affinity FcεR1 receptor. *Mol Immunol* 38: 1277–1282.
- Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, et al. (1997) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol* 7: 191–201.
- Cooper MS, Cornell-Bell AH, Chernjavsky A, Dani JW, Smith SJ (1990) Tubulovesicular processes emerge from trans-Golgi cisternae, extend along microtubules, and interlink adjacent trans-Golgi elements into a reticulum. *Cell* 61: 135–145.
- Cordeiro D, Carcedo C, Bonazzi M (2002) Molecular aspects of membrane fission in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci* 59: 1819–1832.
- Corrotte M, Chasserot-Golaz S, Huang P, Du G, Ktistakis NT, et al. (2006) Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic* 7: 365–377.
- Cosson P, Letourneur F (1994) Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263: 1629–1631.
- Dalton AJ, Felix MD (1956) A comparative study of the Golgi complex. *J Biophys Biochem Cytol* 2: 79–84.

- De Chaffoy de Courcelles D, Roevens P, Van Belle H (1985) R 59 022, a diacylglycerol kinase inhibitor. Its effect on diacylglycerol and thrombin-induced C kinase activation in the intact platelet. *J Biol Chem* 260: 15762–15770.
- de Figueiredo P, Drecktrah D, Polizotto RS, Cole NB, Lippincott-Schwartz J, et al. (2000) Phospholipase A2 antagonists inhibit constitutive retrograde membrane traffic to the endoplasmic reticulum. *Traffic* 1: 504–511.
- De Matteis MA, Luini A (2008) Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 273–284.
- Del Nery E, Miserey-Lenkei S, Falguières T, Nizak C, Johannes L, et al. (2006) Rab6A and Rab6A' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic* 7: 394–407.
- Di Paolo G, De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443: 651–657.
- Dotti CG, Simons K (1990) Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell* 62: 63–72.
- Drecktrah D, Chambers K, Racoosin EL, Cluett EB, Gucwa A, et al. (2003) Inhibition of a Golgi complex lysophospholipid acyltransferase induces membrane tubule formation and retrograde trafficking. *Mol Biol Cell* 14: 3459–3469.
- Du G, Altshuller YM, Vitale N, Huang P, Chasserot-Golaz S, et al. (2003) Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol* 162: 305–315.
- East MP, Kahn RA (2011) Models for the functions of Arf GAPs. *Semin Cell Dev Biol* 22: 3–9.
- English AR, Voeltz GK (2013) Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a013227.
- Faini M, Beck R, Wieland FT, Briggs JAG (2013) Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol* 23: 279–288.

- Fan JY, Roth J, Zuber C (2003) Ultrastructural analysis of transitional endoplasmic reticulum and pre-Golgi intermediates: A highway for cars and trucks. *Histochem Cell Biol* 120: 455–463.
- Fan JY, Roth J, Zuber C (2007) Expression of mutant Ins2C96Y results in enhanced tubule formation causing enlargement of pre-Golgi intermediates of CHO cells. *Histochem Cell Biol* 128: 161–173.
- Farge E, Devaux PF (1992) Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys J* 61: 347–357.
- Farquhar MG (1985) Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu Rev Cell Biol* 1: 447–488.
- Farquhar MG, Hauri H-P (1997) Protein sorting and vesicular traffic in the Golgi apparatus. In: Berger E, Roth J, editors. *The Golgi Apparatus*. Basel: Birkhäuser Verlag. pp. 63–129.
- Farquhar MG, Palade GE (1981) The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage. *J Cell Biol* 91: 77s – 103s.
- Farquhar MG, Palade GE (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol* 8: 2–10.
- Farsad K, De Camilli P (2003) Mechanisms of membrane deformation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 372–381.
- Feng Y, Yu S, Lasell TKR, Jadhav AP, Macia E, et al. (2003) Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6469–6474.
- Fernández-Ulibarri I, Vilella M, Lázaro-Diéguez F, Sarri E, Martínez SE, et al. (2007) Diacylglycerol is required for the formation of COPI vesicles in the Golgi-to-ER transport pathway. *Mol Biol Cell* 18: 3250–3263.
- Freyberg Z (2003) “Slip, sliding away”: phospholipase D and the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* 13: 540–546.
- Freyberg Z, Bourgoïn S, Shields D (2002) Phospholipase D2 is localized to the rims of the Golgi apparatus in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 13: 3930–3942.

- Freyberg Z, Sweeney DA, Siddhanta A, Bourgoïn S, Frohman MA, et al. (2001) Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12: 943–955.
- Fuller N, Rand RP (2001) The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. *Biophys J* 81: 243–254.
- Gallop JL, Jao CC, Kent HM, Butler PJG, Evans PR, et al. (2006) Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J* 25: 2898–2910.
- García-Mata R, Szul T, Álvarez C, Sztul E (2003) ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol Biol Cell* 14: 2250–2261.
- Geuze HJ, Morré DJ (1991) Trans-Golgi reticulum. *J Electron Microsc Tech* 17: 24–34.
- Gibbs TC, Meier KE (2000) Expression and regulation of phospholipase D isoforms in mammalian cell lines. *J Cell Physiol* 182: 77–87.
- Girod A, Storrie B, Simpson JC, Johannes L, Goud B, et al. (1999) Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 1: 423–430.
- Gleeson PA, Lock JG, Luke MR, Stow JL (2004) Domains of the TGN: Coats, tethers and G proteins. *Traffic* 5: 315–326.
- Glick BS (2000) Organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 12: 450–456.
- Glick BS, Luini A (2011) Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005215.
- Gómez-Cambrónero J (2011) The exquisite regulation of PLD2 by a wealth of interacting proteins: S6K, Grb2, Sos, WASp and Rac2 (and a surprise discovery: PLD2 is a GEF). *Cell Signal* 23: 1885–1895.
- Gommel DU, Memon AR, Heiss A, Lottspeich F, Pfannstiel J, et al. (2001) Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J* 20: 6751–6760.

- González-Rubio J, Ortiz-Martínez D, Casacuberta F (2011) An active learning scenario for interactive machine translation. Proceedings of the 13th international conference on multimodal interfaces - ICMI '11. New York, New York, USA: ACM Press. pp. 197–200.
- Goyal U, Blackstone C (2013) Untangling the web: Mechanisms underlying ER network formation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1833: 2492–2498.
- Graham TR, Kozlov MM (2010) Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. *Curr Opin Cell Biol* 22: 430–436.
- Grasse PP (1957) Ultrastructure, polarity and reproduction of Golgi apparatus. *C R Hebd Seances Acad Sci* 245: 1278–1281.
- Griffiths G (1985) Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane. *J Cell Biol* 101: 949–964.
- Griffiths G (2000) Gut thoughts on the Golgi complex. *Traffic* 1: 738–745.
- Griffiths G, Simons K (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234: 438–443.
- Gutiérrez-Martínez E, Fernández-Ulibarri I, Lázaro-Diéguéz F, Johannes L, Pyne S, et al. (2013) Lipid phosphate phosphatase 3 participates in transport carrier formation and protein trafficking in the early secretory pathway. *J Cell Sci* 126: 2641–2655.
- Ha KD, Clarke BA, Brown WJ (2012) Regulation of the Golgi complex by phospholipid remodeling enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1821: 1078–1088.
- Hammond AT, Glick BS (2000) Dynamics of Transitional Endoplasmic Reticulum Sites in Vertebrate Cells. *Mol Biol Cell* 11: 3013–3030.
- Hammond SM, Altshuller YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, et al. (1995) Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem* 270: 29640–29643.
- Haucke V, Di Paolo G (2007) Lipids and lipid modifications in the regulation of membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* 19: 426–435.

- Hauri HP, Schweizer A (1992) The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr Opin Cell Biol* 4: 600–608.
- Henkels KM, Peng H-J, Frondorf K, Gomez-Cambroner J (2010) A comprehensive model that explains the regulation of phospholipase D2 activity by phosphorylation-dephosphorylation. *Mol Cell Biol* 30: 2251–2263.
- Hirschberg K, Miller CM, Ellenberg J, Presley JF, Siggia ED, et al. (1998) Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of Golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol* 143: 1485–1503.
- Hodgkin MN, Masson MR, Powner D, Saqib KM, Ponting CP, et al. (2000) Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-specific PH domain. *Curr Biol* 10: 43–46.
- Holthuis JCM, Levine TP (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 209–220.
- Hsu VW, Shah N, Klausner RD (1992) A brefeldin A-like phenotype is induced by the overexpression of a human ERD-2-like protein, ELP-1. *Cell* 69: 625–635.
- Jackson LP, Lewis M, Kent HM, Edeling MA, Evans PR, et al. (2012) Molecular Basis for Recognition of Dilysine Trafficking Motifs by COPI. *Dev Cell* 23: 1255–1262.
- Jang J-H, Lee CS, Hwang D, Ryu SH (2012) Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res* 51: 71–81.
- Jang YH, Min DS (2011) Nuclear localization of phospholipase D1 mediates the activation of nuclear protein kinase C (alpha) and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 286: 4680–4689.
- Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ (1998) Regulation of phospholipase D2: Selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by α - and β -synucleins. *Biochemistry* 37: 4901–4909.
- Jenkins GM, Frohman MA (2005) Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* 62: 2305–2316.

- Jin L, Pahuja KB, Wickliffe KE, Gorur A, Baumgärtel C, et al. (2012) Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature* 482: 495–500.
- Johannes L, Popoff V (2008) Tracing the Retrograde Route in Protein Trafficking. *Cell* 135: 1175–1187.
- Judson BL, Brown WJ (2009) Assembly of an intact Golgi complex requires phospholipase A2 (PLA2) activity, membrane tubules, and dynein-mediated microtubule transport. *Biochem Biophys Res Commun* 389: 473–477.
- Kaiser CA, Schekman R (1990) Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61: 723–733.
- Kawamoto K, Yoshida Y, Tamaki H, Torii S, Shinotsuka C, et al. (2002) GBF1, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for ADP-Ribosylation Factors, is Localized to the cis-Golgi and Involved in Membrane Association of the COPI Coat. *Traffic* 3: 483–495.
- Keller P, Simons K (1997) Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J Cell Sci* 110: 3001–3009.
- Kim H, Lee J, Kim S, Shin MK, Min DS, et al. (2007) Differential expression of phospholipases D1 and D2 in mouse tissues. *Cell Biol Int* 31: 148–155.
- Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJJ, et al. (1998) The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* 101: 289–294.
- Kirchhausen T (2007) Making COPII coats. *Cell* 129: 1251–1252.
- Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC (2014) Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6: a016725.
- Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J (1992) Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116: 1071–1080.
- Klumperman J (2011) Architecture of the mammalian Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005181.

- Klumperman J, Schweizer A, Clausen H, Tang B, Hong W, et al. (1998) The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci* 111: 3411–3425.
- Kolesnikov YS, Nokhrina KP, Kretynin S V, Volotovskii ID, Martinec J, et al. (2012) Molecular structure of phospholipase D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells. *Biochem Biokhimiia* 77: 1–14.
- Kooijman EE, Chupin V, Fuller NL, Kozlov MM, de Kruijff B, et al. (2005) Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* 44: 2097–2102.
- Kornfeld S, Mellman I (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5: 483–525.
- Koul O, Hauser G (1987) Modulation of rat brain cytosolic phosphatidate phosphohydrolase: Effect of cationic amphiphilic drugs and divalent cations. *Arch Biochem Biophys* 253: 453–461.
- Kozlovsky Y, Kozlov MM (2003) Membrane fission: model for intermediate structures. *Biophys J* 85: 85–96.
- Krauss M, Jia J-Y, Roux A, Beck R, Wieland FT, et al. (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.
- Kreis TE (1992) Regulation of vesicular and tubular membrane traffic of the Golgi complex by coat proteins. *Curr Opin Cell Biol* 4: 609–615.
- Krijnse-Locker J, Ericsson M, Rottier PJM, Griffiths G (1994) Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: Evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J Cell Biol* 124: 55–70.
- Ktistakis NT, Brown HA, Waters MG, Sternweis PC, Roth MG (1996) Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol* 134: 295–306.

- Ladinsky MS, Kremer JR, Furcinitti PS, McIntosh JR, Howell KE (1994) HVEM tomography of the trans-Golgi network: Structural insights and identification of a lace-like vesicle coat. *J Cell Biol* 127: 29–38.
- Ladinsky MS, Mastronarde DN, McIntosh JR, Howell KE, Staehelin LA (1999) Golgi structure in three dimensions: Functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol* 144: 1135–1149.
- Ladinsky MS, Wu CC, McIntosh S, McIntosh JR, Howell KE (2002) Structure of the Golgi and distribution of reporter molecules at 20 degrees C reveals the complexity of the exit compartments. *Mol Biol Cell* 13: 2810–2825.
- Lavieri R, Scott SA, Selvy PE, Kim K, Jadhav S, et al. (2010) Design, synthesis, and biological evaluation of halogenated N-(2-(4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-8-yl)ethyl)benzamides: discovery of an isoform-selective small molecule phospholipase D2 inhibitor. *J Med Chem* 53: 6706–6719.
- Lee CS, Kim IS, Park JB, Lee MN, Lee HY, et al. (2006) The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol* 8: 477–484.
- Lee TH, Linstedt AD (1999) Osmotically induced cell volume changes alter anterograde and retrograde transport, Golgi structure, and COPI dissociation. *Mol Biol Cell* 10: 1445–1462.
- Letourneur F, Gaynor EC, Hennecke S, Démollière C, Duden R, et al. (1994) Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79: 1199–1207.
- Levi S, Rawet M, Kliouchnikov L, Parnis A, Cassel D (2008) Topology of amphipathic motifs mediating Golgi localization in ArfGAP1 and its splice isoforms. *J Biol Chem* 283: 8564–8572.
- Lewis JA, Scott SA, Lavieri R, Buck JR, Selvy PE, et al. (2009) Design and synthesis of isoform-selective phospholipase D (PLD) inhibitors. Part I: Impact of alternative halogenated privileged structures for PLD1 specificity. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 1916–1920.

- Lewis MJ, Pelham HR (1990) A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348: 162–163.
- Liou W, Geuze HJ, Slot JW (1996) Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol* 106: 41–58.
- Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, Berger EG, Hauri H-P, et al. (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, Liu W (2003) Membrane trafficking: coat control by curvature. *Nature* 426: 507–508.
- Lippincott-Schwartz J, Liu W (2006) Insights into COPI coat assembly and function in living cells. *Trends Cell Biol* 16: e1–e4.
- Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, et al. (2007) The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med* 356: 217–226.
- Liu S, Storrie B (2012) Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cell Mol Life Sci* 69: 4093–4106.
- Liu W, Duden R, Phair RD, Lippincott-Schwartz J (2005) ArfGAP1 dynamics and its role in COPI coat assembly on Golgi membranes of living cells. *J Cell Biol* 168: 1053–1063.
- López I, Arnold RS, Lambeth JD (1998) Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2): ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J Biol Chem* 273: 12846–12852.
- López-Andreo MJ, Gómez-Fernández JC, Corbalán-García S (2003) The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase C ϵ to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Mol Biol Cell* 14: 4885–4895.
- Lord C, Ferro-Novick S, Miller EA (2013) The highly conserved COPII coat complex sorts cargo from the endoplasmic reticulum and targets it to the golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a013367.

- Lorente-Rodríguez A, Barlowe C (2011) Entry and exit mechanisms at the cis-face of the Golgi complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005207.
- Losev E, Reinke CA, Jellen J, Strongin DE, Bevis BJ, et al. (2006) Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* 441: 1002–1006.
- Lowe M, Kreis TE (1998) Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim Biophys Acta* 1404: 53–66.
- Lowery J, Szul T, Seetharaman J, Jian X, Su M, et al. (2011) Novel C-terminal motif within Sec7 domain of guanine nucleotide exchange factors regulates ADP-ribosylation factor (ARF) binding and activation. *J Biol Chem* 286: 36898–36906.
- Majoul I, Straub M, Hell SW, Duden R, Söling HD (2001) KDEL-Cargo Regulates Interactions between Proteins Involved in COPI Vesicle Traffic: Measurements in Living Cells Using FRET. *Dev Cell* 1: 139–153.
- Malhotra V, Campelo F (2011) PKD regulates membrane fission to generate TGN to cell surface transport carriers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1–9.
- Malhotra V, Serafini T, Orci L, Shepherd JC, Rothman JE (1989) Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* 58: 329–336.
- Mardones GA, Snyder CM, Howell KE (2006) Cis-Golgi matrix proteins move directly to endoplasmic reticulum exit sites by association with tubules. *Mol Biol Cell* 17: 525–538.
- Marsh BJ, Volkmann N, McIntosh JR, Howell KE (2004) Direct continuities between cisternae at different levels of the Golgi complex in glucose-stimulated mouse islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5565–5570.
- Martinez O, Schmidt A, Salaméro J, Hoflack B, Roa M, et al. (1994) The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport. *J Cell Biol* 127: 1575–1588.
- Martínez-Alonso E, Ballesta J, Martínez-Menárguez JA (2007) Low-temperature-induced Golgi tubules are transient membranes enriched in molecules regulating intra-Golgi transport. *Traffic* 8: 359–368.

- Martínez-Alonso E, Egea G, Ballesta J, Martínez-Menárguez JA (2005) Structure and dynamics of the Golgi complex at 15°C: low temperature induces the formation of Golgi-derived tubules. *Traffic* 6: 32–44.
- Martínez-Alonso E, Tomás M, Martínez-Menárguez JA (2013) Golgi tubules: their structure, formation and role in intra-Golgi transport. *Histochem Cell Biol* 140: 327–339.
- Martínez-Menárguez JA (2013) Intra-Golgi transport: roles for vesicles, tubules, and cisternae. *ISRN Cell Biol* 2013: 1–15.
- Martínez-Menárguez JA, Geuze HJ, Ballesta J (1996) Identification of two types of beta-COP vesicles in the Golgi complex of rat spermatids. *Eur J Cell Biol* 71: 137–143.
- Martínez-Menárguez JA, Geuze HJ, Slot JW, Klumperman J (1999) Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* 98: 81–90.
- Martínez-Menárguez JA, Prekeris R, Oorschot VMJ, Scheller R, Slot JW, et al. (2001) Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport. *J Cell Biol* 155: 1213–1224.
- Matsuura-Tokita K, Takeuchi M, Ichihara A, Mikuriya K, Nakano A (2006) Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* 441: 1007–1010.
- McMahon HT, Gallop JL (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438: 590–596.
- Meier KE, Gibbs TC, Knoepp SM, Ella KM (1999) Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439: 199–213.
- Mellman I, Simons K (1992) The Golgi complex: In vitro veritas? *Cell* 68: 829–840.
- Mironov A (1997) Role of NAD⁺ and ADP-ribosylation in the maintenance of the Golgi structure. *J Cell Biol* 139: 1109–1118.

- Mironov A, Beznoussenko G V., Trucco A, Lupetti P, Smith JD, et al. (2003) ER-to-Golgi carriers arise through direct en bloc protrusion and multistage maturation of specialized ER exit domains. *Dev Cell* 5: 583–594.
- Mironov AA, Beznoussenko G V. (2011) Molecular mechanisms responsible for formation of Golgi ribbon. *Histol Histopathol* 26: 117–133.
- Mironov AA, Beznoussenko G V. (2012) The kiss-and-run model of intra-Golgi transport. *Int J Mol Sci* 13: 6800–6819.
- Mollenhauer HH, Morré DJ (1998) The tubular network of the Golgi apparatus. *Histochem Cell Biol* 109: 533–543.
- Morré DJ (1987) The Golgi Apparatus. In *Cytology and Cell Physiology. Int. Rev.* Kwang W. Jeon GHB and MF, editor Elsevier.
- Nakanishi H, Morishita M, Schwartz CL, Coluccio A, Engebrecht J, et al. (2006) Phospholipase D and the SNARE Sso1p are necessary for vesicle fusion during sporulation in yeast. *J Cell Sci* 119: 1406–1415.
- Nakanishi H, Morishita M, Schwartz CL, Coluccio A, Engebrecht J, et al. (2006) Phospholipase D and the SNARE Sso1p are necessary for vesicle fusion during sporulation in yeast. *J Cell Sci* 119: 1406–1415.
- Nanjundan M, Possmayer F (2003) Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L1–L23.
- Nickel W, Sohn K, Bünning C, Wieland FT (1997) p23, a major COPI-vesicle membrane protein, constitutively cycles through the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11393–11398.
- Nie Z, Stanley KT, Stauffer S, Jacques KM, Hirsch DS, et al. (2002) AGAP1, an endosome-associated, phosphoinositide-dependent ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein that affects actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 277: 48965–48975.
- Oprins A, Duden R, Kreis TE, Geuze HJ, Slot JW (1993) Beta-COP localizes mainly to the cis-Golgi side in exocrine pancreas. *J Cell Biol* 121: 49–59.

- Orci L, Ravazzola M, Meda P, Holcomb C, Moore HP, et al. (1991) Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8611–8615.
- Padrón D, Tall RD, Roth MG (2006) Phospholipase D2 is required for efficient endocytic recycling of transferrin receptors. *Mol Biol Cell* 17: 598–606.
- Pagano A, Letourneur F, Garcia-Estefania D, Carpentier JL, Orci L, et al. (1999) Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 274: 7833–7840.
- Palade G (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 867.
- Palade GE (1956) The endoplasmic reticulum. *J Biophys Biochem Cytol* 2: 85–98.
- Pathre P, Shome K, Blumental-Perry A, Bielli A, Haney CJ, et al. (2003) Activation of phospholipase D by the small GTPase Sar1p is required to support COPII assembly and ER export. *EMBO J* 22: 4059–4069.
- Patterson GH, Hirschberg K, Polishchuk RS, Gerlich D, Phair RD, et al. (2008) Transport through the Golgi Apparatus by Rapid Partitioning within a Two-Phase Membrane System. *Cell* 133: 1055–1067.
- Pearse BM, Robinson MS (1990) Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol* 6: 151–171.
- Pelham HR, Rothman JE (2000) The Debate about Transport in the Golgi—Two Sides of the Same Coin? *Cell* 102: 713–719.
- Peng X, Frohman MA (2012) Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. *Acta Physiol* 204: 219–226.
- Pettitt TR, McDermott MI, Saqib KM, Shimwell N, Wakelam MJO (2001) Phospholipase D1b and D2a generate structurally identical phosphatidic acid species in mammalian cells. *Biochem J* 306: 707–715.
- Pfeffer SR (2010) How the Golgi works: a cisternal progenitor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 19614–19618.

- Pfeffer SR (2011) Entry at the trans-face of the Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005272.
- Polishchuk E V, Di Pentima A, Luini A, Polishchuk RS (2003) Mechanism of constitutive export from the Golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-Golgi network tubular domains. *Mol Biol Cell* 14: 4470–4485.
- Polishchuk RS, Capestrano M, Polishchuk E V (2009) Shaping tubular carriers for intracellular membrane transport. *FEBS Lett* 583: 3847–3856.
- Polizotto RS, De Figueiredo P, Brown WJ (1999) Stimulation of Golgi membrane tubulation and retrograde trafficking to the ER by phospholipase A2 activating protein (PLAP) peptide. *J Cell Biochem* 74: 670–683.
- Popoff V, Adolf F, Brügger B, Wieland F (2011) COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005231.
- Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ, et al. (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389: 81–85.
- Rabouille C, Kondylis V (2007) Golgi ribbon unlinking: An organelle-based G2/M checkpoint. *Cell Cycle* 6: 2723–2729.
- Rambourg A, Clermont Y (1997) Three-dimensional structure of the Golgi apparatus in mammalian cells. In *The Golgi Apparatus*. Birkhäuser. Berger EG RJ, editor Switzerland: Springer Science & Business Media.
- Rambourg A, Clermont Y, Hermo L (1979) Three-dimensional architecture of the golgi apparatus in Sertoli cells of the rat. *Am J Anat* 154: 455–476.
- Rambourg A, Clermont Y, Marraud A (1974) Three-dimensional structure of the osmium-impregnated Golgi apparatus as seen in the high voltage electron microscope. *Am J Anat* 140: 27–45.
- Reinhard C, Schweikert M, Wieland FT, Nickel W (2003) Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8253–8257.

- Rexach MF, Latterich M, Schekman RW (1994) Characteristics of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles. *J Cell Biol* 126: 1133–1148.
- Riebeling C, Morris AJ, Shields D (2009). Phospholipase D in the Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta* 179: 876–80.
- Ríos RM, Bornens M (2003) The Golgi apparatus at the cell centre. *Curr Opin Cell Biol* 15: 60–66.
- Rizzo MA, Shome K, Vasudevan C, Stolz DB, Sung TC, et al. (1999) Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 274: 1131–1139.
- Robinson MS, Bonifacino JS (2001) Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13: 444–453.
- Rodríguez-Boulán E, Kreitzer G, Müsch A (2005) Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 233–247.
- Rodríguez-Boulán E, Müsch A (2005) Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim Biophys Acta* 1744: 455–464.
- Roth J, Taatjes DJ, Lucocq JM, Weinstein J, Paulson JC (1985) Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation. *Cell* 43: 287–295.
- Roth MG (2008) Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* 9: 1233–1239.
- Rothman JE, Wieland FT (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272: 227–234.
- Roux A, Cappello G, Cartaud J, Prost J, Goud B, et al. (2002) A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5394–5399.
- Saito K, Chen M, Bard F, Chen S, Zhou H, et al. (2009) TANGO1 Facilitates Cargo Loading at Endoplasmic Reticulum Exit Sites. *Cell* 136: 891–902.

- Saito K, Yamashiro K, Ichikawa Y, Erlmann P, Kontani K, et al. (2011) cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell* 22: 2301–2308.
- San Pietro E, Capestrano M, Polishchuk E V, DiPentima A, Trucco A, 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.
- Sandvig K, Spilsberg B, Lauvrak SU, Torgersen ML, Iversen T-G, et al. (2004) Pathways followed by protein toxins into cells. *Int J Med Microbiol* 293: 483–490.
- Saraste J, Kuismanen E (1984) Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell* 38: 535–549.
- Scales SJ, Pepperkok R, Kreis TE (1997) Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* 90: 1137–1148.
- Schekman R, Orci L (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271: 1526–1533.
- Schindler R, Itin C, Zerial M, Lottspeich F, Hauri HP (1993) ERGIC-53, a membrane protein of the ER-Golgi intermediate compartment, carries an ER retention motif. *Eur J Cell Biol* 61: 1–9.
- Schindler R, Itin C, Zerial M, Lottspeich F, Hauri HP (1993) ERGIC-53, a membrane protein of the ER-Golgi intermediate compartment, carries an ER retention motif. *Eur J Cell Biol* 61: 1–9.
- Schmid SL (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 66: 511–548.
- Schmidt JA, Kalkofen DN, Donovan KW, Brown WJ (2010) A Role for Phospholipase A2 Activity in Membrane Tubule Formation and TGN Trafficking. *Traffic* 11: 1530–1536.

- Schweizer A, Fransen JA, Matter K, Kreis TE, Ginsel L, et al. (1990) Identification of an intermediate compartment involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. *Eur J Cell Biol* 53: 185–196.
- Sciaky N, Presley J, Smith C, Zaal KJM, Cole N, et al. (1997) Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* 139: 1137–1155.
- Sciorra VA, Rudge SA, Wang J, McLaughlin S, Engebrecht J, et al. (2002) Dual role for phosphoinositides in regulation of yeast and mammalian phospholipase D enzymes. *J Cell Biol* 159: 1039–1049.
- Selvy P, Lavieri R, Lindsley C, Brown H (2011) Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev* 111: 6064–6119.
- Semenza JC, Hardwick KG, Dean N, Pelham HRB (1990) ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* 61: 1349–1357.
- Sesso A, de Faria F, Iwamura E, Correa H (1994) A three-dimensional reconstruction study of the rough ER-Golgi interface in serial thin sections of the pancreatic acinar cell of the rat. *J Cell Sci* 107: 517–528.
- Shemesh T, Luini A, Malhotra V, Burger KNJ, Kozlov MM (2003) Prefission constriction of Golgi tubular carriers driven by local lipid metabolism: a theoretical model. *Biophys J* 85: 3813–3827.
- Shiba Y, Randazzo PA (2012) ArfGAP1 function in COPI mediated membrane traffic: Currently debated models and comparison to other coat-binding arfGAPs. *Histol Histopathol* 27: 1143–1153.
- Siddhanta A, Backer JM, Shields D (2000) Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the Golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. *J Biol Chem* 275: 12023–12031.
- Simons K, Van Meer G (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27: 6197–6202.
- Simpson JC, Nilsson T, Pepperkok R (2006) Biogenesis of tubular ER-to-Golgi transport intermediates. *Mol Biol Cell* 17: 723–737.

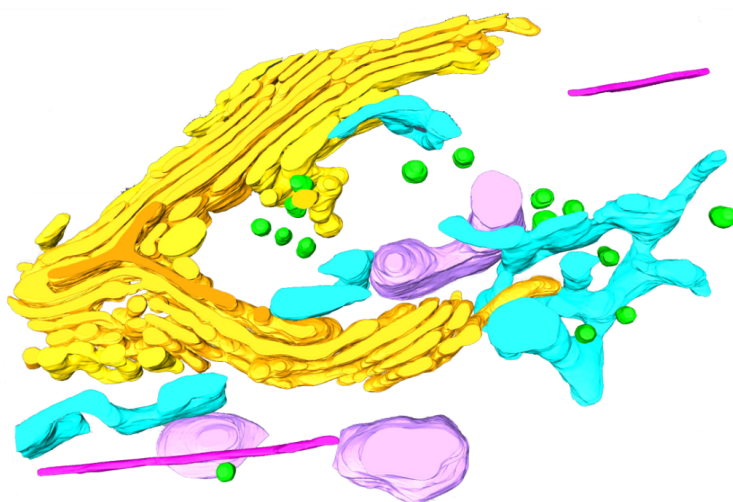
- Spang A (2013) Retrograde traffic from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a013391.
- Sprong H, Sluijs P Van Der, Meer G Van (2001) How Proteins Move Lipids And Lipids Move Proteins. *Nature* 2: 504–513.
- Stace CL, Ktistakis NT (2006) Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1761: 913–926.
- Stagg SM, LaPointe P, Razvi A, Gürkan C, Potter CS, et al. (2008) Structural Basis for Cargo Regulation of COPII Coat Assembly. *Cell* 134: 474–484.
- Sugars JM, Celtek S, Manifava M, Coadwell J, Ktistakis NT (2002) Hierarchy of membrane-targeting signals of phospholipase D1 involving lipid modification of a pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 277: 29152–29161.
- Sung TC, Altshuler YM, Morris AJ, Frohman MA (1999) Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. *J Biol Chem* 274: 494–502.
- Szul T, Grabski R, Lyons S, Morohashi Y, Shestopal S, et al. (2007) Dissecting the role of the ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 in Golgi biogenesis and protein trafficking. *J Cell Sci* 120: 3929–3940.
- Szul T, Sztul E (2011) COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda)* 26: 348–364.
- Szule JA, Fuller NL, Rand RP (2002) The effects of acyl chain length and saturation of diacylglycerols and phosphatidylcholines on membrane monolayer curvature. *Biophys J* 83: 977–984.
- Taatjes DJ, Roth J (1986) The trans-tubular network of the hepatocyte Golgi apparatus is part of the secretory pathway. *Eur J Cell Biol* 42: 344–350.
- Tanaka K, Fukudome H (1991) Three-dimensional organization of the Golgi complex observed by scanning electron microscopy. *J Electron Microsc Tech* 17: 15–23.
- Tang BL, Low SH, Hauri HP, Hong W (1995) Segregation of ERGIC53 and the mammalian KDEL receptor upon exit from the 15 degrees C compartment. *Eur J Cell Biol* 68: 398–410.

- Tomás M, Martínez-Alonso E, Ballesta J, Martínez-Menárguez JA (2010) Regulation of ER-Golgi intermediate compartment tubulation and mobility by COPI coats, motor proteins and microtubules. *Traffic* 11: 616–625.
- Toomre D, Keller P, White J, Olivo JC, Simons K (1999) Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci* 112: 21–33.
- Topham MK (2006) Signaling roles of diacylglycerol kinases. *J Cell Biochem* 97: 474–484.
- Traub LM, Bonifacino JS (2013) Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a016790.
- Traub LM, Kornfeld S (1997) The trans-Golgi network: A late secretory sorting station. *Curr Opin Cell Biol* 9: 527–533.
- Trucco A, Polishchuk RS, Martella O, Di Pentima A, Fusella A, et al. (2004) Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat Cell Biol* 6: 1071–1081.
- Tüscher O, Lorra C, Bouma B, Wirtz KWA, Huttner WB (1997) Cooperativity of phosphatidylinositol transfer protein and phospholipase D in secretory vesicle formation from the TGN - phosphoinositides as a common denominator? *FEBS Lett* 419: 271–275.
- van Meel E, Klumperman J (2008) Imaging and imagination: Understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol* 129: 253–266.
- van Meer G, Sprong H (2004) Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol* 16: 373–378.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 112–124.
- Venditti R, Scanu T, Santoro M, Di Tullio G, Spaar A, et al. (2012) Sedlin Controls the ER Export of Procollagen by Regulating the Sar1 Cycle. *Science* 337(6102), 1668-1672.

- Vicogne J, Vollenweider D, Smith JR, Huang P, Frohman MA, et al. (2006) Asymmetric phospholipid distribution drives in vitro reconstituted SNARE-dependent membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14761–14766.
- Vivero-Salmerón G, Ballesta J, Martínez-Menárguez JA (2008) Heterotypic tubular connections at the endoplasmic reticulum-Golgi complex interface. *Histochem Cell Biol* 130: 709–717.
- Voet D, Voet JG (1995) Pyruvate Dehydrogenase Multienzyme Complex. *Biochem* 2nd Ed: 541.
- Volchuk A, Amherdt M, Ravazzola M, Brügger B, Rivera VM, et al. (2000) Megavesicles implicated in the rapid transport of intracisternal aggregates across the Golgi stack. *Cell* 102: 335–348.
- Volpicelli-Daley LA, Li Y, Zhang C-J, Kahn RA (2005) Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol Biol Cell* 16: 4495–4508.
- Wandinger-Ness A, Bennett MK, Antony C, Simons K (1990) Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J Cell Biol* 111: 987–1000.
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welte R (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res* 45: 250–278.
- Warren G, Mellman I (1999) Bulk Flow Redux? *Cell* 98: 125–127.
- Waters MG, Griff IC, Rothman JE (1991) Proteins involved in vesicular transport and membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 3: 615–620.
- Wei J-H, Seemann J (2010) Nakteripiosin targets tubulin and triggers mitotic catastrophe in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 9: 3375–3385.
- Weigert R, Silletta MG, Spanò S, Turacchio G, Cericola C, et al. (1999) CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature* 402: 429–433.
- White J, Johannes L, Mallard F, Girod A, Grill S, et al. (1999) Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol* 147: 743–759.

- Xu D, Hay JC (2004) Reconstitution of COPII vesicle fusion to generate a pre-Golgi intermediate compartment. *J Cell Biol* 167: 997–1003.
- Yang J, Gad H, Lee S, Mironov A (2008) COPI vesicle fission: a role for phosphatidic acid and insight into Golgi maintenance. *Nat Cell Biol* 10: 1146–1153.
- Yang J-S, Lee SY, Spanò S, Gad H, Zhang L, et al. (2005) A role for BARS at the fission step of COPI vesicle formation from Golgi membrane. *EMBO J* 24: 4133–4143.
- Yang J-S, Valente C, Polishchuk RS (2011) COPI acts in both vesicular and tubular transport. *Nat Cell Biol* 13: 996–1003.
- Zeuschner D, Geerts WJC, van Donselaar E, Humbel BM, Slot JW, et al. (2006) Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COPII-coated transport carriers. *Nat Cell Biol* 8: 377–383.
- Zimmerberg J, Kozlov MM (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 9–19.
- Zuber C, Fan JY, Guhl B, Roth J (2004) Misfolded proinsulin accumulates in expanded pre-Golgi intermediates and endoplasmic reticulum subdomains in pancreatic beta cells of Akita mice. *FASEB J* 18: 917–919.

ANEXO





Phospholipase D2 Is Involved in the Formation of Golgi Tubules and ArfGAP1 Recruitment

Narcisa Martínez-Martínez, Emma Martínez-Alonso, José Ballesta, José A. Martínez-Menárguez*

Department of Cell Biology and Histology, Medical School, IMIB-Arrixaca, University of Murcia, Murcia, Spain

Abstract

Lipids and lipid-modifying enzymes play a key role in the biogenesis, maintenance and fission of transport carriers in the secretory and endocytic pathways. In the present study we demonstrate that phosphatidic acid generated by phospholipase D2 (PLD2) is involved in the formation of Golgi tubules. The main evidence to support this is: 1) inhibitors of phosphatidic acid formation and PLD2 depletion inhibit the formation of tubules containing resident enzymes and regulators of intra-Golgi transport in a low temperature (15°C) model of Golgi tubulation but do not affect brefeldin A-induced tubules, 2) inhibition of PLD2 enzymatic activity and PLD2 depletion in cells cultured under physiological conditions (37°C) induce the formation of tubules specifically containing Golgi matrix proteins, and, 3) over-expression of PLD2 induces the formation of a tubular network. In addition, it was found that the generation of this lipid by the isoenzyme is necessary for ArfGAP1 recruitment to Golgi membranes. These results suggest that both proteins are involved in the molecular mechanisms which drive the formation of different types of Golgi tubules.

Citation: Martínez-Martínez N, Martínez-Alonso E, Ballesta J, Martínez-Menárguez JA (2014) Phospholipase D2 Is Involved in the Formation of Golgi Tubules and ArfGAP1 Recruitment. PLoS ONE 9(10): e111685. doi:10.1371/journal.pone.0111685

Editor: Paul A. Randazzo, National Cancer Institute, United States of America

Received: March 18, 2014; **Accepted:** October 3, 2014; **Published:** October 29, 2014

Copyright: © 2014 Martínez-Martínez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) (Consolider COAT CSD2009-00016) and Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (04542/GERM/06) to JAM-M. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: jamartin@um.es

Introduction

Membrane flux into, through and out of the Golgi complex is mediated by vesicular and tubular transport intermediates. Much information is available on the composition and the molecular machinery involved in the formation and fusion of COPI-, COPII- and clathrin-coated vesicles with the corresponding target membranes; for example, it is known that coat complexes, tethering factors and Rab and SNARE proteins play a key role in these processes [1–3]. More recently, lipids and lipid-modifying enzymes have been added to this list of important regulatory molecules that are necessary for the deformation of the membrane during budding and fission. In contrast, despite the fact that they are a common feature of the secretory (and endocytic) pathway, little is known about the mechanisms regulating tubular transport intermediates [1–3].

The first indications about the molecular machinery involved in the formation of tubules came from studies on brefeldin A (BFA), a fungal drug that induces extensive tubulation of the Golgi followed by fusion of the Golgi complex into the endoplasmic reticulum [4]. Analysis of its action showed that BFA induces the detachment of the COPI coats from membranes, and that the main target of this drug is GBF1, a GTP exchange factor (GEF) for Arf1 [5]. This interaction prevents activation of this small GTPase and the subsequent formation of COPI vesicles. BFA-induced Golgi tubules may be representative of the tubules that mediate COPI-independent Golgi-to-ER transport.

Another experimental condition that induces extensive Golgi tubulation is low temperature (15°C). In contrast to BFA-induced

tubules, such tubules are enriched in some molecules (Golgi resident enzymes) but not others (anterograde and retrograde cargo, matrix proteins) [6]. Further analysis demonstrated the presence of specific Rabs and SNAREs in these tubules that are involved in intra-Golgi transport but not in ER-Golgi traffic [7]. Thus, low temperature-induced tubules may represent transport carriers operating in intra-Golgi transport, more specifically in the recycling of resident enzymes. A detailed explanation of the physiological significance of low-temperature-induced tubules and their putative roles in the framework of intra-Golgi transport models can be found in our recent review [8]. As described for BFA-induced tubules, the formation of low temperature-induced tubules may also depend on COPI machinery.

Tubule formation needs the deformation and further elongation of Golgi membranes, processes which may require a specific lipid composition [9]. There is growing evidence that glycerolipids, such as lysophosphatidic acid (LPA), phosphatidic acid (PA) and diacylglycerol (DAG) play an important role in tubule formation by mediating protein recruitment to membranes, by modulating protein functions or by directly affecting membrane curvature [10–12]. Hence, the enzymes associated with the metabolism of these lipids, such as phospholipases, acyltransferases and lipid kinases, probably play a key role in tubule formation. It is known, for example, that the LPA generated by the enzyme phospholipase A₂ is involved in tubule-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the endoplasmic reticulum [13,14]. Studies using the drug propranolol indicated that DAG is involved in the formation and/or fission of vesicles and tubules [15,16]. Furthermore, recent

studies indicate that lipid phosphate phosphatase 3, which generates DAG from PA, is also involved in tubule-mediated retrograde transport [17]. PA generated by phospholipase D2 (PLD2), in cooperation with the protein BARS, is involved in the fission of Golgi carriers [18]. The coordinate action of lipid modifying enzymes, LPA acyltransferase and phospholipase A₂ in the biogenesis of vesicles and tubules has also been demonstrated [19]. Interestingly, these enzymes promote or inhibit COPI fission, respectively. The association with membranes of components of the COPI machinery depends on a specific lipid composition, as is the case with Arf [20] and ArfGAP1 [16,21,22].

The aim of the present study was to deepen our understanding of the molecular mechanisms that participate in tubule formation. More specifically, we analysed the role of glycerolipids and related enzymatic activities in the generation and/or maintenance of Golgi tubules as well as their relationship with the COPI machinery. Our findings reveal for the first time that PA generated via phospholipase D2 activity plays an active role in the formation of Golgi tubules and that it is involved in the recruitment of ArfGAP1 to the Golgi membranes.

Results

The formation of low temperature-induced tubules requires phosphatidic acid

As the initial model to ascertain the role of lipid and lipid-modifying enzymes in Golgi tubule formation, we used HeLa cells cultured at 15°C, a condition that stimulated the formation of tubules containing Golgi resident enzymes and SNARE and Rab proteins involved in intra-Golgi transport [6,7]. Several enzyme inhibitors were used to characterise the lipid requirements for the formation of tubules in this model (Fig. 1). N-acetyl-galactosaminyltransferase T2 was selected as Golgi marker but results were confirmed with other resident proteins such as Rab6, Gos28 or galactosyltransferase. In the presence of 1-butanol, the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase D results in phosphatidylbutanol instead of PA, in a reaction known as transphosphatidylolation [23]. To see how this primary alcohol affects the formation of low temperature-induced tubules, the number of cells with Golgi tubules was compared in cells cultured at 15°C for 45 min in the presence and absence of this compound. It was found that the number was halved in the presence of 1-butanol (Figs 1A, I), while many treated cells showed fragmented tubules throughout the cytoplasm (Fig. 1A). This effect was even more pronounced when cells were pre-treated with this compound for 15 min before cooling (Figs 1B, I). Additionally, our experiments showed that not only the number of tubulated cells was significantly reduced but also the mean number of tubules per cell (Fig. 1J). The concentration of alcohol used in this study (0.3% v/v) is efficient inducing transphosphatidylolation [24] but did not alter Golgi morphology or cytoskeleton organization (data not shown). No significant inhibition of the tubulation was observed with 2-butanol, which is a poor substrate of PLD (data not shown). These results suggest that PA is necessary for the formation of this type of Golgi tubule. Unfortunately, it was not possible to use specific inhibitors of PLD1 and PLD2 in this model because they were seen to alter the Golgi structure when used in cell cultures at 15°C (data not shown).

Propranolol inhibits the formation of DAG through the dephosphorylation of PA, a reaction catalysed by phosphatidic acid phosphohydrolases/lipid phosphate phosphatases (PAP/LPP) [25]. In contrast with 1-butanol, this compound did not inhibit the formation of low temperature-induced tubules (Fig. 1C, D). In fact, there was a slight increase in the number of tubulated cells

and the number of tubules per cell (Fig. 1I, J), suggesting that DAG is not necessary for the formation of this type of tubule. The increase, although small, in the number of tubules also pointed to a key role for PA.

PA can also be synthesised from LPA by the action of LPA acyltransferase, a reaction that can be inhibited by the pharmacological agent CI-976 [26,27]. Treatment with this compound slightly reduced the number of cells with tubules but increased the mean number of tubules per cell (Fig. 1E, I, J), probably due to the accumulation of LPA [13,14]. However, pre-treatment of the cells for 15 min with this compound before cooling reduced the number of tubulated cells and the mean number of tubules per cell by a half (Figs 1F, I, J).

The compound R59022 is an inhibitor of DAG kinase, which has the opposite effect to propranolol, inhibiting the formation of PA from DAG [28,29]. As expected, it inhibited the formation of low temperature-induced tubules (Figs 1G, H–J). The results were similar with or without pre-treatment.

Previous studies using propranolol showed that DAG is necessary for the formation of BFA-induced Golgi tubules [16]. In agreement with these studies, we found that propranolol inhibited the formation of these tubules compared with the observations made in control conditions (data not shown). In contrast, 1-butanol increased the number of BFA-induced tubules (Fig. 1L–N). It was more evident when the cells were pre-treated with 1-butanol before the addition of BFA. Under this condition, 70% cells developed huge tubular networks (Fig. 1M). Interestingly, 30% of the cells showed a cytoplasmic labelling pattern after very short BFA treatment indicative that 1-butanol accelerated BFA-induced Golgi-endoplasmic reticulum fusion (Fig. 1N). These findings confirm that Golgi tubules induced by low temperature and BFA require different lipidic species.

PLD2 is necessary for the formation of low temperature-induced tubules but not BFA-induced tubules

The above results demonstrate that PA is required for low temperature-induced Golgi tubule formation. The most important route producing signalling PA uses phosphatidylcholine as source in a reaction catalysed by PLD [30]. The highest inhibition of tubule formation was obtained with 1-butanol, suggesting that this pathway is the most important for the formation and maintenance of this kind of tubule. In mammals there are two isoforms of this enzyme, called PLD1 and PLD2, both of which have been localised in the Golgi complex [31,32]. It may be possible that one or both of these isoforms are involved in the formation of the PA necessary for Golgi tubule formation at low temperature. To explore this hypothesis, we first analysed whether low temperature affects the distribution of these isoforms. Under control conditions, PLD1 is found in spots distributed throughout the cytoplasm (Fig. 2A). In addition, it has also been observed in the nucleus [31]. No co-location with Golgi markers was observed (Fig. 2B). Low temperature did not alter its distribution. PLD2 showed a typical cytoplasmic labelling pattern, which was more intense in the perinuclear area (Fig. 2A). Double immunolabelling experiments confirmed the Golgi location of PLD2 (Fig. 2B). Low temperature induced time-dependent concentration of PLD2 in the perinuclear area (Figs. 2A, B). In addition, PLD2 was also present in some Rab1-reactive spot distributed throughout the cell (Fig. 2B, inset), thus indicating the presence of this enzyme in ERGIC elements. Identical results were obtained with different anti-PLD2 antibodies. Since our non-commercial antibody gave stronger signal, next experiments were carried out with this antibody. This low temperature-induced concentration in the Golgi area was not observed in other enzymes involved in

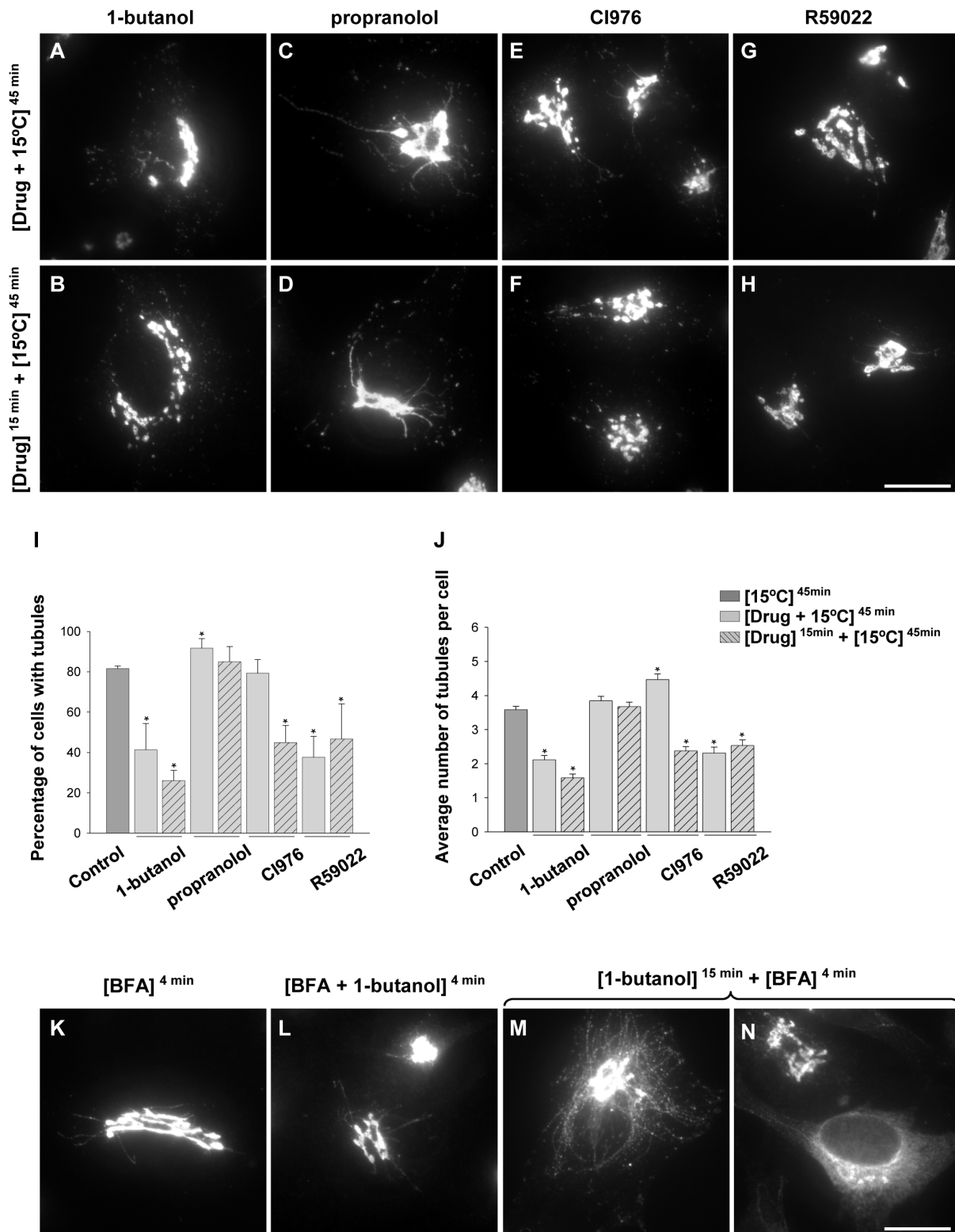


Figure 1. Effects of inhibitors in the formation of low temperature- and BFA-induced tubules. (A–H) Cells were incubated at 15°C for 45 minutes in the presence of inhibitor without (A, C, E, G) or with (B, D, F, H) pre-treatment with the same inhibitor for 15 min at 37°C and then immunolabelled for N-acetyl-galactosaminyltransferase T2 as Golgi marker. (I, J) Quantitative analysis. Bars represent the percentage of cells showing tubules (I) and the number of tubules per cell (J) obtained after each treatment (expressed as mean $\pm$ SEM). At least 300 cells were counted from three independent experiments. Asterisks indicate significant differences (Student t test $p \leq 0.05$). (K–N) Cells were incubated for 4 minutes with BFA in the presence of 1-butanol without (L) or with (M,N) pre-treatment with the same inhibitor for 15 min at 37°C and then immunolabelled for N-acetyl-galactosaminyltransferase T2 as Golgi marker. Bars, 20 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0111685.g001

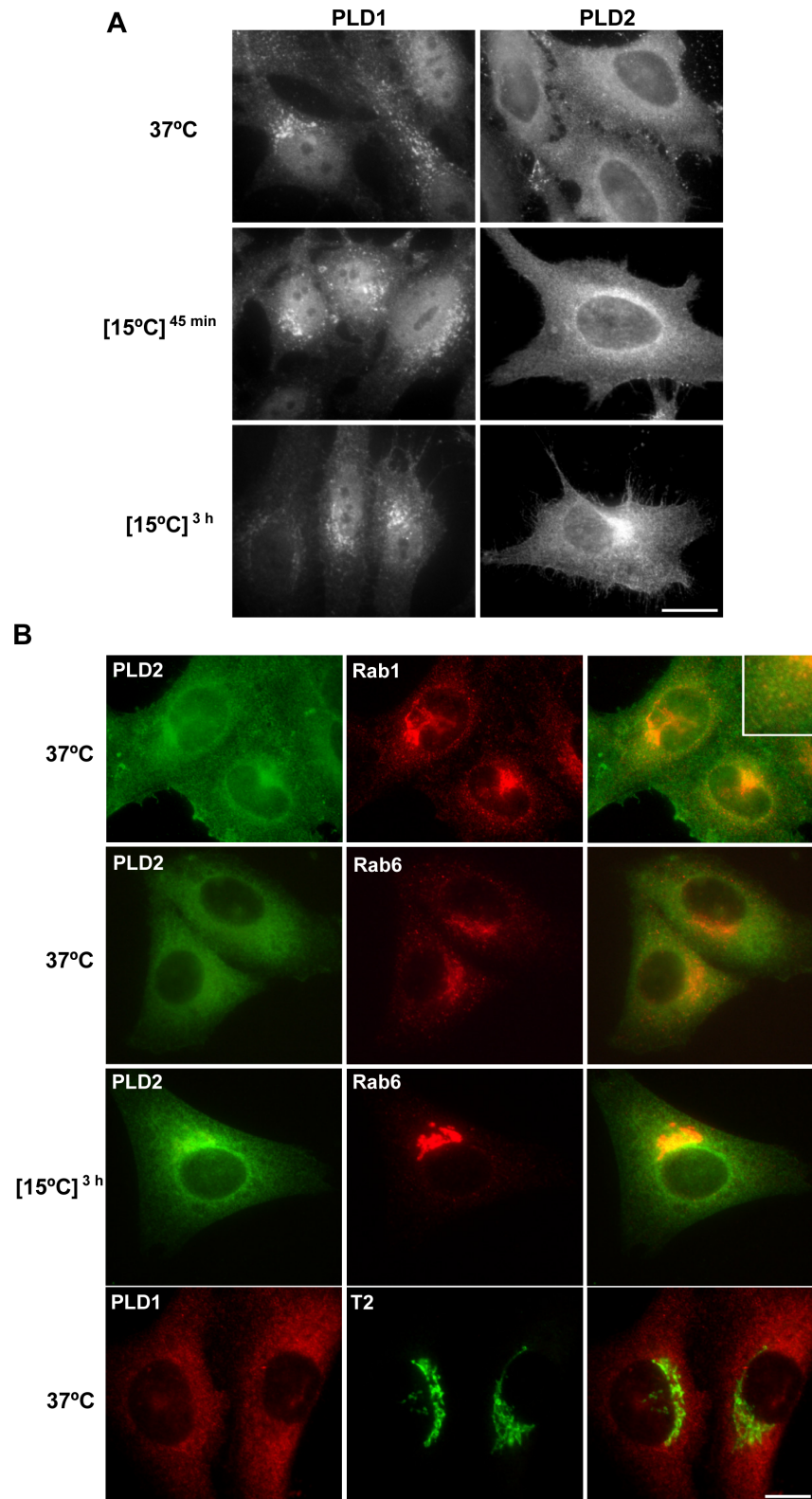


Figure 2. Effect of 15°C in the distribution of PLD1 and PLD2. Cells were cultured at 37°C, 15°C for 45 min or 3 h and immunolabelled for PLD1 and PLD2 (A) or double immunolabelled for PLD isoforms and Golgi markers (B). (A) In control and treated cells, PLD1 is located in small immunolabelled dots distributed throughout the cell. PLD2 showed a diffuse cytoplasmic labelling pattern. The incubation at low temperature concentrates PLD2 into the perinuclear area. (B) PLD2 but not PLD1 co-localizes with Golgi markers in the perinuclear area. PLD2 is also present in several Rab1-immunoreactive dots representing ERGIC elements. Bars, 20 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0111685.g002

tubulation, such as cytosolic phospholipase A₂ group IV and lipid phosphate phosphatase 3 (data not shown).

The present result pointed to PLD2 as the isoform involved in the formation of low temperature-induced Golgi tubules; therefore to confirm this role, we analysed the formation of Golgi tubules in depleted cells by using small interfering RNA (siRNA). Unfortunately, the antibodies used only detected the enzyme in over-expressing cells; thus, so depletion was measured in cells overexpressing GFP-tagged PLD2. The tagged enzyme was downregulated by 30–40% 24 h after transfection with siRNA (Fig. 3A). Moreover, analysis of real-time quantitative PCR demonstrated that endogenous PLD2 expression decreased by 56% 48 h after transfection with siRNA. This drop in the levels of PLD2 affected the formation of this type of tubules (Fig. 3B). Thus, the percentage of cells with Golgi tubules decreased from 80–90% to 55–60% in depleted cells cultured at 15°C for 45 min or 3 h (Fig. 3B). However, depletion affected neither tubule formation (Figs 3B, C) nor Golgi-to-ER redistribution in BFA experiments (data not shown). Taken together, our results show that PLD2 is necessary for the formation of low temperature-induced but not for the BFA-induced tubules, which suggests that there are two types of tubules in the Golgi complex, with different formation mechanisms and, probably, different functions.

Inhibition of PLD2 activity induces the formation of tubules containing Golgi matrix proteins

Low temperature experiments support a role for PLD2 in the formation of Golgi tubules. To confirm this role we explored the role of this enzyme under physiological conditions (37°C) and using different approaches: (i) decreasing its expression level of the enzyme by small interfering RNA (ii) blocking its activity by a specific inhibitor; (iii) over-expressing the enzyme and, finally, (iv) analysing its distribution within the Golgi membranes at ultrastructural level. First, we analysed how PLD2-depletion affected Golgi morphology. As previously described [18], immunofluorescence analysis using a large number of Golgi markers (resident enzymes, Rabs, SNAREs) confirmed that the Golgi morphology of depleted cells showed no major alterations, most of them being of typical perinuclear appearance (Fig. 4A). Only a small percentage of them had a compact round morphology (data not shown). However, we found that PLD2 depletion by siRNA induced the formation of tubules containing the Golgi matrix proteins GM130 and GRASP65 (Fig. 4A). It should be mentioned that this tubulation was not observed in the case of cis Golgi markers such as Rab 1. Electron microscopy confirmed that the architecture of the Golgi complex in PLD2-depleted cells was normal (Fig. 4B). Although tubules are difficult to observe in 2D images, some were observed emerging from the lateral rims and cis cisternae. To confirm that tubulation in depleted cells was specifically related with the enzymatic activity of PLD2 we used the isoform-specific inhibitors VU0364739 and VU0359595 which are 75-fold and 1700-fold selective for PLD2 and PLD1, respectively [33,34]. The Golgi complex of cells treated with PLD2 inhibitor showed a normal morphology when analysed by immunofluorescence for most Golgi markers (Fig. 4A). However, once again, we observed GM130 and GRASP65-positive tubules (Fig. 4A). In fact, a much greater level of tubulation was observed with this inhibitor than following depletion probably because VU0364739 inhibit PLD2 activity more than depletion does. Conversely, PLD1 inhibitor did not induce tubulation (Fig. 4A).

We also analysed how the over-expression of PLD2 might affect Golgi morphology. The GFP-tagged form of this isoform showed a similar distribution in the cell to the endogenous enzyme (Fig. 5A). However, to our initial surprise, the Golgi complex of over-

expressing cells was apparently lost when analysed by immunofluorescence (Fig. 5A). This loss was not due to protein degradation as confirmed by western blot analysis (Fig. 3A). Electron microscopical analysis of PLD2-overexpressed cells showed a disorganised Golgi complex, where most stacks were replaced by tubular networks (Fig. 5B), supporting that this enzyme regulates Golgi morphology. Cells with low levels of PLD2-GFP showed an altered GC with a high number of tubules (Fig. 5C).

Finally, we assessed the localization of PLD2 within the Golgi membranes by cryoimmunoelectron microscopy. A previous study in GH3 cells showed that this enzyme is located in the lateral rims of the Golgi complex, as would be expected if it plays a role in tubulation. In order to analyse these data in HeLa cells and obtain detailed information about this distribution, mild fixation conditions (4% paraformaldehyde) were used. It was found that the enzyme is located on cisternae (61%) and peri-Golgi tubule-vesicular elements (39%) (Fig. 6). PLD2 was observed in lateral zones of the cisterna (Fig. 6A), including COPI-coated buds (inset in Fig. 6A) as well as flat portion of cisternae (Fig. 6B). Most of the immunolabelled vesicles were uncoated (80% of the immunolabelled vesicles) although some showed clathrin (12%) and COPI (7%) coats.

Taken together, our results support the idea that PLD2 is an important player in Golgi tubulation. The present results also provide clues on how different types of tubules may be regulated (see Discussion).

Association of ArfGAP1 in the Golgi membrane depends of PLD2 activity

We found that some PLD2 was associated to COPI coats. In addition to a specific lipid composition, Golgi tubulation may require COPI coat machinery. The association of a GTP-tagged form of ArfGAP1 with the Golgi complex depends on DAG [16]. We wanted to know whether there is a relation between the PA generated by PLD2 and the association of ArfGAP1 with Golgi membranes. For this purpose, the way in which lipid inhibitors affected ArfGAP1 distribution was analysed. Endogenous ArfGAP1 was detected using a polyclonal antibody that specifically recognises this protein but not ArfGAP2/3 (data not shown). Of the inhibitors used, only propranolol and the PLD2-specific inhibitor VU0364739 induced ArfGAP1 redistribution from Golgi membranes (Fig. 7). None of these inhibitors affected the Golgi location of other COPI components/regulators, including β' COP (Fig. 7), Arf1 and GBF1. This suggests that ArfGAP1 interacts with DAG and/or the PA generated by PLD2 during the formation of different types of Golgi tubule. To confirm this, we analysed how the association of ArfGAP1 with Golgi membranes was affected during the massive Golgi tubulation induced by low temperatures as opposed to short treatment (4 min) with BFA (Fig. 8). It was found that BFA induced a fall in Golgi-associated ArfGAP1 as described previously [35], whereas low temperature induced the opposite effect - its recruitment into the perinuclear area. This recruitment was quantitatively analyzed by measuring the immunofluorescence signal in the Golgi area in relation to the rest of the cytoplasm. We found that the immunofluorescence in the Golgi area significantly increased 13% and 27% after 45 min and 3 h of incubation at low temperature, respectively (Student's test, $p < 0.05$). Although both BFA and low temperature induce the detachment of coatome proteins [6], they affected other components of the COPI machinery differently (Fig. 8). Thus, Arf1 remained in the Golgi area, including tubules, after exposure to low temperature, while BFA rapidly expelled it from the Golgi membranes. Low temperature did not affect the distribution of GBF1, the GEF for Arf1, whereas it concentrated in the Golgi

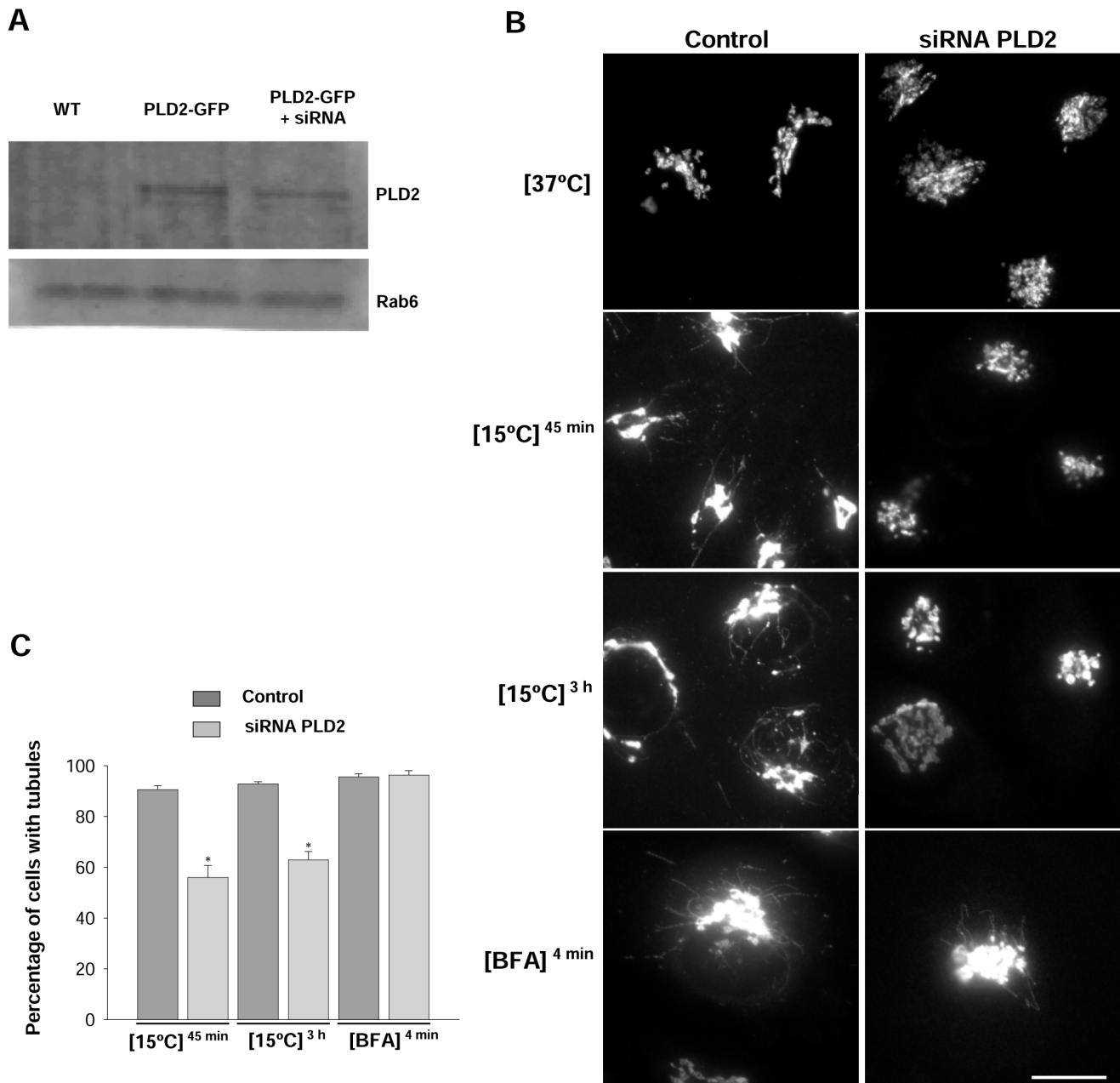


Figure 3. Effects of PLD2 depletion in Golgi tubule formation. (A) Lysates of wild-type cells (WT), cells overexpressing GFP-tagged PLD2 (GFP-PLD2) and cells overexpressing GFP-tagged PLD2 and depleted for PLD2 using siRNA (GFP-PLD2+ siRNA) were immunoblotted using our monoclonal antibody against PLD2 or a polyclonal antibody against Rab6. PLD2 antibody detects a 117 kDa band which corresponds with the tagged form of the enzyme. Expression of GFP-PLD2 but not Rab6 is effectively decreased by RNA interference. The antibody against PLD2 does not recognize the enzyme in wild-type cells. (B) Control and PLD2-depleted cells were cultured at 15°C (45 min or 3 h) or treated with BFA (4 min) and immunolabelled for N-acetyl-galactosaminyltransferase T2. At low temperature, PLD2-depleted cells showed a typical perinuclear labelling pattern but hardly any tubules. However, depletion did not affect tubule formation in BFA experiments. (C) Quantitative analysis. Numbers represent percentage ($\pm$ SEM) of cells showing tubules ($n=300$). Asterisks indicate significant differences (Student t test $p \leq 0.05$). Bars, 20 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0111685.g003

area after BFA addition. COPI-induced membrane deformation also depends on BARS [18], a process which depends on the PA generated by PLD2. However, neither BFA nor low temperature affected the distribution of BARS (data not shown). Together, these results support the idea that the association of ArfGAP1 to the Golgi membranes is regulated by PLD2 activity and suggest that ArfGAP1 may play a role in the formation of a specific subset of tubules.

Discussion

PLD is associated with important cell signalling pathways that regulate cell survival, proliferation, migration, cytoskeletal organization, endocytosis and exocytosis, differentiation and defence [23,30,36]. The altered expression of PLD has been associated with several diseases, including cancer and neurodegeneration [37]. The product of the enzyme, PA, is an anionic phospholipid

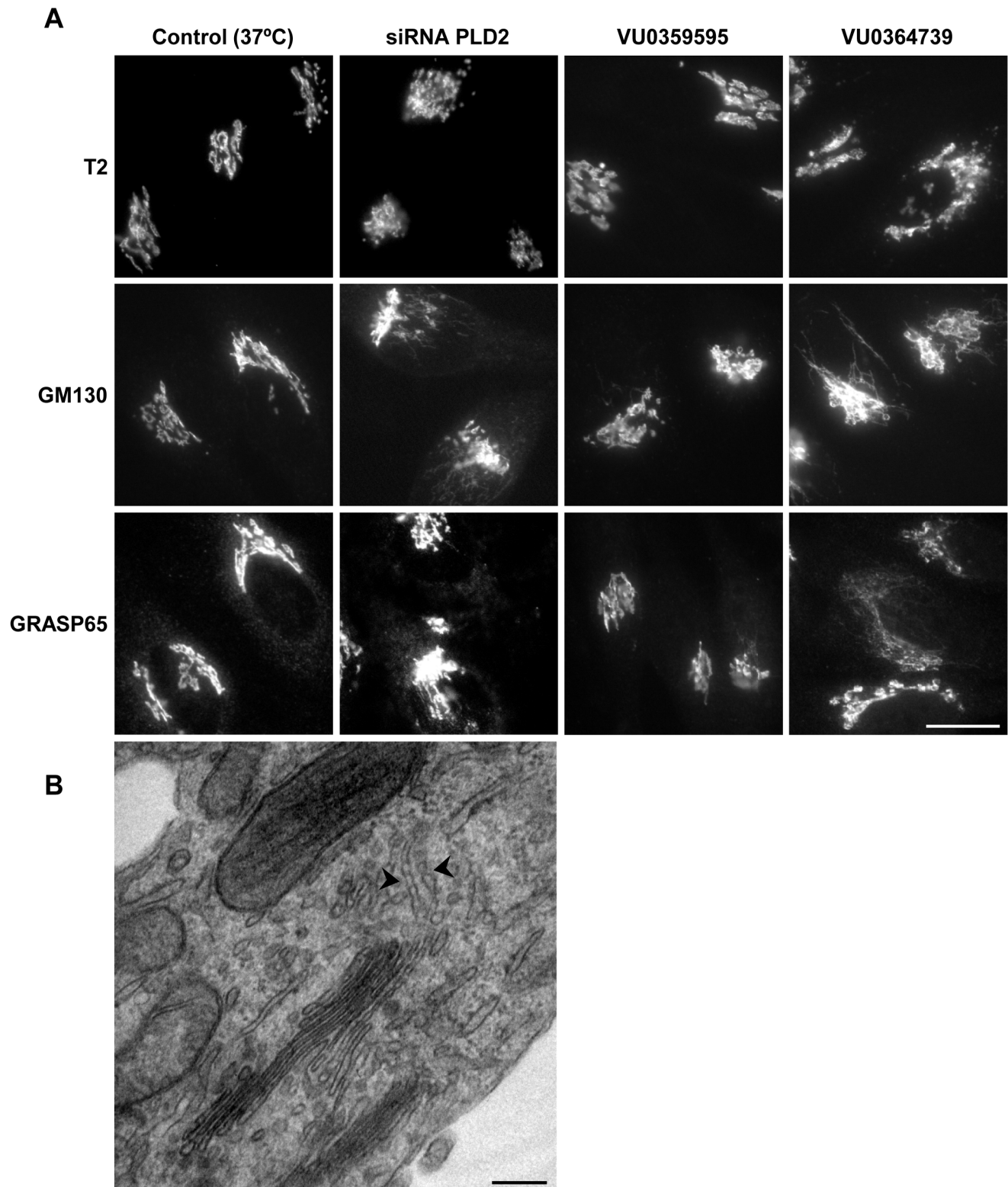


Figure 4. Effect of the depletion and inhibition of PLD2 in the morphology of the Golgi complex. (A) Cells cultured at 37°C were transfected with siRNA against PLD2, treated with VU0359595 (PLD1 inhibitor) or VU0364739 (PLD2 inhibitor) and immunolabelled for N-acetylgalactosaminyltransferase T2, GM130 or GRASP65. Both siRNA-PLD2 and VU0364739 treatments induced the formation of tubules containing the Golgi matrix proteins GM130 and GRASP65 but not the Golgi resident enzyme T2. (B) Electron microscopy analysis of Golgi complex of PLD2-depleted cells. Arrowheads point to tubules emerging from lateral rims and cis cisternae containing necks (arrowheads). Bars (A), 20 μ m; (B), 200 nm.
doi:10.1371/journal.pone.0111685.g004

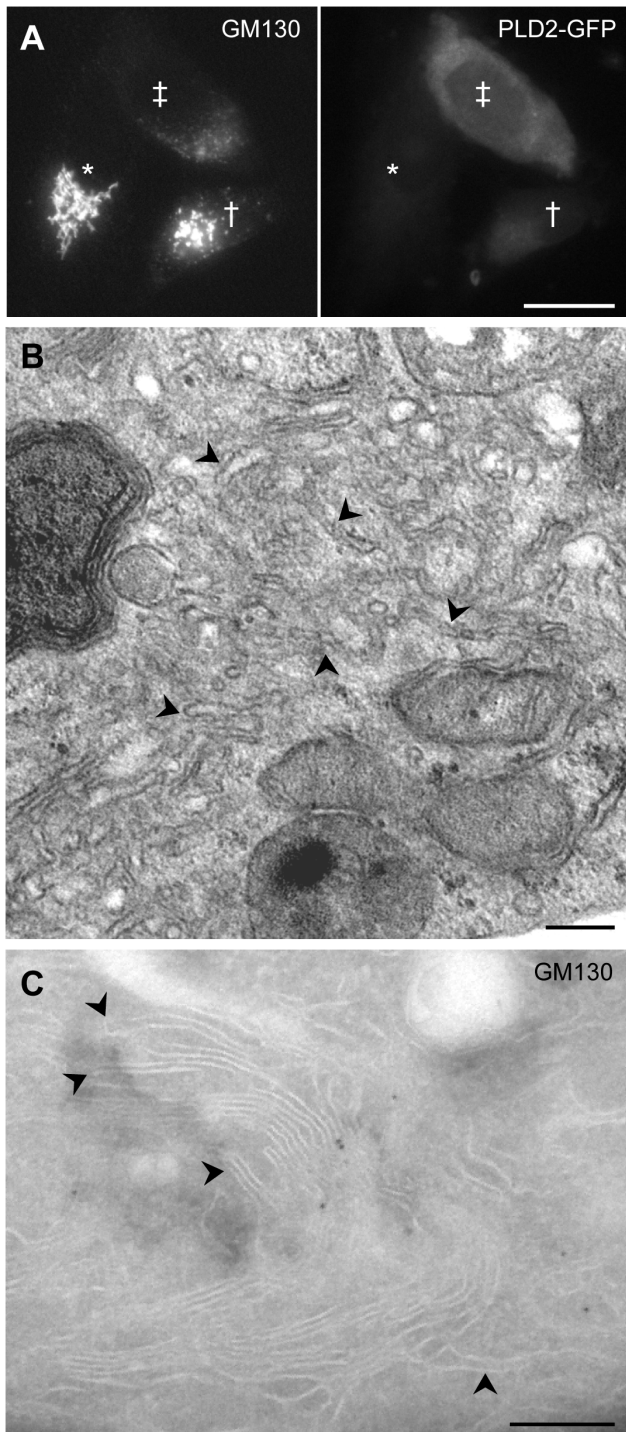


Figure 5. Effect of the over-expression of PLD2 on Golgi morphology. Immunofluorescence (A), electron microscopic (B) and cryoimmunoelectron microscopic (C) analysis of the effect of the over-expression of PLD2 in cells cultured at 37°C. (A) Cells transiently expressing GFP-tagged PLD2 were immunolabelled for GM130. Cells over-expressing high level of PLD2 (‡) apparently lost the Golgi complex. The morphology of this organelle in cells expressing low level of PLD2 (†) is altered in comparison with non-transfected cells (*). (B) PLD2-overexpressed cell showing a highly disorganised Golgi complex formed by tubular networks (arrowheads). (C) Cell expressing GFP-tagged PLD2 was immunolabelled for GM130. The morphology of the Golgi stack is altered and it shows a weak immunoreactivity for GM130. Despite of the difficulty to observe tubules in ultrathin sections, several

tubules (arrowheads) emerging from the stack can be identified. Bars (A), 20 μ m; (B, C), 200 nm.

doi:10.1371/journal.pone.0111685.g005

which is able to recruit and activate positively charged proteins. In addition, it can be converted into other signalling molecules such LPA and DAG [38]. So far, PLD has been found to interact with 58 proteins and 5 lipids [36]. In mammals, there are two major isoforms, PLD1 and PLD2, which are widely expressed [39] and share 50% homology [40]. PA generated by PLD2 has been seen to be involved in the late steps of COPI-coated vesicle formation, more specifically in the scission of budding vesicles [18]. PLD2 inhibition affects COPI retrograde transport but not anterograde intra-Golgi transport [19]. However, in contrast with our results, these studies failed to find a role for this enzyme in membrane tubule formation. Here, we show that this enzyme and its product, PA, are key regulators in Golgi tubule formation. We first demonstrate that low temperature-induced tubules, in contrast to their BFA-induced counterparts, require PA. The data obtained with different inhibitors suggest that all routes that regulate the amount of this lipid contribute to tubule formation. The fact that DAG and LPA are also involved in tubule formation [41] led us to think that they might regulate the formation of different types of tubules. However, it might also be possible that tubulation is an unspecific attribute of Golgi membranes, which may be very sensitive to the lipid composition, and any slight change in their composition may artificially alter their curvature. However, the specific composition of the tubules induced by low temperature and PLD2 depletion argue against this idea.

PA can be generated by the action of LPA acyltransferase, DAG kinase and PLD. In our low temperature experiments, the maximum inhibition was obtained with 1-butanol, therefore we focused on PA generation from phosphatidylcholine catalysed by PLD. Low temperatures induce a redistribution of PLD2 isoform from cytoplasm to the Golgi area. It should be mentioned that mammalian PLD maintains high enzymatic activity at temperatures around 15°C [42]. The fact that low temperatures induce movement of peripheral ERGIC elements to the Golgi area [43] may explain the increased labelling observed at the perinuclear area. We found some PLD2-immunoreactivity in ERGIC elements. Our EM images, under physiological conditions, showed PLD2-immunolabelled peri-Golgi tubulovesicular elements, which may correspond to these intermediates. It might be also possible that low temperature affect the recycling of the enzyme thorough ERGIC/Golgi membranes. Conversely, the increase in perinuclear labelling might correspond to a pool of cytosolic enzyme recruited to the Golgi membranes. PLD2 (and PLD1) have PX and PH domains with an affinity for phosphoinositidies, but low affinity for Golgi-associated phosphoinositidies [44]. Its specific binding to membranes and the intracellular location of PLD2 also depends on palmitoylation in the PH domain [44]. In fact, the exact distribution of the isoforms is not well known, but PLD2 seems to be more membrane-bound, including lipid rafts [36], in contrast to PLD1, which is more cytosolic when expressed in insect cells [23].

The role of PLD2 in tubule formation was also confirmed under physiological conditions. The endogenous enzyme is located in the lateral rims of the Golgi apparatus from which the tubules grow (this study and [32]). Second and importantly, depletion experiments and the use of specific inhibitors confirmed that this enzyme is involved in the formation of a specific set of Golgi tubules containing matrix proteins. Finally, over-expression of a GFP-tagged form of enzyme induced the replacement of stacked cisternae by tubular networks. The final conclusion is that this

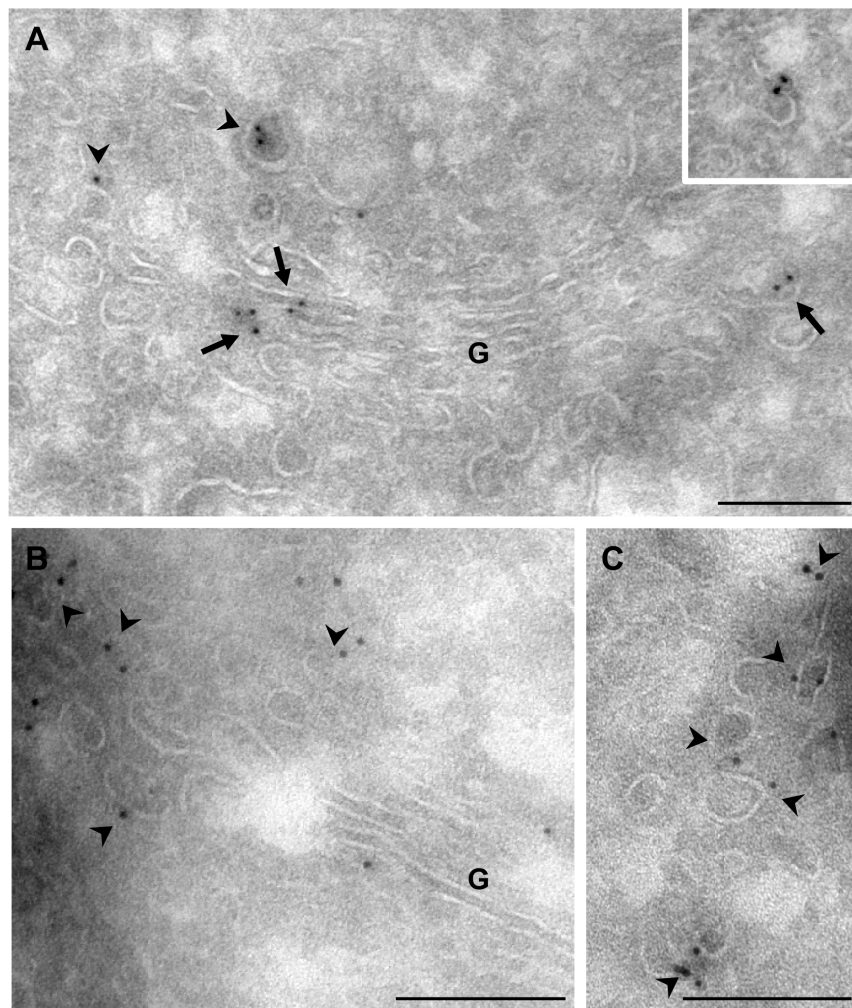


Figure 6. Ultrastructural distribution of PLD2. Ultrathin cryosections of HeLa cells were immunolabelled for PLD2 followed by 10-nm gold-conjugated protein A. (A–C) This enzyme is located on cisternae (G), including their rims (arrows), as well as coated and uncoated peri-Golgi tubule-vesicular membranes (arrowheads). The inset in A shows a COPI-coated bud at the lateral rim of the cisterna. Bars, 200 nm.
doi:10.1371/journal.pone.0111685.g006

isoform is a key regulator of Golgi morphology and tubule formation. Activation or inhibition of the enzyme will induce the formation of specific tubules containing resident enzymes or matrix proteins, respectively. The different results obtained with or without pre-treatment suggest that PA is important in an early step of tubule formation. Conversely, our depletion studies support a role for this enzyme in the fission of a specific set of transport carriers. Thus, as described for DAG [15,16], this lipid may be involved in different steps of carrier biogenesis.

Apart from their specific lipid composition, coat complexes may be involved in tubule formation. We found that low temperature and BFA affect COPI coat components and regulatory molecules very differently. Although low temperature also induces the detachment of COPI coat proteins, the process is very slow compared with BFA [6]. The most dramatic and interesting difference between BFA and low temperature treatments is found in the case of ArfGAP1, which is recruited in the Golgi area at 15°C but detached from these membranes soon after the addition of the fungal drug. The specific recruitment of ArfGAP1 into the Golgi area at low temperature suggests that this phenomenon might be related to tubule formation. The relationship between COPI coats and lipid composition during transport carrier

formation has recently been demonstrated. The coordinated action of LPA acyltransferase type γ and cytosolic phospholipase A₂ type α acting on COPI coats facilitates the formation of vesicles or tubules, respectively [19]. Moreover, Arf1 stimulates PLD activity, although to a greater extent in the case of PLD1 isoform [23]. Our EM images support that PLD2 is associated with COPI coats, confirming previous results on the role of this isoform in retrograde transport. Importantly, experiments based on specific lipid inhibitors suggest that PA specifically generated by PLD2 is necessary for the recruitment of ArfGAP1 to membranes. However, ArfGAP1 remained in the Golgi area in PLD2-depleted cells (data not shown) probably because the diminution of PA in these silenced cells (~60%) is not as great as in cells treated with 10 μ M of inhibitor (100%) [34]. DAG also seems to be necessary for this recruitment (our results and [16]). It is possible that both lipids are needed simultaneously for this process, as described previously for other proteins [29]. The role of ArfGAP1 is controversial [45,46]. Classically, it was considered that the hydrolysis of GTP in GTP-bound Arf triggers the loss of the COPI coats. Conversely, it might be involved in coat polymerization, promoting vesicle formation. Its role in cargo sorting is also under discussion. PA interacts with members of the GAP

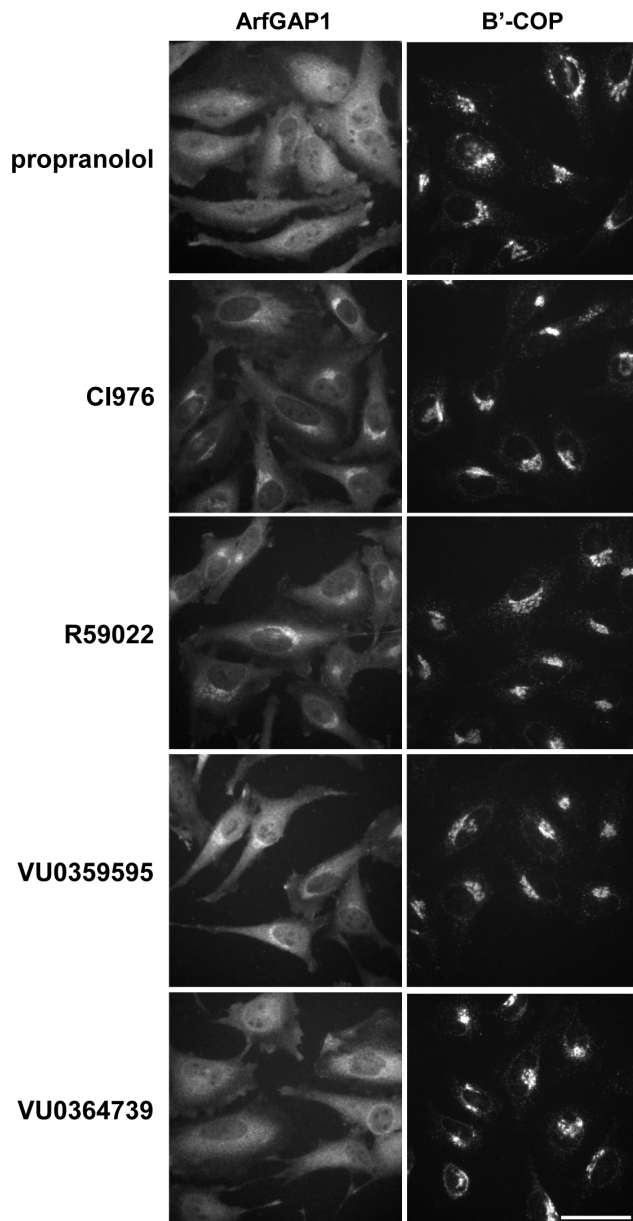


Figure 7. Effects of the alteration of PA levels on the distribution of ArfGAP1 and β' -COP. Cells cultured at 37°C were incubated for 1 h with the corresponding inhibitor and immunolabelled for ArfGAP1 or β' -COP. When cells were treated with the PLD2 inhibitor VU0364739 and propranolol, ArfGAP1 but not β' -COP is redistributed from Golgi membranes. Bars 20 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0111685.g007

family, including AGAP1 [47] and Rho-GAP [48], although, to the best of our knowledge, such interaction has not been described for ArfGAP1. ArfGAP1 binds membranes containing lipids with spontaneous negative curvature because of its ability to sense packing defects of the membrane, for instance, when conical shaped lipids are incorporated into membranes made of cylindrical lipids [49]. DAG and PA have conical forms and induce spontaneous negative curvature [50]. ArfGAP1 binds highly curved membranes, although this is not the case with BFA-treated cells. The interaction between PA and ArfGAP1 could be indirect (through the protein BARS) [18] although this is unlikely because this protein, in contrast to ArfGAP1, was not recruited into Golgi

membranes in our tubulation models (data not shown). It is interesting that PLD1-generated PA is not involved in the binding of ArfGAP1 to Golgi membranes, as was demonstrated by the use of a specific inhibitor. *In vitro* analysis showed that both isoforms elaborate the same PA species [51]. However, this may not be the case *in vivo* due to the specific lipidic environment of cellular membranes.

Our results suggest that Golgi membranes are able to generate different types of tubules of varied composition, as it has been postulated for COPI vesicles [52]. Lipid-generating enzymes such as LPA acyltransferase, phospholipase A, DAG kinase and LPP are key regulators of this process. PLD2 must be included in this list. When PLD2 enzymatic activity is enhanced or the enzyme is recruited to certain Golgi areas, the PA generated is able to bend the membrane and to recruit ArfGAP1, which might be necessary for the recruitment of resident enzymes [53]. Conversely, when its activity is inhibited, there is an accumulation of DAG or LPA, which might generate another type of tubule containing matrix proteins. It can be speculated that some Golgi tubules may be involved in retrograde intra-Golgi traffic [6,54], whereas others keep the architecture of the Golgi ribbon [54] or anterograde intra-Golgi transport [55]. Thus, new experiments are needed to shed light on the fine tuning of tubular regulation.

Materials and Methods

Antibodies and reagents

A monoclonal antibody against PLD2 was generated by Abmart (Shanghai, China) using the KEGEDPADRM epitope sequence of the human protein. Polyclonal antibodies against PC-PLD1 and PC-PLD2 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit polyclonal antibodies against ArfGAP1 and GBF1 were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Rabbit polyclonal against GRASP65 was purchased from Abcam (Cambridge, UK). The source of other primary antibodies has been previously described [6,7]. Secondary mouse and rabbit antibodies coupled to Alexa Conjugated (488, 568) were obtained from Invitrogen (Barcelona, Spain). Protein A-gold was obtained from the department of Cell Biology at Utrecht University (Utrecht, The Netherlands). The plasmids coding PLD2-GFP and Arf1-GFP were obtained from OriGene (Rockville, MD, USA). The small interfering RNA (siRNA) for PC-PLD2 was obtained from Santa Cruz Biotechnology.

BFA, 1-butanol, propranolol, 6-{2-[4-[(p-Fluorophenyl)phenylmethylene]-1-piperidinyl]ethyl}-7-methyl-5H-thiazolo(3,2-a)pyrimidine-5-one (R59022) and 2,2-Dimethyl-N-(2,4,6-trimethoxyphenyl)dodecanamide (CI976) and unspecified chemical reagents were purchased from Sigma. (1R, 2R)-N-([S]-1-{4-[5-bromo-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo(d)imidazol-1-yl]piperidin-1-yl}propan-2-yl)-2-phenylcyclopropanecarboxamide (VU0359595), a selective phospholipase D1 inhibitor, was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). N-[2-[1-(3-Fluorophenyl)-4-oxo-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-8-yl]ethyl]-2-naphthalenecarboxamid (VU0364739), a selective phospholipase D2 inhibitor, was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). A frozen stock solution of 20 mM CI976 and 2 mM R59022 were prepared in DMSO. VU0359595 and VU0364739 were prepared as a 10 nM stock solution in DMSO and stored at 4°C.

Cell culture and experimental treatments

HeLa cells (ATTC CRM-CCL-2) were cultured in DMEM (Gibco, Paisley, UK) containing 10% FBS under standard tissue culture conditions (37°C, 5% CO₂). To induce Golgi tubule formation, cells were cultured in a temperature-controlled

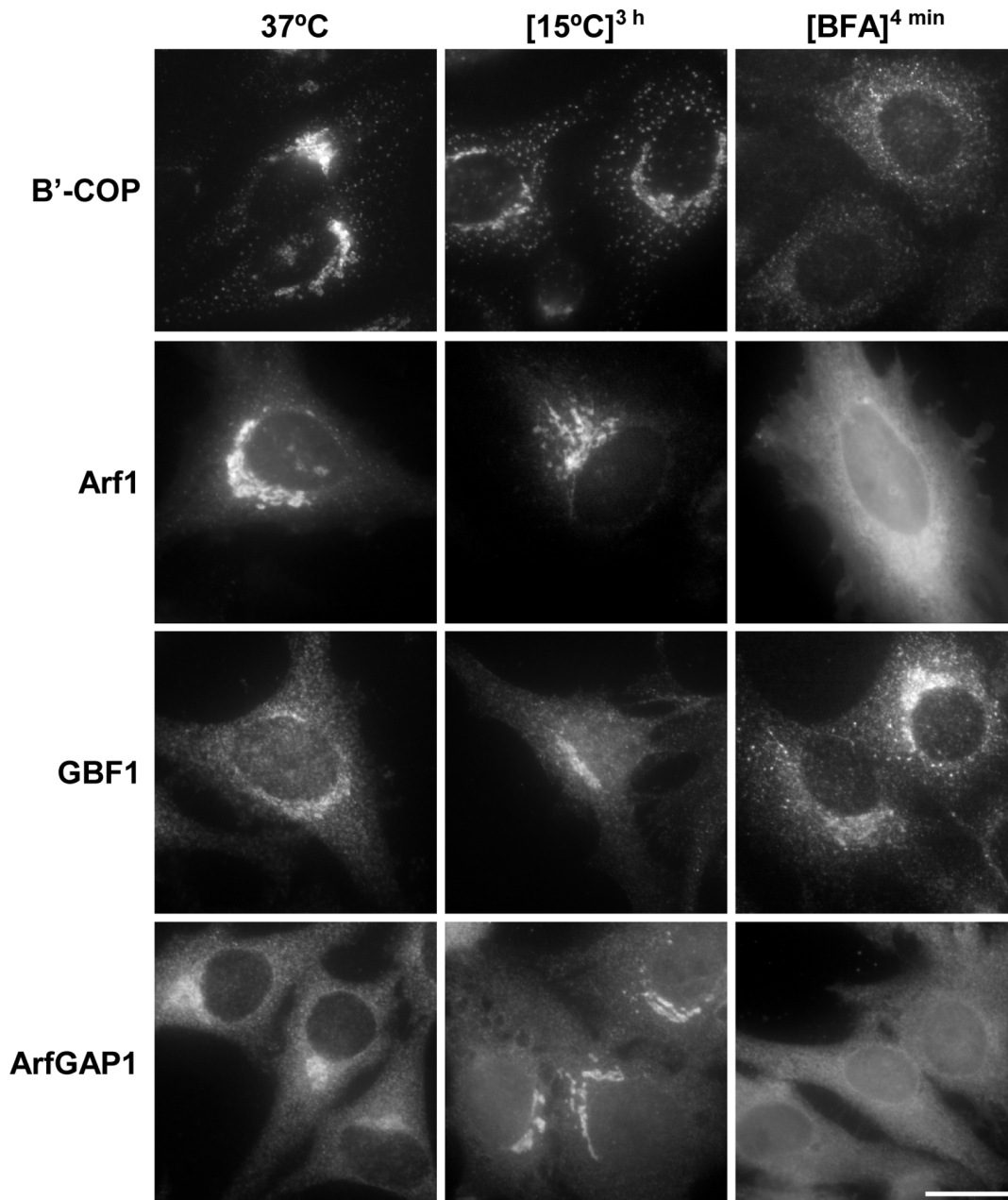


Figure 8. Effect of 15°C and BFA on the distribution of the COPI components. Immunofluorescence analysis of the distribution of COPI, Arf1, GBF1 and ArfGAP1 in control, low temperature (3 h), and BFA (4 min)-treated cells. BFA and low temperature affected components of the COPI machinery differently. Bars 20 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0111685.g008

incubator at 15°C for different periods of time (45 min or 3 h) or, conversely, cells were treated with freshly prepared BFA (1 μ g/mL) in DMEM for 4 minutes at 37°C. Cells were grown on glass coverslips and incubated with freshly prepared inhibitors before each experiment. The following concentrations of enzyme inhibitors were used: 0.3% 1-butanol, 60 μ M propranolol [16], 20 μ M CI976 [27], 20 μ M R59022 [29], 10 μ M VU0359595 [33] or 10 μ M VU0364739 [34].

Transfection and protein depletion

HeLa cells were transiently transfected with the plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's

instructions. After 18 hours of protein expression, cells were fixed and processed for immunofluorescence or electron microscopy.

PLD2 downregulation by means of the siRNA approach was performed according to the manufacturer's protocol (Santa Cruz Biotechnology). The knockdown efficiency after 48 h was determined by RT-PCR, using GAPDH mRNA to normalize RNA inputs. Efficiency was also determined by SDS-PAGE and subsequent immunoblot analysis of cells overexpressing GFP-tagged-PLD2 and depleted for 24 h.

Immunofluorescence microscopy

Cells grown on glass coverslips to 70% confluence were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. After washing with PBS, blocking with PBS-glycine and permeabilization with 0.1% saponin, the samples were processed for indirect immunofluorescence, as described previously [6,7]. The coverslips were examined with a Zeiss Axiophot fluorescent microscope coupled to a Leica DC 500 digital camera.

Quantitation of the percentage of cells immunolabelled for N-acetyl-galactosaminyltransferase T2 showing at least one unambiguously identified Golgi tubule was performed by analysing 300 cells per treatment (Figs 1I and 3). Only tubules unambiguously connected to the Golgi complex (perinuclear area) were used to analyse the mean number of tubules per cell (Fig. 1J).

Ultrastructural analysis

For conventional electron microscopy, cells were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.4 for 120 min at 4°C, post-fixed for 1 h in a mixture 1:1 of 2% OsO₄ and 3% of potassium ferrocyanide, dehydrated and embedded in Epon 812.

References

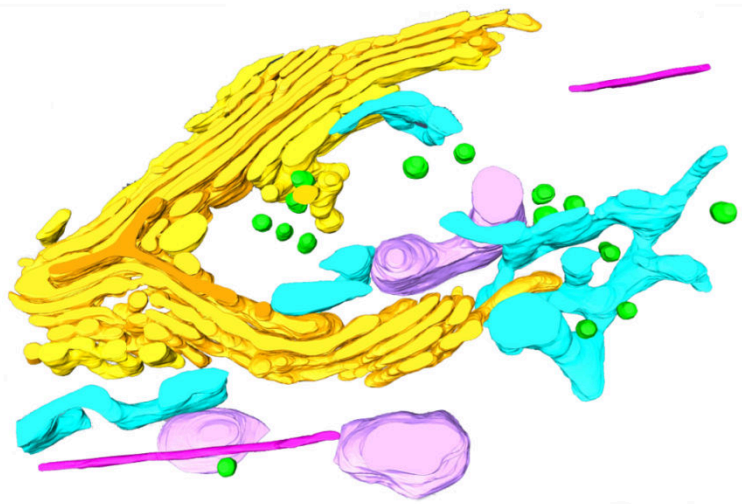
- Martínez-Menárguez JA (2013) Intra-Golgi transport: roles for vesicles, tubules, and cisternae. *ISRN Cell Biol* 2013: 1–15.
- Bonifacino J, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153–166.
- Klumperman J (2011) Architecture of the mammalian Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005181.
- Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, Berger EG, Hauri H-P, et al. (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.
- García-Mata R, Szul T, Álvarez C, Sztul E (2003) ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol Biol Cell* 14: 2250–2261.
- Martínez-Alonso E, Egea G, Ballesta J, Martínez-Menárguez JA (2005) Structure and dynamics of the Golgi complex at 15°C: low temperature induces the formation of Golgi-derived tubules. *Traffic* 6: 32–44.
- Martínez-Alonso E, Ballesta J, Martínez-Menárguez JA (2007) Low-temperature-induced Golgi tubules are transient membranes enriched in molecules regulating intra-Golgi transport. *Traffic* 8: 359–368.
- Martínez-Alonso E, Tomás M, Martínez-Menárguez JA (2013) Golgi tubules: their structure, formation and role in intra-Golgi transport. *Histochem Cell Biol* 140: 327–339.
- Polishchuk RS, Capestrano M, Polishchuk EV (2009) Shaping tubular carriers for intracellular membrane transport. *FEBS Lett* 583: 3847–3856.
- Zimmerberg J, Kozlov MM (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 9–19.
- Haucke V, Di Paolo G (2007) Lipids and lipid modifications in the regulation of membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* 19: 426–435.
- Graham TR, Kozlov MM (2010) Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. *Curr Opin Cell Biol* 22: 430–436.
- De Figueiredo P, Drecktrah D, Polizotto RS, Cole NB, Lippincott-Schwartz J, et al. (2000) Phospholipase A₂ antagonists inhibit constitutive retrograde membrane traffic to the endoplasmic reticulum. *Traffic* 1: 504–511.
- Brown WJ, Chambers K, Doody AM (2003) Phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* 4: 214–221.
- Asp L, Kartberg F (2009) Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol Biol Cell* 20: 780–790.
- Fernández-Ulibarri I, Vilella M, Lázaro-Díéguez F, Sarri E, Martínez SE, et al. (2007) Diacylglycerol is required for the formation of COPI vesicles in the Golgi-to-ER transport pathway. *Mol Biol Cell* 18: 3250–3263.
- Gutiérrez-Martínez E, Fernández-Ulibarri I, Lázaro-Díéguez F, Johannes L, Pyne S, et al. (2013) Lipid phosphate phosphatase 3 participates in transport carrier formation and protein trafficking in the early secretory pathway. *J Cell Sci* 126: 2641–2655.
- Yang J-S, Gad H, Lee SY, Mironov A, Zhang L, et al. (2008) COPI vesicle fission: a role for phosphatidic acid and insight into Golgi maintenance. *Nat Cell Biol* 10: 1146–1153.
- Yang J-S, Valente C, Polishchuk RS, Turacchio G, Layre E, et al. (2011) COPI acts in both vesicular and tubular transport. *Nat Cell Biol* 13: 996–1003.
- Krauss M, Jia J-Y, Roux A, Beck R, Wieland FT, et al. (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.
- Antony B, Huber I, Paris S, Chabre M, Cassel D (1997) Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem* 272: 30848–30851.
- Bigay J, Gounon P, Robineau S, Antony B (2003) Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* 426: 563–566.
- Selvy PE, Lavieri R, Lindsley CW, Brown HA (2011) Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev* 111: 6064–6119.
- Bi K, Roth MG, Ktistakis NT (1997) Phosphatidic acid formation by phospholipase D is required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Curr Biol* 7: 301–307.
- Koul O, Hauser G (1987) Modulation of rat brain cytosolic phosphatidate phosphohydrolase: Effect of cationic amphiphilic drugs and divalent cations. *Arch Biochem Biophys* 253: 453–461.
- Brown WJ, Plutner H, Drecktrah D, Judson BL, Balch WE (2008) The lysophospholipid acyltransferase antagonist CI-976 inhibits a late step in COPII vesicle budding. *Traffic* 9: 786–797.
- Drecktrah D, Chambers K, Racocin EL, Cluett EB, Gucwa A, et al. (2003) Inhibition of a Golgi complex lysophospholipid acyltransferase induces membrane tubule formation and retrograde trafficking. *Mol Biol Cell* 14: 3459–3469.
- De Chaffoy de Courcelles D, Roevens P, Van Belle H (1985) R 59 022, a diacylglycerol kinase inhibitor. Its effect on diacylglycerol and thrombin-induced C kinase activation in the intact platelet. *J Biol Chem* 260: 15762–15770.
- López-Andreo MJ, Gómez-Fernández JC, Corbalán-García S (2003) The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase Cepsilon to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Mol Biol Cell* 14: 4885–4895.
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res* 45: 250–278.
- Freyberg Z, Sweeney DA, Siddhanta A, Bourgoin S, Frohman MA, et al. (2001) Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12: 943–955.
- Freyberg Z, Bourgoin S, Shields D (2002) Phospholipase D2 is localised to the rims of the Golgi apparatus in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 13: 3930–3942.
- Lewis JA, Scott SA, Lavieri R, Buck JR, Selvy PE, et al. (2009) Design and synthesis of isoform-selective phospholipase D (PLD) inhibitors. Part I: Impact of alternative halogenated privileged structures for PLD1 specificity. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 1916–1920.
- Lavieri R, Scott SA, Selvy PE, Kim K, Jadhav S, et al. (2010) Design, synthesis, and biological evaluation of halogenated N-(2-(4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-8-yl)ethyl)benzamides: discovery of an isoform-selective small molecule phospholipase D2 inhibitor. *J Med Chem* 53: 6706–6719.
- Lippincott-Schwartz J, Liu W (2006) Insights into COPI coat assembly and function in living cells. *Trends Cell Biol* 16: e1–e4.
- Jang J-H, Lee CS, Hwang D, Ryu SH (2012) Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res* 51: 71–81.
- Peng X, Frohman MA (2012) Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. *Acta Physiol* 204: 219–226.
- Kooijman EE, Burger KNJ (2009) Biophysics and function of phosphatidic acid: a molecular perspective. *Biochim Biophys Acta* 1791: 881–888.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NM-M EM-A JB JAM-M. Performed the experiments: NM-M EM-A. Analyzed the data: NM-M EM-A JB JAM-M. Contributed to the writing of the manuscript: NM-M EM-A JB JAM-M.

39. Kim H, Lee J, Kim S, Shin MK, Min DS, et al. (2007) Differential expression of phospholipases D1 and D2 in mouse tissues. *Cell Biol Int* 31: 148–155.
40. Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, et al. (1997) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol* 7: 191–201.
41. Ha KD, Clarke BA, Brown WJ (2012) Regulation of the Golgi complex by phospholipid remodeling enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1821: 1078–1088.
42. Chalifour R, Kanfer JN (1982) Fatty acid activation and temperature perturbation of rat brain microsomal phospholipase D. *J Neurochem* 39: 299–305.
43. Klumperman J, Schweizer A, Clausen H, Tang B, Hong W, et al. (1998) The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci* 111: 3411–3425.
44. Kolesnikov YS, Nokhrina KP, Kretynin SV, Volotovskii ID, Martinec J, et al. (2012) Molecular structure of phospholipase D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells. *Biochem Biokhimiia* 77: 1–14.
45. East MP, Kahn RA (2011) Models for the functions of Arf GAPs. *Semin Cell Dev Biol* 22: 3–9.
46. Shiba Y, Randazzo PA (2012) ArfGAP1 function in COPI mediated membrane traffic: Currently debated models and comparison to other coat-binding ArfGAPs. *Histol Histopathol* 27: 1143–1153.
47. Nie Z, Stanley KT, Stauffer S, Jacques KM, Hirsch DS, et al. (2002) AGAP1, an endosome-associated, phosphoinositide-dependent ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein that affects actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 277: 48965–48975.
48. Kurooka T, Yamamoto Y, Takai Y, Sakisaka T (2011) Dual regulation of RA-RhoGAP activity by phosphatidic acid and Rap1 during neurite outgrowth. *J Biol Chem* 286: 6832–6843.
49. González-Rubio P, Gautier R, Etchebest C, Fuchs PF (2011) Amphipathic-Lipid-Packing-Sensor interactions with lipids assessed by atomistic molecular dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1808: 2119–2127.
50. Kooijman EE, Chupin V, Fuller NL, Kozlov MM, de Kruijff B, et al. (2005) Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* 44: 2097–2102.
51. Pettitt TR, McDermott MI, Saqib KM, Shimwell N, Wakelam MJO (2001) Phospholipase D1b and D2a generate structurally identical phosphatidic acid species in mammalian cells. *Biochem J* 306: 707–715.
52. Moelleken J, Malsam J, Betts MJ, Movafeghi A, Reckmann I, et al. (2007) Differential localization of coatamer complex isoforms within the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4425–4430.
53. Lanoix J, Ouwendijk J, Stark A, Szafer E, Cassel D, et al. (2001) Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *J Cell Biol* 155: 1199–1212.
54. Trucco A1, Polishchuk RS, Martella O, Di Pentima A, Fusella A, et al. (2004) Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat Cell Biol* 6: 1071–1081.
55. Beznoussenko GV, Parashuraman S, Rizzo R, Polishchuk R, Martella O, et al. (2014) Transport of soluble proteins through the Golgi occurs by diffusion via continuities across cisternae. *Elife* 3. doi: 10.7554/eLife.02009.

AGRADECIMIENTOS



Me gustaría expresar mi gratitud a los que, de una manera o de otra, han contribuido a que esta tesis vea la luz.

En primer lugar, quería agradecer a mis directores de tesis, porque me siento muy afortunada de haber realizado la tesis con ellos. A José Ángel Martínez Menárguez, por haber confiado en mí y por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Por sus consejos y conocimientos, y por la ayuda y apoyo en todo momento. A Emma Martínez Alonso, por haber podido continuar y aprovechar todo su trabajo. Por su supervisión y capacidad crítica. Por todo ese tiempo que me ha dedicado cuando he necesitado ayuda. Por convertirse en una amiga.

Mi gratitud a todos los miembros del Departamento de Biología Celular e Histología, a los profesores Manuel Avilés, Luís Miguel Pastor, Concepción Ferrer, Adelina Zuasti, José Ballesta, María Teresa Castell, Juan Francisco Madrid y Francisco Hernández. A todos mis compañeros, a los que ya no están y recuerdo con mucho cariño y a los que acaban de llegar, que les deseo mucha suerte. Especialmente me gustaría dar las gracias a mi compañero de laboratorio Wilson, por su inestimable ayuda al comienzo, y al resto de compañeros Vicente, Carla, Salvador, Blanca, Ascensión, Lourdes, María, María José, Esther, Jesús, Lili, Airyn, Tere, Luis Miguel y Mari Carmen, les agradezco tantos buenos momentos que hemos pasado juntos entre cafés, comidas y risas. Por ser tan buenos compañeros. Gracias a todos por el buen ambiente de trabajo, el apoyo que me han dado y los buenos ratos que hemos pasado juntos en estos años.

Mi agradecimiento también a los profesores Margit Pavelka y Adolf Ellinger, por haberme recibido y acogido en su grupo de investigación en la *Medizinische Universität Wien* (Austria) y permitirme aprender nuevas técnicas de microscopía, además de conocer la preciosa ciudad de Viena. Agradezco enormemente a Margit Pavelka por todo el entusiasmo, cariño y esfuerzo que me dedicó durante los meses que estuve en Viena, y a Ulrich Kaindl por su esfuerzo y atención durante mi estancia. Sin su ayuda, tanto personal como profesional, esta estancia no hubiese sido igual.

Me gustaría expresar mi gratitud a Trini Hernández y Manuel Cánovas por iniciarme en este mundo de la ciencia. Gracias también a mis antiguos compañeros de Bioquímica: José María, Sara, Vicente, David, Lali, Sergio, Emilia, Juana Mari y Berenice, por los buenos ratos que hemos compartido y por su amistad.

A los referees y el editor del trabajo publicado, porque con espíritu constructivo han aportado su tiempo e ideas para mejorarlo.

Esta tesis no habría sido posible sin el contrato predoctoral del programa Consolidar Ingenio ni la beca para estancia en el extranjero del programa Erasmus que recibí, ambos financiados con fondos públicos nacionales y europeos. Por ello, quería agradecer la oportunidad que la sociedad me ha dado para formarme e investigar. Espero que la investigación pública en España se fortalezca y que los ahora jóvenes investigadores tengamos la oportunidad de devolver a la sociedad española lo invertido en nosotros.

A mis amigas de siempre, Juana Mari y Mari Sol, que siempre están ahí cuando se las necesita para brindarme su amistad y respaldo. Por los momentos que hemos disfrutado juntas, y todo lo que hemos aprendido durante estos años.

Gracias a mis dos familias, a mis padres Miguel y Antonia, y a Pedro y Josefina. A mis padres, Miguel y Antonia, por ser mi punto de referencia. Muchas gracias por todo el cariño que he recibido, por la educación que me han dado y por construir el hogar al que siempre quiero volver. A Antonia y Josefina, por esos *tupers* de comida casera tan envidiados en la hora de la comida. Muchas gracias al resto de mi familia por todo el apoyo y cariño que siempre me han regalado.

No tengo palabras para agradecer a Pedro, por su infinita paciencia y apoyo incondicional. Por su cariño. Por ser mi ángel de la guarda.

