

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y ANATOMÍA PATOLÓGICA  
FACULTAD DE MEDICINA



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

Tesis presentada por Inés Fernández Ulibarri  
para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

*Materiales y  
 Métodos*



## MATERIALES

### 1. Reactivos

Reactivo	Descripción	Concentración	Procedencia
Brefeldina A	Metabolito fúngico que desorganiza la estructura y bloquea la función del complejo de Golgi	1-5 µg/ml	Sigma (St.Louis, MO)
Cicloheximida	Antibiótico que inhibe la síntesis proteica	100 µg/ml	Sigma (St.Louis, MO)
D609 (O-tricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]dec-9-yl dithiocarbonate potassium salt )	Inhibidor de la fosfolipasa C (PLC) específica para la fosfatidilcolina	500 µM	Sigma (St.Louis, MO)
DOG (2-dioctanoyl- <i>sn</i> -glycerol)	1,2-diacilglicerol sintético con ácidos grasos de cadena corta	3, 10, 50 µM	Sigma (St.Louis, MO)
Faloidina	Toxina que se une específicamente a la F-actina e inhibe la conversión de F- a G-actina	10 µg/ml	Sigma (St.Louis, MO)
Fumonisina B1	Metabolito fúngico que inhibe la biosíntesis de los esfingolípidos	25 µg/ml	Sigma (St.Louis, MO)
Latrunculina B	Toxina marina que inhibe la polimerización de los filamentos de actina	500 nM	Calbiochem (San Diego, CA)
Nocodazole	Promotor de la despolimerización de los microtúbulos	30 µM	Calbiochem (San Diego, CA)
PDBu (Phorbol 12,13-dibutirato )	Ester de forbol que es análogo al diacilglicerol. Permeable a la membrana plasmática	250 nM	Sigma (St.Louis, MO)
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Ester de forbol que es análogo al diacilglicerol. Poco permeable a la membrana plasmática	250 nM	Sigma (St.Louis, MO)
Propranolol	Inhibidor de la fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP/LPP)	60 µM	Calbiochem (San Diego, CA)
Puomicina	Antibiótico que selecciona células eucarióticas que son positivas para la puomicina acetiltransferasa	3 µg/ml	Sigma (St.Louis, MO)
U73122 (1-[6-(((17β)-3-Methoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione)	Inhibidor de la activación de la fosfolipasa C (PLC) específica para los fosfoinosítidos	6 µM	Calbiochem (San Diego, CA)
SLO (Streptolisina-O)	Toxina que permeabiliza las membranas celulares animales	5 µg/ml	Sigma (St.Louis, MO)
Subunidad B de la toxina de Shigela (toxina Shiga B)	Toxina de Shigela que se internaliza hasta el RE. Se utiliza como marcador de la vía retrógrada	4 µg/ml	Dr. L. Johannes (Instituto Curie, Paris, Francia)

## 2.- Anticuerpos

### 2.1.- Anticuerpos primarios

Antígeno detectado	Fuente/ especie	Peso Molecular (KDa)	Procedencia	IF	WB
ArfGAP1	Conejo	50	Acris Antibodies GmbH	-	1:2000
Calnexina	Conejo	90	BD Transduction Laboratories	1:1000	-
COP ( $\beta$ )	Ratón	110	Sigma (St.Louis, MO)	1:100	1:1000
CtBP/Bars50	Ratón	48	BD Transduction Laboratories	1:50	1:2000
CTR433	Ratón		Dr.M. Bornens Institute Curie, Paris	1:5	-
Flag	Ratón		Sigma (St.Louis, MO)	1:1000	-
Galactosiltransferasa	Conejo	49	Dr.E. Berger University of Zurich	1:100	-
Giantina	Ratón	372	Dr. H.P. Hauri Biozentrum, Basel	1:1000	-
GM130	Ratón / Rata	130	BD Transduction Laboratories	1:200	1:1000
GMAP210	Conejo	210	Dra.R.M. Rios Cabimer, Sevilla	1:1000	-
Golgina 97	Ratón / Humano	97	Molecular Probes (Invitrogen)	-	1:3000
KDEL receptor(Erd2)	Conejo	23	Dr.H-D Soling University of Gottingen	1:500	-
KDEL receptor (KR-10)	Ratón / Bovino	23	Calbiochem (San Diego, CA)	1:500	1:1000
LPP3/PAP2b	Conejo / Humano	35	Dr. A.J. Morris University of Kentucky Lexington KY, USA	1:100	1:500
Manosidasa II	Conejo	35	Dr. K. Moremen University of Georgia, Athens	1:1000	-
PKC $\epsilon$	Ratón	90	BD Transduction Laboratories	1:100	1:1000
p-PKC $\epsilon$ (Ser729)	Conejo	90	BD Transduction Laboratories	1:100	1:1000
tubulina ( $\alpha$ )	Ratón / Pollo	55	Sigma (St.Louis, MO)	-	1:50000
tubulina ( $\beta$ )	Ratón	55	Sigma (St.Louis, MO)	1:100	-
TGN 46	Oveja	46	Serotec (Oxford, UK)	1:5000	1:500

## 2.2.- Anticuerpos secundarios

IF	Procedencia	Dilución
488 Alexa-conejo	Molecular Probes	1:500
Cy2-ratón	Jackson Laboratories	1:50
Cy3-conejo	Jackson Laboratories	1:250
Cy3-ratón	Jackson Laboratories	1:50
WB	Procedencia	Dilución
Anti-ratón IgG HRP	Promega	1:3000
Anti-conejo IgG HRP	Promega	1:3000

## 3.- Plásmidos

Plásmido	Procedencia	Vector
ArfGAP1	Dr.H. Gad CMNS, Chieti, Italy	pEGFP
C1b-PKC $\theta$	Dr.I. Merida CSIC, Madrid, Spain	pEGFP
t045VSV-G	Dr.K.Simons NIH, Bethesda, USA	pEGFP
psPAX	Dr. A.J. Morris University of Kentucky Lexington KY, USA	psPAX
pMD2.G	Dr. A.J. Morris University of Kentucky Lexington KY, USA	pMD2.G
shRNA LPP3 (clon TRC49)	Dr. A.J. Morris University of Kentucky Lexington KY, USA	pKLO.1
shRNA LPP3 (clon TRC51)	Dr. A.J. Morris University of Kentucky Lexington KY, USA	pKLO.1
PKC $\epsilon$	Dr.C. Larson Lund University, Malmö, Sweden	pEGFP
PKC $\epsilon$ -KD	Dr.C. Larson Lund University, Malmö, Sweden	pEGFP
LPP3	Dr. A.J. Morris University of Kentucky Lexington KY, USA	pEGFP
LPP3-S203T	Mutagenesis dirigida de la construcción LPP3	pEGFP

## MÉTODOS

### 4.- Líneas y cultivos celulares

Líneas celulares	Especie	Medio Cultivo
293T	Humana	DMEM
COS-1/COS-7	Mono	DMEM
*HeLa GST-Flag-PKD-KD (K618N)	Humana	DMEM
HeLa YFP- Galactosiltransferasa (YFP-GalT)	Humana	DMEM
HeLa-S (cultivadas en suspensión)	Humana	RPMI 1640
NRK	Rata	DMEM
Swiss3T3	Ratón	DMEM
Vero	Mono	DMEM

\* Donado por V. Malhotra, Centro de Regulación Genómica (CRG), Barcelona.

Las células COS, Vero, Swiss 3T3, NRK, 293T, HeLa y las HeLa que constitutivamente expresan YFP-GalT o GST-Flag-PKD-KD crecieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % (volumen/volumen) inactivado. Tanto el DMEM como el FBS proceden de la casa comercial GIBCO / Invitrogen (Paisley, UK). Las células HeLa-S crecieron en medio RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Germany) suplementado con FBS al 7,5 %. Las células Swiss 3T3 infectadas con los lentivirus que contienen el shRNA (short hairpin RNA) contra la LPP3 se seleccionaron con puromicina (3 µg/ml). Todos los medios llevaban antibióticos [penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml)], piruvato sódico (100 mM) y L-glutamina (200 mM). Las células crecieron a 37 °C en atmósfera saturada de agua y 5 % de CO<sub>2</sub>.

## 5. -Técnicas morfológicas

### 5.1.- Inmunocitoquímica y microscopía de epifluorescencia

La inmunofluorescencia indirecta se realizó en células con un grado de confluencia de entre el 50-70 % sobre cubreobjetos de vidrio estériles. Teniendo en cuenta el tipo de experimento que se quería realizar, se hicieron diferentes tipos de fijación y/o permeabilización:

#### 5.1.1.- Permeabilización con Saponina

La fijación se realizó con paraformaldehído al 4 % (en PBS) durante 15 min. A continuación, las células se lavaron con PBS y se bloquearon los grupos aldehídos con una solución 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (en PBS) durante 15 min. Después, se permeabilizaron durante 10 minutos con saponina (0.1 %) disuelta en PBS que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1 % (solución de bloqueo). Los anticuerpos primarios se diluyeron en la solución de bloqueo y las células se incubaron 1 hora a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C. Seguidamente, se lavaron con PBS (3 x 5 min) y después se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo durante 45-60 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron con PBS (3 x 5 min) y los cubreobjetos se montaron en Mowiol.

#### 5.1.2.- Permeabilización con Estreptolisina-O

Este tipo de permeabilización se utilizó para vaciar la mayoría del citosol y facilitar la visualización de la proteína CtBP3/BARS en el Golgi. Para ello, las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio estériles tratados con poli-D-lisina (1 mg/ml). Estos cubreobjetos se prepararon sumergiéndolos durante 60 min en polilisina y posteriormente se lavaron con abundante agua estéril. Después, se dejaron secar completamente a 37 °C para poder sembrar las células. En el momento de la permeabilización, se preparó la solución de trabajo [2 U/ml; disuelta en la solución A (20 mM HEPES ~ pH 7.2, 100 mM acetato potásico, 2 mM acetato magnésico, 1 mM DTT)] a partir de la solución stock (25 U/ml, disuelta en la solución A) y se incubó la mezcla a 37 °C durante 5 min para activar la estreptolisina-O (SLO). A continuación, se lavaron las células con la solución A (fría) y después se incubaron con la SLO activa durante 20 minutos en hielo. Después, se lavaron con la solución A (fría) y seguidamente con la solución B (25 mM HEPES ~ pH 7.2, 75 mM acetato potásico, 2.5 mM acetato magnésico, 5 mM EGTA; 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ ) también en frío. Luego se incubaron con la solución B durante 5 min a 37 °C.



Finalmente se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se procesaron para inmunofluorescencia (ver subapartado 5.1.1).

### 5.1.3.- Fijación y permeabilización celular con metanol

Este método conjunto de fijación y permeabilización se utilizó para visualizar bien el citoesqueleto de microtúbulos. Se realizó incubando las células durante 5 min en metanol frío (-20°C). Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se procesaron para inmunofluorescencia (ver subapartado 5.1.1).

Las preparaciones se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 y las imágenes se captaron con una cámara digital Olympus CCD (Lake Success, NY). Para los estudios de cuantificación y colocación se utilizó un microscopio confocal Leica TCS-NT (Heerbrugg, Switzerland) o un microscopio Leica TCS-SL (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Alemania). El procesamiento y análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando los programas Adobe PhotoShop CS (Adobe Systems, SanJose,CA) e Image J 1.33 (NIH, Bethesda, MD).

## 5.2.- Análisis cuantitativo de las imágenes

La cuantificación de las estructuras citoplasmáticas puntiformes que contienen el receptor de KDEL se realizó con la ayuda del programa de análisis de imagen Image J. 1.33 (NIH, Bethesda, MD). Previamente se fijaron una serie de parámetros para poder comparar las imágenes entre sí. Para ello, las imágenes se tomaron en escala de grises a 8-bit y se eligieron aquellas células que no tenían la fluorescencia saturada. Para eliminar el ruido de fondo, se cambió la escala de fluorescencia real (0-255) por otra en la que el valor mínimo de intensidad era "90" en lugar de ser "0" (90-255). De esta manera, el programa consideró 0 la fluorescencia comprendida entre 0-90. Por cada célula analizada se definió como Golgi aquellas estructuras que tenían un tamaño mayor de 600 píxeles mientras que las estructuras con un tamaño menor de 600 píxeles se consideraron estructuras citoplasmáticas puntiformes (es decir, aquellos ITs que viajan entre el RE y el Golgi). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el análisis ANOVA y el test de Bonferroni utilizando el programa Graphpad Prism 3.0. (Graphpad Software, San Diego, CA).

## 5.3.- Microscopía confocal *in vivo*

Los experimentos de microscopía a tiempo real (*time-lapse*) se llevaron a cabo utilizando un sistema confocal láser espectral denominado Leica TCS-SL (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Alemania). Este sistema está equipado con un

microscopio invertido Leica DMIRE2, láseres de Argón y Helio-Neón y una pequeña cámara para mantener las condiciones de temperatura y CO<sub>2</sub>.

Para la visualización de la GFP (*green fluorescence protein*) o la YFP (*yellow fluorescence protein*) se usó el láser con la línea de excitación a 488 nm y un rango de detección de emisión entre 500-600 nm. La secuencia de imágenes se grabó en el mismo plano y a la misma profundidad cada 10-15 s durante 20-30 min (dependiendo del tipo de experimento). Las imágenes se captaron utilizando un objetivo NA 0.8 de aceite inmersión Zeiss Plan-Neofluor x63 y con el *pinhole* a 150 (correspondiente a una profundidad de  $\sim 22 \mu\text{m}$ ). El tamaño de las imágenes que se obtuvo era de 2024 x 2024.

Los diferentes agentes farmacológicos utilizados en los experimentos se añadieron al medio a distintos tiempos. Por ejemplo, el PMA se añadió a las células justo después de la primera foto o *frame*, y las imágenes se tomaron cada 15 s. Después del *frame* 41 se añadió el DOG o el PDBu al medio que contenía el PMA. Los experimentos en el que las células se trataron sólo con propranolol o sólo con DOG también se añadieron después del primer *frame*. En el caso de las células tratadas con DOG más propranolol, primero se preincubaron con el DOG durante 15 min y pasado este tiempo comenzó la grabación. Justo después del primer *frame* se añadió el propranolol (las imágenes se tomaron cada 15 s). En los experimentos del desensamblaje del Golgi, los distintos tratamientos se añadieron después del primer *frame* pero en este caso las imágenes se grabaron cada 10 s.

El procesamiento de las imágenes, la cuantificación de la fluorescencia y el montaje de los videos se realizaron con los programas de procesamiento y análisis de imagen Image Processing Leica Confocal (Leica Microsystems Heidelberg, Manheim, Alemania) e Image J 1.33 (NIH, Bethesda, MD).

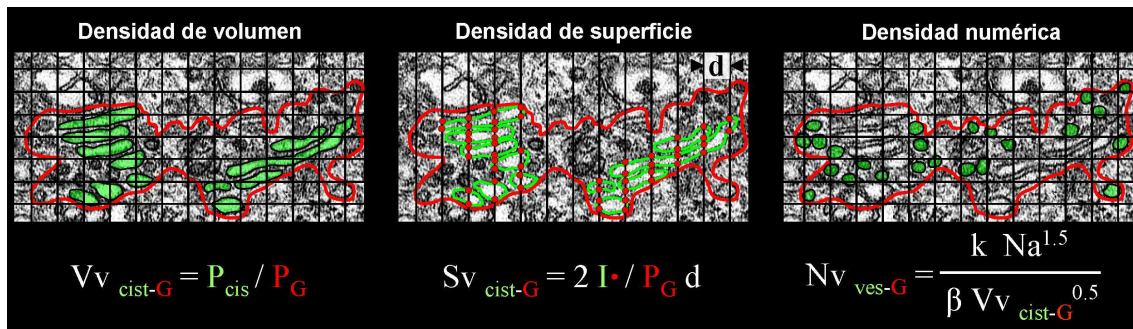
En la cuantificación de los resultados de los experimentos se restó el ruido de fondo a todos los valores obtenidos, los cuales posteriormente se corrigieron y normalizaron. Para cada registro de fluorescencia, se calculó la fluorescencia en el área del Golgi (F Golgi) utilizando la ecuación descrita a continuación:  $F \text{ Golgi} = (\text{ROI Total}_{\text{máx}}) / (\text{ROI Total}_t) * (\text{ROI Golgi}_t) / (\text{ROI Golgi}_{\text{máx}})$ . Se definió como ROI a la región de interés (Region Of Interest) donde ROI Total<sub>máx</sub> es la intensidad máxima registrada en el área de la célula, ROI Total<sub>t</sub> es la intensidad en cada registro del área de la célula, ROI Golgi<sub>t</sub> es la intensidad en cada registro del área del Golgi y ROI Golgi<sub>máx</sub> es la intensidad máxima registrada en el área del Golgi. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el análisis ANOVA y el test de Bonferroni utilizando el programa Graphpad Prism 3.0. (Graphpad Software, San Diego, CA).

#### 5.4.- Microscopía electrónica de transmisión

Las células NRK, Vero o Swiss 3T3 sembradas al 80% de confluencia se procesaron para MET. Tras un lavado rápido con tampón PIPES precalentado a 37 °C (0.1 M, pH 7.4) las células se fijaron con 1.25 % glutaraldehído en tampón PIPES que contiene sacarosa (2 %) y  $Mg_2SO_4$  (2 mM) durante 60 min a 37 °C. Seguidamente las células se lavaron con tampón PIPES (3 x 5 min) y se levantaron suavemente de la placa de cultivo con la ayuda de un raspador o *scraper*. A continuación, se centrifugaron a 100 g durante 5 min. Posteriormente, las células se postfijaron en 1 %  $OsO_4$ , 1 %  $K_3Fe(CN)_6$  en tampón PIPES durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se lavaron con PIPES (3 x 5 min) y se incubaron con 0.1 % ácido tánico en tampón PIPES durante 5 min para aumentar su contraste. Tras varios lavados con PIPES (3 x 5 min), las células se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol (80 %, 90 %, 95 % y 3 x 100%) y finalmente se incluyeron en resina Epon EMBed-812 polimerizando a 60 °C durante 48 h. Las secciones ultrafinas (40-60 nm) se contrastaron con acetato de uranilo (30 min) y citrato de plomo (10 min). La observación de las secciones ultrafinas se realizó en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 operando a 80-90 kV equipado con una cámara digital modelo Gatan BioScan 792. Para la captación digital de las imágenes se utilizó el programa DigitalMicrograph 3.11.0 (Gatan, Inc., Pleasanton, CA, USA)

#### 5.5.- Análisis estereológico

El estudio estereológico se realizó manualmente mediante la técnica de recuento de puntos con una plantilla cuadrículada superpuesta aleatoriamente sobre las micrografías obtenidas en el microscopio electrónico a 50000 y 60000 aumentos. El tamaño mínimo de la muestra para el análisis estereológico se determinó mediante la técnica de la media progresiva (con límite de confianza del 95 %). Los parámetros estereológicos analizados son la densidad el volumen de las cisternas respecto al volumen del *stack* analizado ( $Vv_{cist-G}$ ), la densidad de superficie de las cisternas respecto a la superficie del *stack* analizado ( $Sv_{cist-G}$ ) y la densidad numérica de perfiles túbulovesiculares peri-Golgi ( $Nv_{ves-G}$ ). El cálculo de estos parámetros se representa en la siguiente figura:



En el cálculo de la  $Vv_{cist-G}$ ,  $P_{cis}$  corresponde a los puntos de la cuadrícula encontrados el interior de las cisternas y  $P_G$  a los puntos de la cuadrícula encontrados el interior del área delimitada como *stack* del Golgi. En el cálculo de la  $Sv_{cist-G}$ ,  $I \cdot$  corresponde al número de intersecciones de las membranas de las cisternas del *stack* del Golgi con la plantilla y  $d$ , en  $\mu m$ , es la distancia entre líneas respecto a la estructura analizada calculada como la distancia correspondiente a la cuadrícula entre el número de aumentos de la micrografía. En el cálculo de la  $Nv_{ves-G}$ ,  $k$  es una constante con valor 1.5 y  $\beta$  es una constante de forma que en el caso de una esfera corresponde a 1.328.  $Na$  es el área del *stack* del Golgi analizado calculándose como  $P_G$  por la distancia  $d^2$ . Por último  $Vv_{ves-G}$  corresponde a los puntos de la cuadrícula encontrados el interior de los perfiles túbulovesiculares entre  $P_G$ . Los valores obtenidos para los distintos parámetros se analizaron estadísticamente mediante análisis t-test para muestras independientes con el programa estadístico SPSS 12.0. (Chicago, USA).

### 5.6.- Tomografía electrónica y reconstrucción tridimensional

Las células NRK se fijaron con la mezcla 2 % glutaraldehído - 1 % formaldehído en 0.1 M tampón cacodilato (pH  $\sim$  7.4) y procesadas según el procedimiento descrito para MET. Las secciones seriadas de 250 nm se recogieron en rejillas de cobre de ojal recubiertas con una película de butvar en las que previamente se evaporó carbono para darle estabilidad frente al haz de electrones. Las secciones se incubaron con oro coloidal de 10 nm que sirve para el enfoque y el alineamiento de la muestra durante la toma de imágenes. Se realizaron dos series ortogonales de imágenes a distintos ángulos de inclinación o *tilt series* con un microscopio electrónico Tecnai20 (FEI/Philips, Eindhoven, Holanda) operando a 200 kV equipado con una cámara TemCAM F214 (TVIPS, GMBH, Alemania) y un goniómetro motorizado. Las imágenes se tomaron desde  $-65^\circ$  a  $+65^\circ$  con incrementos de  $1^\circ$ . Mediante el programa IMOD 3.5.5. (Colorado, USA) se realizó la construcción de sendos tomogramas ortogonales a partir de la proyección inversa o *backprojection* de las series obtenidas a distintos ángulos y finalmente se realizó

el modelado manual tridimensional de los *stacks* del Golgi a partir de la fusión de sendos tomogramas.

## 6.- Técnicas bioquímicas y de biología molecular

### 6.1.-Fraccionamiento celular

Las fracciones de membrana P16 y las fracciones solubles S16 procedentes de células Vero control o tratadas con propanolol (60  $\mu\text{M}$ ) se prepararon siguiendo una versión modificada del protocolo establecido en la ref.<sup>270</sup>. Las células se cultivaron en una placa de 500  $\text{cm}^2$  de superficie (Triflask) en DMEM completo hasta alcanzar una confluencia del 90 % ( $2 \times 10^7$  células). A continuación, se tripsinizaron y se centrifugaron a 1000 *rpm* durante 5 min para recoger las células. Seguidamente, se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de tampón de homogenización frío (20 mM HEPES, pH  $\sim$  7.5, 320 mM sacarosa, 2 mM EDTA e inhibidores de proteasas) y se pasaron 30 veces por una aguja de 21G acoplada a una jeringa de 5 ml. Posteriormente, se hizo una primera centrifugación de 1000 *g* durante 20 min y después otra a 16000 *g* durante otros 20 min más. El *pellet* corresponde a la fracción P16 (se resuspende en 50-100  $\mu\text{l}$  de tampón de homogenización) y el sobrenadante a la fracción S16. La concentración de proteína se determinó mediante el método Lowry.

### 6.2.- Aislamiento de las membranas de Golgi de células en cultivo

Las membranas de Golgi procedentes de las células HeLa-S se prepararon a 4 °C siguiendo una versión modificada del protocolo establecido en la ref.<sup>271</sup>. Para obtener el lisado celular, las células se cultivaron en suspensión en 1 L de medio RPMI hasta llegar a las  $5 \times 10^8$  células. A continuación, se trataron con propanolol (60  $\mu\text{M}$ ) o U73122 (6  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, se centrifugaron a 500 *g* durante 10 min y se lavaron 2 veces con PBS (10 minutos a 500 *g*) y otras 2 con tampón de homogenización (250 mM sacarosa en 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 min a 1500 *g*). El *pellet* celular se resuspendió en el tampón de homogenización en un volumen 4 veces superior al del *pellet*. Después, las células se rompieron mecánicamente con un dispositivo denominado homogenizador de bolas (*Ball-Balch homogenizer device*). Para hacer el gradiente discontinuo se añadió sacarosa al 67 % (10 mM Tris-HCl, pH  $\sim$  7.4) al lisado celular obtenido hasta conseguir una concentración final del 37 % sacarosa. Seguidamente, se añadió 12 ml de esta solución en un tubo SW28, después 15 ml sacarosa al 35 % y finalmente 9 ml de sacarosa al 29 %. Los gradientes se centrifugaron a 25000 *rpm* durante 2.5 h. Tras la centrifugación, se recogió entre 2-3 ml de la banda que queda en la interfase 29-

35 % (corresponde a las fracciones enriquecidas de membranas de Golgi). Por último, las membranas se alicuotaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La concentración de proteína se determinó mediante el método Lowry y estaba entre 0,1- 0,3 mg/ml (por cada gradiente).

### 6.3.- Cuantificación de los niveles de diacilglicerol

Para determinar el contenido de diacilglicerol en las membranas de Golgi procedentes de células Vero control o tratadas con propanolol ( $60\ \mu\text{M}$ ; 15 min) o U73122 ( $6\ \mu\text{M}$ ; 15 min) y en las membranas totales celulares procedentes de células Swiss 3T3 control o infectadas con el shRNA LPP3 se siguió una versión modificada del protocolo establecido en la ref.<sup>272</sup>. La extracción lipídica se llevó a cabo con cloroformo/metanol/HCl (100:200:1)<sup>273</sup> en tubos de cristal. El cloroformo que contiene los extractos de membranas de Golgi, de membranas totales o las muestras de la curva patrón [1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicerol (30-500 pmol)] se evaporó cuidadosamente bajo un flujo de nitrógeno. Los lípidos secos se solubilizaron en 7.5 % octil- $\beta$ -D-glucósido, 5 mM cardiolipina y 1 mM DETAPAC mediante sonicación en el baño (50-60 Hz) durante 30 segundos, seguida de una incubación de 10 min a temperatura ambiente. A esta solución lipídica, se le añadió el tampón imidazol/HCl (100 mM, pH  $\sim$  6.6; que contiene 100 mM NaCl, 25 mM  $\text{MgCl}_2$  y 2 mM EGTA), 20 mM DTT (1 mM DETAPAC, pH  $\sim$  7.0) y 10  $\mu\text{l}$  de la solución diacilglicerol quinasa (0.25 mg/mL) (tampón imidazol/HCl, 20 mM, pH  $\sim$  6.6, que contiene 2 mM DETAPAC). La reacción comenzó cuando se le añadió 10  $\mu\text{l}$  del tampón imidazol/HCl (100 mM pH  $\sim$  6.6, que contiene 1 mM DETAPAC, 10 mM ATP y 0.6  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (Amersham, 3 Ci/mmol, 2 mCi/mL) y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Las reacciones se pararon con 0.6 ml de cloroformo/metanol/HCl (100:200:1 por volumen) seguido de la adición 0.25 ml de agua y 0.25 ml de cloroformo para separar las dos fases. La fase inferior (cloroformo) se lavó con metanol saturado con cloroformo/agua (1:1), se evaporó con nitrógeno, y se disolvió en 20  $\mu\text{l}$  de cloroformo/metanol (4:1). Después se separaron en placas de sílica gel 60 TLC usando cloroformo/metanol/ácido acético/agua (100:60:16:8; v/v/v/v) y se dejaron secar al aire. El [ $^{32}\text{P}$ ] ácido fosfatídico se cuantificó usando el PhosphorImager (Molecular Dynamics, Inc) y el programa NIH Image.

### 6.4.- Transfecciones con ADN plasmídico

Para las transfecciones se utilizaron los plásmidos C1b-PKC $\theta$ -GFP, ArfGAP1-GFP, el mutante termosensible ts045 VSV-G-GFP, PKC $\epsilon$ -GFP, el mutante inactivo PKC $\epsilon$ -KD-GFP, LPP3-GFP y el mutante inactivo LPP3-S203T-GFP aislados con

columnas comerciales de Sigma. La concentración y pureza se determinaron con un espectrofotómetro midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm.

El método de transfección utilizado para las células COS, HeLa y Vero fue el reactivo comercial Effectene (Quiagen, USA). Las células se sembraron el día anterior a la transfección entre el 60-80 % de confluencia en cubreobjetos estériles. La transfección se realizó siguiendo el protocolo adjunto con el producto. Consiste en dos pasos, en el primer paso se mezcló el *enhancer* con el ADN (en las proporciones indicadas) y se incubó durante 2-5 min a temperatura ambiente. En el segundo paso se añadió el reactivo *effectene* a la mezcla y se incubó durante 5-10 min para que se formen los complejos entre el lípido y el ADN. Mientras tanto, las células se lavaron con PBS y se les añadió el volumen de medio fresco indicado. A continuación se añadió medio de cultivo a los complejos (ADN y effectene) y esta mezcla se añadió directamente a las células. Los experimentos se realizaron entre las 12-16 h después de la transfección y tras 1 h de tratamiento con cicloheximida (100 µg/ml).

El método de transfección utilizado para las Swiss3T3 fue el kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA). Las células se sembraron al 60-80% de confluencia y crecieron en un medio sin antibiótico. Aproximadamente 1 h antes de la transfección, se lavaron las células con PBS y se cambió el medio sin antibiótico por medio opti-MEM. La mezcla final de la transfección se preparó en dos mezclas iniciales (solución A y solución B). Para preparar la solución A se añadió el ADN en el opti-MEM (según las proporciones indicadas). Paralelamente, la solución B se preparó añadiendo la Lipofectamina en opti-MEM (según las proporciones indicadas). Tanto la solución A como la B se incubaron por separado durante 7 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron y se incubó durante 20 min. Finalmente se añadió la mezcla a las células que contienen el opti-MEM. Al cabo de 6h, se cambió el medio de transfección por DMEM completo con antibióticos. Después de 14-16 h, se procesaron para inmunofluorescencia (Ver subapartado 5.1.1)

### **6.5.- Producción e infección lentiviral**

Para inhibir específicamente la expresión de las LPP3 en las células Swiss 3T3 se empleó el sistema lentiviral, que consiste en introducir dentro de las células una secuencia de ARN complementaria al RNA codificante para la proteína de interés usando los lentivirus como vector de internalización y expresión.

Para llevar a cabo esta técnica, se necesitaron los plásmidos lentivirales que codifican el ARN de interferencia contra la LPP3. Las secuencias de 21 nucleótidos del ARN de

interferencia que estaban clonadas en los plásmidos lentivirales pKLO.1 se especifican en la siguiente tabla:

RNA interferencia contra LPP3 (ShRNA LPP3)	Secuencias
TCR51	5'-CCTGATTTTCAGTCAGATCAAT-3'
TCR49	5'-CGGGTATCTGACTACAAGCAT-3'

El protocolo constó de dos pasos: primero las células empaquetadoras 293T se transfectaron con 3 vectores lentivirales para obtener los lentivirus shRNA LPP3 y después las células Swiss 3T3 se infectaron para silenciar la expresión de la LPP3.

#### 6.4.1.- Producción de los shRNA LPP3 lentivirus

La transfección de las células empaquetadoras 293T para generar los lentivirus se realizó siguiendo el manual de instrucciones de la Lipofectamina 2000 (Invitrogen). La mezcla final de la transfección se preparó en dos mezclas iniciales (solución A y solución B). La solución A consistió en añadir los vectores lentivirales pMD2.G (vector con los genes de la cápside), pPAX (vector con los genes de la envuelta) y el vector con el shRNA LPP3 en 1.5 ml de opti-MEM en el orden citado. La cantidad de ADN corresponde a 4.5 µg, 9 µg y 13.5 µg, respectivamente. La solución B se preparó añadiendo 60µl de Lipofectamina en 1.5 ml de opti-MEM. Tanto la solución A como la B se incubaron por separado durante 7 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron y se incubó durante 20 min. Mientras tanto las células 293T, que habían sido previamente sembradas en placas p100 con DMEM sin antibiótico a una confluencia del 80-90%, se lavaron con PBS y se añadió 6ml opti-MEM. Finalmente se añadió la mezcla al medio. Al cabo de 6h, se cambió el medio de transfección y se añadió 10 ml de DMEM completo sin antibióticos. Después de 48 h, se recogió el medio que contiene los lentivirus, se filtró cuidadosamente con un filtro de 45 µm, se alicuotó y se guardó a -80 °C.

#### 6.4.2.- Infección de las células Swiss 3T3 con los lentivirus producidos.

Una vez obtenidos los lentivirus shRNA LPP3, se procedió a infectar las Swiss 3T3. Para ello, se sembraron  $6 \times 10^5$  de células en una p100 y se infectaron con 5 ml de DMEM con los lentivirus (el volumen final fue 10ml). Después de 24 h, se cambió el medio por DMEM completo fresco que contenía puromicina (3 µg/ml). Los experimentos se realizaron a partir de las 96 h después de la infección (post-



infection). Como control negativo de los efectos de la infección se utilizaron lentivirus que no contienen el shRNA LPP3 sino la envuelta y la cápside y lentivirus con una secuencia que no interfiere con la expresión de la LPP3 (*non-silencing sequence*),

### 6.6.- Extractos celulares y western blotting

Los extractos celulares se obtuvieron a partir de  $5 \times 10^5$  de células Swiss 3T3 control y silenciadas con los lentivirus shRNA LPP3. Una vez tripsinizadas se centrifugaron y el *pellet* se incubó en hielo durante 10 min en 50  $\mu$ l tampón de lisis Tris-ID NP40 (pH  $\sim$  7.5) (50 mM Tris; 150 mM NaCl; NP40 1 %; azida 0.02 %). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 500 *g* durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante se cuantificó por el método de Lowry. Luego se añadió el buffer de carga y se hirvió durante 5 min. Para la electroforesis, 20  $\mu$ g de proteínas se cargaron en un gel al 7.5 % de acrilamida (*SDS-PAGE*). A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y, por último, se realizó la inmunodetección mediante la técnica de *western blotting*. Primero, estas membranas se bloquearon con una solución de TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH  $\sim$  7.5, 0.05 % Tween-20) que contiene 5 % de leche en polvo libre de grasas. Una vez bloqueadas, se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Al día siguiente, tras varios lavados en TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario. Para visualizar el reconocimiento del antígeno se utilizó el ECL (Enhanced Chemiluminescence Luminol, Santa Cruz) y la reacción se reveló mediante la exposición sobre una película fotográfica dentro de un *cassette* protegido de la luz.

### 6.7.- Mutagénesis dirigida

El mutante inactivo de la LPP3-GFP se generó mediante PCR usando el kit QuickChange (Stratagene) y siguiendo el manual de instrucciones. Los oligos utilizados para cambiar la serina del residuo 203 por una treonina eran de Invitrogen y se describen a continuación:

oligos	Secuencia
S203T	5'- ggccatgcctcctcaccatgtacactatgc -3'
Antisense S203	5'- gcatagtgtacatggtgaaggagcatggcc -3'

La nueva construcción generada se secuenció para comprobar que se había producido la mutación S203T en la construcción silvestre. El oligo de secuenciación (5'- ttcagccagatcaactgctc -3') proceden de la casa comercial Invitrogen.

## **7.- Ensayos de flujo de membrana y transporte intracelular**

### **7.1.- Uso de la brefeldina A como herramienta para estudiar el flujo retrógrado y anterógrado de membrana.**

La BFA es una herramienta muy útil para estudiar el flujo retrógrado de membrana en la zona RE/Golgi. Por un lado, la BFA inhibe el transporte anterógrado. Por otro, inhibe la activación de la GTPasa Arf1 impidiendo que se puedan generar las vesículas COPI (Ver apartado II). Esto desencadena un flujo de membrana unidireccional del Golgi al RE mediante túbulos, lo que finalmente comporta la fusión de las membranas del Golgi con el RE y también la redistribución completa de las proteínas residentes en el Golgi. Un bloqueo o retraso en el efecto de desensamblaje del Golgi inducido por la BFA representa una alteración en el flujo retrógrado y sugiere también una perturbación en el transporte retrógrado de proteínas COPI dependiente. Por otro lado, aprovechando el efecto de la BFA sobre la redistribución del Golgi al RE, se puede estudiar el flujo anterógrado. Al eliminar la BFA del medio, se restablece el transporte anterógrado así como la activación de Arf1, provocando la reconstitución del Golgi.

### **7.2.- Ensayos de transporte con el virus de la estomatitis vesicular**

Para los experimentos de transporte del ts045 VSV-G-GFP, las células se incubaron durante 2 h a 40 °C (temperatura restrictiva) para acumular la glicoproteína G del virus en el RE. Posteriormente, se añadió cicloheximida (100 µg/mL) en el medio, para inhibir la síntesis proteica y se incubaron 2 horas más a 40 °C. Finalmente, las células se incubaron a 32 °C (temperatura permisiva) para inducir el transporte de la proteína VSV-G del RE a la membrana plasmática pasando por el Golgi. Las células se fijaron a distintos tiempos de transporte (15 min, 30 min, 1 h) con paraformaldehído 4 % y se procesaron para inmunofluorescencia (Ver subapartado 5.1.1).

### **7.3.- Ensayos de transporte con la Toxina Shiga**

En los experimentos de transporte de la STx se utilizó el fragmento B de la toxina que contiene una secuencia KDEL (STx-B-KDEL) para provoca su retención en RE al llegar a este compartimento. Además, la STx-B-KDEL está marcada con el fluorocromo Cy3 (STx-B-KDEL-Cy3) permitiendo su visualización a través del microscopio de fluorescencia<sup>274</sup>. En los ensayos de transporte de la STx, las células se lavaron con PBS y se incubaron con DMEM sin FBS durante 30 min a 37 °C. A continuación, se añadió la STx-B-KDEL-Cy3 y las células se incubaron 30 min a 4

°C. Tras este tiempo, se eliminó la Stx no unida a la membrana plasmática lavando con DMEM al 10 % de suero. Después, las células se incubaron a 19,5 °C durante 1 h con el fin de acumular la toxina internalizada en el compartimento endosomal<sup>275</sup>. Una vez sincronizada la STx en los endosomas, las células se incubaron a 37 °C para inducir su transporte al Golgi para alcanzar finalmente el RE. Las células se fijaron a distintos tiempos de transporte (2, 4, 6 h) con paraformaldehído 4 % y se procesaron para inmunofluorescencia (Ver subapartado 5.1.1).