

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

Introducción

I. TRÁFICO INTRACELULAR DE MEMBRANAS

1.-RUTAS O VÍAS DE TRÁFICO INTRACELULAR

La célula eucariota ha desarrollado a lo largo de la evolución compartimentos intracelulares que organizan y optimizan su metabolismo. Esta compartimentación va acompañada de la aparición de rutas de transporte que permiten la entrada y la salida de moléculas necesarias para mantener la integridad y la función celular. Estas vías de transporte se encargan de llevar el *cargo* (conjunto de moléculas a transportar que pueden ser (glico) proteínas, (glico) lípidos y sustancias inorgánicas) de un compartimento a otro. El transporte se realiza a través de intermediarios de transporte (ITs) que tienen forma vesicular o túbulovesicular. Los ITs se mueven mediante proteínas motoras utilizando los elementos del citoesqueleto como soporte estructural para su desplazamiento. Las distintas vías de transporte intracelular se pueden clasificar siguiendo un criterio funcional (Fig. 1).

1.1.- La ruta endocítica y de reciclaje

La **ruta endocítica** es la vía por la que componentes solubles y de membrana son incorporados dentro de la célula. El *cargo* se internaliza a los endosomas tempranos, donde son destinados hacia los endosomas tardíos y los lisosomas, la red trans-Golgi (TGN) o bien hacia los endosomas de reciclaje¹ (Fig.1). Existen dos mecanismos básicos de endocitosis según el tamaño y la naturaleza del material que se va a internalizar: la fagocitosis y la pinocitosis². La fagocitosis es un tipo especializado de endocitosis que utiliza la célula para internalizar grandes partículas. Este mecanismo es característico de las células del sistema inmune como los macrófagos y las células dendríticas, las cuales endocitan patógenos como bacterias, virus y cuerpos extraños, desencadenando respuestas inmunes contra ellos. La pinocitosis es una vía por la que se internalizan macromoléculas y fluidos y se distinguen tres mecanismos: la macropinocitosis, la endocitosis clatrina- o caveolina-dependiente y la endocitosis clatrina o caveolina-independiente. En la macropinocitosis tiene lugar la formación de protusiones de membrana que se colapsan y fusionan con la membrana plasmática endocitando el elemento exógeno. La endocitosis clatrina-dependiente ocurre constitutivamente en las células de mamífero y es crucial para la comunicación intercelular durante el desarrollo de tejidos y órganos³ así como para la homeostasis celular. Los ITs que median este proceso son vesículas recubiertas por trisqueliones de clatrina que se ensamblan para deformar la membrana durante la incorporación del ligando-

receptor⁴. La endocitosis mediada por clatrina está implicada en la incorporación de

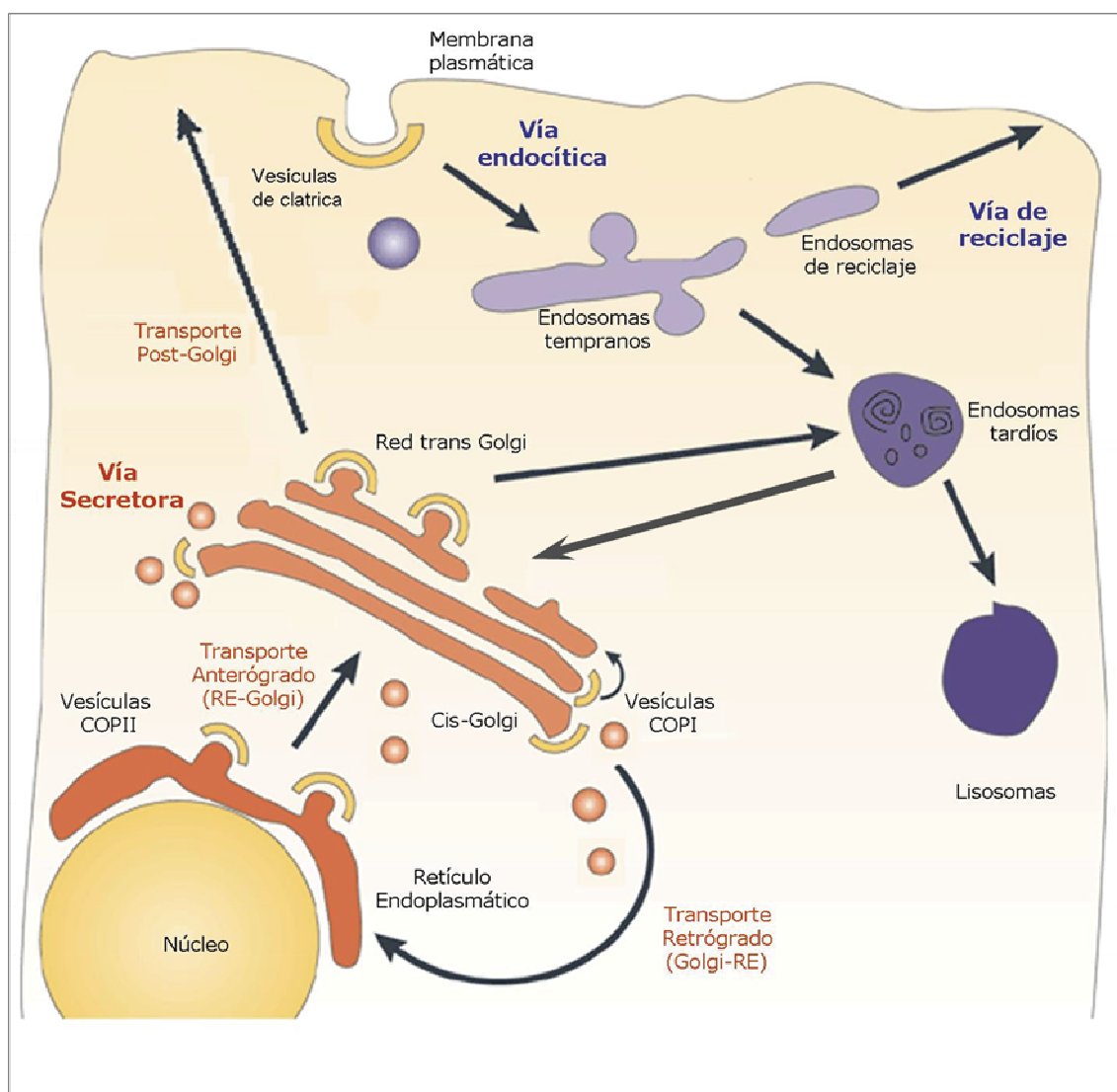


Figura 1: Esquema general de las principales vías del tráfico intracelular. En la vía secretora, el cargo recién sintetizado en el RE se transporta al Golgi. Una vez alcanzado la TGN se transporta a la membrana plasmática o al sistema endo/lisosomal. En la vía endocítica, el cargo se internaliza en la membrana plasmática hacia los compartimentos endosomales y continúa su transporte hacia el Golgi o los lisosomas. La vía de reciclaje devuelve parte del cargo endocitado desde los endosomas de reciclaje hacia la superficie celular (Modificado de la ref ⁵)

nutrientes esenciales como las lipoproteínas de baja densidad y la transferrina en un proceso mediado por receptores específicos de estas sustancias⁶. La endocitosis caveola-dependiente está mediada por las caveolas que son estructuras de membrana plasmática con forma de botella enriquecidas en la proteína caveolina. Estas estructuras se asocian a la internalización de glicoesfingolípidos, colesterol y ciertas proteínas con afinidad a formar microdominios de membrana⁷. A parte de las caveolas, existen otros tipos de microdominios en la membrana plasmática como es el caso de las balsas lipídicas o *lipids rafts*. Las balsas lipídicas contienen

colesterol y esfingolípidos con una organización y dinámica diferente al resto de la membrana enriquecida en glicerofosfolípidos⁸. Su composición lipídica proporciona las bases físicas para la internalización de proteínas y/o glicolípidos^{9;10}. Así, a nivel de las balsas lipídicas tiene lugar la internalización de moléculas de forma clatrina- o caveolina-independiente como el receptor de la interleuquina-2 en linfocitos. Además, es donde se concentran gran cantidad de moléculas implicadas en la señalización intracelular.

La **ruta de reciclaje** es la vía seguida por ciertas moléculas que tras su endocitosis son seleccionadas y devueltas a la membrana plasmática (Fig.1). Por ejemplo, el receptor de la transferrina, una vez endocitado, se separa de su *cargo* (transferrina) y vuelve a la membrana plasmática pasando por los endosomas de reciclaje para reutilizarse¹¹.

Aunque todos estos mecanismos de endocitosis aparentemente son distintos podrían compartir, en parte, las maquinarias moleculares. En realidad, podrían representar el mismo mecanismo pero con diferentes niveles de regulación y complejidad¹².

1.2.- La ruta secretora o biosintética

La ruta secretora es la vía que sigue el *cargo* después de sintetizarse en el retículo endoplasmático (RE) para transportarse a su destino final (que incluye los compartimentos intracelulares, la membrana plasmática o el medio extracelular) (Fig.1).

Existen dos tipos de secreción dentro de la vía biosintética: la secreción constitutiva y la secreción regulada. La secreción constitutiva es un proceso de transporte continuo que utilizan todos los tipos celulares para liberar constantemente las proteínas y los lípidos recién sintetizados^{13;14}. Por el contrario, en la secreción regulada, el transporte final tiene lugar como respuesta a algún tipo de estímulo (iones de calcio, hormonas o factores de crecimiento)¹⁵. La secreción regulada sólo se da en determinados tipos celulares como, por ejemplo, neuronas y células (neuro) endocrinas. En este tipo de secreción, el *cargo* se almacena en vesículas especializadas o gránulos de secreción como es el caso de la insulina en las células del páncreas endocrino.

Recientemente, se ha descrito otro mecanismo de secreción denominado secreción no convencional que se caracteriza por utilizar una ruta independiente del transporte mediado por ITs y no pasa por el RE ni el complejo de Golgi (Golgi). Algunas proteínas extracelulares como el factor de crecimiento de fibroblastos o la interleuquina 1 β , una vez sintetizados no se translocan al interior del lumen del RE

sino que van directamente del citoplasma a la membrana plasmática para salir exterior celular¹⁶.

2.-EL COMPLEJO DE GOLGI

El Golgi tiene una morfología muy particular dentro de todos los orgánulos celulares. Localizado generalmente en la zona perinuclear, está formado por un número variable de cisternas apiladas y aplanadas. Su función principal es la de modificar proteínas y lípidos sintetizados en el RE (modificaciones post-traduccionales) y enviarlas a su destino final. El conocimiento de su estructura y función es crucial para entender cómo funciona la vía secretora.

2.1.- Estructura del complejo de Golgi

A nivel de microscopía óptica, usando técnicas de inmunofluorescencia, el Golgi aparece como una estructura única cuya morfología depende del tipo celular (Fig.2). Este orgánulo se localiza junto al centrosoma ya que interacciona con los microtúbulos (MTs) y proteínas asociadas a estos (MAPs)¹⁷. A nivel ultraestructural, utilizando técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) y tomografía electrónica, el Golgi aparece como un número variable de cisternas o *stacks* interconectados dinámicamente entre sí mediante un sistema túbulovesicular de membranas. Cada *stack* contiene varias cisternas apiladas en las que se distingue una región central aplanada y otra lateral dilatada¹⁸ (Fig.2). Debido a la complejidad funcional del Golgi, los *stacks* están polarizados tanto molecular como morfológicamente. Así se puede distinguir una cara *cis*- cuyas cisternas reciben el aporte del *cargo* procedente del RE, una cara *trans*- en la que tiene lugar la salida del *cargo* procesado y un conjunto de cisternas intermedias muy compactas que constituyen la parte *medial*- del Golgi. Además, el contenido de enzimas residentes del Golgi es heterogéneo en cada una de las cisternas. Adyacentes a las cisternas del Golgi existen unas redes de estructuras túbulovesiculares altamente dinámicas que actúan como una interfase entre el Golgi y otros compartimentos de la vía secretora. Así se describe una red *cis*-Golgi o *cis-Golgi network* (CGN) entre el RE y la cara *cis*-Golgi y una red *trans*-Golgi o *trans-Golgi network* (TGN) entre la cara *trans*-Golgi y la membrana plasmática o compartimentos endosomales.

2.2.- Funciones del complejo de Golgi

El Golgi actúa como una "estación central" en la vía secretora y su función principal es la de organizar gran parte del tráfico intracelular¹⁹. El Golgi recibe los *cargos* que vienen del RE y proporciona una compartimentación para las distintas

modificaciones post-traduccionales que estos sufren. Además, aporta la maquinaria molecular que, en parte, reconoce o determina el destino final del *cargo*. En este compartimento se producen numerosas modificaciones post-traduccionales de lípidos y proteínas (glicosilación, fosforilación, sulfatación y procesamiento proteolítico) sintetizados en el RE. Para ello, se transportan azúcares y nucleótidos desde el citoplasma al interior (lumen) de las cisternas del Golgi. La mayoría de proteínas son glicosiladas en el RE mediante la adición de oligosacáridos ramificados sobre residuos de ácido aspártico (*N*-glicosilación). Cuando las proteínas *N*-glicosiladas pasan a través de las cisternas del Golgi distintas enzimas (*O*-glicosilasas y *O*-glicosiltransferasas) modifican las cadenas de oligosacáridos

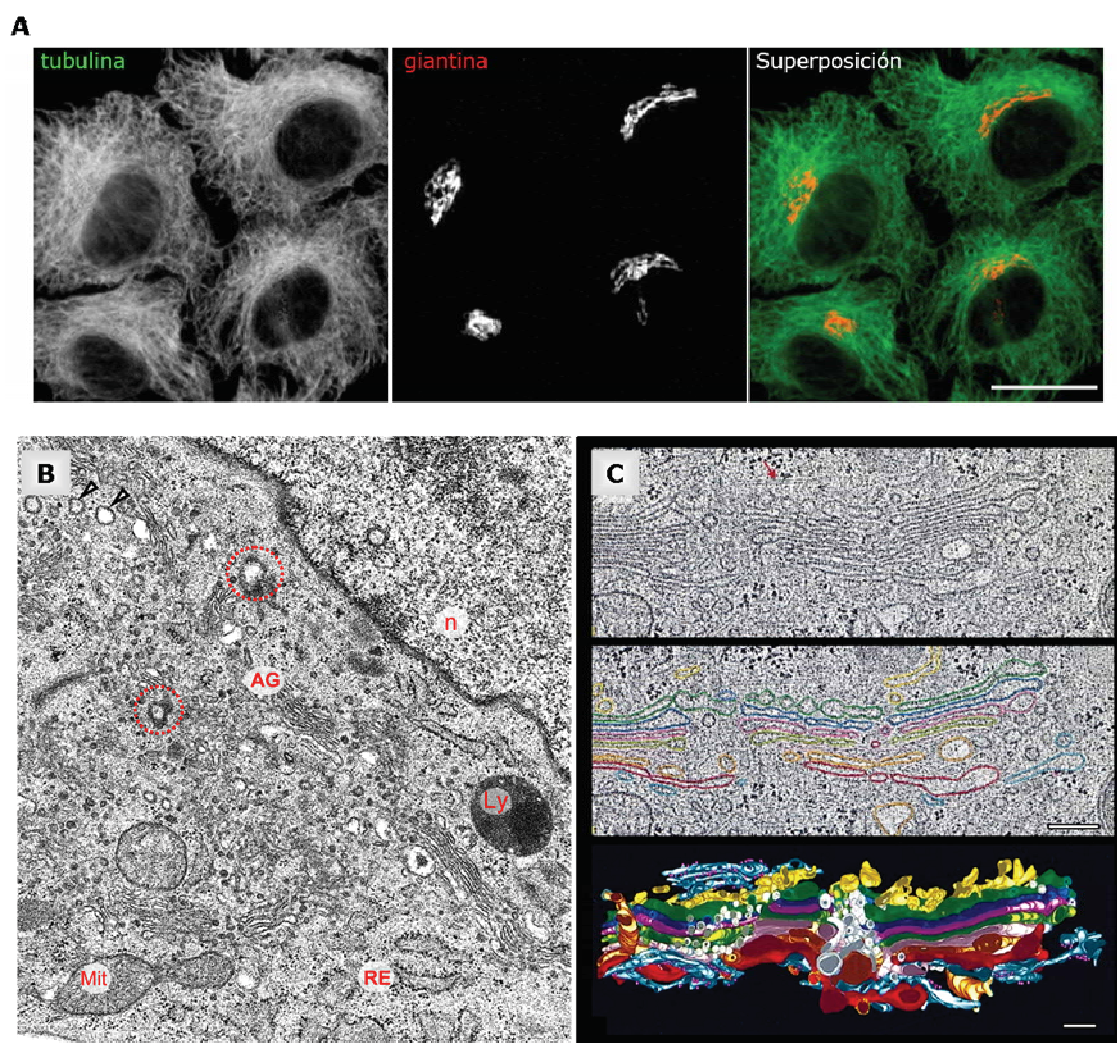


Figura 2: Localización y organización del Golgi en una célula NRK. A. Imágenes de microscopía óptica en las que se observan los microtúbulos (anti- β -tubulina) y el Golgi (anti-giantina). **B.** Micrografía electrónica en la que se muestra la distribución perinuclear del Golgi en la zona centrosomal donde se encuentra la pareja de los centriolos (círculos discontinuos). En las inmediaciones de las cisternas del Golgi e detectan perfiles vesiculares con cubierta de tipo COPI o clatrina. Núcleo (n), mitocondria (Mit), retículo endoplasmático (RE) y lisosoma (Ly). **C.** Tomografía electrónica / reconstrucción 3D en la que se representan las 7 cisternas del Golgi. Barras; 200 nm. (Modificado de las ref.^{20,21})

hasta alcanzar su maduración final (O-glicosilación). La correcta modificación de las proteínas es fundamental para seleccionar su destino final y funcionalidad. Por ejemplo, en algunos casos la proteína requiere un tipo concreto de residuo glucídico para ser destinada a un compartimento determinado. En este sentido, las enzimas lisosomales contienen manosa-6-fosfato terminal en sus cadenas de oligosacáridos, residuo que es reconocido por la maquinaria molecular de selección y transporte en el TGN para destinarlas a los lisosomas²². Otro ejemplo, es la proteína Glicosilfosfatidilinositol o GPI que necesita estar glicosilada para transportarse desde el TGN al dominio apical de la membrana²³. En otros casos las glicosilaciones son necesarias para estabilizar la conformación de la proteína. Sin embargo, las modificaciones no son exclusivas del *cargo* proteico, sino que también tienen lugar en los lípidos. Así, los glucoesfingolípidos se sintetizan en el Golgi tras añadir azúcares a la ceramida sintetizada en el RE. Algunos esfingolípidos (gangliósidos y cerebrósidos) son muy complejos con estructuras ramificadas²⁴. Los lípidos son necesarios para mantener la estabilidad de las membranas celulares. En el Golgi se sintetiza gran cantidad de carbohidratos, incluyendo la producción de glicosaminoglicanos (GAGs), largos polisacáridos que son anclados a las proteínas sintetizadas en el RE para dar lugar a los proteoglicanos que conforman la matriz extracelular. Por último, hay que destacar que el Golgi participa en el reciclaje de la membrana plasmática mediante la fusión de elementos vesiculares y/o túbulares generados y procedentes de sus cisternas.

3.- TRÁFICO DE MEMBRANAS ASOCIADO AL COMPLEJO DE GOLGI

El Golgi es un orgánulo altamente dinámico cuyos componentes moleculares se renuevan de manera constante. Este compartimento recibe continuamente "membrana" procedente del RE (vía secretora) y de los endosomas (vía endocítica) (Fig.1). Paralelamente, pierde "membrana" debido a la formación de ITs que se dirigen a la membrana plasmática y a otros orgánulos intracelulares. Por lo tanto, para mantener su estructura y, probablemente, su función es necesaria una regulación rigurosa de la entrada y salida de flujo de membrana para que el balance neto sea nulo. Hay que tener en cuenta que este equilibrio se adapta a las demandas requeridas en un momento determinado de la célula frente a estímulos diversos (proliferación, diferenciación, señalización, invasión de patógenos, etc). Alteraciones en el tráfico de membrana modifican la estructura del Golgi e impiden su correcto funcionamiento.

ETAPA TEMPRANA DE LA VÍA SECRETORA

3.1 Transporte entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi

El transporte de membranas entre el RE y el Golgi se caracteriza por ser un transporte bidireccional. Se denomina transporte anterógrado el flujo de membrana que va desde el RE al Golgi, mientras que el que tiene lugar en sentido contrario (del Golgi al RE) se conoce como transporte retrógrado (Fig.1).

Los ITs que conectan estos dos compartimentos son las vesículas COPI y las vesículas COPII. Las cubiertas o *coats* COPI y COPII difieren tanto en la composición molecular, la ubicación y la direccionalidad en el transporte. Así, las vesículas COPII sólo están implicadas en el transporte anterógrado^{25;26} mientras que las COPI participan en el retrógrado²⁷, aunque también se postula que participan en el transporte anterógrado²⁷ (Fig.3).

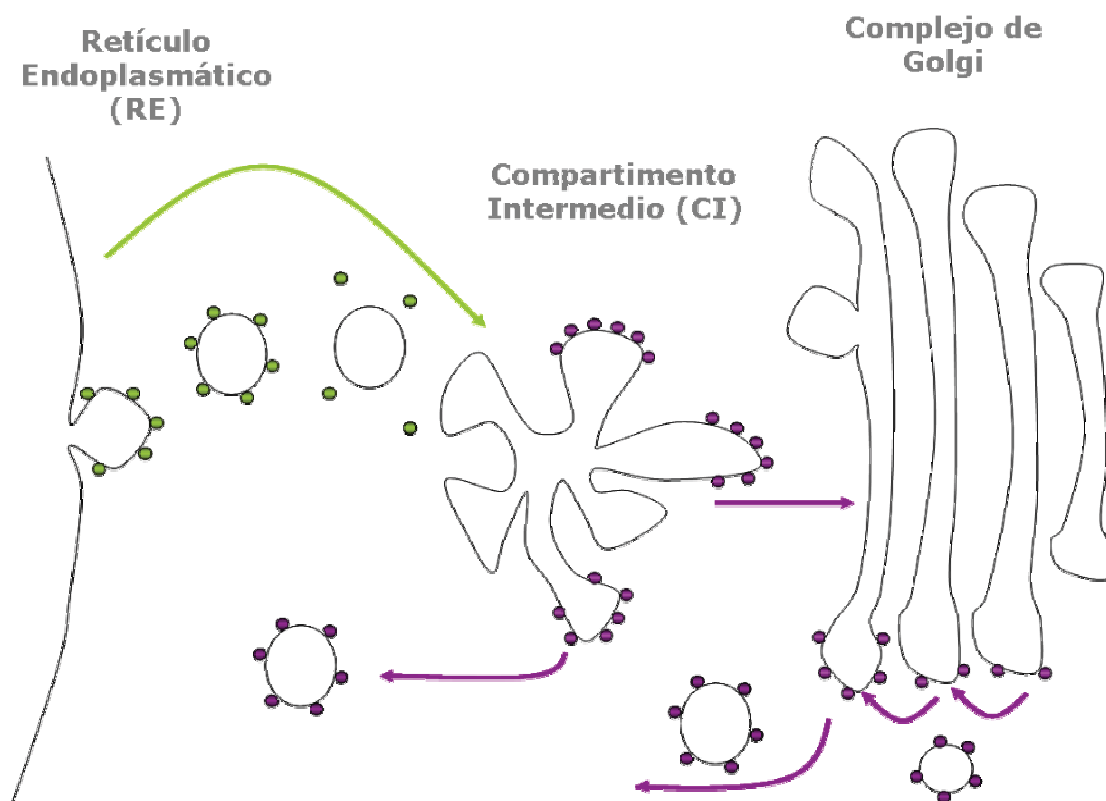


Figura 3: Transporte en la zona entre el RE y el Golgi. El transporte entre el RE y el Golgi ocurre en varios pasos. Las gemas nacientes formadas en el RE forman las vesículas COPII (flecha verde) y se dirigen al CI. Después, las proteínas se mueven del CI hacia el Golgi a través de las vesículas COPI o directamente por conexiones tubulares. Las proteínas residentes del RE tienen que regresar desde el CI o el Golgi a través de vesículas COPI (flecha morada). (•) COPI; (◐) COPII. (Modificado de la ref.²⁸)

a) Transporte anterógrado (del RE al Golgi)

A través del tráfico anterógrado, las proteínas y lípidos sintetizados en el RE entran en la vía secretora y se dirigen al Golgi para ser modificados. Las membranas del RE encaradas hacia el *cis*-Golgi tienen la particularidad de presentar unas zonas de su superficie desprovista de ribosomas denominada sitios de salida o *ER exit sites* (ERES)²⁹. Representan el lugar de exportación del *cargo* sintetizado que abandona el RE³⁰, por lo que de estas zonas emergen continuamente vesículas con cubierta COPII. Reciben este nombre porque para su formación requieren del ensamblaje de un complejo multiproteico llamado COPII o *coatamer protein II*, el cual está compuesto por las proteínas Sec23/24p, Sec13/31 y la GTPasa monomérica Sar1p^{5;31}. Los ERES son dominios de membrana donde se acumula el *cargo* destinado a la ruta secretora al interactuar específicamente con los componentes de la cubierta COPII³². Una vez se forma la gema o *bud* con cubierta COPII en la membrana del RE, ésta se separa de la membrana donadora dando lugar a una vesícula libre que desprende la cubierta inmediatamente después de su fisión.

Las vesículas tipo COPII generadas en el RE no viajan directamente al Golgi sino que se fusionan entre sí originando unas estructuras membranosas túbulovesiculares (*vesicular tubular clusters*; VTCs) entre el RE y el Golgi formando el compartimento intermedio o ERGIC (CI)^{33;34} (Fig.3). Existen dos hipótesis que explican el transporte desde el CI hasta el CGN/*cis*-Golgi³⁵ (Ver subapartado 3.2). La primera hipótesis sugiere que el *cargo* llega a la primera cisterna del Golgi desde CI a través de las vesículas COPI. La segunda hipótesis propone que se produce la fusión de los elementos membranosos del CI para generar la primera cisterna del Golgi. La fusión continuada de membrana de los ITs derivados del RE compensa la pérdida de membrana utilizada para el transporte post-Golgi (desde el Golgi a la membrana plasmática) y para el transporte retrógrado (desde el Golgi al RE) manteniendo así la integridad estructural y funcional del Golgi.

b) Transporte retrógrado (del Golgi al RE)

A través de la vía retrógrada, se devuelven proteínas residentes del RE (proteínas lumbales y de membrana)^{36;37} que se han escapado de este compartimento por la vía anterógrada³⁸. Además, se reciclan proteínas de membrana, como el receptor de KDEL (KDELr)³⁹ o proteínas residentes de Golgi, como las glicosiltransferasas⁴⁰⁻⁴³. Por último, se equilibra en parte la membrana consumida en el transporte anterógrado^{44;45}.

Existen dos subrutas del transporte retrógrado, la COPI-dependiente y la COPI-independiente, aunque parece ser que existen similitudes en los mecanismos

y maquinarias empleadas. Estas vías funcionan en paralelo para devolver proteínas residentes del RE y para ciclar proteínas y lípidos entre el RE y Golgi.

La vía dependiente de COPI acontece desde el CI, los diferentes compartimentos del Golgi o incluso desde el TGN y utiliza los ITs de tipo COPI. Reciben este nombre porque para su formación requieren del complejo proteico COPI o *coatamer protein I*, formado por 7 subunidades (α , β , β' , γ , σ , ϵ , ζ)⁴⁶. El modelo más aceptado propone que estas vesículas tienen como función acumular y seleccionar el *cargo* y transportarlo sólo de manera retrógrada^{47;48} aunque también se ha descrito que podrían estar implicadas en el transporte bidireccional entre los *stacks* de Golgi⁴⁹. Esta vía es la que utiliza el KDELr para devolver proteínas lumenales residentes del RE que han salido de este compartimento (junto con otras proteínas) siguiendo el flujo anterógrado. Hay que tener en cuenta que las proteínas residentes del RE deben "retenerse" en este compartimento pero que el sistema de retención no es 100% eficaz. Así pues, las proteínas que se "escapan" del RE acaban recuperándose en el Golgi. La mayoría de las proteínas solubles residentes del RE poseen una secuencia, denominada KDEL, en su extremo C-terminal³⁶. Esta secuencia es reconocida por el KDELr, una proteína transmembrana residente del Golgi y del ERGIC que cicla constantemente entre el RE y el Golgi⁵⁰. La unión del KDELr a una proteína que contenga la secuencia KDEL permite el transporte retrógrado del complejo proteína/receptor vía vesículas COPI. Una vez que el complejo receptor-proteína llega al RE, se disocia y el KDELr se relocaliza mayoritariamente al *cis*-Golgi. Cualquier deficiencia en el transporte entre el RE y el Golgi, se refleja en la redistribución del KDELr quedando retenido mayoritariamente en el RE o Golgi, en el caso de una alteración del transporte anterógrado o retrógrado, respectivamente. Este cambio de distribución intracelular del mismo se utiliza para detectar alteraciones en el transporte en la zona ER/Golgi. Existen otros mecanismos para recuperar proteínas residentes del RE. Es el caso de muchas proteínas transmembrana residentes del RE que contienen una secuencia de dilisinas KKXX en su extremo C-terminal citoplasmático. Esta secuencia interacciona con componentes de la cubierta COPI y actúa como una señal de recuperación que estimula el transporte retrógrado de la proteína que han escapado del RE y alcanzado el CI o el Golgi⁵¹.

Por otro lado, aunque el sistema COPI ha evolucionado como un mecanismo eficiente para recuperar proteínas que escapan del RE no parece ser el único que participa en el flujo retrógrado. Las primeras evidencias del transporte COPI-independiente surgieron tras identificar una GTPasa localizada en el Golgi denominada Rab6⁵². La sobreexpresión de Rab6 activada (Rab6-GTP) provocaba un flujo retrógrado con fenotipo similar al producido por la brefeldina A (BFA) (Ver en

el apartado II el mecanismo acción de la BFA). La existencia de varias rutas de transporte retrógrado se confirmó gracias al estudio del transporte de distintas toxinas bacterianas, como por ejemplo, la toxina Shiga (STx). Se ha descrito que en las células que se tratan con agentes para inhibir la vía COPI, no se altera el transporte de la STx desde el Golgi al RE. Además se ha visualizado que los ITs que contienen la STx colocalizan con Rab6. Se ha descrito que la sobreexpresión de mutantes constitutivamente inactivos de Rab6 (Rab6-GDP) retrasa el transporte de la STx y también de las enzimas de glicosilación al RE⁵³. Aunque el mecanismo por el cual Rab6 promueve el transporte retrógrado no se conoce bien, se han identificado proteínas que interaccionan con Rab6-GTP que podrían actuar como efectores. Por un lado, se ha visto que Rab6 interacciona con una proteína de la familia de las quinesinas llamada rabquinesina⁵⁴. El extremo C-terminal de esta proteína reconoce específicamente Rab6-GTP y la sobreexpresión de mutantes inactivos de la rabquinesina enlentecen el efecto sobre el tráfico de membrana inducido por Rab6-GTP. Esto indica que Rab6 utiliza este motor de MTs para mover los ITs en el mismo sentido de movimiento que la mayoría de las quinesinas del extremo (-) al extremo (+) de los MTs⁵⁵. Por otro lado, mediante estudios con sistemas de doble híbrido se aisló una proteína denominada Bicaudal-D que interacciona con Rab6⁵⁶. Tras su translocación a la membrana del Golgi, Bicaudal-D recluta el complejo motor dineína-dinactina, el cual se desplaza hacia el extremo (-) de los MTs.

3.2.- Transporte de membranas intra-Golgi

Una vez el *cargo* llega a la cara *cis* del Golgi, atraviesa las distintas cisternas en dirección vectorial *cis-trans* para modificarse antes de alcanzar el TGN. Existen varios modelos que intentan explicar como tiene lugar el transporte entre los diferentes compartimentos del Golgi³⁵.

El modelo de "transporte vesicular" considera que las cisternas del Golgi son estructuras estables donde el flujo de membrana tiene lugar mediante las vesículas COPI que contienen el *cargo* anterógrado. Las vesículas se desplazan lateralmente por los extremos de las cisternas o *lateral rims* y el *cargo* pasa secuencialmente a través de todas las cisternas desde la *cis-*, la *medial-* y la *trans-* hasta llegar al TGN. Por el contrario, el modelo de "maduración de cisternas" considera que las cisternas del Golgi son estructuras dinámicas. Según este modelo, la primera cisterna *cis-* se forma por la fusión de los ITs que generan los VTCs y, finalmente, éstas maduran en sentido *cis-trans*. Una vez la cisterna madura (conteniendo el *cargo* ya procesado) llega a la parte *trans*-Golgi donde se produce la segregación de los distintos *cargos*. Seguidamente, sufre cambios bioquímicos y morfológicos

para adquirir características del TGN. En este modelo, las vesículas tipo COPI sólo transportan el *cargo* en sentido retrógrado dirigiéndolo hacia la cisterna inferior adyacente para mantener las enzimas residentes en la cisterna apropiada y así preservar la identidad y la polaridad del Golgi. Se postula que el modelo de maduración de cisternas es importante para el transporte de ciertas proteínas o para la biogénesis del Golgi. Sin embargo, estudios recientes sugieren que es demasiado lento para el transporte anterógrado de la mayoría de las proteínas^{49;57}. Así que se propone un modelo "híbrido" basado en el modelo de maduración de cisternas en el que las vesículas COPI mediarían el transporte de *cargo* anterógrado y retrógrado^{27;49;58}. Existen evidencias de la participación de las vesículas COPI en el transporte anterógrado a lo largo de las cisternas de Golgi^{49;59;60}, incluso algunas poblaciones de vesículas COPI sólo contienen *cargo* anterógrado y no retrogrado²⁷. Por último, tras la observación de estructuras tubulares entre cisternas por MET se postula un nuevo modelo "de conexiones entre cisternas", en el cual no participarían los ITs de tipo COPI y propone que el *cargo* y las enzimas residentes del Golgi se moverían de forma anterógrada y retrógrada, respectivamente, mediante conexiones cortas de membranas que interconectarían las cisternas⁶¹⁻⁶³.

ETAPA TARDIA DE LA VÍA SECRETORA

3.3.- Transporte de membranas post-Golgi

Una vez que el *cargo* ha atravesado todos los compartimentos del Golgi, entra en contacto con el compartimento adyacente al Golgi conocido como el TGN. En esta red de membranas túbulovesiculares se producen sus últimas modificaciones post-traduccionales y, posteriormente, se introducen en ITs pleiomórficos para ser transportados a su destino final. En células polarizadas, las rutas de salida del TGN incluyen la membrana plasmática apical y basolateral, los endosomas tempranos, los endosomas tardíos y los endosomas de reciclaje. Existen varios mecanismos de selección que permiten a la maquinaria molecular distinguir la ruta que debe seguir un determinado *cargo*⁶⁴. En el caso de las proteínas con "destino basolateral" la señal está localizada en el dominio citoplasmático del *cargo* y consiste en secuencias de aminoácidos (aa) del tipo YXXO (donde Y es tirosina, X cualquier aa y O un aa hidrofóbico) o en secuencias de aa con motivos di-leucina DXXLL (donde D es el ácido aspártico y L es leucina). Estas señales son reconocidas por las proteínas de la cubierta o proteínas adaptadoras asociadas periféricamente a la cara citosólica de la membrana⁶⁵. En el caso de proteínas con "destino apical", la salida se facilita por interacciones de tipo lípido-lípido o lípido-proteína dentro de los dominios transmembrana o luminales, en las que participan los N- y O-

glicanos⁶⁶ o bien por interacciones con el dominio de anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI), que está asociado a las balsas lipídicas⁶⁷. Por tanto, muchas de las proteínas destinadas al dominio apical tienen una afinidad mayor a las zonas ricas en esfingolípidos y colesterol para ser transportadas separadamente del *cargo* con destino basolateral⁶⁸. Después de su selección, el *cargo* se retiene en unos dominios específicos de membrana del TGN que forman una estructura túbulovesicular, excluyendo proteínas residentes del Golgi y *cargos* con otro destino. A continuación, estos dominios son separados progresivamente del resto de la membrana del TGN, a través de los microtúbulos, generando estructuras tubularesvesiculares. Por último, se produce la fisión de los ITs derivados de la membrana del TGN y, posteriormente, se transporta a la membrana plasmática⁶⁴.

II. BIOGENESIS DE LAS VESÍCULAS COPI

1.- ETAPAS DE LA FORMACIÓN DE LAS VESÍCULAS COPI

Las vesículas COPI son los intermediarios de transporte que median el tráfico retrógrado de proteínas y lípidos. La cubierta COPI o coatómero se encarga de seleccionar y concentrar el *cargo* a través de la interacción directa o mediante un receptor. Además, es esencial para deformar la membrana y generar las gemas que darán lugar a las vesículas libres⁶⁹⁻⁷³. Para el proceso de formación de las vesículas COPI en las membranas del Golgi es necesario controlar espacial y temporalmente el reclutamiento del complejo citosólico COPI^{74;75}. En el modelo clásico, este proceso ocurre en tres etapas secuenciales^{76;77}: en primer lugar, se produce el reclutamiento de la GTPasa Arf1 a las membranas de Golgi. A continuación, se ensambla en bloque todo el complejo multiproteico COPI para deformar la membrana y originar las gemas nacientes y, finalmente, se produce la separación de las gemas para liberar las vesículas con cubierta COPI (Fig.4). El inicio del ensamblaje de la cubierta consiste en la activación de Arf1 regulada por la proteína Arf1GEF, que intercambia el Arf1-GDP por Arf1-GTP. El cambio nucleotídico induce un cambio conformacional en Arf1 que le permite exponer un ácido mirístico en su extremo N-terminal para anclarse en las membranas del Golgi⁷⁸. Una vez activada en la membrana, Arf1 induce el reclutamiento del complejo COPI preformado del citoplasma. El coatómero unido a Arf1 favorece la asociación de ArfGAP1, la proteína que activa la actividad GTPasa de la Arf1, con el complejo coatómero-Arf1. A continuación, el complejo coatómero-Arf1-ArfGAP1 polimeriza en la membrana formando la cubierta y concentrando el *cargo*. El coatómero deforma

la membrana en gemas y, finalmente, la vesícula se separará de la membrana. El desensamblaje del coatómero ocurre cuando la ArfGAP1 hidroliza el GTP de Arf1⁷⁹.

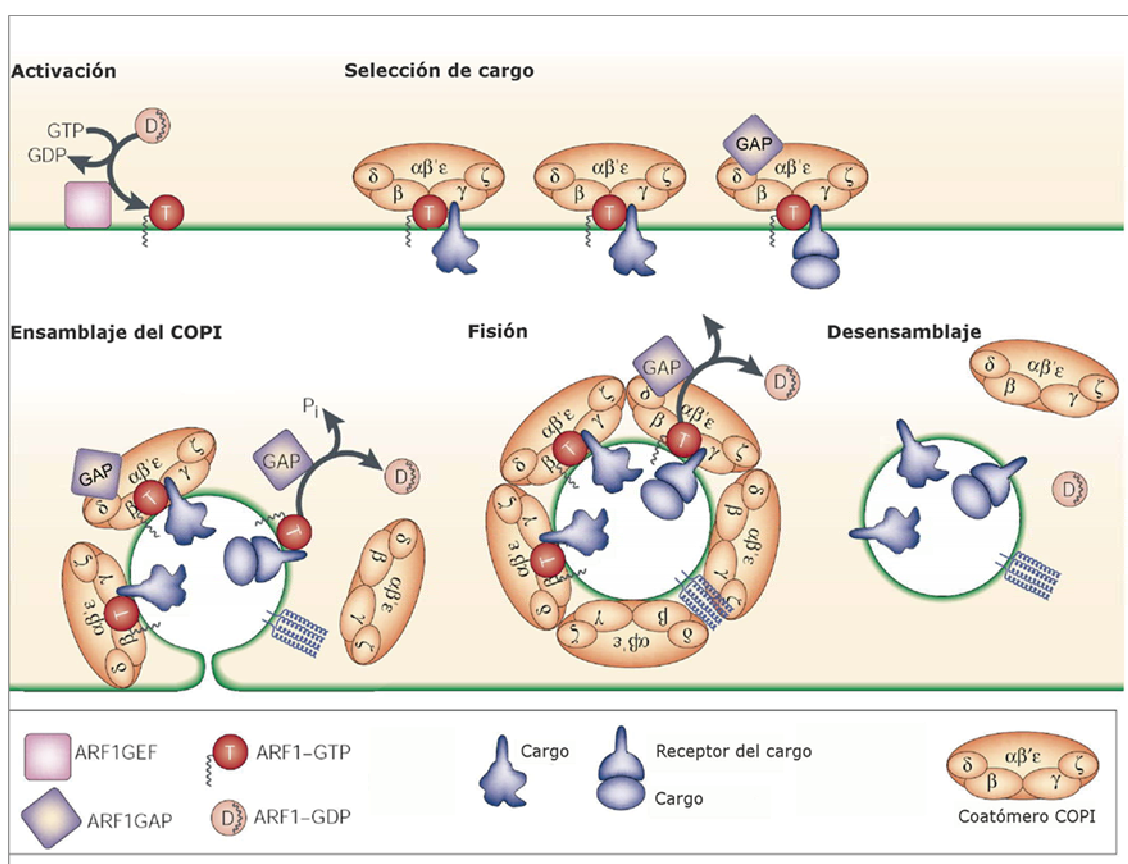


Figura 4: Etapas de la formación de las vesículas COPI. El ensamblaje del coatómero se activa por el reclutamiento de Arf1-GTP a las membranas. Seguidamente, Arf1 permite la unión del coatómero formando un complejo Arf1-COPI que favorece la unión de ArfGAP1 (Arf1-GTP/COPI/ArfGAP1). Al mismo tiempo que se recluta el cargo. Después se deforma la membrana para crear una gema naciente. Finalmente, el complejo multiproteico COPI se desensambla al inactivarse Arf1 (Arf1-GDP) y consecuentemente se libera la nueva vesícula. (Modificado de la ref.⁸⁰)

Arf1-GDP se libera de las membranas y vuelve al citoplasma^{81;82}, desencadenando la liberación del coatómero y ArfGAP1 de la vesícula. Todos los componentes quedan de nuevo libres para poder reutilizarse en el reensamblaje del COPI. El ciclo de activación / desactivación de Arf1 es muy sensible al metabolito fúngico BFA^{83;84} ya que inhibe la actividad de las proteínas Arf1-GEF. Como consecuencia, Arf1 queda permanentemente en un estado inactivo (Arf1-GDP) y no puede insertarse en la membrana del Golgi. Por tanto, el coatómero no puede asociarse a la membrana y las vesículas COPI no se forman. Consecuentemente, las membranas de Golgi forman largos túbulos y éstos acaban fusionándose completamente con las membranas del RE.

El modelo clásico sólo se basa en identificar los componentes proteicos de la maquinaria molecular que controla la formación de las vesículas COPI. Sin

embargo, estudios recientes demuestran que lípidos específicos de la membrana del Golgi también juegan un papel esencial en el transporte asociado a este compartimento⁸⁵⁻⁸⁷. Se ha descrito que estos lípidos regulan tanto la actividad de proteínas específicas como las propiedades biofísicas de la membrana, sugiriendo que el coatómero no es suficiente para inducir cambios dinámicos en la curvatura. Se propone que los cambios constantes que sufre la topología de la membrana están regulados por una estrecha cooperación entre proteínas y lípidos en determinados subdominios de la bicapa. De manera que se propone un modelo modificado del anterior^{88;89} en el que se establece un acoplamiento entre el coatómero y el remodelaje dinámico de los lípidos⁹⁰ para deformar la membrana.

2.- CONCEPTOS DE CURVATURA Y MECANISMOS DE DEFORMACIÓN DE MEMBRANA

Durante las diferentes etapas de la biogénesis de las vesículas COPI, la membrana adquiere diferentes tipos de curvatura que vienen determinados por las propiedades de la propia membrana. Se define como curvatura positiva aquella en

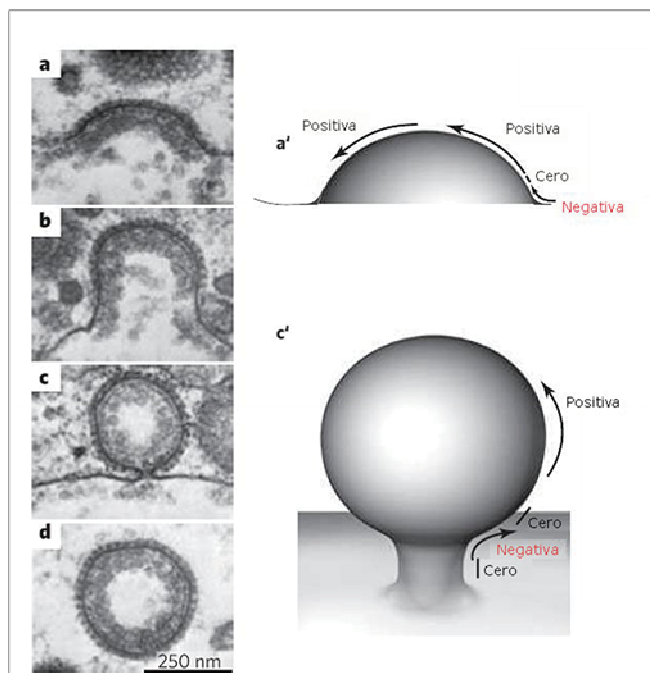


Figura 5: Curvaturas de membrana. Las diferentes etapas en la formación de vesículas con cubierta (**a-d**) muestran la progresión de la invaginación y las correspondientes curvaturas (**a'-c'**) de membrana. (Modificado de la ref.⁹⁰)

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 (Fig.5). 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 invaginada⁹⁰. Estos

tipos de curvatura se forman y disuelven constantemente por la interconexión entre lípidos y proteínas.

En la membrana existen unas zonas específicas o microdominios que son susceptibles a deformarse. En estos microdominios actúan principalmente dos mecanismos complementarios que facilitan la generación de curvatura positiva y/o negativa: las fuerzas extrínsecas y las intrínsecas. La curvatura generada por las fuerzas extrínsecas a la membrana está mediada por el citoesqueleto (Fig.6). 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. Se ha descrito que la deformación de la membrana para generar las vesículas COPI depende tanto de microtúbulos como de filamentos de actina. Experimentos *in vitro* demuestran que algunos motores de los microtúbulos, como la quinesina, se anclan en las membranas de Golgi para tirar de ella y generar túbulos sobre los MTs⁹¹. *In vivo* se sabe que los microtúbulos, posiblemente en cooperación con otros factores citosólicos, regula la dinámica de los túbulos en el Golgi después del tratamiento con BFA⁹². El citoesqueleto de actina proporciona un soporte estructural que facilita la deformación de la membrana en las porciones laterales bien a través de la polimerización de actina *de novo* o bien empleando la fuerza generada por los motores de actina (miosinas). Existen evidencias experimentales del acoplamiento funcional entre maquinaria de fisión y la polimerización de actina en el TGN⁹³⁻⁹⁸. Por otro lado, la curvatura generada por fuerzas intrínsecas a la membrana está mediada por proteínas y especialmente lípidos⁹⁹⁻¹⁰³(Fig.6). En cuanto a las proteínas, existen 3 mecanismos por el que las proteínas citosólicas reclutadas a la membrana inducen curvatura local en la bicapa. Uno de los mecanismos, ya descrito previamente, es la oligomerización de las proteínas del coatómero COPI que promueven la gemación por imponer la deformación de la membrana^{99;102}. Los otros dos mecanismos de deformación consisten en la inserción de una hélice anfipática en la bicapa o en la absorción de proteínas cóncavas. Se piensa que todos estos mecanismos no son excluyentes entre sí, sino que existe una interacción y cooperación entre ellos para asegurar la deformación. Hasta el momento, no hay evidencias de que este tipo de proteínas interaccionen con el coatómero, sólo con vesículas de clatrina. Sin embargo, teniendo en cuenta que es poco probable que el coatómero sea suficiente para doblar la membrana, se especula que exista una colaboración entre los diferentes tipos de proteínas para curvarla y así poder formar las vesículas COPI.

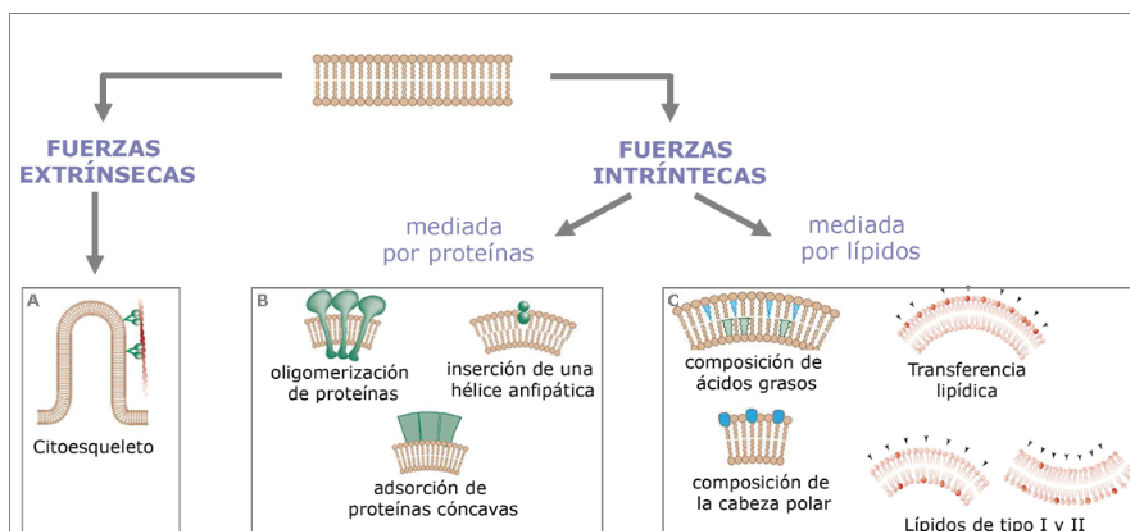


Figura 6: Mecanismos de deformación de la membrana. La bicapa lipídica puede deformarse y generar curvatura positiva y negativa mediante fuerzas extrínsecas e intrínsecas a la membrana. **A.** Cambios en la polimerización del citoesqueleto y proteínas motoras; **B.** Oligomerización de proteínas, inserción de la hélice anfipática en una de las hemimembranas y adsorción de proteínas cóncavas; **C.** Cambios en la composición lipídica y transferencia de lípidos entre las hemimembranas (Modificado de las refs.^{90;100})

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 comporta un cambio en la curvatura de la membrana. Además, se propone que la transferencia selectiva de un determinado lípido de una hemimembrana a la otra (*flip-flop*) (Fig.6) es un mecanismo que facilita la gemación¹⁰⁴. También se sabe que ciertas especies lipídicas favorecen la curvatura por sus propias propiedades fisicoquímicas. Por el ejemplo, la acumulación selectiva del diacilglicerol (DAG) o del ácido fosfatídico (PA) facilita la deformación de la membrana necesaria para generar los ITs en el TGN. Por último, cambios en la composición lipídica mediante la acción de enzimas que generan lípidos de tipo I o II (Ver apartado III) cuya geometría facilita la deformación de la membrana. 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 espacio-temporal de las proteínas que deforman la membrana (Ver apartado III).

Una vez que se ha formado la gema con cubierta COPI, ¿Cuál es el mecanismo que determina la separación del IT naciente de la membrana donadora (ERGIC o cisternas)? El mecanismo de fisión implica un contacto cercano entre los lípidos de la membrana y la fusión de las hemimembranas en áreas específicas donde la membrana se curva formando un cuello muy estrecho^{105;106} (Fig.7). Este proceso es energéticamente desfavorable para la célula¹⁰⁷ y no ocurre de manera

espontánea sino que se encuentra bajo un estricto control temporal y espacial de diversos factores (Fig.7). Así, se postula la siguiente secuencia: (1) La membrana lipídica con alta curvatura negativa se estrecha por el borde del coatómero, (2) la membrana se tensa gracias a la adhesión del coatómero y del citoesqueleto de actina y (3) la curvatura de membrana y las interacciones específicas del coatómero con los lípidos de membranas generan una composición lipídica particular en el cuello de la gema, convirtiéndose en la zona preferencial de ruptura debido a la tensión lineal. Además, existen proteínas que participan en la escisión de las vesículas COPI de la membrana donadora modificando la composición lipídica de las membranas o interaccionando con los lípidos de membrana para ser funcionales. La maquinaria de fisión de las vesículas COPI implica de manera más o menos consistente a las proteínas CtBP3/Bars, ArfGAP1, fosfolipasa D (PLD), proteína quinasa C (PKC) y proteína transferidora de fosfatidilcolina (PIPT)¹⁰⁶.

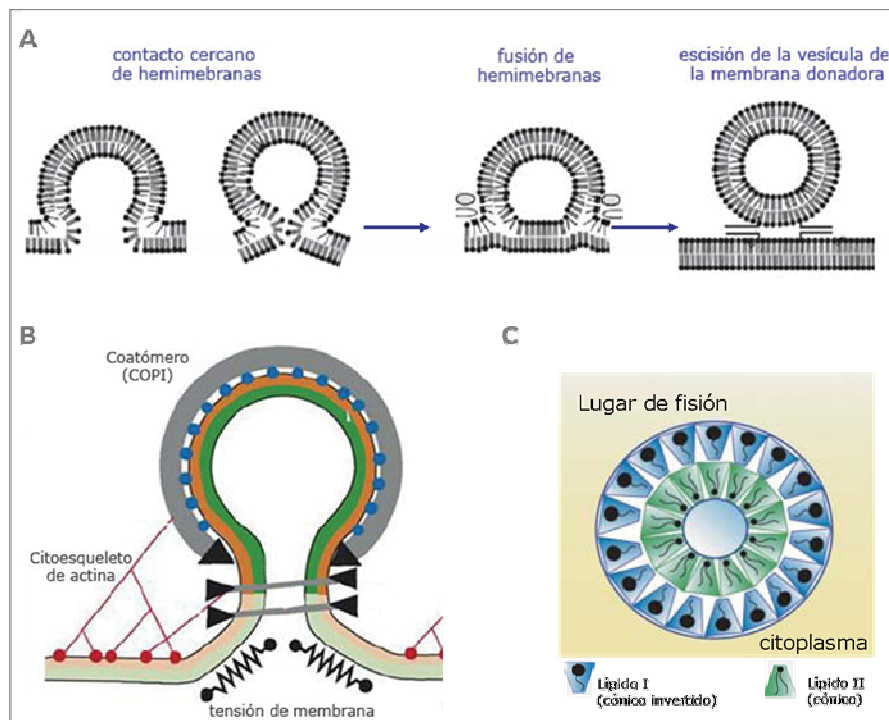


Figura 7: Factores que contribuyen a la fisión. **A.** Esquema del contacto que se produce entre las membranas durante la fisión de intermediarios de transporte en el Golgi. **B.** La membrana se estrecha por el borde del coatómero. Paralelamente, la membrana se tensa por la adhesión del coatómero y del citoesqueleto de actina. La curvatura de membrana y las interacciones específicas del coatómero con lípidos puede promover la selección de lípidos que determinan la unión de las hemimembranas del cuello de la vesícula. **C.** Sección transversal del lugar de fisión. En la geometría del lugar de fisión se observa que en la membrana interna (luminal) se encuentran lípidos cónicos y en la hemimembrana externa (citoplasmática) lípidos cónicos invertidos (Modificado de las refs ^{99;106})

3.-MAQUINARIA MOLECULAR IMPLICADA EN LA FISIÓN DE LAS VESÍCULAS COPI

3.1.- CtBP3/BARS

CtBP3/Bars es una proteína de 50 KDa que se localiza en el núcleo actuando como factor de transcripción y en el Golgi controlando el tráfico de membranas. Inicialmente se identificó como sustrato de la ribosilación del ADP dependiente de la BFA [BFA-dependent ADP-ribosylation substrate] durante la búsqueda de factores que controlan la tubulación de la membrana^{106;108}. Aunque la BFA bloquea Arf-GEF, este hecho no parece explicar completamente el mecanismo del desensamblaje tubular del Golgi. En una serie de estudios, se ha demostrado que CtBP3/Bars induce la formación de constricciones o fisión completa de los túbulos del Golgi *in vitro*^{109;110}. Además, experimentos *in vivo* implican a la CtBP3/Bars en el proceso de fisión en distintas rutas de transporte, incluyendo transporte post-Golgi basolateral, endocitosis de fase fluida y transporte retrógrado COPI-dependiente¹¹¹. Cuando CtBP3/Bars se inhibe con anticuerpos neutralizantes o mutantes inactivos¹¹², las gemas COPI se generan con normalidad pero no pueden separarse de las cisternas. Existen fuertes evidencias de que la actividad aciltransferasa no es necesaria para producir la fisión de las vesículas COPI¹¹¹ y se propone un mecanismo alternativo que estaría mediado por la unión de CtBP3/Bars a ArfGAP1. Además, CtBP3/Bars necesita interaccionar con acil-CoA para que se produzca la interacción de CtBP3/Bars con ArfGAP1 en el Golgi¹¹³. Se sugiere que la formación de un complejo que contiene CtBP3/Bars potencia o modifica la interacción de ArfGAP1 con la membrana, desestabilizando el cuello y consecuentemente la fisión de la nueva vesícula. Por tanto, CtBP3/Bars parece tener un papel crítico en la etapa de fisión en el proceso de formación de las vesículas COPI pero necesita de la interacción con ArfGAP1¹¹³.

3.2.- ArfGAP1

ArfGAP1 pertenece a la familia de proteínas con multidominios ArfGAPs. Inicialmente se identificaron como reguladores de las proteínas Arf. Sin embargo, ArfGAP tiene múltiples dominios que le hacen independiente de Arf para inducir cambios estructurales o transducir señales dentro de la célula¹¹⁴. Todos los miembros de la familia se caracterizan por tener el dominio catalítico GAP en el extremo N-terminal que se compone del dominio de unión a zinc ("zinc-finger motif") necesario para activar la hidrólisis del GTP de Arf1. ArfGAP1 fue la primera Arf1 GAP que se identificó en células de mamíferos y se implicó como regulador del tráfico intracelular. ArfGAP1 se asocia al Golgi¹¹⁵ y su sobreexpresión causa la pérdida de este compartimento. En el modelo propuesto al principio de los 90s⁷⁹, se

mostraba que la función principal de la ArfGAP1 era inducir la disociación de la cubierta COPI^{81;82} a través de la inactivación de Arf1^{79;116}. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la proteína ArfGAP1 no sólo se comporta como un regulador negativo de Arf1 sino que podría ser un componente del complejo COPI funcionando de manera similar al Sec23 en el transporte del ER al Golgi mediado por las vesículas COPII¹¹⁷. El reclutamiento de ArfGAP1 a las membranas de Golgi no depende de su interacción con Arf1 o con el coatómero¹¹⁸, sino que inicialmente podría estar regulada por la interacción directa con el *cargo* o con el receptor de éste^{119;120}. Una vez unido a la membrana interacciona con el coatómero^{121;122}. La formación de complejo Arf1-ArfGAP1-COPI sugiere que el coatómero sirve para localizar espacialmente ArfGAP1 en las membranas de Golgi ya que la actividad catalítica está asociada a Arf1 unida al coatómero¹²¹. Existen evidencias de que el coatómero ejerce un efecto estimulador sobre la actividad ArfGAP^{123;124}. Por otro lado, la activación de ArfGAP1 depende de los lípidos cónicos/cónicas invertidos y de la curvatura de membrana causada por en el ensamblaje del complejo Arf1-ArfGAP1-coatómero⁸¹. Esto se debe a que ArfGAP1 contiene en la región central dos dominios no catalíticos, denominados dominios ALPS (ArfGAP lipid-packing sensor; ALPS1 y ALPS2), que consisten en una hélice α anfipática de 40 aminoácidos rica en residuos de treonina y serina¹²⁵. Estos dominios ALPS contribuyen a la sensibilidad de ArfGAP1 con la composición lipídica de las membranas de Golgi, donde ALPS1 es el primer determinante de la interacción y el ALPS2 la refuerza¹²⁶. Una vez que el dominio ALPS reconoce las membranas altamente curvadas, se inserta directamente entre los lípidos de la bicapa y se une a ellos a través de interacciones hidrofóbicas¹²⁵. La inserción del dominio ALPS de ArfGAP1 puede servir de control de la orientación del dominio GAP hacia la Arf1-GTP unido a la membrana para permitir la hidrólisis del GTP. El dominio ALPS no reconoce los lípidos *per se* ni la geometría curva de la membrana sino el grado de empaquetamiento de ésta. Así pues, la activación de ArfGAP1 se produce al insertar el dominio ALPS en las zonas poco empaquetadas de las membranas de Golgi¹²⁷ quedando excluido del cuello de la vesícula ya que esta región se encuentra altamente empaquetada. Uno de los lípidos que facilitan una curvatura de membrana óptima para activar la ArfGAP1 es el DAG. Experimentos *in vitro* demuestran que el aumento de DAG monoinsaturado, que *in vivo* deriva de la acción secuencial de la PLD y la fosfatasa del ácido fosfatídico (PAP), induce la translocación del ArfGAP1 a la membrana y su activación permitiendo la hidrólisis de Arf1 y el desensamblaje del coatómero¹²⁸. Este efecto se debe a que la curvatura generada por esta especie molecular del DAG es la adecuada para que la ArfGAP1 pueda insertarse dentro de la membrana¹²⁸.

3.3.- Fosfolipasa D

Estudios iniciales de la función de la PLD asociada al tráfico de membranas sugirieron que la activación de PLD por Arf1 *in vitro*^{129;130} inducía la formación del coatómero. Posteriormente, otros trabajos confirmaron que la formación del PA (producto de la PLD) como consecuencia de la activación de la PLD estimulaba la secreción en células HL60 diferenciadas^{131;132}. Sin embargo, esta afirmación no se ha podido confirmar mediante experimentos de silenciamiento con ARN de interferencia (siRNA) frente a la PLD. Este resultado podría explicarse como una compensación funcional por parte de otras proteínas que han aumentado su expresión mientras disminuía la expresión de la PLD, limitando la interpretación de este resultado negativo. A pesar de la controversia que existe en cuanto a la localización de PLD en el Golgi, se especula que la presencia de la actividad PLD en este compartimento se ajusta a la participación del PA u otros lípidos derivados del PA como el DAG en el proceso de fisión de las vesículas COPI. Se ha descrito que el PA se empaqueta poco en la membrana plana y, por tanto, facilita la generación de curvatura negativa. La carga negativa del fosfato del PA puede eliminarse por la acción de la PAP que genera DAG. Consecuentemente, debido a la naturaleza neutra y al tamaño pequeño de la cabeza polar del DAG se estabilizan las áreas de curvatura negativa. A diferencia de las especies moleculares de DAG derivadas de la acción de la fosfolipasa C específica para fosfoinosítidos (PI-PLC) que tienen cadenas de ácidos grasos poliinsaturados, las que provienen de la PLD tienen cadenas saturadas o/y monoinsaturadas y se empaqueta mejor las membranas planas. Este hecho explica que dependiendo de las especies moleculares de DAG presentes en las membranas se produzcan diferentes grados de curvatura de membrana. Por lo tanto, teóricamente las proteínas que se unen a la membrana en respuesta a la curvatura inducida por el DAG prefieren que se produzca por una vía que por otra^{125;133}.

3.4.- Proteína quinasa C y Proteína quinasa D

Se ha demostrado *in vitro* que la actividad de la PKC está implicada en el proceso de fisión de los ITs en el Golgi¹³⁴⁻¹³⁶, pero el mecanismo es independiente de su actividad quinasa¹³⁵. La activación de la PKC induce fragmentación del Golgi mientras que su inhibición bloquea este efecto. Se propone que durante el ensamblaje del coatómero, la PKC se activa por DAG o por un análogo de éste (TPA; tetradecanoil forbol acetato) e interacciona directamente con la PLD, activándola por un mecanismo alostérico^{137;138}. Como consecuencia del remodelaje de los fosfolípidos el Golgi se fragmenta. Por tanto, según estas evidencias, las PKCs participan en este proceso regulando la actividad de ciertas proteínas que

modifican las propiedades biofísicas de las membranas. Sin embargo, también se ha descrito que algunas PKCs son capaces de activar, mediante fosforilación, otras PKCs como la PKC η (proteína quinasa D1; PKD1) que se localiza en el Golgi y que está implicada en la formación de ITs en el TGN^{139;140}. De manera que a través de la activación de la PLC mediada por receptor, se induce la formación de DAG y la activación de PKC ϵ o PKC η , que directa o indirectamente fosforilan y activan la proteína quinasa D (PKD)^{141;142}. La activación de la PKD con ilimaquinone induce fragmentación de Golgi mientras que la sobreexpresión del mutante inactivo de la kinasa de la PKD (PKD-K618N) causa tubulación en el TGN, confirmando que la PKD participa en la fisión de ITs en el TGN¹³⁹. PKD se une a DAG a través del dominio C1a y esta unión es necesaria para localizarse en el TGN^{143;144}.

Por tanto, los lípidos participan activamente en todas las etapas de formación de las vesículas tanto por el reclutamiento de proteínas a la membrana y por la regulación de su actividad así como por modificar la geometría y fluidez de la bicapa lipídica¹⁴⁵. La organización y composición lipídica en cuello de la vesícula es crucial para el proceso de fisión ya que la forma de las membranas también depende de su dinámica y plasticidad. La relativa abundancia de lípidos cónicos y cónicos invertidos facilita la curvatura positiva o negativa de la membrana dependiendo de su distribución dentro de la bicapa^{90;106}.

III. DINÁMICA Y COMPOSICIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES

1.- LÍPIDOS DE LAS BIOMEMBRANAS

1.1.- Clasificación, estructura y función

Los lípidos de membrana son moléculas anfipáticas que, en general, contienen una parte hidrofóbica (apolar) y otra hidrofílica (polar). Existen diferentes especies lipídicas en las biomembranas eucariotas debido a la gran variedad de cabezas polares y cadenas alifáticas. Aunque no está claro el motivo de esta diversidad parece ser que los lípidos no sólo actúan como barrera sino que tienen otras funciones adicionales¹⁴⁶. Por ejemplo, la interacción entre la cabeza polar de los lípidos con ciertas proteínas es crucial para el correcto ensamblaje, integración y/o translocación de dichas proteínas¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. También actúan como co-factores formando parte estructural del complejo proteico¹⁵⁰⁻¹⁵². Además, el empaquetamiento de los lípidos en la membrana puede afectar la actividad de algunas proteínas¹⁵³. Por otro lado, modifican las propiedades biofísicas de la

membrana como la fluidez y la curvatura¹⁵⁴. Por último, los lípidos actúan como segundos mensajeros dentro de las células^{155;156}. Estos lípidos señalizadores reclutan, activan y/o inactivan proteínas que regulan diferentes procesos celulares¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

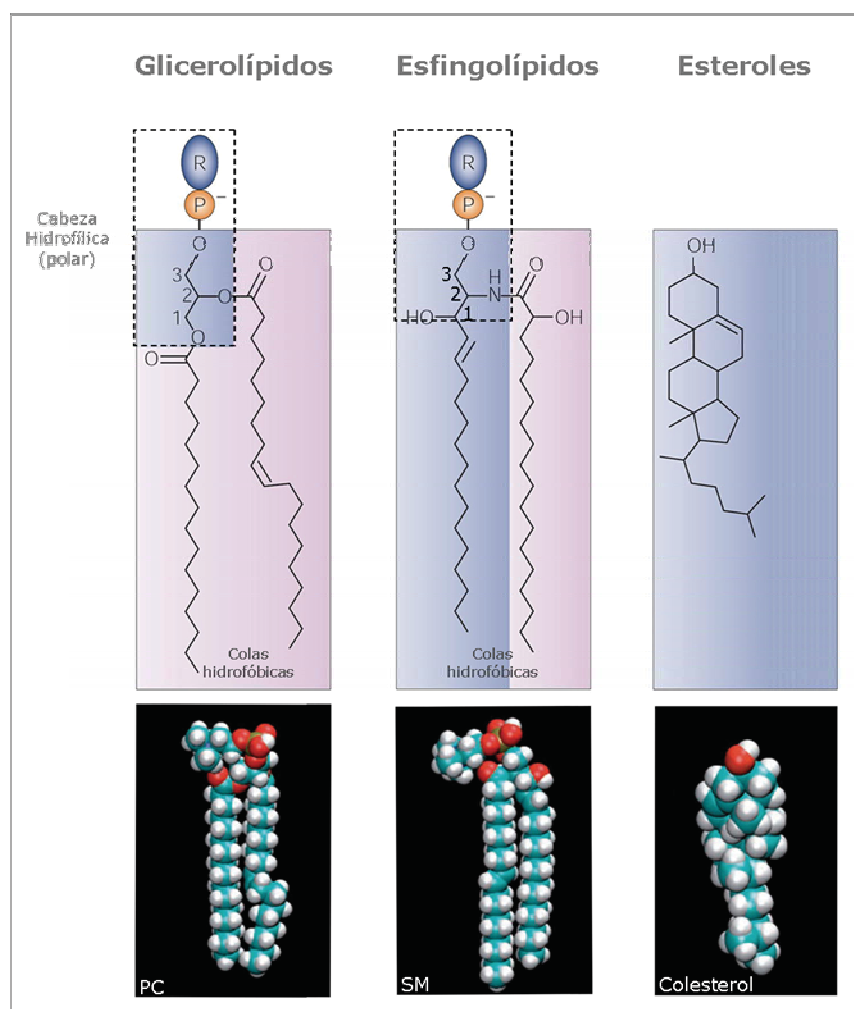


Figura 8: Clases de lípidos que se encuentran en las membranas celulares. Estructura de los glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides cuya molécula básica es el glicerol, la esfingosina y el anillo plano, respectivamente (sombreado de azul). La P representa el grupo fosfato y la R representa moléculas como la colina o el inositol. Las cadenas alifáticas están sombreadas de rosa. (Modificado de las refs.^{158;159})

Los lípidos de membrana pueden clasificarse en tres grupos: los glicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroides^{158;159} (Fig.8). Los glicerolípidos, cuya porción hidrofóbica es el DAG, pueden presentar uno o varios enlaces *cis* en las cadenas de ácidos grasos que están unidos al carbono *sn*-1 o *sn*-2 del glicerol. Además, a esta estructura básica se le puede unir un grupo fosfato en el carbono *sn*-3 del glicerol (formando PA) y a este fosfato una molécula (R) que puede ser neutra como la serina o el inositol [formando la fosfatidilserina (PS) o el

fosfatidilinositol (PI)] o de carga positiva como la colina o la etanolamina [formando la fosfatidilcolina (PC) o la fosfatidiletanolamina (PE)]. Los esfingolípidos, cuya porción hidrofóbica es la ceramida (Cer), presentan sólo una cadena saturada de ácido graso y también se le pueden unir un grupo fosfato y un grupo R (como la colina) para formar la esfingomielina (SM). A la Cer también se le puede unir grupos de azúcares para formar la glucosilceramida (GluCer) o la galactosilceramida (GalCer). Por último, los esteroides, cuya porción hidrofóbica es un anillo esteroide plano, y el más abundante es el colesterol. La hidrólisis de los fosfolípidos estructurales produce lípidos biológicamente activos como la lisofosfatidilcolina, el ácido lisofosfatídico (LPA), el PA y el DAG que derivan de los glicerolípidos y como la esfingosilfosforilcolina, la esfingosina, la esfingosina-1-fosfato (S1P), la ceramida-1-fosfato (C1P) y la Cer que derivan de los esfingolípidos.

1.2.- Metabolismo lipídico y localización subcelular

Es interesante destacar que los lípidos no se distribuyen de manera aleatoria entre los distintos orgánulos subcelulares ni tampoco entre las dos hemimembranas de la bicapa. Dentro de las células eucarióticas, la síntesis de lípidos está topográficamente restringida¹⁵⁹ y el primer determinante de la composición única de los orgánulos es el metabolismo lipídico local (Fig.9). El RE es el principal orgánulo biosintético de los lípidos y produce la mayor parte de fosfolípidos estructurales y colesterol, aunque este último es rápidamente transportado a otros orgánulos. También produce altos niveles de triglicéridos y de ésteres de colesterol, sintetiza la Cer (que es el precursor de los esfingolípidos) y genera otros lípidos menos abundantes como el DAG y PA. Las membranas del RE se caracterizan por estar poco empaquetadas facilitando la inserción y el transporte de lípidos y proteínas *de nova* síntesis. El Golgi es otro orgánulo en el que tiene lugar la síntesis de lípidos. En las células de mamíferos, el Golgi sintetiza principalmente los esfingolípidos complejos como la esfingomielina. La producción de esfingolípidos puede tener un papel importante en el proceso de selección de proteínas de membrana en los distintos a través de las balsas lipídicas. En este compartimento también se sintetiza la PE a través de la vía de la PS y se finaliza la síntesis de PC, aunque este paso también puede ocurrir en el RE. Por último, la membrana plasmática no está implicada en la síntesis de los lípidos estructurales, pero acoge muchas reacciones de síntesis y degradación de lípidos que participan en diferentes cascadas de señalización. Debido a que la membrana plasmática está enriquecida en esfingolípidos y esteroides, la bicapa presenta un nivel mayor de

empaquetamiento respecto a las enriquecidas en glicerolípidos y por tanto resisten al mejor el estrés mecánico.

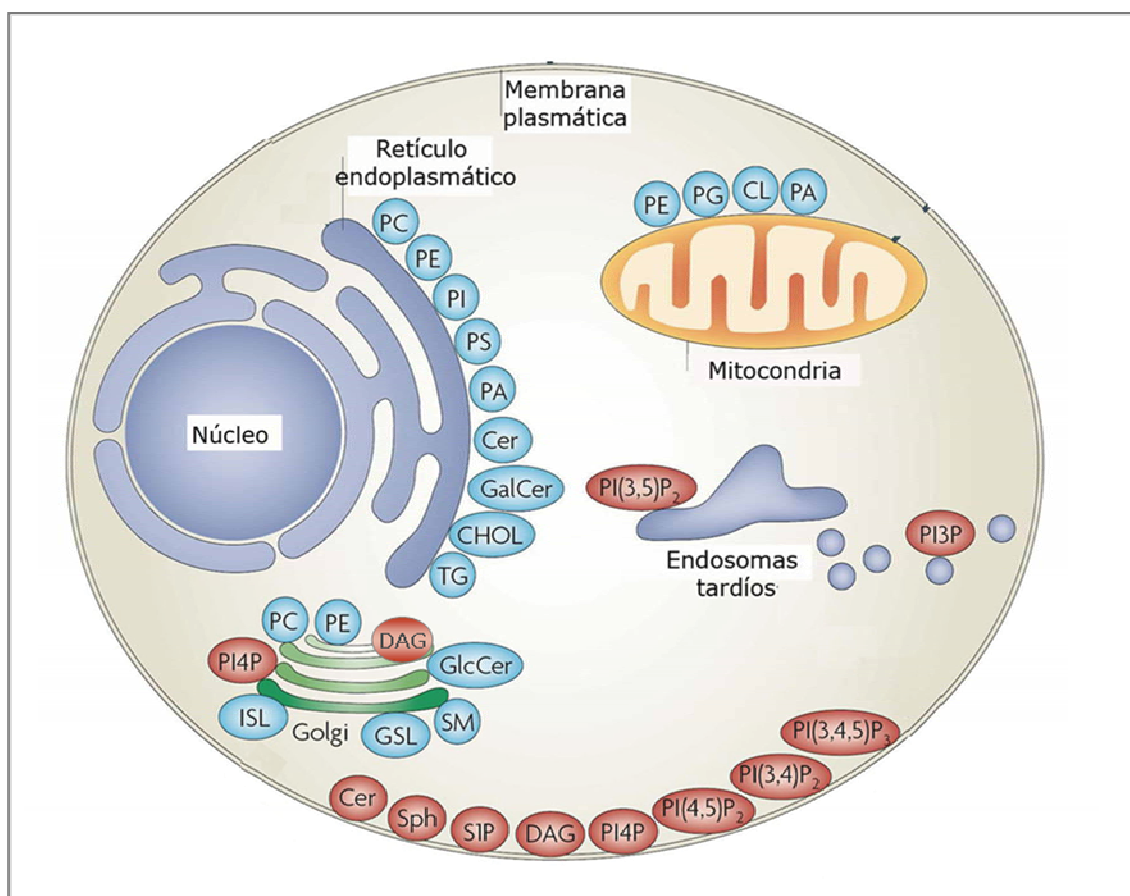


Figura 9: Composición lipídica de las membranas intracelulares. La composición de lípidos en los diferentes orgánulos varía dentro de la célula. La figura muestra el lugar de síntesis de la mayoría de fosfolípidos (azul) y los lípidos que están implicados en la señalización intracelular (rojo). La mayoría de glicerofosfolípidos estructurales (PC, PE, PI y PS) se sintetizan en el RE, así como la Cer, GalCer y colesterol (CHOL). También participa en la síntesis de triglicéridos (TAG). En el Golgi se sintetiza principalmente esfingomielina (SM) y también algunos fosfolípidos como la PC y PE y glicolípidos (GluCer). Finalmente producen PI4P y PA. La membrana plasmática está compuesta por esfingolípidos y esteroides y otros lípidos que actúan como moléculas señalizadoras. (Modificado de la ref. ¹⁵⁹)

Sin embargo, el metabolismo lipídico local no es suficiente para mantener la distribución y asimetría de las membranas celulares siendo necesario otros mecanismos que permitan el movimiento selectivo y direccional de los lípidos. Así pues, los lípidos de membrana están sujetos a dos tipos de movimientos dentro de la bicapa en un mismo compartimento: la transferencia selectiva de una hemimembrana a la otra o *flip-flop* y la difusión lateral, y a otros dos movimientos entre las membranas de diferentes compartimentos: el transporte vesicular y las proteínas transportadoras de lípidos (Fig.10).

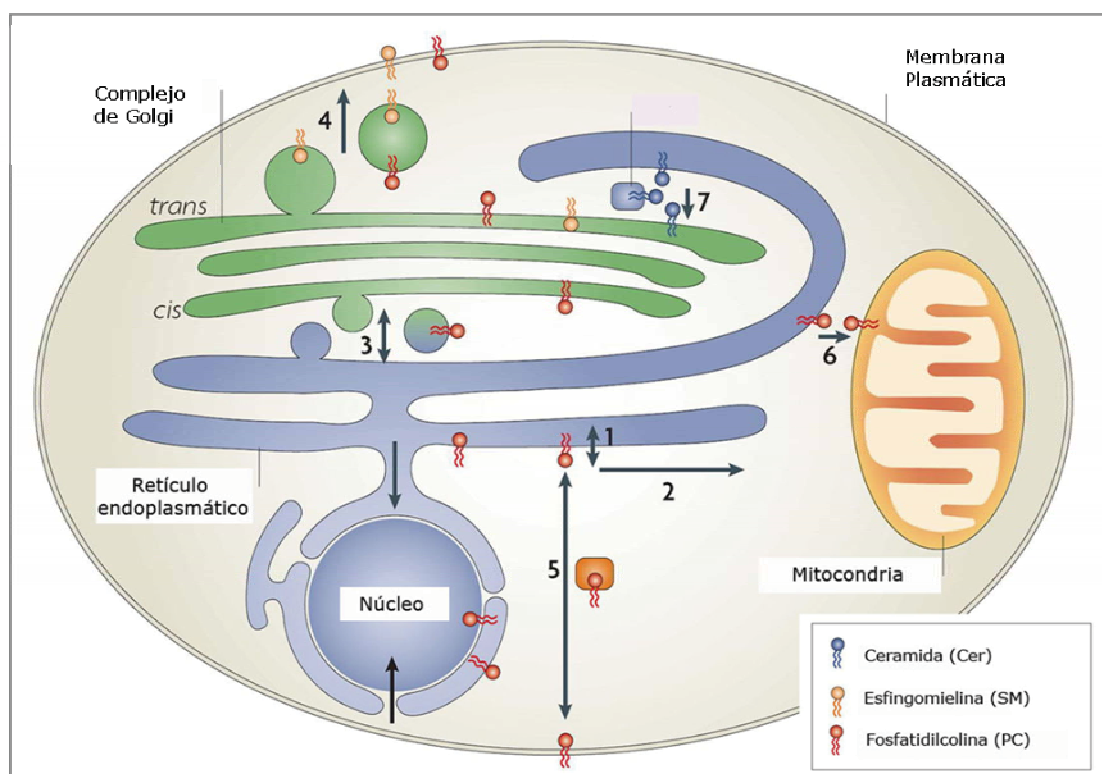


Figura 10: Modelos del transporte de lípidos. 1. Flip-flop o salto del lípido de una hemimembrana a la otra. 2. Difusión lateral rápida dentro de la misma hemimembrana. 3 y 4. Transporte vesicular. 5, 6 y 7. Transporte a través de proteínas que transfieren lípidos de un compartimento a otro. (Modificado de la ref.¹⁵⁹)

1.3.- El papel de los lípidos en la estructura y dinámica de las membranas

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 hidrófobas se orientan hacia el interior. Esta distribución lipídica genera una estructura estable y dinámica que se deforma ajustándose a las necesidades celulares¹⁶⁰. Esto se debe a que los lípidos, en función del tamaño de la región polar o apolar, adaptan su contorno a una forma geométrica similar a un cilindro, a un cono o a un cono invertido (Fig.11). De este modo, los lípidos con una cabeza polar que ocupa el misma área que las cadenas hidrocarbonadas se denominan lípidos cilíndricos. Los lípidos con una cabeza polar grande que ocupa más que el área de las cadenas hidrocarbonadas son los lípidos conos invertidos (también llamados tipo I) y forman estructuras convexas con curvatura positiva.

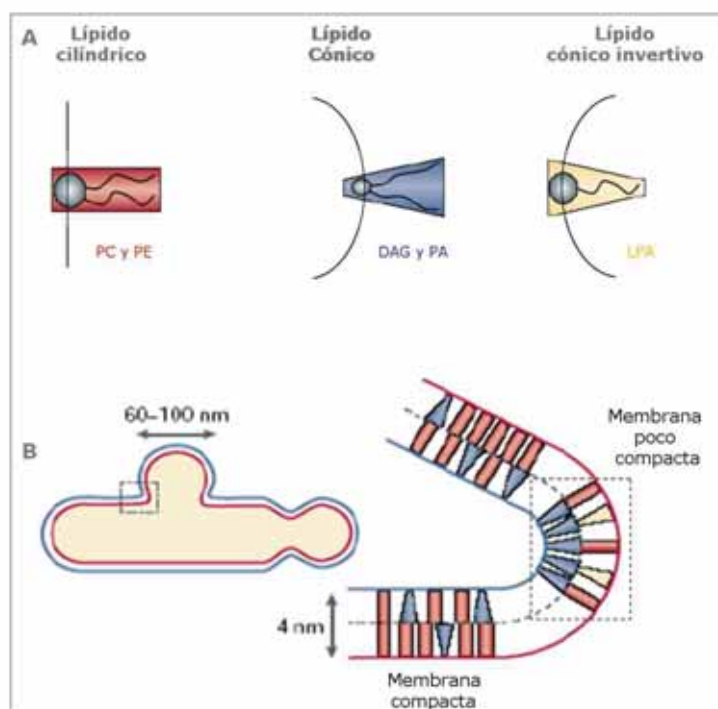


Figura 11: Lípidos y curvatura. A. Tipos de lípidos según su forma molecular. Los lípidos cilíndricos como la PC y PE, los cónicos como el DAG y PA y los cónicos invertidos como LPA se representan en rojo, azul y amarillo, respectivamente. La línea continua simboliza la curvatura de la membrana que genera cada tipo de lípido. **B. Nivel de empaquetamiento de las membranas.** La membrana está compacta en los sitios ricos en lípidos estructurales; y la membrana está poco compacta en unos microdominios específicos ricos en lípidos cónicos y cónicos invertidos

Los lípidos con una cabeza polar pequeña que ocupa menos que el área de las cadenas hidrocarbonadas son los lípidos cónicos (también llamados tipo II) y forman estructuras cóncavas con curvatura negativa. Además, la forma final que adquiere un lípido también depende de la longitud y grado de saturación de los ácidos grasos, de las interacciones intermoleculares 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 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 (Fig.11).

2.- EL DIACILGLICEROL

2.1.- Características estructurales

El DAG es un lípido neutro constituido por una cabeza polar muy pequeña, únicamente un grupo $-OH$ del glicerol. A este glicerol se le unen dos ácidos grasos (AG) de 14 o más carbonos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 de la cadena del glicerol. El ácido graso esterificado de la posición *sn*-1 generalmente es saturado (sin ningún doble enlace), mientras que el de la posición *sn*-2 es insaturado ya que presenta uno o varios (*cis*) dobles enlaces (mono- o poliinsaturado). Esto comporta un

plegamiento de la cadena acil que disminuye el empaquetamiento (Fig.11). Los AG saturados presentes en las membranas celulares son el ácido palmítico (16:0), el ácido esteárico (18:0) y el ácido araquídico (20:0); los AG monoinsaturados son el ácido oléico (18:1) y el ácido erúcico (22:1); y los AG poliinsaturados son el ácido linoleico (18:2), el ácido linolenico (18:3) y el ácido araquidónico (20:4) (Fig.12). Se han identificado más de 50 especies diferentes de DAG en base a la longitud del ácido graso y al grado de saturación, y existen evidencias de la diferente participación de estas especies moleculares en los procesos celulares^{133;161}. Por ejemplo, la proteína ArfGAP1 aumenta su actividad al aumentar la longitud de la

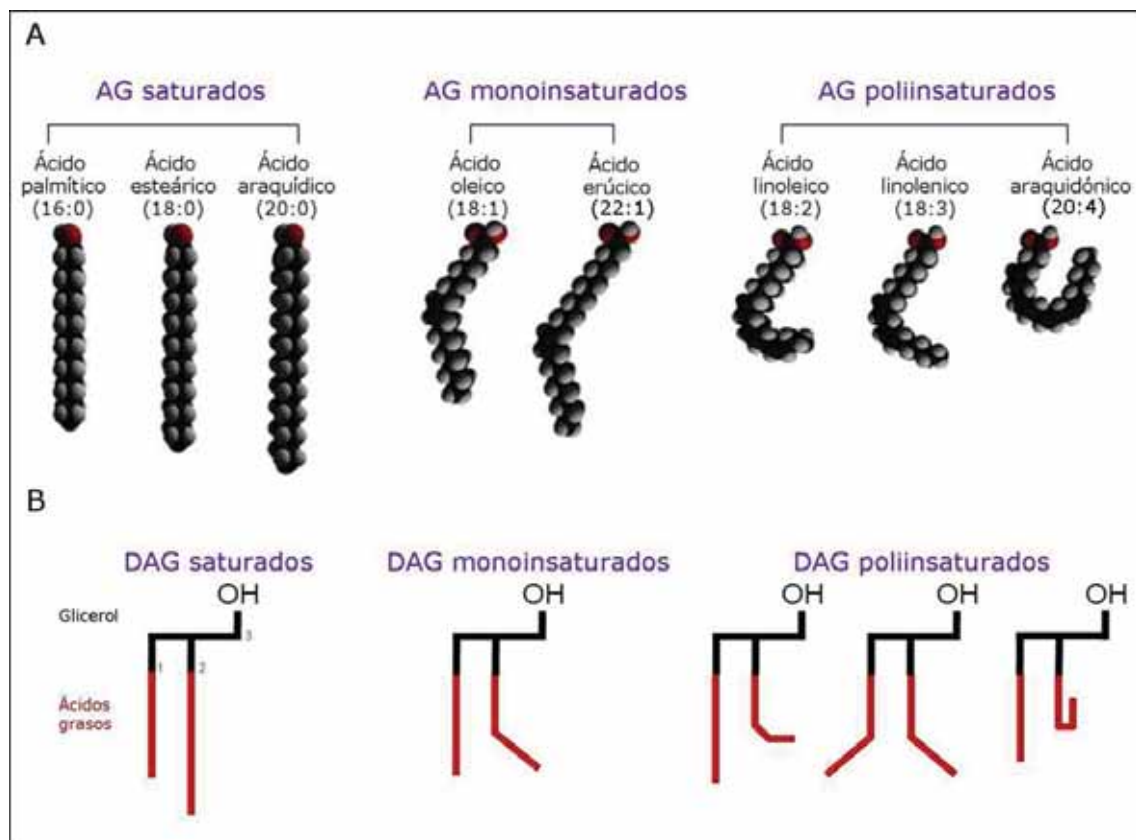


Figura 12: Tipos de AGs y DAGs en las membranas celulares. A. Tipos de AGs. La nomenclatura de los AG se indica poniendo primero el número de carbonos que forman la cadena y después el número de insaturaciones que este presenta. Por ejemplo, en el caso del ácido palmítico (16:0) tiene 16 carbonos y ninguna insaturación. Los AGs más abundantes en las células son el 16:0, 18:0, 18:1 y el 18:2). **B. Tipos de DAGs.** Los DAG se forman por combinación de dos de los AG mostrados en el panel A. En rojo se muestra la morfología de los AG que es importante para la topología final de las membranas.

cadena hidrocarbonada y el número de insaturaciones de la especie de DAG¹²⁸. Esto es debido a que ArfGAP1 inserta con más facilidad sus residuos hidrofóbicos en las membranas que están poco empaquetadas.

El DAG es crucial en la homeostasis lipídica durante el crecimiento y desarrollo celular ya que, debido a su pequeño tamaño y composición sencilla, tiene unas características únicas. Por un lado, es capaz de modular funciones celulares como el tráfico de membranas a través de la modificación de las propiedades biofísicas de las membranas. También sirven como almacenamiento de energía y es precursor de lípidos más complejos como los fosfolípidos. Por último, el DAG actúa como segundo mensajero reclutando y/o activando proteínas citoplasmáticas con dominios de unión a DAG (dominio C1), por ejemplo, las PKCs, que regulan diversos procesos celulares.

2.2.-Metabolismo del diacilglicerol en el complejo de Golgi.

En condiciones de equilibrio, las membranas celulares no contienen altos niveles de DAG. Sin embargo, se han propuesto numerosas vías metabólicas que controlan rigurosamente la producción y consumo de este lípido en el Golgi para mantener su estructura y función.

Existen tres posibles mecanismos para producir DAG en el Golgi (Fig.13): (1) La esfingomielina sintasa (SMS) transfiere la colina y el fosfato de la PC a la Cer para generar SM y libera DAG¹⁶². El tratamiento con un inhibidor de la Cer sintasa (FB1; fumonisina B1) disminuye los niveles de DAG en el Golgi; (2) La PLD convierte la PC en PA. En general se acepta que el PA tiene una vida media muy corta en las membranas intracelulares ya que rápidamente es desfosforilado por la PAP para formar DAG^{163;164}. En células de mamíferos, el tratamiento con propanolol inhibe la PAP y disminuye los niveles de DAG en el Golgi¹⁴³. A diferencia del PA, el DAG tiene una vida media más larga; (3) La PI-PLC¹⁶⁵ hidroliza el fosfatidilinositol-4-fosfato [PI(4)P] o el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato [PI(4,5)P₂] para generar DAG. El tratamiento con un inhibidor de la activación de la PI-PLC (U73122) disminuye los niveles de DAG en diferentes compartimentos intracelulares¹⁶⁶, entre ellos en el Golgi¹⁶⁷.

Es fundamental que la producción de DAG esté equilibrada por otras rutas metabólicas que regulan su consumo¹⁶⁸. Principalmente, tres vías podrían ser las responsables de eliminar el DAG generado en el Golgi (Fig.13): (1) el DAG podría ser fosforilado por la diacilglicerol quinasa (DAGK) para producir PA y/o (2) el DAG podría ser consumido por la vía CDP-colina para la biosíntesis de PC¹⁶⁹. Además, las PIPT tienen un papel esencial en esta última vía. Recientemente, se ha identificado una proteína humana (Nir2) en el Golgi que tiene una función crítica en la regulación de los niveles de DAG en este compartimento¹⁷⁰.

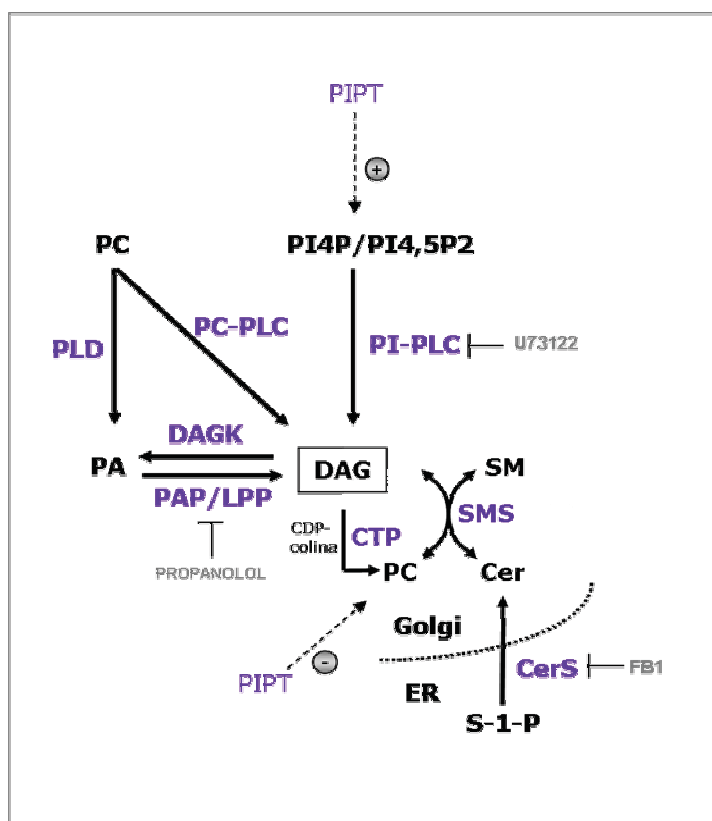


Figura 13: Vías metabólicas que regulan los niveles de DAG en el Golgi. Las enzimas implicadas en la producción y degradación del DAG se representan en azul. Los agentes farmacológicos que inhiben las diferentes enzimas se representan en gris (Modificado de la ref.¹⁷¹)

A continuación se describen detalladamente las enzimas que participan en la formación de DAG en las membranas del Golgi:

a) La fosfolipasa D y la fosfatasa del ácido fosfatídico

Teniendo en cuenta la gran abundancia de PC en las membranas, la formación de DAG en el Golgi a partir de la acción secuencial de la PLD/PAP debe ser la más importante desde el punto de vista cuantitativo.

a.1) La fosfolipasa D

La PLD hidroliza la PC y libera PA y colina. Se han identificado dos isoformas: la PLD1 y la PLD2¹⁷²⁻¹⁷⁴. La PLD se une a la membrana a través de su dominio PH¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ pero esta unión no la activa. La actividad de PLD está regulada por la unión a ciertas proteínas importantes para el transporte intracelular como las PKCs, Rho GTPasas y Arf1^{172;173;178-180} y también por fosforilación y palmitoilación^{172;181}. Existe una gran controversia respecto a la localización subcelular de la PLD1 y PLD2, aunque ambas isoformas se han localizado en el Golgi^{182;183}. El PA generado a través de la PLD puede convertirse rápidamente en DAG por la acción de la PAP.

a.2) La fosfatasa del ácido fosfatídico

La PAP cataliza la desfosforilación del PA produciendo DAG y fosfato inorgánico. La PAP juega un papel muy importante en la síntesis *de novo* de triglicéridos y glicerolípidos¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Además, participan en la señal de transducción intracelular¹⁸⁷. Existen dos clases de PAP que se clasifican según la localización subcelular, los mecanismos de activación y las funciones¹⁸⁸. Las de tipo I (PAP1) se encuentran en el citoplasma, necesitan de Mg^{2+} para activarse y se inhiben con N-etilmaleimida. Su único sustrato es el PA. Se considera que están implicadas en la síntesis de lípidos ya que se translocan a los microsomas después de estimular la síntesis de triglicéridos¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Por otro lado, las de tipo II (PAP2) son proteínas

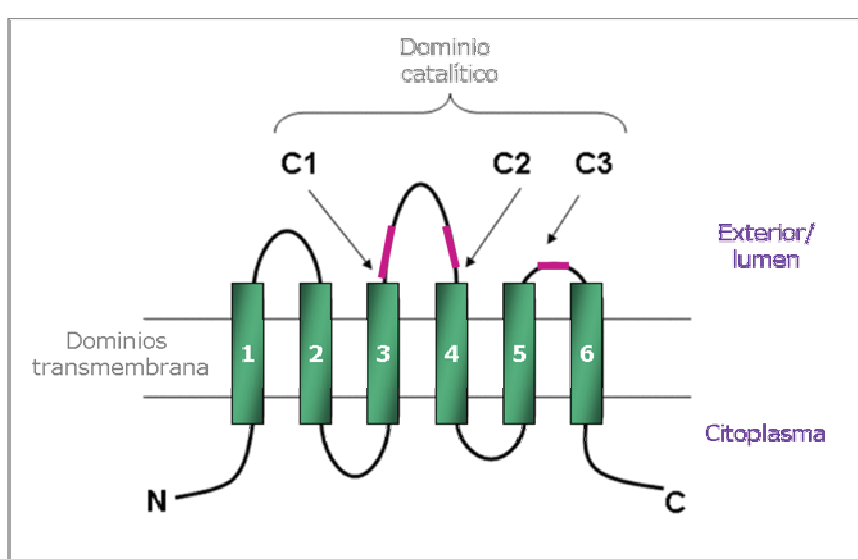


Figura 14: Predicción de la topografía de la estructura de las LPPs y localización de los motivos conservados del dominio catalítico (Modificado de la ref.¹⁹²)

integrales de membranas que no necesitan Mg^{2+} para su activación ni se inhiben con N-etilmaleimida^{188;190;193-195}. También se conocen como LPPs (*lipid phosphate phosphatases*) porque *in vitro* tiene varios sustratos específicos como el PA, LPA, S1P y C1P¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Las LPPs presentan en su estructura 6 dominios transmembrana y el dominio catalítico queda encarado hacia el exterior celular o hacia en lumen de las membranas intracelulares^{199;200} (Fig.14). El dominio catalítico está formado por 3 motivos (C1, KXXXXXXRP; C2, SXH; C3, -RXXXXXHXXD) cuyos residuos conservados son esenciales para su actividad fosfatasa. Dentro de la familia de las PAP2 (LPPs) existen 3 isoformas que se denominan PAP2a (LPP1), PAP2c (LPP2) y PAP2b (LPP3)²⁰¹⁻²⁰⁴. Aunque la localización depende del tipo celular^{187;205}, todas se han detectado en la membrana plasmática²⁰⁵⁻²¹¹. En el caso de la LPP3, también se encuentra en las membranas intracelulares, como el RE y el Golgi^{205;208;212}. Además, la LPP3 junto con la LPP2 están presentes en vesículas citoplasmáticas²⁰⁸.

La regulación de la actividad catalítica de las LPPs no está bien definida. No existen evidencias de que sea por fosforilación o desfosforilación pero parece que puede ser por interacción proteína-proteína¹⁶⁴ o, alternativamente, por homo- o heterodimerización de las LPPs^{192;213}. A diferencia de la PAP1, las LPPs parecen participar en la transducción de señal mediada por la PLD²¹⁴.

Por último, las características físicas del DAG producido a través de la vía PLD/PAP son importantes para entender sus posibles funciones. La especie molecular de PC que es sustrato de la PLD se caracteriza por tener un ácido graso saturado y el otro monoinsaturado. La acción secuencial de la PLD y PAP genera un DAG que se compone de ácidos grasos saturados/monoinsaturados, en particular 16:0, 18:0, y 18:1^{133;215}.

b) La fosfolipasa C

La PLC, al igual que la PLD, es una enzima que cataliza la hidrólisis de glicerofosfolípidos. Mientras que la PLD hidroliza el enlace entre el grupo fosforil y la cabeza polar, la PLC hidroliza el enlace entre el grupo fosforil y el glicerol. Existen dos tipos de PLC que se clasifican según el sustrato específico: la PI-PLC hidroliza fosfoinosítidos y la PC-PLC hidroliza la PC²¹⁶.

La PI-PLC es una enzima que se encuentra tanto en la fracción de membrana como en la citosólica. Se ha descrito que algunos subtipos se asocian a las membranas de Golgi^{217;218}. Teniendo en cuenta que existen numerosas evidencias de que [PI(4)P] se sintetiza en el Golgi y, sin embargo, no las hay de [PI(4,5)P₂], es probable que los DAG generados a partir de la PI-PLC en este compartimento provengan principalmente de la hidrólisis de [PI(4)P]. Las especies moleculares de DAG generadas a través de estas enzimas se componen de ácidos grasos poliinsaturados, en particular 18:0/20:3, 18:0/20:4 y 18:0/20:5^{133;215}. Uno de los mecanismos por el cual se obtienen PI en las membranas de Golgi es gracias a la participación de las PIPT²¹⁹. PIPT se unen con las especies moleculares de PI que participan en la síntesis PI4,5P₂ o PI4P, los cuales servirán como sustrato de la PLC para generar DAG²²⁰⁻²²² (Fig.13). El silenciamiento de la PIPT Nir2 induce una disminución de los niveles de DAG en el Golgi¹⁷⁰.

La PC-PLC ha sido menos estudiada. No hay evidencias de que esté en el Golgi, aunque puede translocarse a este compartimento en respuesta a la citotoxicidad celular²²³.

c) La esfingomielina sintasa

La SMS se encarga de la síntesis de la esfingomielina a partir de PC, intercambiando la molécula de glicerol por una de ceramida y liberando así el DAG. Se han identificado dos isoformas de la SMS en mamíferos^{224;225}, la SMS1 y la SMS2, de las cuales no se han encontrado diferencias bioquímicas²²⁴. SMS1 localiza en el Golgi mientras que la SMS2 se encuentra tanto en el Golgi como en la membrana plasmática²²⁴. El silenciamiento y la sobreexpresión de las enzimas SMS1 y SMS2 regulan los niveles de DAG en el Golgi²²⁶.

2.3.- Papel del diacilglicerol como segundo mensajero en el complejo de Golgi

El DAG es un componente de la bicapa que es capaz de regular las propiedades biofísicas de las membranas lipídicas debido a sus características moleculares (Ver subapartado 2.4). Sin embargo, el DAG también puede actuar como molécula señalizadora. Se ha descrito que después de una estimulación se producen cambios transitorios de DAG en determinadas zonas de la membrana, llamados dominios ricos en DAG, para modular la localización y/o la actividad enzimática de ciertas proteínas citosólicas en el Golgi. En general, las proteínas reguladas por DAG presentan en su estructura primaria un dominio de unión a DAG, o dominio C1, que le permite su interacción directa con el lípido.

El dominio C1 es un dominio muy conservado rico en cisteínas (*cysteine-rich domain*) que se identificó inicialmente en las PKCs y, posteriormente, en otras proteínas. El dominio C1 de las PKCs se caracteriza por tener una secuencia conservada de 50/51 de aminoácidos en el N-terminal con una estructura compacta rica en cisteína que contiene cinco laminas β , una helice α y dos iones de zinc. Se definió primero como un dominio necesario para unirse a forbol ester (PMA o PDBu)^{227;228} y más tarde se estableció que también se unían a DAG²²⁹. El Golgi hospeda varias proteínas con este dominio como la RasGRP1²³⁰, las quimerinas^{231;232} o la PKD¹⁴⁴ y están implicadas en diferentes procesos en el Golgi: la RasGRP1 y, posiblemente, las quimerinas participan en las cascadas de señalización iniciadas en la membrana plasmática pero implicadas en señalización en endomembranas mientras que la PKD participa en la generación de ITs en el TGN¹⁴³. Otras PKCs como la PKC α , PKC δ , PKC ϵ y PKC θ también se asocian al Golgi mediante el dominio C1^{233;234} aunque no se ha estudiado extensamente su mecanismo de localización en este compartimento. En el caso de la PKC θ , aunque la sobreexpresión de la proteína completa localiza en la membrana plasmática, la expresión de su dominio C1 localiza en el Golgi y se comporta como sensor de los niveles de DAG en este compartimento¹⁶⁷. Respecto a la PKC ϵ , experimentos *in vitro* demuestran que

mutaciones en algunos residuos hidrofóbicos de su dominio C1 disminuye su capacidad de asociación a los liposomas ricos en DAG y su actividad quinasas²³⁵. La PKC ϵ sobreexpresada localiza en la membrana plasmática, en el Golgi y en el citoplasma²³⁶. Su localización en Golgi esta mediada por el dominio C1^{236;237} y también por su estado de fosforilación. PKC ϵ se fosforila en los residuos treonina-566, treonina-710 y serina-729²³⁸ siendo la fosforilación en la serina-729 (Ser 729) la que determina su localización en el Golgi²³⁹. Se ha demostrado que la serina-703 se autofosforila y es posible que la serina-729 se autofosforile²⁴⁰. Se propone que una vez fosforilados los tres residuos de la proteína está preparada para su activación por otros cofactores como el DAG. De manera que la transferencia del citoplasma al Golgi puede representar su activación. Es posible que la fosforilación en la serina-729 facilite que la PKC ϵ se reclute en el Golgi a través del dominio C1^{236;241} quizás por inducir cambios conformacionales que hacen que la señal de localización del Golgi sea accesible²⁴². Por último, la localización estable de las PKCs en la membrana se determina por la unión de la PKC a unas proteínas específicas denominadas RACKs (receptors for activated C-kinases). Se han identificado y caracterizado dos de estas RACKs: RACK específicas para β IIPKC (RACK1)^{243;244} y RACK específicas para PKC ϵ (ϵ RACK), también conocida como β 'COP²⁴⁵, que es un componente del COPI y por tanto se localiza en el Golgi.

El mecanismo por el cual el DAG recluta y activa a las PKCs novel no está del todo claro. Se ha descrito que la unión de la PKC a una sola molécula de DAG es suficiente para activarla y también que los cambios conformacionales en la membrana inducidos por el DAG potencian la activación²¹⁵. Por otro lado, no todas las especies moleculares del DAG son equivalentes para estimular la actividad de PKC. El DAG generado a través de la PLC en células endoteliales de la aorta porcina activa la PKC mientras que no ocurre lo mismo con el DAG generado a través de la acción consecutiva de la PLD y PAP¹³³. Parece que se debe a que el primero contiene ácidos grasos poliinsaturados y el segundo contiene principalmente saturados y monoinsaturados¹³³.

2.4.- El diacilglicerol en la deformación de la membrana y en la fisión de los intermediarios de transporte

Entre todos los lípidos de membrana, se considera que el DAG es clave para regular el transporte asociado al Golgi. El DAG es un lípido pequeño, neutro y con una forma cónica que, además, puede transferirse de una hemimembrana a la otra. Gracias a estas características puede facilitar la flexibilidad y la curvatura de membrana y, consecuentemente, permite el proceso de gemación y fisión de los ITs. El aumento local del DAG en regiones concretas de la bicapa provoca la

acumulación de energía elástica generando inestabilidad en la membrana. Para minimizar esta tensión y mantener la estabilidad en la membrana se forman los iITs²⁴⁶. El DAG induce curvatura negativa cuando se acumula en una de las hemimembranas de la bicapa^{105;215;246}. Esto quiere decir que si el DAG se acumula en la hemimembrana citoplasmática, la membrana tiende a curvarse hacia el lumen promoviendo la fusión luminal y liberando la vesícula que contiene el cargo para ser transportado²⁴⁷. La escisión se favorece por la fuerza ejercida por motores moleculares sobre los dominios enriquecidos en DAG. La inhibición de la concentración local de DAG inhibiría la curvatura hacia el lumen y posteriormente la fusión de las hemimembranas luminales. Por lo tanto, la generación local de DAG en la hemimembrana citoplasmática es la clave de la generación de ITs²⁴⁷.

Además, las acumulaciones de DAG no sólo modifican la estructura de la membrana, disminuyendo la energía necesaria en el proceso, sino que permite el reclutamiento y/o activación de proteínas necesarias para la formación de las vesículas, como la PKD¹⁴⁴.

Por otro lado, la capacidad del DAG de alterar la estructura de las membranas lipídicas de forma puntual también afecta a la actividad de ciertas proteínas que realizan su función en las proximidades de la membrana como la PLC^{248;249}, la fosfolipasa A²⁵⁰, la PKC^{251;252}, la CTP:fosfocolina citidiltransferasa²⁵³⁻²⁵⁵, ArfGAPs¹²⁸ o componentes del coatómero¹³⁰. Este efecto se debe a que al deformarse la membrana por la acumulación de DAG se genera pequeñas zonas donde las regiones apolares de la bicapa se exponen mejorando las interacciones hidrofóbicas de las proteínas con la membrana²¹⁵.

Por último, existe cierta controversia respecto al papel que juegan el PA o el DAG en la formación de vesículas ya que el PA también tiene una curvatura espontánea negativa^{256;257} y ambos lípidos han sido implicados en los procesos de formación de vesículas^{71;87;247;258-265}. La diferencia fundamental entre estos lípidos es que el DAG, al no tener carga, se desplaza con mayor facilidad tanto a lo largo como a través de la bicapa lipídica²⁶⁶ lo que, según algunos autores, es fundamental para su función²⁴⁶. El PA, en cambio, se mantiene formando pequeños complejos estabilizados por enlaces de hidrógeno que permiten generar regiones de monocapa esenciales, según otros autores, para la formación de la vesícula²⁵⁷. Además, la curvatura espontánea del PA es muy dependiente del pH lo que provoca que sólo a pH ácido tenga capacidad de generar estructuras no lamelares limitando su acción a contextos celulares muy concretos²⁵⁷.