



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Papel del citoesqueleto de actina en la regulación de la H⁺-ATPasa vacuolar de complejo de Golgi

Carla Serra Peinado

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias
Facultad de Medicina

**PAPEL DEL CITOESQUELETO DE ACTINA
EN LA REGULACIÓN DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR
DEL COMPLEJO DE GOLGI**

**Tesis presentada por Carla Serra Peinado
para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona**

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

Dr. Gustavo Egea Guri

Carla Serra Peinado

Programa de Doctorado de Biomedicina

Als meus pares

i al Nil

*Eres loca, eres serena
eres viento, eres brisa
eres luz en mis quimeras
eres fuego, eres ceniza*

Antonio González “El Pescaílla”, Niña

AGRADECIMIENTOS

La tesi... A la carrera ja t'avisen que serà dur, que requerirà molta implicació, molta feina, que només la facis si n'estàs realment convençut. No sé ben bé perquè, però a mi tot això no m'espantava les ganes de fer recerca em podien. I ara, un cop casi superada aquesta etapa me'n adono de la raó que tenien! Però hi ha una part de la tesi de la que no te'n parlen. És una etapa dura sí, però també és una etapa molt maca, t'endinses en un món nou i molt emocionant, i a més ho fas acompanyat de persones que comparteixen la teva mateixa passió, que t'acompanyen i recolzen en aquest camí, persones que no saps ben bé com acaben sent casi casi imprescindibles pel teu dia dia. I és que això no t'ho expliquen, i compartir la ciència amb els teus companys és una experiència preciosa. Per això no podia acabar aquesta etapa sense donar les gràcies a tots aquells que heu estat al meu costat durant la tesi, ja que heu fet el camí molt més fàcil, m'heu ajudat, ensenyat i en definitiva meu fet créixer com a científica i com a persona.

En primer lloc vull donar les gràcies al meu director de tesi, al Gustavo Egea. Gràcies per donar-me la oportunitat de realitzar la tesi en aquest laboratori, per haver confiat amb mi per fer aquest projecte, per haver compartit tots els teus coneixements amb mi i per ajudar-me a créixer com a científica amb totes les discussions del projecte. I sobretot, gràcies per veure que aquella noieta que encara li quedava tot per aprendre podia tenir potencial. Ho hem parlat moltes vegades, jo en aquest laboratori he après molt, he crescut molt. Així que només puc que agrair-te haver-me impulsat a millorar dia a dia.

Gràcies també a la resta de companys del grup que m'han ajudat a tirar endavant aquesta tesi. A la Bet, gràcies per estar sempre disposada a discutir tots els resultats que fessin falta, gràcies per donar el contra punt que és tan necessari i en definitiva gràcies per estar sempre disposada en ajudar-me en el que fes falta. Al Juanma, me guiaste al inicio de este camino y creeme que me enseñaste más de lo que crees, gràcias por tu paciència y por creer en mi. I a tu Javi, el meu company de poyata que tot i ser una mica toca collons sempre sempre estaves allà pel que necessités. Gràcies per fer-me tocar de peus al terra quan ho necessitava, el teu "relativitzaaaa" encara ressona molts cops pel meu cap. Però sobretot gràcies per creure en mi des del minut u i no deixar-ho de fer en tots els anys que em compartit. Ha estat un autèntic plaer compartir poyata amb tu!!!

He tingut la sort de compartir laboratori amb els jordi's, tot i treballar en temes molt diferents sempre és enriquidor tenir al costat algú amb una visió

diferent a la teva. La veritat és que entre tots heu aconseguit que la meua visió de les neurociències canviï molt i he après molt al vostre costat. Així que moltes gràcies al Jordi, al Pep, la Sílvia i l'Esther per tots els moments que hem compartit.

No hem puc oblidar d'agrair a totes aquelles persones que tot i no estar estrictament relacionades amb la ciència sense la seva feina res d'això existiria. A la Núria i a la Carme per totes les seves gestions, per ajudar-me a desfer tots els embolics administratius i per fer-me sentir part d'aquesta família des del primer moment. A l'Anna Alsina que en l'etapa final de la tesi ho ha fet tot més fàcil amb les seves gestions i competitivitat. I com no? A la Nuri gràcies pel teu bon rollo, pels teus somriures que et puguen l'ànim quan a les tantes segueixes treballant, moltes gràcies per cuidar-nos tant!! Ets una autèntica curranta!!

Al llarg d'aquesta tesi he hagut de passar moltes i moltes hores al confocal, així que no em puc deixar la seva gent. A la Maria pel seu suport tècnic en tots els in vivos, a l'Anna per les macros que tan de temps m'han estalviat (jeje) i a l'Elisenda per solucionar-me tots problemes que anaven sorgit a les hores de confocal. A totes vosaltres us vull agrair la vostra paciència, ajuda i carinyu.

Hi ha molta gent de fora del clínic amb la que he tingut el plaer de col·laborar i que també m'han ajudat molt en diferents aspectes del meu projecte. En primer lloc, agrair a en Juan Llopis la seva generositat al deixar-nos els sensors de pH així com el seu suport i consell en les mesures. També a tota la gent del servei de bioquímica i genètica molecular per permetrem estudiar el complex de Golgi en un cas clínic. A la gent del grup de la Isabel Fabregat de Bellvitge, gràcies per tots els consells que em compartit, pel congrés de Madrid on vam poder compartir molts moments, però sobretot gràcies a l'Eva per ensenyar-me a fer ELISA's, et desitjo tota la sort del món amb la tesi i amb el que vingui després!! T'ho mereixes. I finalment, gràcies a la gent de biologia cel·lular del IDIBAPS pels seus consells amb diversos fraccionaments cel·lulars que he fet, gràcies per la vostra generositat i per compartir la vostra opinió, però sobretot gràcies per ajudar-me a obrir el rotor sempre que jo no podia!! Jaja!! Que era casi sempre...

I ara és el torn del Gustavo's!! He tingut la grandíssima sort de estar sempre recolzada per un gran grup (gran d'esperit no de número, jeje). Som un grup petit però molt compacte, m'ha encantat compartir amb vosaltres l'orgull de formar part de la recerca bàsica, però també ha estat molt emocionat poder participar en la nova aventura de Marfan. Dasha, nunca te podre agradecer suficiente que me ayudaras con el clonaje del maldito mutante, sin tus consejos

nunca lo hubiera conseguido, me encanta tu iniciativa y tu perfeccionismo te deseo muchísima suerte en esta etapa y espero poder ayudarte con todas tus dudas del catalán que estaré encantada de solucionar, dóna corda al català!! Jajaja. Thayna, fue un placer compartir contigo ese tiempo, aportaste una nueva visión a este grupo, hasta pronto. Yoli!! Has estat sempre al meu costat en aquesta etapa final, estic realment agraïda de debò!! Gràcies per estar sempre atenta a tots els detalls, per estar disposada en donar-me un cop de mà amb el que fes falta (ens hem ajudat molt), desitjo que siguis molt i molt feliç en la nova etapa que ara iniciés ja saps que estic aquí pel que necessitis. Júlieta, que dir? Estàs com una cabra i m'encanta!! La teva motivació i iniciativa són difícils de trobar, em fa l'efecte que res t'espanta i sé que arribaràs molt lluny, no canviïs mai que el que tens val un imperi. Annemie, acabas de empezar un viaje muy bonito así que disfrútalo, confía en ti misma que tú puedes, no tengas miedo de nada i pa' adelante que vas a triunfar! Ya tienes mucho ganado, creo que nunca te he vistos sin tu sonrisa y eso ya es tener media batalla ganada. I Vane, que dir? T'admiro, ets de les persones més currantes que he conegut mai, tens les idees clares i el que és més important les portes a terme. Mil gràcies per ajudar-me amb els animals, és molt important per mi, gràcies per la teva paciència!! No sé que fariem sense tu. I a tots aquells gustavo's que heu passat per aquí però ja no hi sou. Jèssica, gràcies pel teu carinyu! Vam compartir l'aventura dels DRMs i gràcies als teus "hellos" i al teu bon rollo ho vas fer tot molt més fàcil!! Ets una romàntica sense remei en tots els sentits i m'encanta, espero que la gran aventura que estàs a punt d'iniciar et faci molt i molt feliç. Henry, com set troba a faltar!! Ara a les tantes de la nit no hi ets fent companyia!! Jajaja!! En serio, crec que conec poques persones tan apassionades pel que fan com tu i espero que a Londres estiguis triomfant perquè t'ho mereixes!! Rocío, la teva estança al lab va ser curta però has deixat "huella", saps que pel que necessitis estem aquí i que encara que fos breu va ser un plaer poder compartir la feina amb tu.

En aquets agraïments no em vull deixar a ningú, sou molts els que heu estat al meu costat! així que comencem el viatge pel clínic!!

Començaré per la tercera, Marco i Phil no em pogut compartir gaires moments però us desitjo molt sort en tots els vostres projectes. Raquel i Cris, ja sé que us heu mudat a la sala blanca però jo us segueixo considerant tercera, ha estat un plaer compartir dinars i festes amb vosaltres m'encanta la vostra energia i el vostre bon rollo!! Miriam, em vas acompanyar en el meu viatge cap a la biologia

molecular, em vas ajudar moltíssim i em vas donar consells que no tenen preu, espero que tot t'estigui anant superbé per Alemanya i poder compartir amb tu molt més sopar i pitis!! Ana desprendes una serenidad y calidez que no tiene precio, yo no he tenido el placer de poder trabajar contigo, pero solo el hecho de que estuvieras ahí compartiendo cigarrillos o cenas ha sido un auténtico placer. Jordi, gràcies per deixar-nos sempre els vidres de westerns, tubs o el que fes falta quan tenim una emergència, ets treballador com tu sol i a sobre sempre amb un somriure als llavis, ha estat un plaer. Andrea et desitjo molta sort amb la tesi, gaudeix-la molt que passa volant. Inés, mucha fuerza con lo que te viene estoy segura de que triunfaras! Ha sido un placer compartir contigo cervezas, cenitas y rumbas!! Jajaja!! Espero compartir muchas más! Mònica, em compartit gran part de viatge i la veritat és que m'ho he passat molt bé amb tu, després bon rollo i energia positiva, les nostres llargues converses tu al criòstat i jo a la poyata no les oblidaré!! Jajaja!! El Nature pa' cuando?? Jajaja!! Molta sort en aquest spring final que això ja ho tens a tocar!! A triomfar!! Jajaja!! Andy, ese alemán atípico, jajaja!! Lo he pasado muy bien contigo siempre dispuesto a una cervecita, una cenita o incluso una salida a esquiar, pero mira de cenita en cenita hemos pasado de "Andy no entiende nada" a que ahora ya te atreves hasta con el catalán, que eso que un placer poder compartir todos los momentos contigo!! Mucho ánimo que ya no te queda na'!! I Georgina, el meu alterego rumberu!! Sé que tu i jo algun dia farem realitat algun dels nostres projectes, aquets que se'ns acudeixen després de dues cerveses (o dues copes de vi blanc) i que el dia següent no semblen tan mala idea, jajaja!! Que?? Casa de colònies? O bar rumberu? De debò, que em sento molt afortunada de haver-te conegut m'encanta com ets i espero compartir molts més moments i rumbes amb tu!!

I de la tercera creuem la facultat cap al Cellex. Vero, en la quinta hechamos de menos tus tacones, que energía que tienes!! Te deseo mucha suerte con todo. Núria i Elena, vau marxar al cellex al poc d'arribar aquí però tot hi així em pogut compartir molts moments i me'n alegro molt, es veu a milles que valeu per això, així que molta sort i molts ànims perquè estic convençuda que us anirà genial, ah!! I si us plau no deixeu que la tradició del vídeos mori mai!! ;P. I per últim al Quim, ets un gran currante!! Aixó es veu al moment, mira que passar una agost al clínic per amor al l'art!!! Jajaja!! Estic convençuda que amb la teva empenta triunfaras a Anglaterra, molta sort!!

I ara sí passem a la cinquena!! Allà crec que hi he passat més hores que a casa meva!! Jajaja!! I al arribar a la cinquena a la primera persona a qui li he

de donar les gràcies és a la Maite. Et podria donar les gràcies per tots els buffers, plasmids, medis de cultiu, membranes de Golgi... i mil coses més, però tot això ja saps que t'ho agraeixo moltíssim, encara que la teva feina no sempre es vegi sense tu saps que el laboratori s'enfonsaria, així que em limitaré a donar-te les gràcies per cuidar-nos tan duran aquets anys i per estar sempre allà quan feia falta!!

També agrair a tots aquells que han format part d'aquest laboratori i ja no hi són Dani, Olga, Paola, Ingrid, Empar i Albert ha estat un plaer poder treballar amb vosaltres. Ingrid, sembla mentida la de coses que em arribat a compartir!! Ja fa uns anys que ens coneixem i m'ha fet moltíssima il·lusió que reapareguessis pel clínic!! Empar, vaig poder compartir el principi d'aquesta tesi amb tu i ara vist amb distància m'ha quedat la sensació que vas ser un gran exemple, gràcies per tot!! Albert!! El Natureman!! Que dir-te... que ets un crack!! Ets l'exemple vivent que la treballar dur té la seva recompensa, m'ho he passat molt bé amb tu tan dintre com fora del lab.

A tots els estudiants de pràctiques que han passat per la cinquena, la il·lusió que transmeteu ajuda a recordar-nos perquè estem aquí i això a vegades és necessari. Silvieta, moltíssima sort amb tot, acabes de començar una etapa molt bonica, ja veuràs, ànims i força!! Roseretaaaa!! Per aquí trobo a faltar els teus pastissos!! (ja has vist que passa quan en deixes de portar!! Jajaja!!) però encara trobo més a faltar els teus "Carlita!!" i tot el carinyu que em vas transmetre quan estaves aquí, no deixis mai de visitar-nos!!!

Shiraz, voy a echar de menos el olor a especies en las comidas y tus bailoteos en las fiestas del lab!! Mucha suerte con todo!! Gerardo, has estat el meu (i el de tots) informàtic particular, gràcies per tenir sempre un moment per instal·lar un programa, formatjar l'ordinador o el que fes falta, moltíssima sort en aquesta etapa final de tesi!! Sara (la haré en catalán, vale?) ja t'han dit mil vegades que ets un diamant en brut, i és que és veritat, tens tot el que s'ha de tenir per triomfar i no dubto que ho faràs!! És un gustassu treballar amb tu perquè després una energia positiva i unes ganes que s'encomanen!! Gràcies per toot!! Laureta, trobar algú amb la teva sensibilitat (en el millor del sentits!!) en aquest món no és fàcil, per això me'n alegro tan d'haver-te conegut!! Hem compartit molt més que ciència i mai oblidaré aquell sopar amb l'ampolla de vi mano a mano, moltíssimes gràcies per tot guapa!! Molts ànims amb el que ve que tu pots amb això i amb molt més. Rafa, la teva motivació i les teves ganes d'innovar s'encomanen però és que a sobre ets un company excel·lent i és amb això amb

el que em quedo!! Gràcies per estar allà en tot moment amb la teva infinita paciència (tes un cor gegant!), tenir companys com tu és un luju!! i moltes moltes gràcies per les galetes a les 8 del vespre quan ja no queda energia per res!! Jejeje!! Et mereixes el millor i no dubto que ho aconseguiràs!! Jordieeeeet!! Sembla mentida però ara ja fa uns anys que corres per aquí i fum rera fum he tingut la gran sort de anar-te coneixent, i saps que? Que t'admiro, admiro la teva passió per la ciència, les teves ganes i la manera en com ho vius, el millor que et puc dir ara és que no deixis que res ni ningú (ni jo) canvï la teva manera de viure-la!! Res, que ja ho saps, moltes gràcies per tots els pitis, per aguantar el meu mal humor i les meves queixes (sóc una quejica, ho sé) en definitiva gràcies per fer-me costat!! Has fet molt més fàcil el final d'aquesta tesi!!

Andrés, tú has sido mi descubrimiento de última hora!! No he tenido el placer de trabajar contigo pero ya se ve desde lejos que eres un currante nato! Gracias por todos los momentos compartidos me lo he pasado muy bien contigo y espero que haya muchos más! Ana, siempre a tu manera has estado a mi lado, cuando he necesitado algún consejo estabas allí para hablar el rato que hiciera falta, gracias por todo el apoyo!! Gari, ya son varias las cervezas que hemos hecho intentando arreglar el mundo, no sé si lo vamos a conseguir pero por si acoso yo lo seguiré intentado, muchas gracias por todas las risas y todos los ratos compartidos!! I Xavi, no sé molt bé perquè (jeje) sempre has cregut amb mi, has estat al meu costat i m'has valorat, i això que jo sóc fan de Victor Valdés!! Jajaja!! El que encara et dona més mèrit!! Que moltíssimes gràcies per confiar en mi, per escoltar-me i aconsellar-me sé que encara que sembli mentida podré contar amb tu pel que faci falta i això significa molt per a mi.

I sí, ha arribat el moment per vosaltres Sirenetes!! La veritat és que no sé ni per on començar!! Han estat cinc anys molt intensos i sempre heu estat allà per compartir les alegries o per ajudar a superar les penes. Per mi amb les sirenes la frase: "sense vosaltres no ho hagués aconseguit" cobra sentit. Duran aquets anys em estat una família i ara, tot i estar separats per uns quants quilometres, us segueixo sentit a prop. Laia, qui ho hagués dit en un inici, però al final tu i jo hem acabat compartint moltes més coses de les que ens haguéssim imaginat, i és que les circumstàncies han fet que anés així i me'n alegro moltíssim, me'n alegro molt perquè així he pogut conèixer a una persona empàtica i generosa que inclús en els mals moments està disposada a ajudar els altres. Va ser un plaer ajudar-te amb la recerca dels anticossos espectrina i anquirina, quina paciència vas tenir!! Mai et vaig donar les gràcies per ensenyar-me duran tot

aquell temps, estic segura que no va ser fàcil per tu. Laura, sempre m'has contagiats el teu bon rollo i inclús alguna de les teves manies, jajaja!! Quan vaig entrar em vas rebre amb els braços oberts i així has continuat fins al final, sempre disposada a escoltar i entendre el del teu costat. Hem compartit molts moments en aquets anys, fins hi tot té vist ballant una sardana amb uns alemanys al mig del carrer!!! Jajaja!! Imagina't!! Adri, com em vas dir tu: "tu i jo em compartim les penes i alegries d'aquest orgànul (el Golgi)" i és que de la època lastre a ara em fa la sensació que ha passat una vida, i la veritat que pocs moments recordo de tesi en que no apareguis tu fent alguna conyeta, corregint-me el català (sí, sé que als agraïments hi ha moltes faltes) o ficant-te amb mi simplement perquè sí. Tu m'has ensenyat moltes coses, com que algú que li agrada el heavy també pot ser molt nyonyo, que el bacon és imprescindible per sobreviure o que els rentats de les immunos es poden fer molt més ràpid, jajaja!! No, en serio!! Aquesta tesi no hagués estat el mateix sense tu perquè m'has ajudat quan ho he necessitat i has estat allà per animar-me quan calia o per tocar de peus a terra quan feia falta. M'ha encantat compartir penes i alegries del Golgi amb tu!! Gerard!! Ja sé que tu mai t'has volgut considerar una sirena però t'agradia o no per mi ho ets i ho seràs!! Ara em posaré sentimetaloide o sigui que preparat... Amb tu sempre m'he sentit protegida, he tingut la sensació de ser com la teva germaneta petita del clínic, ets de les poques persones a qui li permeto dir-me Carleta i és que t'agreixo molt tot el que has fet duran aquest temps, per una happy-flower com jo sempre és necessari una mica més del teu punt de vista, potser d'ara en endavant haurem de fer skype's perquè em facis reaccionar amb la teva mirada assassina, jajaja!! Marta, no tinc paraules!! Em fet aquest camí juntes i t'asseguro que aquest últim any en que no has estat tres taules més enllà s'ha notat, molt!! I és que birra a birra (que han estat moltes!!) i festa a festa em creat una amistat que no es trenca així com així, o sigui que ves en compte perquè tens Carla per rato!! Això no hagués estat el mateix sense tu, sense tenir-te al costat portant sempre la contraria, buscant les millors ofertes per fer plans barats per Barcelona, sense les teves empanaments varies i les teves sortides de to, en definitiva sense la teva amistat!! Cheruu!! Que sepas que a mí ya no me espantan tus borderies, y es que lo siento pero ya he descubierto que tienes un corazón tan grande que no te cabe en el pecho, así que ya me puedes obligar a ir a todas las clases de yoga que quieras que no te vas a deshacer de mí tan fácilmente, jajaja!! Adoro tus freakadas y que aceptes las mías, poca gente hubiera accedido a ir a un concierto de rumba solo por

amistad, y es que eso es lo que te hace tan especial, estas dispuesta a hacer lo que sea por la gente que quieres, porque acéptalo me quieres mogollón!! Jajaja!! Marutxi, la meva compi del planeta piruleta!! primer de tot t'he de donar les gràcies, gràcies per tenir aquella sensibilitat especial, aquella que ha fet que ens entenguéssim en tot moment, aquella que ha fet que estiguessis al meu costat incondicionalment, aquella que no a jutjat mai i ha posat l'amistat per sobre de tot. I és que tu i jo sabem que viure en el planeta piruleta no sempre és fàcil, però també sabem que no volem viure cap altre lloc. De inici a fi juntes fins al final, i ens ho hem passat molt bé durant aquesta tesi i només puc que agrair-te tots els moments compartits, els feliços i els no tan, i haver tingut sempre un lloc al teu sofà per quan ho necessités!! Jajaja!! Acabaràs aquesta tesi por todo lo alto i és que t'ho mereixes més que ningú!! Això no acaba aquí, ho saps, hi ha amistats que ni els quilometres poden trencar. I sirenes crec que no puc acabar els vostres agraiments sense donar les gràcies al Sr. Ascot, jajaja!! Per ajudar-nos a construir aquesta amistat i tenir l'estrella preparada abans que ens donés temps de posar el cul a la cadira!!!

Per sort duran aquets cinc anys no ha estat tot ciència!! Primer de tot vull donar les gràcies als Hòbbits, gràcies per acceptar-me tal com sóc, per entendre que això era tan i tan important per a mi, per fer-me costat tot i que no sempre enteníeu de que estava parlant, però sobretot gràcies per tornar-me al món real en cada sopar y birreta, sou la canya!! I en especial a la Marta, crec que ets la persona que a patit més per mi en aquest temps al veure'm treballar tan i tan així que et mereixes una menció especial!! Jajaja!! Marta moltes gràcies per tants anys de cul·legas t'asseguro que això ja no ho parem!! També agrair als bombons rumberus per cada tarda de dijous, on gràcies a la rumba deixàvem tots els problemes a la porta!! I és que ja sabeu: endavant, el pas sempre endavant!! I finalment, a tota aquella gent que ha estat al meu costat en aquets anys, que m'ha aguantat i m'ha ajudat a tirar endavant.

Per acabar als meus pares i al meu germà, gràcies a vosaltres sóc la persona que sóc ara. Vosaltres m'heu ensenyat que per pujar una muntanya hem de suar, que el que val la pena de fer cim no és arribar a dalt de tot sinó l'esforç per aconseguir-ho. Moltes gràcies pel suport incondicional i per impulsar-me a ser millor persona!! Us estimo!!

MIL GRÀCIES A TOTS !!

ÍNDICE

ABRVIATURAS	23
INTRODUCCIÓN	27
I. TRÁFICO INTRACELULAR DE MEMBRANAS	29
1. VÍAS DE TRÁFICO INTRACELULAR	29
1.1. La vía endocítica y de reciclaje	29
1.2. La vía secretora o biosintética	31
2. EL COMPLEJO DE GOLGI	32
2.1. Estructura	32
2.2. Funciones	33
3. TRÁFICO DE MEMBRANAS ASOCIADO AL COMPLEJO DE GOLGI	34
3.1. Transporte entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi	35
3.1.1. Transporte anterógrado	36
3.1.2. Transporte retrógrado	37
3.2. Transporte intra-Golgi	39
3.3. Transporte post-Golgi	40
II. EL CITOESQUELETO DE ACTINA	41
1. LOS FILAMENTOS DE ACTINA O MICROFILAMENTOS	41
1.1. Estructura	41
1.2. Dinámica	43
1.2.1. Toxinas que alteran la dinámica de los microfilamentos	45
2. ORGANIZACIÓN Y REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA	46
2.1. Proteínas de unión a actina (ABPs)	46
2.2. Proteínas motoras (miosinas)	48
2.3. Nucleadores de actina	48
2.4. RhoGTPasas	50
3. INTERACCIÓN ENTRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y EL COMPLEJO DE GOLGI	51
3.1. Efectos sobre la arquitectura del complejo de Golgi	53
3.2. Efectos sobre la formación de intermediarios de transporte	54
3.2.1. Actina filamentosa	55
3.2.2. Rho-GTPasas y nucleadores de actina	56

3.2.3. Miosinas	57
III. LA H⁺-ATPasa VACUOLAR	58
1. DEFINICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA H ⁺ -ATPasa VACUOLAR	58
2. ESTRUCTURA Y ENSAMBLADO DE LA H ⁺ -ATPasa VACUOLAR	60
2.1. El dominio V ₀	60
2.2. El dominio V ₁	62
2.2.1. Interacción entre el citoesqueleto de actina y la H ⁺ -ATPasa vacuolar	64
2.3. Ensamblaje y localización de la H ⁺ -ATPasa vacuolar	65
2.4. Mecanismo de translocación de protones	67
3. FUNCIONES DE LA H ⁺ -ATPasa VACUOLAR	68
3.1. Funciones de la H ⁺ -ATPasa vacuolar en el tráfico intracelular	69
3.1.1. Funciones de la H ⁺ -ATPasa vacuolar en el complejo de Golgi	70
3.2. Funciones de la H ⁺ -ATPasa vacuolar en la membrana plasmática	71
4. REGULACIÓN DE LA H ⁺ -ATPasa VACUOLAR	73
4.1. Direccionamiento y reciclaje de la H ⁺ -ATPasa vacuolar	73
4.2. Eficiencia de translocación de protones con la hidrólisis del ATP	74
4.3. Disociación reversible de los dominios V ₁ y V ₀ de la H ⁺ -ATPasa vacuolar	76
4.3.1. Implicaciones estructurales de la disociación de los dominios V ₁ y V ₀ de la H ⁺ -ATPasa vacuolar	77
4.3.2. Señales inductoras de la disociación de los dominios V ₁ y V ₀ de la H ⁺ -ATPasa vacuolar	78
5. OTROS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL pH INTRA-GOLGI	80
ANTECEDENTES, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	83
MATERIALES Y MÉTODOS	87
I. MATERIALES	89
1. REACTIVOS	89
2. ANTICUERPOS	89
3. PLÁSMIDOS	91

II. MÉTODOS	91
1. LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES	91
2. TÉCNICAS MORFOLÓGICAS	91
2.1. Inmunocitoquímica y microscopía de epifluorescencia	91
2.2. Análisis cuantitativo de las imágenes	92
2.2.1. Cuantificación de la colocalización de la GFP-subunidad B con los marcadores del complejo de Golgi	92
2.2.2. Cuantificación de la morfología del complejo de Golgi	92
3. Técnicas de microscopía confocal <i>in vivo</i>	93
3.1. Medida de la vida media de la H ⁺ -ATPasa vacuolar en el complejo de Golgi	93
3.2. FRAP inverso	93
3.3. Medidas de pH del complejo de Golgi	94
4. Técnica bioquímicas y de biología molecular	95
4.1. Extractos celulares y <i>western blot</i>	95
4.2. Inmunoprecipitación	96
4.3. Extracción de membranas de Golgi enriquecidas	93
4.4. Fraccionamiento subcelular membrana-citosol	97
4.5. Fraccionamiento de F/G-actina	97
4.6. Aislamiento de membranas resistentes a detergente	98
4.7. Transfección con ADN plasmídico	98
4.8. Transfección con ARN de interferencia	99
4.9. Generación de constructos de las subunidades B	99
5. ENSAYOS DE TRANSPORTE INTRACELULAR	100
5.1. Ensayos de transporte con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G)	100
5.2. Ensayos de transporte de proteínas marcadas con azufre radioactivo	101
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	102
RESULTADOS	103
1. CARATERIZACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR EN EL COMPLEJO DE GOLGI	105
1.1 ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA H ⁺ -ATPasa VACUOLAR A LO LARGO DEL COMPLEJO DE GOLGI	105

2. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS MICROFILAMENTOS EN LA ASOCIACIÓN DE LOS DOMINIOS V₁ Y V₀ DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR	111
2.1. LOS MICROFILAMENTOS MANTIENEN ASOCIADOS LOS DOMINIOS V ₁ Y V ₀ DE LA H ⁺ -ATPasa VACUOLAR	112
2.2. INTERACCIÓN DIRECTA DE LA ACTINA CON LA SUBUNIDAD C PERO NO CON LA SUBUNIDAD B DE LA H ⁺ -ATPasa VACUOLAR	117
2.3. REGULACIÓN DE LA ACTINA SOBRE LA H ⁺ -ATPasa VACUOLAR A TRAVÉS DE LA ORGANIZACIÓN DE LAS BALSAS LIPÍDICAS	119
3. RELEVANCIA DE LAS SUBUNIDADES A Y B EN LA FUNCIONALIDAD DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR EN EL COMPLEJO DE GOLGI	121
3.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES A Y B DEL DOMINIO V ₁ DE LA H ⁺ -ATPasa EN EL pH DEL COMPLEJO DE GOLGI	122
3.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES A Y B DEL DOMINIO V ₁ DE LA H ⁺ -ATPasa EN EL TRANSPORTE PROTEICO EN EL COMPLEJO DE GOLGI	128
3.3. EFECTOS DE LA DEPLECIÓN DEL DOMINIO DE UNIÓN A ACTINA DE LA SUBUNIDAD B DEL DOMINIO V ₁ SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE LA H ⁺ -ATPasa VACUOLAR	134
4. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	137
DISCUSIÓN	141
I. LA H⁺-ATPasa VACUOLAR EN EL COMPLEJO DE GOLGI	143
II. EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR	146
1. MECANISMO DIRECTA	149
2. MECANISMO INDIRECTO	151
III. LA IMPLICACIÓN DEL DOMINIO V₁ DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR EN TRÁFICO INTRACELULAR ASOCIADO AL COMPLEJO DE GOLGI	152
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	161
ANEXO	191

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos	GAG	Glucosaminoglicanos
ABD	del inglés <i>Actin-binding domain</i>	GalT	Galactosil transferasa
ABP	del inglés <i>Actin binding protein</i>	GAP	del inglés <i>GTPase-Activating protein</i>
AP	del inglés <i>Activator protein</i>	GEF	del inglés <i>Guanine nucleotide exchanger factor</i>
Arf1	del inglés <i>ADP-ribosylation factor 1</i>	GFP	del inglés <i>Green fluorescent protein</i>
Baf A1	Bafilomicina 1	GFP-B	GFP-subunidad B
BFA	Brefeldina	GFP-B(ΔABD)	GFP-subunidad B sin el dominio de unión a actina
B-GFP	subunidad B-GFP	GIC	del inglés <i>Golgi-derived detergent-insoluble complexes</i>
BSA	del inglés <i>Bovine serum albumin</i>	-Glu/FBS	Cultivo sin suero y sin glucosa
CGN	Red <i>cis</i> -Golgi	Golgi	Complejo de Golgi
CHX	Cicloheximida	GPI	Glicosilfosfatidilinositol
COP	Coatómero	IF	Inmunofluorescencia
Cys	Cisteína	iFRAP	del inglés <i>Inversal fluorescence recovery after bleaching</i>
DRM	del inglés <i>Detergent resistant membrane</i>	IP	Inmunoprecipitación
EndoH	Endo-β-N-acetilglucosaminidasa H	IT	Intermediarios de transporte
ERES	del inglés <i>ER exit sites</i>	JpK	Jasplakinolide
ERGIC	del inglés <i>ER/Golgi intermediate compartment</i>	KDEL	Receptor KDEL
F-actina	Actina filamentosa	LtB	Latrunculina B
FBS	del inglés <i>Fetal bovine serum</i>	M6PR	del inglés <i>Manose-6-phosphat receptor</i>
FRET	del inglés <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>		
G-actina	Actina globular		

Abreviaturas

Met	Metionina	siRNA	ARN de interferencia
MET	Microscopía electrónica de transmisión	SNAP	del inglés Soluble N-ethyl-maleimide attachment protein
MFs	Microfilamentos	SNARE	del inglés Soluble N-ethyl-maleimide attachment protein receptor
MP	Membrana plasmática	StxB	Toxina de <i>Shigella</i>
MTs	Microtúbulos	TBS	del inglés <i>Tris-buffered saline</i>
NPF	del inglés Nucleation promoting factor	TBS-T	del inglés <i>Tris-buffered saline containing 1% Tween-20</i>
PBS	del inglés <i>Phosphate buffer saline</i>	TfR	Receptor de transferrina
PCR	del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>	TGN	Red <i>trans</i> -Golgi
PFA	Paraformaldeido	V-ATPasa	H ⁺ -ATPasa Vacuolar
PI3K	Fosfoinositol-3-quinasa	VSV-G	Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular
PKA	Proteína quinasa A	VTC	del inglés <i>Vesicular tubular clusters</i>
PKF	Fosfofructosa quinasa	WB	del inglés <i>Western blot</i>
RE	Retículo endoplasmático		

INTRODUCCIÓN

I. TRÁFICO INTRACELULAR DE MEMBRANAS

1. VÍAS DE TRÁFICO INTRACELULAR

A lo largo de la evolución, la célula eucariota ha desarrollado un conjunto de compartimentos intracelulares, denominados orgánulos, que permiten optimizar y organizar reacciones bioquímicas. Estos compartimentos necesitan estar comunicados entre sí y con el exterior por rutas o vías de transporte que les permitan intercambiar moléculas específicas para mantener la integridad y funcionalidad de la célula (Zierath y Lendahl, 2013). Las moléculas que viajan a través de estas rutas de transporte son (glico)proteínas, (glico)lípidos y sustancias inorgánicas, que en su conjunto reciben el nombre genérico de *cargo*. El transporte del *cargo* se realiza a través de intermediarios de transporte (ITs) que pueden tener forma vesicular, túbulo-vesicular o tubular (van Meer, 2010). Los ITs se mueven sobre elementos del citoesqueleto, que actúan como soporte estructural, y su movimiento se da gracias a la acción de las proteínas motoras. Las distintas vías de transporte intracelular se pueden clasificar siguiendo un criterio funcional (**Fig. 1**).

1.1. La vía endocítica y de reciclaje

La ruta endocítica es la vía por la cual la célula incorpora proteínas, lípidos o elementos exógenos que se encuentran en la membrana plasmática (MP) o en el espacio extracelular. El *cargo* se internaliza primeramente a los endosomas tempranos, luego a los endosomas tardíos y finalmente a los lisosomas, a la red *trans*-Golgi (TGN) o bien hacia los endosomas de reciclaje (**Fig. 1**). Dependiendo del tamaño y la naturaleza de las sustancias que van a ser endocitadas, hablamos de fagocitosis o de pinocitosis (Conner y Schmid, 2003). La **fagocitosis** es un tipo de endocitosis, empleado por macrófagos y células dendríticas del sistema inmune, para internalizar partículas de gran tamaño como bacterias, parásitos intracelulares o complejos inertes que acaban siendo digeridos por los lisosomas. La **pinocitosis**, en cambio, es la vía por la que se internalizan macromoléculas y fluidos, es responsable del constante intercambio de material en la MP (Doherty y McMahon, 2009). Esta vía se divide en diferentes subclases: la macropinocitosis, la endocitosis clatrina-dependiente, la caveolina-dependiente y la clatrina y caveolina-independiente. En la **macropinocitosis** se generan protrusiones de la MP que se colapsan y fusionan endocitando así elementos exógenos (Jones, 2007). La **endocitosis clatrina-dependiente** es constitutiva y crucial para la comunicación intercelular durante el desarrollo de tejidos y órganos (Seto et al., 2002) y para la homeostasis celular. Los ITs que

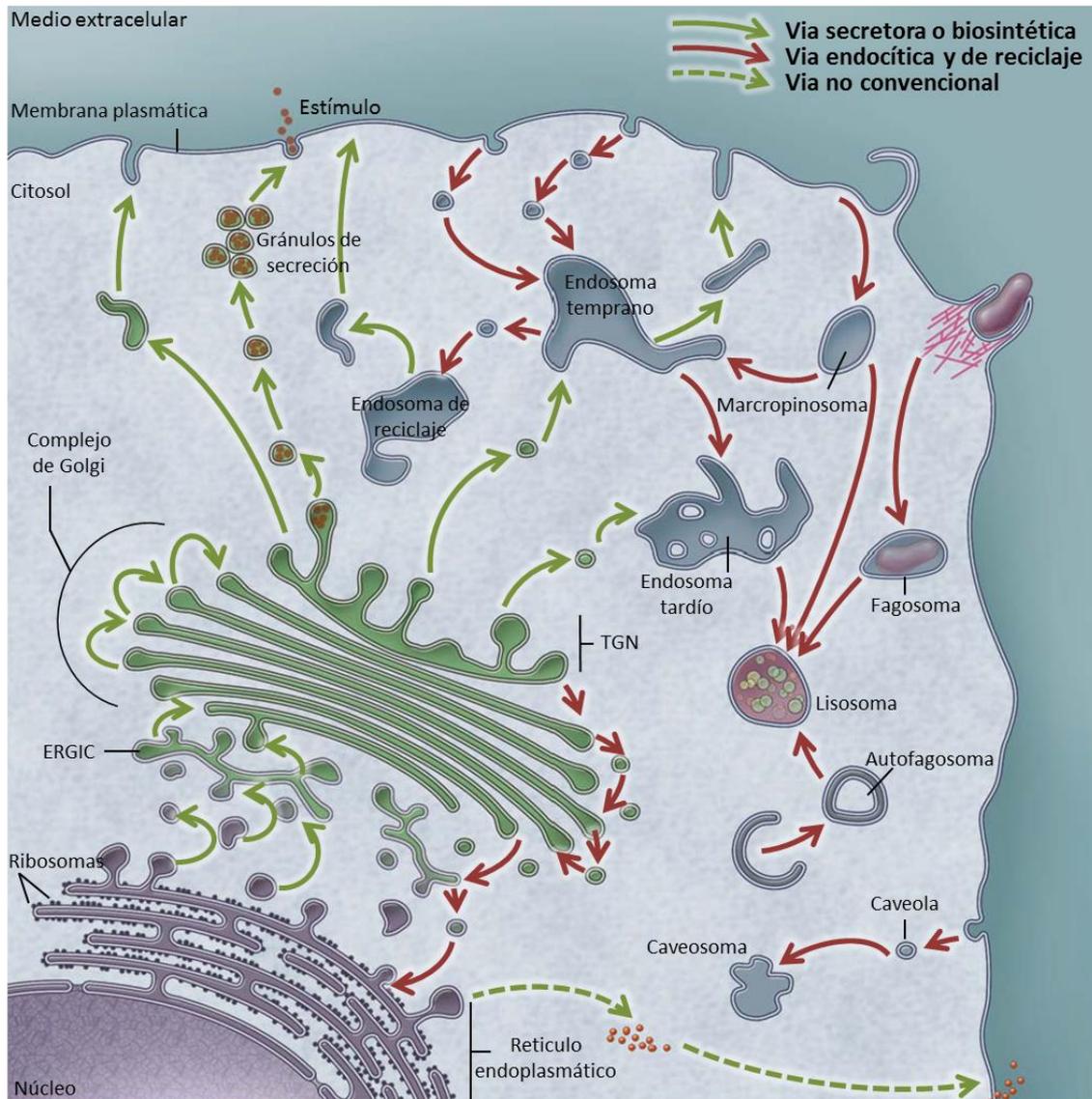


Figura1. Vías de tráfico intracelular. En la vía secretora, el cargo sintetizado en el RE es transportado primeramente a ERGIC y de ahí al complejo de Golgi. Las proteínas de transporte son devueltas al RE. Una vez alcanzado el TGN, el cargo es transportado a la MP, al sistema endo/lisosomal o a los gránulos de secreción en células especializadas. En la vía endocítica, el cargo se internaliza desde la MP hacia los compartimentos endosomales donde se dirigen hacia los lisosomas o el complejo de Golgi. La vía de reciclaje devuelve parte del cargo endocitado hacia la superficie celular por la acción de los endosomas de reciclaje. En la secreción no convencional se transportan proteínas desde el RE hacia la MP sin pasar por el complejo de Golgi (modificado de De Matteis & Luini 2011).

participan en este proceso están recubiertos por trisqueliones de clatrina, que tras el reconocimiento ligando-receptor se asocian a la membrana deformándola para formar los ITs (Robinson y Bonifacino, 2001). La **endocitosis caveolina-dependiente** está mediada por unas estructuras denominadas caveolas que se encuentran en microdominios de la MP ricos en

colesterol y esfingolípidos. La forma y la organización estructural de las caveolas viene dada por la caveolina, una proteína que se une al colesterol. A través de estas vesículas se captan las moléculas de pequeño tamaño y de naturaleza hidrofóbica como glicoesfingolípidos, colesterol y ciertas proteínas con afinidad para formar microdominios de membrana (van Deurs et al., 2003). A parte de las caveolas, existen otros microdominios en la MP ricos en colesterol y esfingolípidos, comúnmente denominados balsas lipídicas o *lipid rafts*. En estas balsas es donde tiene lugar la internalización de moléculas de forma clatrina- o caveolina-independiente. Esta vía se puede clasificar en procesos: dependientes de RhoA y Cdc42, mediados por flotilina o asociados a Arf6 (Sandvig et al., 2011).

Hay ciertas moléculas que, tras ser endocitadas y haber liberado el *cargo*, son devueltas a la MP para volver ejercer su función. La ruta responsable de este proceso es la **vía de reciclaje**. Esta vía es la que emplean la mayoría de receptores. Por ejemplo, el receptor de transferrina una vez endocitado se separa de su *cargo* y vuelve a la MP pasando por los endosomas de reciclaje (Maxfield y McGraw, 2004). La vía de reciclaje podría considerarse una combinación de endocitosis y secreción.

1.2. La vía secretora o biosintética

La vía secretora es la ruta que siguen los componentes sintetizados en el retículo endoplasmático (RE) para ser transportados a su destino final, ya sea la MP, el espacio extracelular u otros orgánulos (**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 transportar las proteínas y lípidos recién sintetizados hacia su destino final (Ponnambalam y Baldwin, 2003). Por lo contrario, la **secreción regulada** solo se da en respuesta a un estímulo, ya sea intra- o extracelular, como por ejemplo iones calcio, hormonas o factores de crecimiento (Blázquez y Shennan, 2000). En este tipo de secreción, el *cargo* no se libera inmediatamente, si no que una vez sintetizado se acumula en vesículas o gránulos de secreción hasta la llegada del estímulo. La secreción regulada sólo se da en determinados tipos celulares como neuronas o células (neuro) endocrinas, 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**. Se caracteriza por ser una ruta independiente del transporte mediado por ITs que no pasa ni por el ER ni por el complejo de Golgi. Esta vía la siguen proteínas como por ejemplo el factor de crecimiento de fibroblastos 2 o la interleuquina 1 β que una vez

sintetizados son secretadas desde el citoplasma directamente al espacio extracelular (Malhotra, 2013; Nickel, 2005).

2. EL COMPLEJO DE GOLGI

El complejo de Golgi es un orgánulo presente en todas las células eucariotas que actúa como estación central de la vía secretora (Egea, 2001). Su función principal es la modificación post-traducciona l de lípidos y proteínas sintetizados en el RE, además de la distribución del *cargo* (Farquhar y Palade, 1998). Se localiza en la región perinuclear asociado al centrosoma (Rios y Bornens, 2003) y está compuesto por un número variable de cisternas aplanadas y apiladas agrupadas formando un dictiosoma o *stack*.

2.1. Estructura

El complejo de Golgi aparece con una morfología única que puede variar en función del tipo celular. Gracias a la interacción de este orgánulo con los microtúbulos (MTs) y las proteínas asociadas a estos, siempre lo encontramos localizado cerca del núcleo y alrededor del centrosoma (Rios y Bornens, 2003) (**Fig. 2A**). El complejo de Golgi está formado por un número variable de cisternas apiladas, con una región central aplanada y los laterales dilatados (**Fig. 2B**). Las cisternas están interconectadas mediante un sistema túbulo-vesicular dinámico que les permite el intercambio de material (Képès et al., 2005; Ladinsky et al., 1999; Lowe, 2011). Debido a la complejidad funcional del complejo de Golgi, los *stacks* están polarizados morfológica, molecular y funcionalmente. De esta manera podemos diferenciar una cara *cis*, por donde entra el *cargo* sintetizado en el RE, una cara *trans* donde el *cargo* ya procesado es clasificado y liberado, y un conjunto de cisternas intermedias muy compactas que constituyen la parte *medial*. Las caras *cis* y *trans* están asociadas a una red túbulo-vesicular muy dinámica que las conecta con los orgánulos secretores adyacentes. De esta manera, entre el RE y la cara *cis* del Golgi encontramos la red tubular *cis* del Golgi (*cis-Golgi network* o CGN) donde tiene lugar la entrada de *cargo*; mientras que la clasificación y salida de *cargo* tiene lugar en la red tubular *trans* del Golgi (*trans-Golgi network* o TGN), localizada entre la cara *trans* y la MP o compartimentos endosomales (Rambourg y Clermont, 1997).

2.2. Funciones

El complejo de Golgi proporciona la compartimentación necesaria para la modificación post-traduccional de lípidos y proteínas. Para llevar a cabo estas modificaciones, se transportan azúcares y nucleótidos desde el citoplasma hacia el lumen de las cisternas del Golgi.

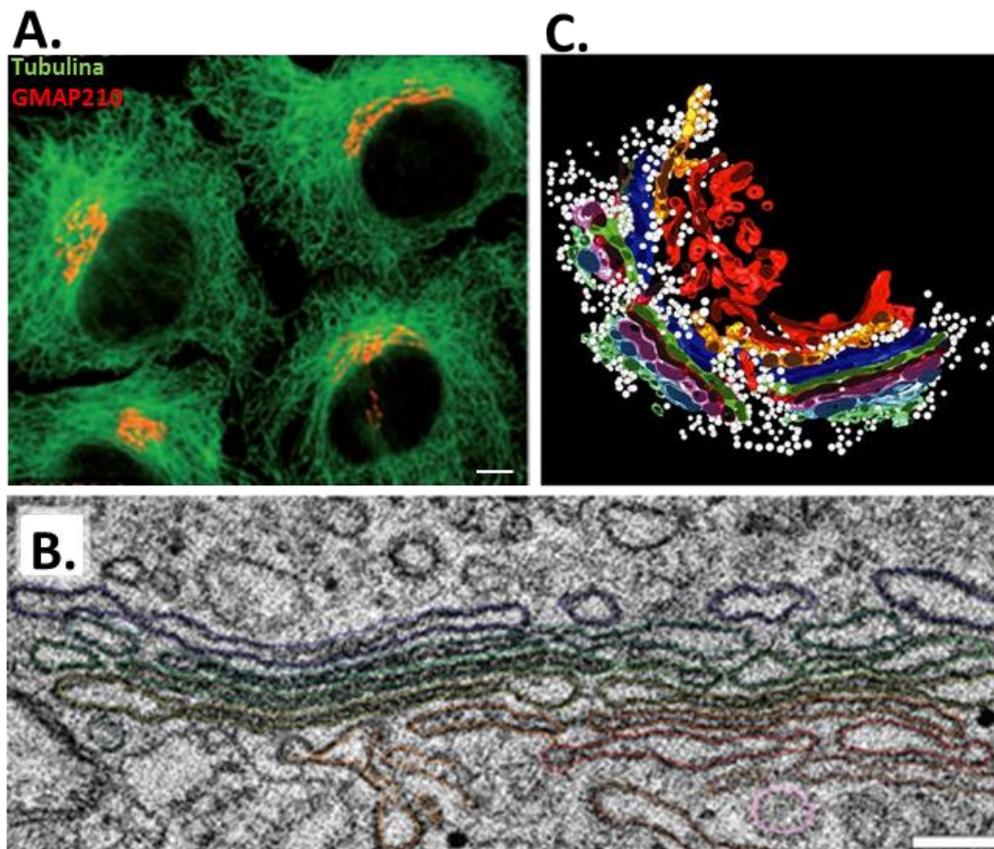


Figura 2. Localización y organización del complejo de Golgi. A. Imagen de microscopía óptica en la que se observa los MTs (anti- β -tubulina) y el complejo de Golgi (anti-GMAP210). Escala Bar, 5 μ m (modificado Egea & Ríos 2007). Tomografía electrónica (B) y reconstrucción tridimensional (C) en la que se muestran las cisternas de Golgi coloreadas agrupadas lateralmente formando un stack y las numerosas vesículas que la rodean en blanco. Escala Bar, 200 nm (modificado de Egea et al. 2006; Marsh & Howell 2002)

Una de las modificaciones post-traduccionales más comunes es la **glicosilación**. La mayoría de proteínas son glicosiladas en el RE mediante la adición de oligosacáridos ramificados sobre residuos de ácido aspártico (N-glicosilación). Las glicosilasas y glicosiltransferasas del complejo de Golgi completan la N-glicosilación a medida que las proteínas pasan a través de las cisternas. Por otra parte, hay proteínas que sólo se glicosilan en el Golgi, en sus residuos de serina o treonina, a este proceso lo llamamos O-glicosilación. Que estas modificaciones se den

correctamente es esencial para seleccionar el destino final y la correcta funcionalidad de las proteínas. Por ejemplo, en algunos casos se requiere un residuo glucídico concreto para que la proteína pueda ser destinada a un compartimento determinado. En este sentido, los enzimas lisosomales contienen manosa-6-fosfato terminal en sus cadenas de oligosacáridos que será reconocido en el TGN por la maquinaria molecular que los enviará a los lisosomas (Hillebrecht, 1995). Otro ejemplo, son las proteínas con anclaje de glicosilfosfatidilinositol o GPI, glicosilación que determina su localización en la MP apical de las células polarizadas (Benting et al., 1999). Hay otros casos las glicosilaciones son necesarias para estabilizar la conformación de la proteína.

En el Golgi se sintetizan gran cantidad de carbohidratos, incluyendo la producción de glucosaminoglicanos (GAGs), largos polisacáridos que son anclados a proteínas sintetizadas en el RE, formando los proteoglicanos, que serán transportados al espacio extracelular donde formaran parte de la matriz. Sin embargo, la glicosilación no es exclusiva de las proteínas, sino que también tiene lugar en los lípidos. Así, los glicoesfingolípidos se sintetizan en el Golgi tras la adición de azúcares a la ceramida sintetizada en el RE (Merrill, 2002).

En el complejo de Golgi se producen otras modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo: la fosforilación, hay ciertas proteínas solubles que necesitan ser fosforiladas para ser enviadas a los lisosomas; la sulfatación de proteoglicanos y ciertos aminoácidos (aa); la proteólisis, que es esencial para la activación de ciertas moléculas; y también recordar la participación del complejo de Golgi en el reciclaje de la MP mediante la fusión de elementos vesiculares o tubulares.

Recientemente, se ha propuesto que el complejo de Golgi podría tener un papel central en la señalización intracelular, ya que numerosas moléculas señalizadoras, como proteínas G o quinasas, se encuentran asociadas a este orgánulo. Se han encontrado evidencias de que el complejo de Golgi podría estar participando en la señalización generando el mismo la señal o bien modulando señales provenientes de la MP, especialmente asociados a la llegada y/o salida del *cargo* (Cancino y Luini, 2013).

3. TRÁFICO DE MEMBRANAS ASOCIADO AL COMPLEJO DE GOLGI

Como hemos mencionado anteriormente, en el complejo de Golgi se centraliza y organiza gran parte del tráfico intracelular, lo que lo convierte en un orgánulo altamente dinámico. Por un lado, este orgánulo, recibe un aporte constante de membrana y *cargo* por la fusión de ITs procedentes del RE y de los endosomas, y por otro lado, una gran porción de membrana se

pierde por la fisión de los IT generados en el Golgi y dirigidos hacia otros orgánulos, la MP o el espacio extracelular. Estos dos procesos deben estar altamente regulados para garantizar que el balance neto de membrana sea nulo y poder mantener la funcionalidad y estructura del complejo de Golgi. Hay que tener en cuenta que este equilibrio se adapta a las demandas requeridas en cada momento por la célula delante de un estímulo (proliferación, diferenciación, señalización, invasión de patógenos, etc). Alteraciones en el tráfico de membrana pueden afectar al equilibrio aporte-consumo de membrana y al potencial osmótico del lumen del Golgi afectando así a la estructura y funcionalidad del orgánulo.

3.1. Transporte entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi

Una de las peculiaridades del transporte entre el RE y el complejo de Golgi es que se trata de un transporte bidireccional. De esta manera, llamamos transporte anterógrado al flujo de membrana desde el RE al Golgi, y transporte retrógrado al flujo que va en sentido contrario (Brandizzi y Barlowe, 2013).

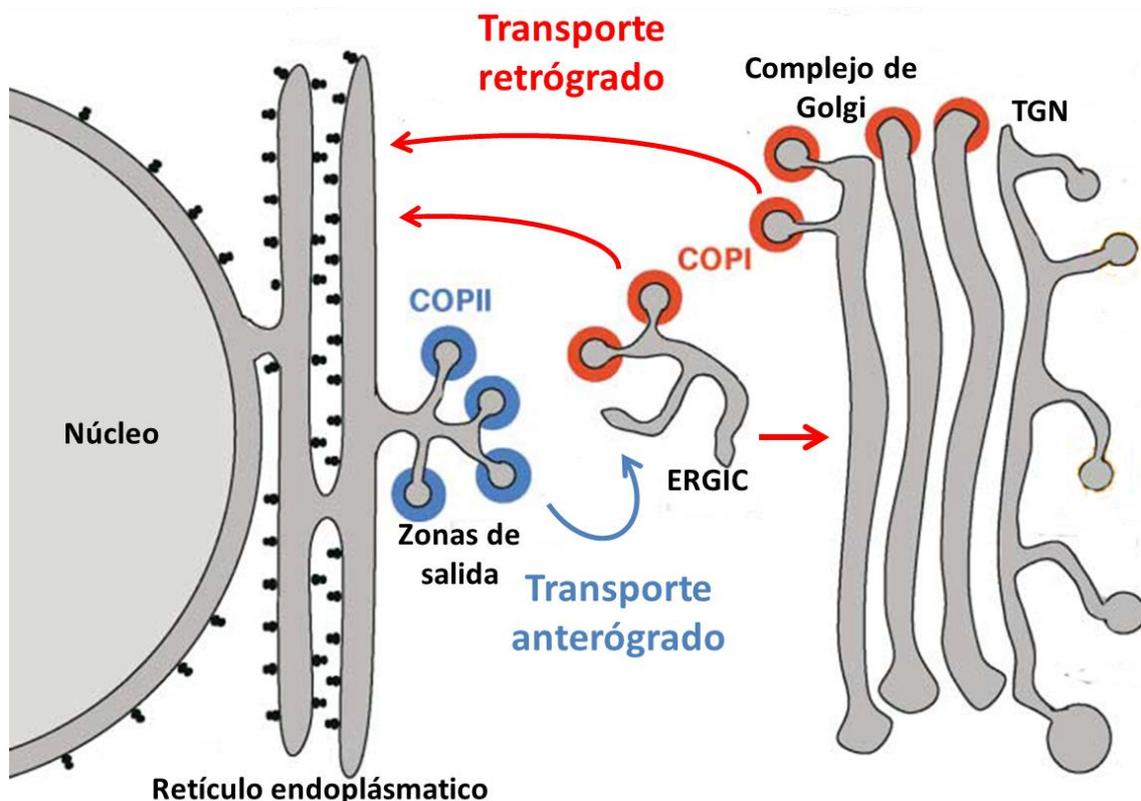


Figura 3. Transporte entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi. El transporte entre el RE y el complejo de Golgi ocurre en varios pasos. Las gemas nascentes formadas en las zonas de salida del RE forman vesículas COPII

que serán transportadas hasta el ERGIC. El cargo se dirigirá del ERGIC al Golgi a través de conexiones tubulares o la fusión de elementos del ERGIC. Las proteínas residentes del RE regresan desde el ERGIC o el Golgi mediante vesículas COPI (modificado de Bonifacino & Glick 2004).

La maquinaria molecular que participa en ambos sentidos es similar ya que los ITs que median este intercambio son vesículas recubiertas de COP. Estas cubiertas o *coats* son complejos multiproteicos que se ensamblan en la membrana donadora y la deforman para formar de las vesículas de transporte (Schekman y Orci, 1996). Existen dos tipos de cubiertas COP: las COPI y las COPII. Las vesículas COPII median el transporte anterógrado, mientras que las COPI están implicadas en el retrógrado (Barlowe et al., 1994), aunque también se postula que podrían participar en el transporte anterógrado (Barlowe et al., 1994). La existencia de dos tipos de cubiertas distintas permite garantizar la direccionalidad del transporte (**Fig. 3**).

3.1.1. Transporte anterógrado

La vía anterógrada es la ruta que utilizan los lípidos y proteínas sintetizados en el RE para dirigirse al complejo de Golgi. Para la salida del RE el *cargo* es empaquetado en vesículas COPII en unos dominios altamente especializados de la membrana del RE llamados sitios de salida o *ER exit sites* (ERES) (Palade, 1975; Sesso et al., 1994). Estos dominios se encuentran en las membranas del RE encaradas hacia el *cis*-Golgi y carecen de ribosomas (**Fig. 3**).

Las **vesículas COPII** reciben este nombre porque su formación requiere el ensamblaje del complejo multiproteico COPII, o *coat protein complex II* (COPII), formado por: La GTPasa Sar1 y dos subcomplejos Sec23/24 y Sec13/31. Estos componentes son reclutados a la membrana del RE y su ensamblaje producirá la curvatura de membrana necesaria para la formación y fisión de la vesícula (Barlowe, 1998; Kirchhausen, 2007). Aunque tiene lugar la difusión pasiva de *cargo* dentro de las vesículas COPII en formación las subunidades del complejo reconocen *cargos* concretos optimizando la salida selectiva (Aridor et al., 1998; Meta J. Kuehn, 1998).

Las vesículas COPII generadas en RE no viajan directamente al complejo de Golgi, sino que se fusionan entre sí formando una estructura membranosa túbulo-vesicular (VTC, *vesicular tubular clusters*) entre el RE y el Golgi. Este compartimento intermedio es conocido como ERGIC (*ER/Golgi intermediate compartment*) (Bannykh y Balch, 1997; Hauri y Schweizer, 1992). Para explicar el transporte desde el ERGIC hasta el *cis*-Golgi existen dos hipótesis: La primera propone que este transporte se da a través de vesículas COPI, mientras que la otra sugiere que los elementos membranosos del ERGIC se fusionan para formar la primera cisterna de Golgi (Lippincott-schwartz et al., 2000; Rabouille y Klumperman, 2005).

3.1.2. Transporte retrógrado

Las proteínas residentes del RE contienen una señal para ser retenidas en este orgánulo (Munro y Pelham, 1987). Sin embargo algunas de ellas se escapan y acaban llegando al complejo de Golgi. El transporte retrógrado es el encargado de retornar al RE todas esas proteínas solubles o de membrana que han escapado (Lee et al., 2004). Las proteínas que ciclan entre los dos compartimentos, como el receptor de KDEL (KDELRL), también usan esta vía para trasladarse desde el Golgi hacia el RE. Finalmente, el transporte retrógrado permite consumir una elevada cantidad de membrana que llega al Golgi desde el RE por la vía anterógrada, lo que podría suponer un trastorno de su función y estructura (Storrie, 2005) (Fig.3).

Los ITs que median este transporte retrógrado están recubiertos por el **coatmero o complejo proteico COPI** (*coat protein complex I*), por lo que los llamamos ITs de tipo COPI (Kreis y Pepperkok, 1994). El COPI es un complejo heptamérico formado por las subunidades α , β , β' , γ , σ , ϵ y ζ , que son reclutadas en bloque a la membrana de Golgi gracias a la activación del *ADP-ribosylation factor 1* (Arf1). El reclutamiento de estas subunidades promueve la deformación necesaria de la membrana para generar la vesícula (Popoff et al., 2011). También se ha descrito que las vesículas COPI podrían estar implicadas en el transporte bidireccional a través de las cisternas de Golgi (Orci et al., 2000).

La mayoría de proteínas solubles residentes del RE contienen una secuencia de 4 aa en su extremo carboxilo llamada KDEL (donde K es una lisina, D el ácido aspártico, E el ácido glutámico y L la leucina) (Lewis y Pelham, 1990). Esta secuencia es reconocida por un receptor que cicla entre el RE y el Golgi, el receptor KDEL (KDELRL). Cuando el receptor reconoce una proteína con secuencia KDEL en el complejo de Golgi se une a ella y la lleva de regreso al RE mediante transporte retrógrado tipo COPI. Se cree que la unión de ligando-receptor desencadena el reclutamiento de la maquinaria COPI (Capitani y Sallèse, 2009). Ensayos in vitro han demostrado que la afinidad del KDELRL con su ligando es altamente sensible al pH, lo que indica que las diferencias de ambiente luminal entre el Golgi y el RE podrían ser las responsables de la liberación del ligando en el RE (Wilson et al., 1993). En referencia a las proteínas transmembrana residentes del RE, contienen en su extremo carboxilo, encarado al citoplasma, la secuencia KKXX (donde K es lisina y X cualquier otro aa). Esta secuencia es reconocida por componentes de la maquinaria COPI que se encargan de retornar estas proteínas al RE a través del transporte retrógrado COPI (Nilsson et al., 1989).

Sin embargo, el transporte retrógrado no se limita a los ITs de tipo COPI. Las primeras evidencias de la existencia de un sistema de transporte independiente de COPI surgieron con la identificación de la GTPasa de Golgi Rab6. Se observó que su sobreexpresión, o la del

mutante constitutivamente activo (Rab6-GTP), provocaba la redistribución del Golgi al RE, a raíz del exceso de flujo retrogrado de membrana (Martinez et al., 1997). Estudios con toxinas bacterianas, como la toxina B de *Shigella* (StxB), demostraron que la inhibición del transporte COPI no afectaba a su transporte del Golgi al RE, mientras que este era dependiente de la actividad Rab6 (Girod et al., 1999).

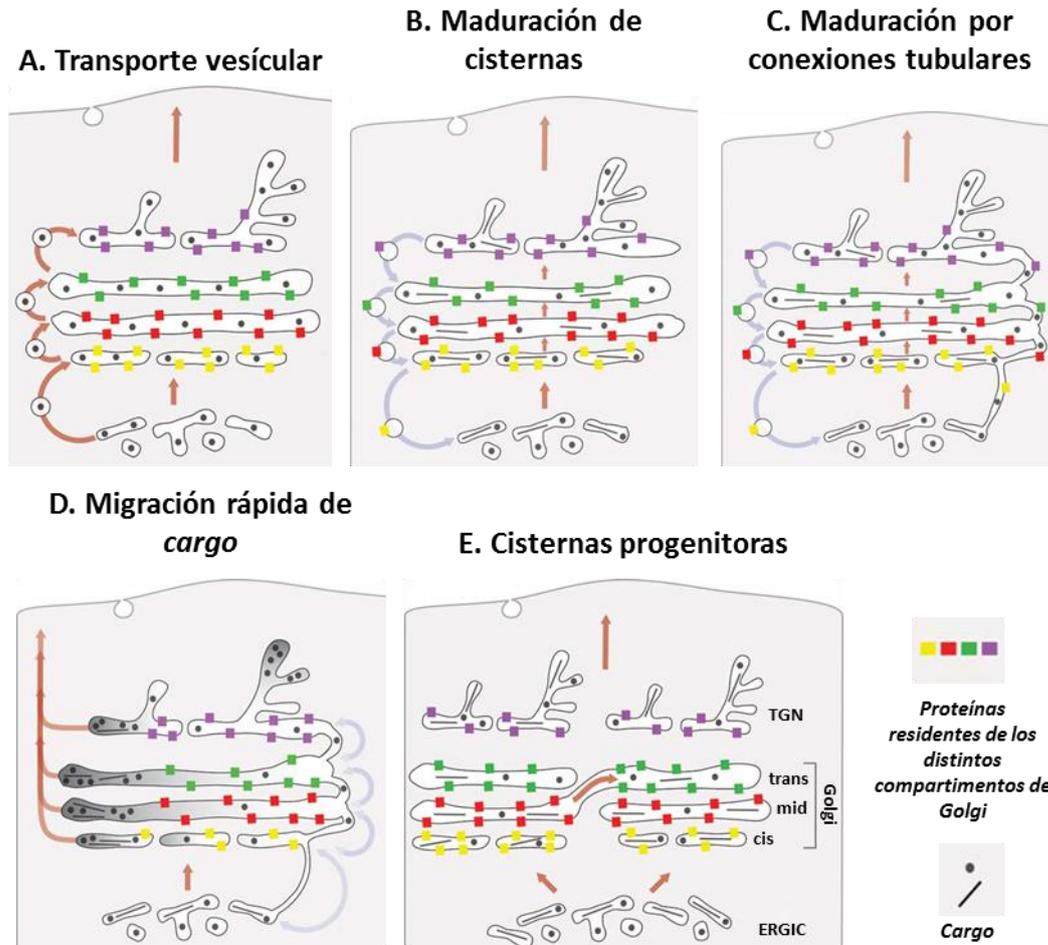


Figura 4. Modelos de transporte intra-Golgi. A. transporte anterógrado de vesículas entre cisternas estables. Los compartimentos de Golgi son estables y bioquímicamente distintos, el cargo viaja entre ellos mediante vesículas COPI. B. Maduración de cisternas. Las cisternas transportan el cargo hacia el TGN y son vesículas COPI cargadas con proteínas residentes las que viajan en sentido retrógrado. C. Maduración de cisternas por conexiones tubulares. Las cisternas están conectadas a través de túbulos que permiten el paso de cargo y proteínas residentes de Golgi. D. Migración rápida del cargo. El complejo de Golgi se considera un único compartimento con dominios de exportación y de procesamiento. E. Cisternas progenitoras. El transporte de cargo se da por fisión y fusión de las distintas cisternas (modificado de Glick y Luini, 2011).

3.2. Transporte intra-Golgi

Una vez el *cargo* llega a la cara *cis* del complejo de Golgi debe viajar a través de todas las cisternas, donde será modificado, para finalmente alcanzar la cara *trans* y dirigirse a su destino final. Las rutas y mecanismos de esta vía todavía se debaten. Aparte de los dos modelos clásicos de transporte intra-Golgi como el transporte anterógrado de vesículas entre cisternas estables (A), y la maduración de cisternas (B), han aparecido nuevos modelos la maduración de cisternas por transporte tubular (C), la migración rápida de *cargo* dentro del lumen mixto de Golgi (D), y compartimentos estables como cisternas progenitoras (E) (Glick y Luini, 2011) (**Fig. 4**).

En el **modelo de transporte vesicular (Fig.4A)**, el Golgi se considera un conjunto de cisternas estables donde cada compartimento contiene un set único de proteínas residentes (mayormente enzimas de glicosilación), el *cargo* se mueve de un compartimento a otro en vesículas COPI que se forman en los extremos laterales de las cisternas (Rothman y Wieland, 1996).

Por el contrario, en el **modelo de maduración de cisternas (Fig.4B)**, éstas se consideran transportadores transitorios (Rabouille y Klumperman, 2005). Se propone que la primera cisterna de la cara *cis* del Golgi se forma a partir de la fusión de ITs procedentes del RE (Mironov et al., 2003) y ésta maduraría gradualmente hasta convertirse en una cisterna del TGN, la cual se fragmentaría para formar los ITs. En este modelo, las cisternas son las encargadas de transportar el *cargo*, mientras que las vesículas COPI viajarían en sentido retrogrado transportando las proteínas residentes de Golgi desde las cisternas más maduras hasta las inmediatamente anteriores (Glick y Malhotra, 1998). Este modelo puede complementarse con el **modelo de maduración de cisternas a través de transporte tubular (Fig.4C)**. Se ha observado, gracias a técnicas de microscopía electrónica, que las cisternas de Golgi presentan conexiones tubulares (Mironov et al., 1997; Trucco et al., 2004) que permitirían el transporte anterógrado rápido del *cargo*, el transporte retrógrado de las proteínas residentes de Golgi, y/o ambas (Mironov et al., 2001).

El **modelo de la migración rápida (Fig.4D)** propone que el complejo de Golgi actuaría como un único compartimento con dominios de exportación y dominios de procesamiento, y por lo tanto, el *cargo* procedente del RE se separaría entre estos dos dominios para ser dirigido a su destino final (Patterson et al., 2008).

Finalmente, el **modelo de compartimentos estables como cisternas progenitoras (Fig.4E)** propone que el complejo de Golgi actuaría como un conjunto estable de compartimentos con

dominios definidos por la composición de Rab GTPasas. El transporte de *cargo* involucraría la continua fusión y fisión de las cisternas entre *stacks* adyacentes (Pfeffer, 2010).

3.3. Transporte post-Golgi

Después de la síntesis en el RE y de cruzar el complejo de Golgi, el *cargo* se clasifica en el TGN para ser dirigido a los diferentes destinos finales. En el TGN se encuentra la maquinaria de clasificación que controla las múltiples vías dirigidas a los compartimentos aceptores: membrana plasmática (apical y basolateral en células polarizadas), endosomas, gránulos de secreción y otros compartimentos especializados (De Matteis y Luini, 2008). La clasificación del *cargo* en los distintos ITs requiere la interacción específica entre la señal de clasificación del *cargo* y los componentes de la cubierta de los ITs (F. Gu, C.M. Crump, 2006; Rodríguez-Boulan y Müsch, 2005; Rodríguez-Boulan et al., 2005).

En función del destino final del *cargo* podemos encontrar una gran variedad de señales de clasificación. En las proteínas dirigidas a endosomas y en algunas dirigidas a la MP basolateral de las células polarizadas, encontramos *sorting motifs* (motivos de clasificación). Se trata de secuencias específicas de aminoácidos (aa) localizados en la parte citosólica de los *cargos* transmembrana o de los receptores de los *cargos* solubles. Estas secuencias pueden estar basadas en tirosina, NPXY (donde N es asparagina, P prolina, X cualquier aa y Y tirosina) o YXXØ (donde Y es tirosina, X cualquier aa y Ø un aa hidrofóbico); o bien, basadas en leucina, con DXXLL (donde D es ácido aspártico, X cualquier aa y L leucina) (Bonifacino y Traub, 2003).

Las modificaciones post-traduccionales también pueden ser señales de clasificación. Por ejemplo, los N- y O-glicanos actúan como señales luminales para ciertas moléculas dirigidas a la membrana apical (Potter et al., 2004; Yeaman et al., 1997). La afinidad de ciertas proteínas para microdominios de membrana enriquecidos en esfingomielina y colesterol también se considera un mecanismo para el direccionamiento hacia la membrana apical, es el caso de las proteínas ancladas a GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Schuck y Simons, 2004). Esta es la base para la hipótesis de formación de *lipid rafts*, donde estos y las proteínas asociadas actuarían como plataforma para el direccionamiento apical. Existen otras señales de clasificación como puede ser la ubiquitinización para las proteínas endosomales (Piper y Luzio, 2007), la fosforilación en algunas proteínas de membrana o la formación de agregados.

Una vez seleccionado el *cargo*, éste se retiene en dominios específicos de la membrana del TGN que formarán estructuras túbulo-vesiculares, excluyendo así proteínas residentes del Golgi y *cargos* con otros destinos (Keller et al., 2001). Estas estructuras túbulo-vesiculares se elongarán progresivamente a través de los MTs hasta producirse la fisión de las membranas

para generar los distintos ITs. Hay que tener en cuenta que los ITs derivados del TGN, a pesar de tener proteínas de cubierta para su formación, éstas no son específicas (Campelo y Malhotra, 2012).

II. EL CITOESQUELETO DE ACTINA

A lo largo de la evolución, la célula eucariota ha desarrollado una estructura de soporte que llamamos citoesqueleto. Se trata de una estructura compleja distribuida por toda la célula imprescindible para mantener la morfología celular, para migrar y para dividirse. Existen tres tipos de biopolímeros que componen el citoesqueleto: los filamentos de actina o microfilamentos (MFs), los filamentos intermedios y los microtúbulos. A su vez, existen una serie de proteínas asociadas a estos biopolímeros que regulan su organización y su dinámica de polimerización-despolimerización.

El citoesqueleto de actina puede organizarse formando distintas estructuras. Por ejemplo, para definir y mantener la morfología celular, los MFs se asocian formando una red debajo la membrana plasmática que constituirá el córtex. Los MFs también participan en la formación de estructuras de locomoción como los filopodios, lamelipodios y ondulaciones de membrana (o *ruffling*) (Small et al., 2002). La implicación de los MFs en el transporte intracelular es bien conocida, formando “carriles” por los que los motores moleculares (miosinas) conducirán moléculas y estructuras membranosas. Por otro lado, la fuerza generada por la polimerización de actina puede ser usada para propulsar virus, bacterias y ciertos orgánulos a través del citoplasma gracias a la formación de los “cometas” de actina (Pollard y Borisy, 2003). Los MFs también son indispensables para la correcta ejecución del ciclo celular, ya que intervienen en la formación del anillo contráctil de actomiosina subcortical necesario para la citoquinesis (Field et al., 1999) y en el empaquetamiento de cromosomas durante la mitosis en oocitos (Lénárt et al., 2005).

1. LOS FILAMENTOS DE ACTINA O MICROFILAMENTOS

1.1. Estructura

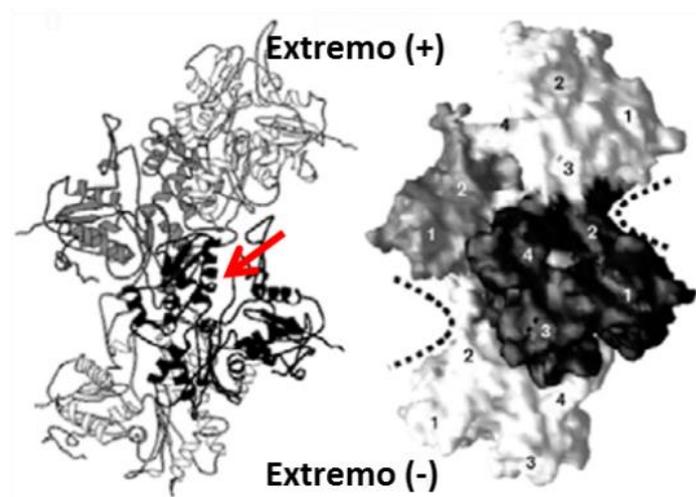
Los MFs son biopolímeros compuestos por la proteína actina. Esta se encuentra altamente conservada entre miembros de especies muy divergentes. Es una de las proteínas más

Introducción

abundantes en la célula (constituye un 15% de la total) y se trata de una proteína globular compuesta por 375 aa con un peso molecular de 43 kDa.

En un sistema *in vitro*, las moléculas de actina se pueden presentar como monómeros, constituyendo lo que llamamos la actina globular libre (G-actina) o bien en forma polimerizada formando filamentos a lo que le llamaremos actina filamentosa (F-actina) (Sheterline et al., 1995). Mediante análisis cristalográfico, se ha observado que los monómeros de actina están divididos en cuatro dominios, agrupados en dos lóbulos separados por una hendidura central. En esta hendidura es donde tiene lugar la unión de los nucleótidos ATP o ADP y/o de los cationes Mg^{2+} o Ca^{2+} , que regulan la conformación, y por lo tanto la funcionalidad de la proteína (Aguda et al., 2005)(Fig.5A).

A.



B.



Figura 5. Estructura de la actina. A. Modelo para la F-actina basado en datos cristalográficos y difracción de fibra, representado en cinta y en diagrama 3D. Se muestra un MF compuesto por cuatro monómeros, los números señalan los cuatro dominios y la flecha señala la hendidura central de cada monómero (modificado Puius et al. 1998). B. Esquema de F-actina basado en microscopía electrónica. Cada monómero está representado por un color y se puede observar como se disponen en hélice (modificado de Carlsson 2010).

Para formar los filamentos de actina (F-actina) los monómeros se disponen en dos cadenas paralelas. Cada monómero al unirse al anterior modifica su posición mediante movimientos de translación y rotación, lo cual acaba originando una hélice dextrógira (Holmes et al., 1990)(**Fig. 5B**). Estos filamentos presentan polaridad, en dónde podemos distinguir un extremo (+) y otro (-), cuya nomenclatura viene dada porque los MFs al decorarse con fragmentos S1 de la cadena pesada de miosina II presentan un aspecto similar a una flecha (vistos por microscopia electrónica) siendo el extremo (+) el correspondiente a la punta de la flecha, por donde se añadirán los monómeros de actina para crecer (Schoenenberger et al., 1999).

En las células de mamífero encontramos seis isoformas de actina, cada una de ellas codificada por un gen distinto. Estas isoformas las podemos distribuir en dos grupos. Las actinas musculares, que presentan especificidad de tejido, como son: α 1-actina (músculo esquelético), α -actina (músculo cardíaco), α 2-actina (músculo liso vascular), α 3-actina (músculo liso entérico), y las citoplasmáticas, compuestas por β -actina y γ -actina, que se encuentran en todos los tejidos. La mayoría de diferencias secuenciales entre isoformas se encuentran en el extremo amino-terminal (Perrin y Ervasti, 2010).

1.2. Dinámica

La dinámica de formación de los MFs en un sistema *in vitro*, a partir de la polimerización de la G-actina, es similar que la que tiene lugar *in vivo* al añadir Mg^{2+} , K^+ o Na^+ . Estrictamente, este proceso no necesita ATP, pero la polimerización se ve favorecida cuando la G-actina está unida al ATP, por lo que podemos encontrar los monómeros de actina en tres formas distintas: G-Actina-ATP, G-Actina-ADP-Pi o G-Actina-ADP.

En la polimerización de los MFs se distinguen tres estadios. En primer lugar, la G-actina se une al ATP y al Mg^{2+} lo que conlleva un cambio conformacional de la proteína y su consecuente activación, esto le proporciona una mayor predisponibilidad para la polimerización. Seguidamente, tres monómeros “activados” se unen entre sí para formar el núcleo susceptible de polimerización, a este proceso lo llamamos **nucleación (Fig. 6A)**. Este núcleo es el oligómero de actina más pequeño en el que la tendencia a formar F-actina es mayor que la tendencia a disociarse en monómeros, es por eso que se considera el inicio de la polimerización de los MFs. No obstante, la formación de este núcleo es termodinámicamente desfavorable, lo que la convierte en la etapa limitante de la polimerización (Carlsson, 2010).

La siguiente fase de la polimerización es la **elongación (Fig. 6B)**. En esta fase los monómeros de G-actina, preferiblemente unidos a ATP, se incorporan en los extremos del núcleo o de filamentos cortos para acabar formando los MFs. Se sabe que el crecimiento en el extremo (+)

es más rápido que en el (-), esto se debe a que la concentración mínima de G-actina necesaria para la polimerización (la concentración crítica, C_c) es menor en el extremo (+) que en el (-) (Pollard y Mooseker, 1981). Una vez la G-actina-ATP se ha incorporado en el filamento tiene lugar la hidrólisis del ATP, lo que conlleva que la afinidad de la G-actina para permanecer en el filamento disminuya, y por lo tanto, los monómeros de G-actina-ADP-Pi son susceptibles de disociarse o liberarse del polímero de F-actina en forma de G-actina-ADP (Bindschadler et al., 2004; Vavylonis et al., 2005). Dado que hay un retraso entre la incorporación de G-actina-ATP y la hidrólisis del ATP, cuando el crecimiento del filamento es muy rápido podemos encontrar G-actina unida a ADP en la región central mientras que en los extremos encontraremos G-actina unida a ATP.

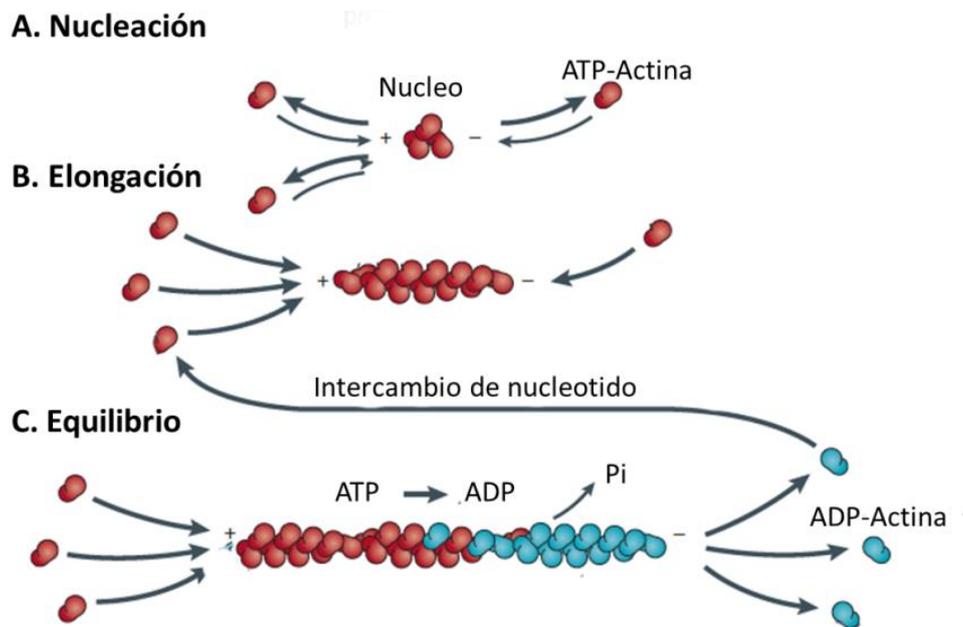


Figura 6. Etapas de la polimerización de actina. A. Nucleación. Tres monómeros unidos a ATP se unen para formar un núcleo susceptible de polimerización. B. Elongación. La G-actina activada se une a los extremos del filamento corto, podemos ver que el crecimiento en el extremo (+) es más rápido que en el negativo. C. Equilibrio. Fase en que la velocidad de polimerización y despolimerización es igual manteniendo el tamaño del filamento. (modificado de Nürnberg et al. 2011).

La fase de elongación termina cuando la adición de nuevas subunidades a los extremos es igual a la disociación de los mismos, a esta etapa la llamamos fase de **equilibrio** o *treadmilling*. Al igualar la velocidad de polimerización y despolimerización obtenemos un crecimiento neto del polímero, por lo que los MFs se pueden mantener como estructuras estables pero

altamente dinámicas, ya que los monómeros que componen el MF se reemplazan continuamente. Este dinamismo permite organizar los MFs rápidamente según las necesidades morfo-funcionales de la célula (Ballestrem et al., 1998).

1.2.1. Toxinas que alteran la dinámica de los microfilamentos

Hay un amplio repertorio de sustancias naturales que alteran la dinámica del citoesqueleto de actina, son lo que denominamos toxinas anti-actina. Éstas proceden de una gran variedad de organismos como plantas terrestres, esponjas, nudibranchios marinos, algas, hongos y bacterias. Todas ellas comparten en su estructura la presencia de un componente hidrofóbico central rodeado de grupos estereoquímicamente complejos. En general, las toxinas o agentes anti-actina se dividen en dos grupos: (1) los que inhiben el ensamblaje y/o que desestabilizan los MFs, y (2) los que los estabilizan (Allingham et al., 2006; Spector et al., 1999). En referencia a las toxinas que inhiben/desestabilizan los MFs, estos compuestos se pueden subdividir en aquellos que secuestran los monómeros de actina (cuando estos se disocian pasivamente del filamento) o aquellos que se unen a la F-actina desestabilizando la unión entre monómeros.

En el primer grupo encontramos las **latrunculinas**. La mayoría de ellas se aíslan de las esponjas marinas *Negombata magnifica*. El efecto de estos compuestos sobre el citoesqueleto de actina se debe únicamente al secuestro de los monómeros de actina. Se unen a los subdominios 2 y 4 de la G-actina (bajo el dominio de unión a ATP) lo que impide los cambios conformacionales necesarios para la incorporación de los monómeros a la F-actina. El secuestro de los monómeros acaba desencadenando la despolimerización total de los filamentos (Spector et al., 1983). Se conocen distintas latrunculinas y en todas ellas destaca la presencia de un anillo macrocíclico unido a un anillo de tiazolidinona responsable de su actividad. En la latrunculina B (LtB) la ausencia de dos carbonos en el anillo macrocíclico provoca que la toxina presente menor citotoxicidad que la latrunculina A, probablemente por la pérdida de interacciones hidrofóbicas con la molécula de actina (El Sayed et al., 2006).

Entre los agentes secuestradores de G-actina existen otras moléculas como el micalolide B, obtenido de *Mycale sp.*, que además de secuestrar monómeros de actina inhibe la actividad Mg^{2+} -ATPasa de los motores de MFs miosinas (Saito et al., 1994). También encontramos las toxinas binarias de *Clostridium sp.*, las cuales provocan la ADP-ribosilación de los monómeros de actina mediante la unión covalente de ADP-ribosa a la G-actina (Aktories y Barth, 2004).

Por otra parte, encontramos las sustancias que se unen a la F-actina para desestabilizar la unión de monómeros. Entre ellos encontramos las **citocalasinas**, en concreto la citocalasina D, obtenida del hongo *Zygosporium mansonii*. Estos componentes se unen al extremo (+) de la F-actina impidiendo la incorporación o liberación de G-actina lo que acaba ocasionando la

completa despolimerización del filamento por el extremo (-) (Goddette y Frieden, 1985; Goddettes y Frieden, 1986).

Entre las toxinas de actina que estabilizan o promueven la polimerización de la F-actina la característica química más común es su estructura de depsipéptido cíclico (Allingham et al., 2006). Una de las toxinas estabilizadoras más conocidas es la **faloidina**, sintetizada por el hongo *Amanita phalloides* (Wieland y Faulstich, 1977). Esta toxina se une a la F-actina impidiendo tanto la liberación del fosfato inorgánico (producto de la hidrólisis del ATP) como la despolimerización de los filamentos (Oda et al., 2005). Otro componente estabilizador es el **jasplakinolide** (JpK), producido por la esponja marina *Jaspisjohnstoni* (Bubb et al., 1994). Este componente, que estabiliza los filamentos de actina y a su vez promueve su polimerización (Bubb, 2000), compite con la faloidina por el sitio de unión en la F-actina. Sin embargo, el JpK difiere de la faloidina en su capacidad por atravesar las membranas y en su estructura macrocíclica con ramificaciones laterales de grupos aromáticos.

2. ORGANIZACIÓN Y REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA

2.1. Proteínas de unión a actina (ABPs)

En la célula eucariota la dinámica de actina está altamente regulada por las proteínas de unión a actina (ABPs). En un sistema *in vivo* la cantidad de G-actina es mayor de la esperada dadas las predicciones hechas con ensayos *in vitro*. Esto es debido a que una gran cantidad de monómeros de actina se encuentran unidos a las ABPs, lo cual evita la polimerización espontánea. Este fenómeno permite mantener un reservorio de G-actina para cuando sea necesaria su polimerización rápida, como por ejemplo durante la formación de lamelipodios. Dos ejemplos de ABPs **secuestradoras de G-actina** son la timosina $\beta 4$ y la profilina. Ambas se unen a los monómeros unidos a ATP, aunque la timosina además bloquea la hidrólisis del ATP (Pollard y Borisy, 2003; Safer et al., 1997)(**Fig. 7A**).

Para evitar que el reservorio de G-actina-ATP se agote debido a la constante polimerización existe otro mecanismo, las **proteínas de coronado/bloqueo** (**Fig. 7B**). Se trata de ABPs que se unen a los extremos de la F-actina, ya sea al extremo (-), evitando la despolimerización del filamento, como es el caso de las tropomodulinas (Fischer y Fowler, 2003), o bien, pueden unirse en el extremo (+), inhibiendo así la polimerización y por consiguiente despolimerizando los filamentos para aumentar la cantidad de G-actina, como es el caso de la proteína CapZ (Schafer et al., 1996). La ADF/cofilina también participa en el mantenimiento del reservorio de

G-actina, ya que se une a la actina-ADP en el extremo (-) del filamento promoviendo su disociación, además se mantiene unida a la G-actina ya liberada evitando el intercambio de ADP por ATP y el ensamblaje de la misma.

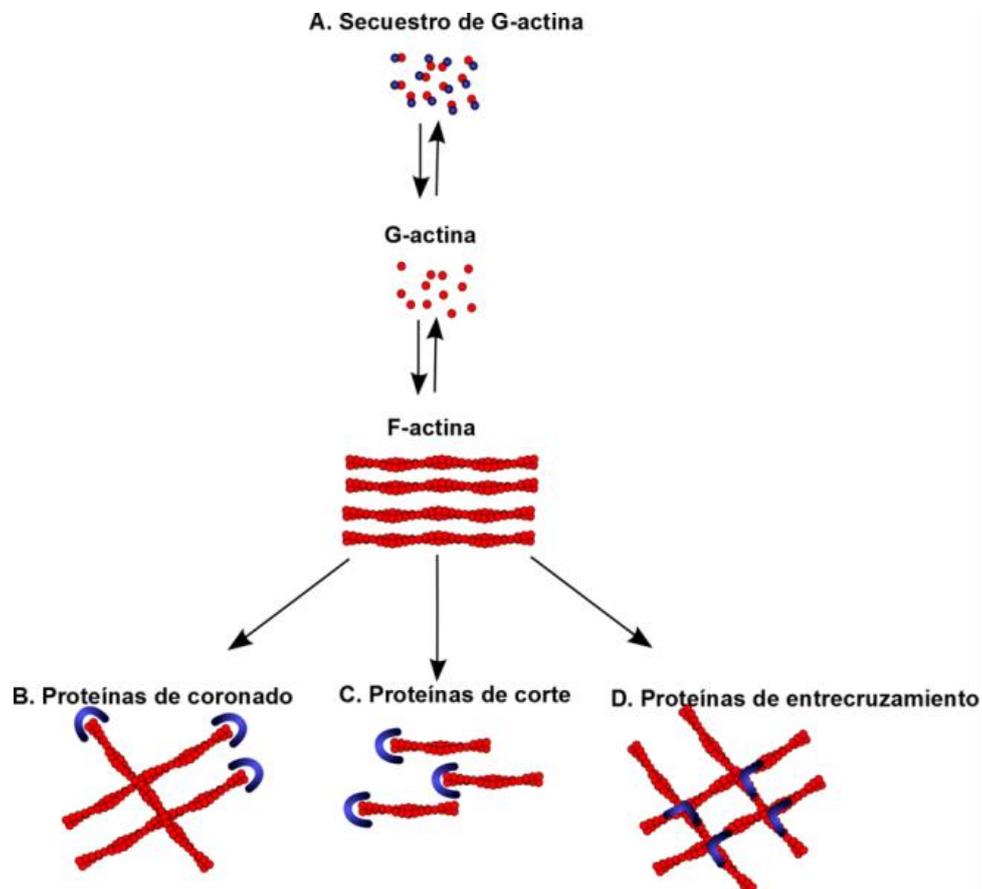


Figura.7 Proteínas de unión a actina. **A.** Proteínas que se unen a la G-actina para evitar su polimerización espontánea, ej.: Timosina $\beta 4$ o Profilina. **B.** Proteínas de coronado, son aquellas que se unen al extremo (+) o (-) de la F-actina para evitar la polimerización o la despolimerización, respectivamente, ej.: CapZ o Tropomodulinas o ADP/Cofilina. **C.** Proteínas de corte, promueven la ruptura de los filamentos en fragmentos más pequeños, ej.: ADP/cofilina o Gelsolina. **D.** Proteínas de entrecruzamiento, unen los filamentos para formar redes, ej.: filamina o α -actinina.

La ADP/cofilina también puede considerarse una **proteína de corte o ruptura (Fig. 7C)**, ya que al unirse lateralmente la hélice del filamento se distorsiona causando tensiones que pueden acabar con la ruptura del filamento. Otra ABP que promueve el corte de los filamentos de actina es la gelsolina (Sun et al., 1999).

Otras acciones comunes de las ABPs son las de formar haces de actina mediante la unión de varios filamentos de actina (fimbrina, valina y fascina) (de Arruda et al., 1990; Yamashiro et al., 1998), entrecruzar los filamentos para formar redes, **proteínas de entrecruzamiento** (Fig. 7C) (filamina y α -actinina), o unir los filamentos de actina con estructuras de la membrana (ezrina-radixina-moesina-ERM) (Defacque et al., 2000; Tsukita y Yonemura, 1999).

2.2. Proteínas motoras (miosinas)

Las miosinas o motores de actina son una superfamilia de proteínas caracterizadas por su capacidad de desplazarse por los MFs gracias al consumo de ATP. En su estructura distinguimos, por un lado, un dominio amino-terminal donde reside su actividad ATPasa y su dominio de unión a actina. Éste dominio es el más conservado entre los distintos miembros de la superfamilia. En cambio, la región carboxi-terminal es muy variable y confiere a cada una de las familias sus peculiares funcionales. Ambos dominios están conectados por cadenas ligeras reguladoras que en algunos casos tienen capacidad de unión con calmodulina (Baker y Titus, 1998).

El contacto de la actina con las miosinas activa la hidrólisis del ATP, convirtiendo esta energía química en energía mecánica para dar lugar al movimiento de las miosinas desde el extremo (-) al (+) del filamento (Cope et al., 1996). Todas la miosinas conocidas se desplazan en esta dirección exceptuando la miosina VI.

En las células eucariotas, la superfamilia de miosinas se divide en al menos 18 clases diferentes de miosinas. Esta clasificación viene dada por el análisis filogenético del extremo amino-terminal, o sea, la cabeza motora (Thompson y Langford, 2002).

Las miosinas son imprescindibles para la mayoría de formas de movimiento celular, así como para el tráfico intracelular, ambos procesos están íntimamente relacionados con el citoesqueleto de actina.

2.3. Nucleadores de actina

Para la formación de nuevos MFs es necesaria la nucleación de tres monómeros de actina, éste proceso es termodinámicamente y cinéticamente desfavorable (Sept y McCammon, 2001). Sin embargo, la célula dispone de factores que promueven la formación de estos núcleos, son los llamados nucleadores de actina.

Una de las proteínas nucleadoras de actina más conocidas es el complejo **Arp2/3**. Se trata de un complejo que genera ramificaciones en filamentos ya existentes. Este complejo ancla al

extremo (-) del nuevo filamentos en filamentos ya existentes, permitiendo así el crecimiento del extremo (+) de la ramificación (**Fig. 8C**). Arp2/3 genera ramificaciones en el frente de avance de las células en movimiento, proporcionando la fuerza necesaria para la proyección de la membrana (Pollard, 2007)(**Fig. 8A**).

Tanto las proteínas reguladoras como los NPFs (del inglés, *nucleation promoting factor*), más la F y G-actina cooperan para estimular el complejo Arp2/3, que es intrínsecamente activo. Entre las NPFs reguladoras de Arp2/3 encontramos los miembros de la familia de proteínas del síndrome de Wiscott-Aldrich (WASP) y su variante neural (N-WASP), así como las proteínas WASP con dominios de homología a verprolina (WAVE) y el supresor del receptor de AMP cíclico (Scar) (Welch y Mullins, 2002).

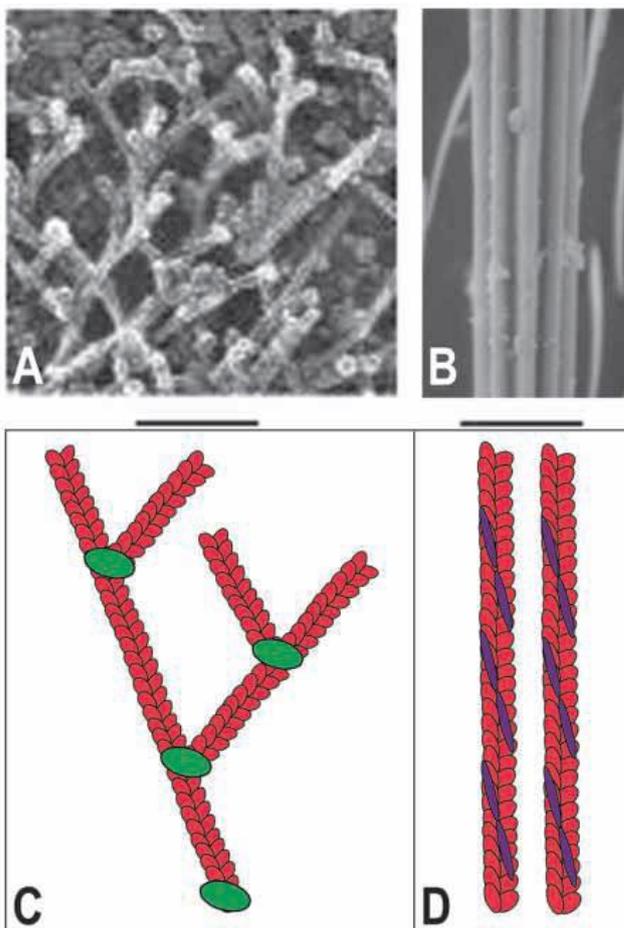


Figura. 8 Nucleadores de actina, Arp2/3 y formina. A y B. Imágenes de microscopía electrónica de las redes de actina de una lamelipodia de fibroblasto (A) y de los haces de actina en *Drosophila melanogaster* (B), Bar 0,1 μm . **C y D.** Diagrama de actina ramificada (C) y no ramificada (D). El complejo Arp 2/3 (verde) entrecruza los filamentos y estabiliza las redes, la formina (violeta) estabiliza los filamentos no ramificados. (modificado de Evangelista et al. 2003).

A parte del complejo Arp2/3 hay otras proteínas nucleadoras de actina como son las **forminas** (Harris y Higgs, 2004)(**Fig. 8B y D**). Estas proteínas contienen dos dominios altamente conservados: el dominio FH2, que se une al extremo (+) de la F-actina para elongarlo; y el

dominio FH1, que interacciona con la profilina para apórtale los monómeros de actina (Evangelista et al., 2003). Las forminas promueven la elongación de MFs de forma no ramificada. Están implicadas en la formación del anillo contráctil durante la citoquinesis y en la polimerización para la formación de la lamelipodia (Pollard, 2007). Dentro de la familia de las forminas encontramos la subfamilia de las proteínas de mamífero relacionadas con la proteína diáfanos de *Drosophila melanogaster* (Dia). Esta subfamilia presenta dos dominios adicionales: el dominio de unión a Rho y el dominio autoregulatorio de la proteína mDia. Las proteínas Dia se encuentran autoinhibidas y necesitan la interacción de Rho para ser activadas (Alberts, 2002).

Más recientemente, también se han descrito otros factores nucleadores de actina como son las proteínas Spir y Cordon-bleu (Cobl). Los factores Spir polimerizan actina de forma no ramificada mediante la unión de cuatro monómeros de actina a una agrupación de cuatro dominios de homología a WASP (WH2) (Kerkhoff, 2006). Por otra parte, Cobl une tres monómeros de actina a tres dominios WH2 (Ahuja et al., 2007).

2.4. RhoGTPasas

Las Rho GTPasas son miembros de la superfamilia de RAS. Hasta la fecha se han identificado diez RhoGTPasas distintas en mamíferos, algunas de ellas con múltiples isoformas: Rho (isoformas A, B, C), Rac (isoformas 1, 2, 3), Cdc42 (isoformas Cdc42Hs, G25K), Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG, TC10 y TTF (Bishop y Hall, 2000).

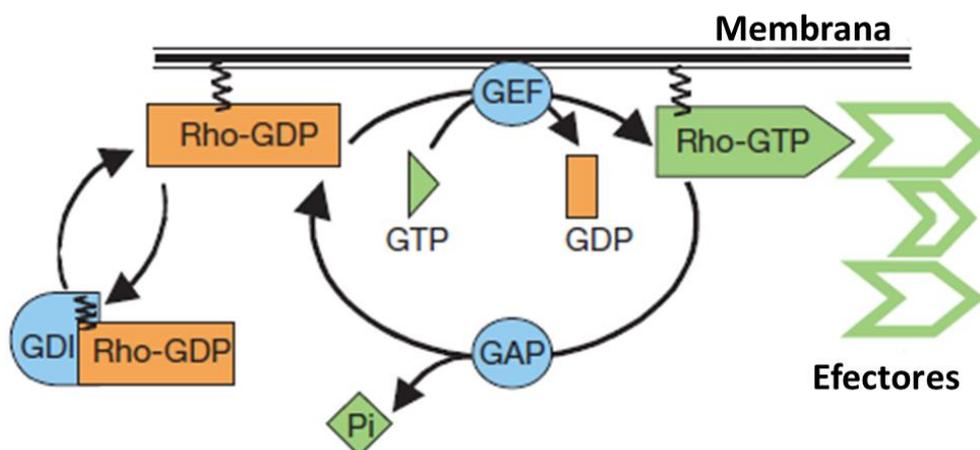


Figura. 9 Ciclo de activación y desactivación de las RhoGTPasas. Las RhoGTPasas activas están unidas a GTP que adquieren gracias a la acción de las proteínas GEF. Su inactivación se puede conseguir por dos vías, la primera la hidrólisis del GTP por parte de las proteínas GAP, y la segunda por el reclutamiento de las RhoGTPasas por parte de la GDI al citosol (modificada de Etienne-Manneville & Hall 2002).

Las RhoGTPasas actúan como interruptores binarios, es decir, son activas cuando están unidas a GTP e inactivas cuando lo están a GDP, el ciclo entre estado activo e inactivo está regulado por factores intercambiadores de GTP/GDP. Por un lado tenemos las GEFs (del inglés, *Guanine Nucleotide Exchanger Factors*) que favorecen el intercambio de GDP por GTP, y por tanto la activación de las RhoGTPasas (**Fig. 9**), aunque este intercambio se puede dar de forma espontánea (Jaffe y Hall, 2005). Actualmente, se han descrito unas 85 GEFs distintas que presentan especificidad por diferentes subgrupos de RhoGTPasas y su expresión, en muchos casos, se ve restringida a tipos celulares concretos.

Por otra parte, el estado inactivo se adquiere por la hidrólisis del GTP catalizada por la actividad intrínseca de la GTPasa y favorecida por las proteínas **GAP** (del inglés, *GTPase-Activating Protein*). Todas las GAPs contienen una región de 140 aa conocida como el dominio GAP, que le confiere la actividad GTPasa. Este dominio va acompañado de otros que regulan su actividad (Jacobs y Hall, 2005). Las RhoGTPasas también se unen a las **GDI** (del inglés, *Guanine Dissociation Inhibitor*), y se postula que estas proteínas movilizan las RhoGTPasas inactivadas (unidas a GDP) al citoplasma previniendo la unión de GTP por parte de las GEFs (DerMardirossian y Bokoch, 2005).

Se han identificado unos 50 efectores para Rho, Rac y Cdc42 que incluyen serina/treonina quinasas, quinasas lipídicas, lipasas, oxidasas y proteínas de andamiaje, estas proteínas serán las responsables de desencadenar las cascadas de señalización necesarias para llevar a cabo el proceso celular. Se ha visto que las RhoGTPasas están implicadas en la regulación del citoesqueleto, la polaridad celular, las rutas de transporte intracelular y varios procesos transcripcionales (Etienne-Manneville y Hall, 2002).

3. INTERACCIÓN ENTRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y EL COMPLEJO DE GOLGI

Para el mantenimiento de las funciones del complejo de Golgi es necesaria la interacción entre las moléculas que establecen su arquitectura, las que participan en el transporte intracelular y aquellas implicadas en la señalización. Elementos del citoesqueleto como los microtúbulos o el citoesqueleto de actina están ampliamente implicados en estos procesos. Tradicionalmente, los microtúbulos fueron los primeros en ser relacionados con la función y arquitectura del complejo de Golgi (Thyberg y Moskalewski, 1999). Sin embargo, en los últimos tiempos se ha visto que el citoesqueleto de actina y las proteínas asociadas a este también juegan un papel importante (Egea et al., 2006; Egea et al., 2013).

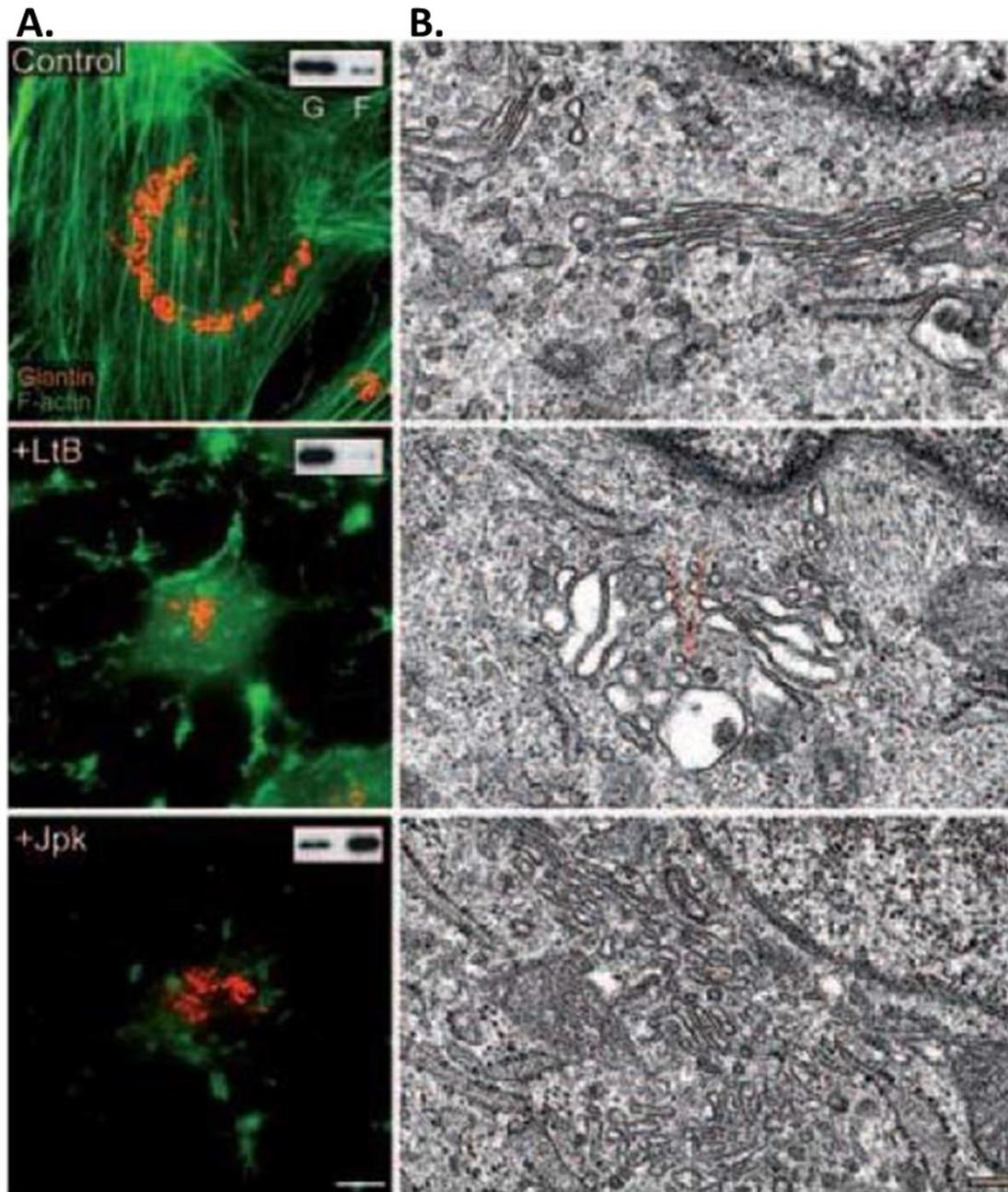


Figura 10. Efecto de las drogas anti-actina sobre la arquitectura del complejo de Golgi. A. Las células NRK muestran una compactación similar del complejo de Golgi al ser tratadas con agentes despolimerizantes de actina con la latrunculina B (LtB) o agentes estabilizantes de actina como el jasplakinolide (JpK). También se muestran los agregados de actina que se generan con las drogas, así como, las fracciones de F-actina y G-actina en cada condición. B. En cambio, por microscopía electrónica se observa que mientras la latrunculina causa la dilatación y fragmentación de las cisternas, el jasplakinolide solo causa la fragmentación de estas. (modificado de Egea y Ríos, 2007).

3.1. Efectos sobre la arquitectura del complejo de Golgi

La primera evidencia experimental que el complejo de Golgi y el citoesqueleto de actina estaban relacionados fue la presencia de actina y proteínas asociadas, como la miosina II o la tropomiosina, en las membranas de Golgi aisladas y en vesículas de transporte (Heimann et al., 1999).

Mediante diferentes aproximaciones experimentales se descubrió que la reorganización del citoesqueleto de actina afecta significativamente la morfología de Golgi. Primeramente, el tratamiento con drogas que perturban la organización del citoesqueleto de actina, ya sea despolimerizando o estabilizando los MFs, promueven invariablemente la compactación del complejo de Golgi (di Campli et al., 1999; Valderrama et al., 1998)(**Fig. 10**). Dicha compactación también se produce al perturbar la función de ciertas proteínas asociadas al citoesqueleto de actina, como por ejemplo, la depleción de proteínas como la cortactina (activador del complejo Arp2/3), o la depleción de la proteína GOLPH3 (que conecta la miosina 18A con las membranas de Golgi gracias a su unión a PtdIns(4)P) (Dippold et al., 2009; Kirkbride et al., 2012; Ng et al., 2013). Sin embargo, en algunos casos, la perturbación de la maquinaria de actina produce la fragmentación del complejo de Golgi. Este es el caso de la depleción de WHAMM (proteína homóloga a WASP que une las membranas de Golgi a los microtúbulos y que además promueve la activación del complejo Arp2/3) (Campellone et al., 2008) o de proteínas de la familia de las forminas (conocidas promotoras de la polimerización de actina, como mDia, FMNL1 o INF2) (Colón-Franco et al., 2011; Ramabhadran et al., 2011; Zilberman et al., 2011). Recientemente se ha visto que el daño del DNA conlleva la dispersión del complejo de Golgi, este fenómeno es dependiente de la activación de GOLPH3/miosina18A (Farber-Katz et al., 2014).

El efecto de la reorganización del citoesqueleto de actina sobre la morfología del complejo de Golgi también se ha estudiado a nivel ultraestructural. Nuestro grupo ha visto que el efecto ultraestructural sobre el Golgi de las drogas anti-actina depende de cual sea su mecanismo de acción. Mientras que aquellas que despolimerizan los MFs (citocalasina D y latrunculina B) causan la fragmentación y dilatación de las cisternas de Golgi, las que inducen la estabilización de los MFs (jasplakinolide) solo las fragmentan y perforan (Lázaro-Diéguez et al., 2006).

La actina es uno de los componentes del **citoesqueleto de espectrina**, que se describió por primera vez en los eritrocitos y que está formado por las proteínas espectrina, anquirina entre otras. Se localiza bajo la membrana y determina la forma bicóncava de los eritrocitos. Por analogía con estos, se pensó que este citoesqueleto podría estar implicado en la morfología de las cisternas de Golgi (Beck et al., 1994). Se ha descrito que el complejo de Golgi de las células

de mamífero contiene la isoforma β III de la espectrina (Salcedo-Sicilia et al., 2013; Stankewich et al., 1998), así como otros elementos del citoesqueleto de espectrina como: β y γ actina (Valderrama et al., 2000), las anquirinas Ank_{G119} y Ank₁₉₅ (Beck et al., 1997; Devarajan et al., 1996), la proteína 4.1 (Kang et al., 2009), el intercambiador de aniones AE2 (Holappa et al., 2001) y la tropomiosina (Percival et al., 2006). El citoesqueleto de espectrina está implicado en el mantenimiento de la función y arquitectura del complejo de Golgi, ya que la depleción de la β III-espectrina conlleva la fragmentación del Golgi (Salcedo-Sicilia et al., 2013).

Las alteraciones morfológicas del complejo de Golgi causadas por las reorganizaciones del citoesqueleto de actina, así como la fragmentación debida a la depleción de la β III-espectrina, muestran que estos elementos son imprescindibles para dar estabilidad mecánica a las cisternas, probablemente impidiendo la esperable dilatación espontánea de las mismas por el incremento osmótico causado por alto contenido de proteínas en tránsito por el complejo de Golgi. Además, sabiendo que la despolimerización de los MFs conlleva un aumento del pH intra-Golgi (Lázaro-Diéguez et al., 2006) y que en el Golgi residen múltiples canales iónicos como el intercambiador de aniones NHE o la H⁺-ATPasa vacuolar, es fácil pensar que la estabilidad mecánica dependiente de actina/espectrina podría pasar por la regulación de la concentración iónica intra-Golgi a través de estos elementos (**Fig. 11A**) (ver nuestra hipótesis de trabajo).

En concordancia con estas evidencias de la participación de la actina en el mantenimiento de la arquitectura del complejo de Golgi, recientemente ha aparecido un estudio en el que miden la rigidez del Golgi, y observan que se ve significativamente reducida al interferir con el citoesqueleto de actina (Guet et al., 2014). Estos resultados son una evidencia muy directa de que el citoesqueleto de actina es esencial en el mantenimiento de la integridad del complejo de Golgi y su función secretora (Egea y Serra-Peinado, 2014).

3.2. Efectos sobre la formación de intermediarios de transporte

Los filamentos de actina al ser elementos tan dinámicos son candidatos ideales para ayudar a la formación de los ITs. La fuerza generada por la polimerización de actina ayuda a deformar las membranas de Golgi para formar los ITs, a escindirlos de las cisternas y/o propulsarlos (**Fig. 11A**). Esto implica que una gran cantidad de proteínas relacionadas con la dinámica de actina se concentren en el complejo de Golgi. A continuación repasaremos el papel de la actina y de sus proteínas asociadas en la formación de ITs del complejo de Golgi.

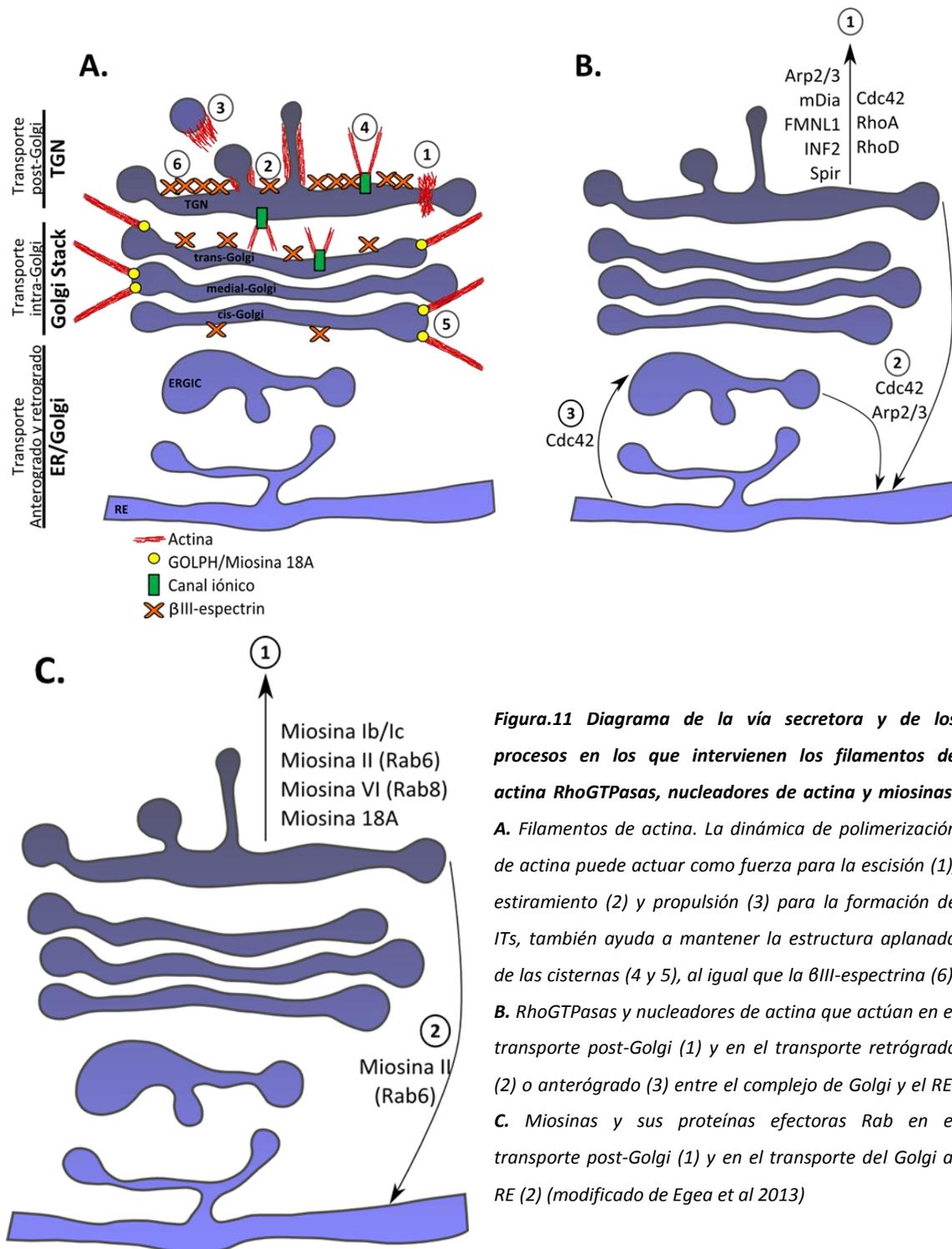


Figura.11 Diagrama de la vía secretora y de los procesos en los que intervienen los filamentos de actina RhoGTPasas, nucleadores de actina y miosinas.

A. Filamentos de actina. La dinámica de polimerización de actina puede actuar como fuerza para la escisión (1), estiramiento (2) y propulsión (3) para la formación de ITs, también ayuda a mantener la estructura aplanada de las cisternas (4 y 5), al igual que la βIII-espectrina (6).

B. RhoGTPasas y nucleadores de actina que actúan en el transporte post-Golgi (1) y en el transporte retrógrado (2) o anterógrado (3) entre el complejo de Golgi y el RE.

C. Miosinas y sus proteínas efectoras Rab en el transporte post-Golgi (1) y en el transporte del Golgi al RE (2) (modificado de Egea et al 2013)

3.2.1. Actina filamentosa

Un aspecto clave en la estructura de las células polarizadas es el mantenimiento de la polaridad molecular, este fenómeno se puede dar gracias a la altamente específica maquinaria

de clasificación del TGN que permite dirigir cada molécula hacia la región de la membrana plasmática correcta (Rodríguez-Boulan et al., 2005). La integridad de los MFs es necesaria para que el transporte de proteínas apicales y basolaterales se dé correctamente, ya sea en células polarizadas como en células no polarizadas. En cambio, el transporte de proteínas asociadas a *lipid raft* no es dependiente de MFs (Jacob et al., 2003; Lázaro-Diéguez et al., 2007; Lebreton et al., 2008)(**Fig. 11A**).

3.2.2. Rho-GTPasas y nucleadores de actina

La coordinación entre la polimerización de actina y la elongación de las membranas de Golgi para la formación de ITs debe estar altamente coordinada, parte de este control se consigue con la regulación de las Rho-GTPasas (**Fig. 11B**).

Cdc42 fue la primera RhoGTPasa localizada en el complejo de Golgi (Erickson y Chun-jiang Zhang, 1996) y se ha descrito que está implicada tanto el transporte entre el RE y el complejo de Golgi como en el transporte post-Golgi (Harris y Tepass, 2010). En referencia al primero, se ha visto que la expresión de mutantes constitutivamente activos o inactivos de Cdc42 bloquean la salida de *cargo* anterógrado del RE (Wu et al., 2000). Además, la sobreexpresión o activación de Cdc42 así como la depleción de una de sus GAPs inhibe el transporte del Golgi al RE (Hehnlly et al., 2009; Luna et al., 2002). Por lo tanto, Cdc42 está implicada tanto en el transporte anterógrado como en el retrogrado. Por otro lado, la expresión de mutantes deficientes para Cdc42 afectan al transporte post-Golgi de proteínas basolaterales, mientras que el transporte de proteínas apicales no se ve afectado o incluso favorecido, dependiendo del *cargo* estudiado (Cohen et al., 2001; Kroschewski et al., 1999; Müsch et al., 2001). Asimismo, se han localizado GAPs y GEFs de Cdc42 en las membranas de Golgi que participan en el transporte post-Golgi (Dubois et al., 2005; Estrada et al., 2001).

A parte de Cdc42 hay otras RhoGTPasas implicadas en el transporte intracelular. **RhoA** ha sido implicada en el transporte post-Golgi, ya sea a través de la activación de la formina mDia (Zilberman et al., 2011), o bien, mediante el control de la RhoA-GEF-H1 (Pathak et al., 2013). También se ha visto que **RhoD** se une y activa a WHAMM que a su vez activa al complejo Arp2/3, favoreciendo la polimerización de actina necesaria para la biogénesis de vesículas en el complejo de Golgi (Gad et al., 2012).

El ensamblaje de los MFs inducido por los nucleadores de actina conjuntamente con la actividad mecánica de los motores de actina (miosinas) ayudan a la formación de los ITs en las membranas de Golgi (**Fig. 11B**). Podemos implicar a los MFs en diferentes etapas de la formación de ITs. La polimerización de actina inducida por Arp2/3, Spir o mDia genera MFs que impulsan la membrana para la **formación de vesículas o estructuras tubulovesiculares**

(Carreno et al., 2004; Chen et al., 2004; Kerkhoff et al., 2001; Matas et al., 2004; Zilberman et al., 2011). Por otro lado, la polimerización de actina se puede dar alrededor del cuello de las vesículas para ayudar a su **escisión**. Por ejemplo en el TGN existe un acoplamiento funcional entre dinamina2 y cortactina imprescindible para la escisión de vesículas en el TGN (Cao et al., 2005). Finalmente, la actina puede ensamblarse para formar las **cometas de actina**, que resultan de polimerizaciones de actina muy focalizadas en una zona de la vesícula. Sin embargo, los cometas de actina no parecen ser mecanismos eficientes para dar direccionalidad a los ITs sino que se cree que ayudan a la escisión final de los ITs. La formación de los cometas es dependiente de Cdc42 y N-WASP (Heuvingh et al., 2007) (**Fig. 11A**).

3.2.3. Miosinas

Al igual que la polimerización de actina, las miosinas también generan la fuerza necesaria para ayudar a la formación y transporte de ITs (**Fig. 11C**). Se ha visto que las **miosinas de clase I** se unen a las membranas de Golgi y que están presentes en las vesículas dirigidas a la región apical de células polarizadas (de Oca et al., 1997; Fath y Burgess, 1993). En concreto, la miosina Ib, conjuntamente con la F-actina, participa en la formación en el TGN de ITs tubulares dirigidos a los endosomas o a la membrana plasmática (Almeida et al., 2011). Adicionalmente, se ha sugerido que esta miosina coopera con la miosina II para la escisión de ITs en el TGN (Coudrier y Almeida, 2011). Las miosinas de clase I también tienen la capacidad de seleccionar el tipo de *cargo*, ya que la miosina Ic controla el transporte de proteínas asociadas a GPI desde la MP a los endosomas de reciclaje (Brandstaetter et al., 2012).

La **miosina II** es otro motor de actina que interacciona con las membranas de Golgi (Fath, 2005). Participa en el transporte desde el complejo de Golgi hasta el RE y en el transporte post-Golgi (Müsch et al., 1997; Stow et al., 1998). Esta miosina forma complejo con Rab6, lo que le facilita su localización en Golgi y le permite controlar la fisión de ITs anterógrados y retrógrados (Miserey-Lenkei et al., 2010). Asimismo, la inactivación de la miosina II induce la acumulación de vesículas alrededor de las cisternas de Golgi, algunas de ellas unidas a la membrana (Durán et al., 2003; Storrie et al., 2013), lo que sugiere defectos tanto en el transporte como en la fisión de los ITs. Se postula que el desplazamiento de la miosina II por los filamentos de actina proporciona la fuerza necesaria para extender las membranas de Golgi y facilitar la acción de las proteínas de escisión.

Otra miosina asociada al complejo de Golgi es la **miosina VI**. A diferencia del resto de miosinas, se mueve hacia el extremo (-) de los filamentos, esta peculiaridad le permite transportar IT a través de los MFs que se originan en las membranas de Golgi (Buss et al., 2004; Warner et al., 2003). Por otra parte, la miosina VI actúa a diferentes estadios de la endocitosis

mediada por clatrina gracias a su interacción con las proteínas Dab2, GIPC, Tom1 y LMTK2 (Tumbarello et al., 2013).

Finalmente, como hemos mencionado anteriormente, la miosina 18A localiza en las membranas de Golgi gracias a su interacción con GOLPH3. Se ha visto que la depleción de GOLPH3 bloquea la salida de *cargo* del TGN (Dippold et al., 2009). La contribución de la miosina 18A en este proceso es controvertida ya que su actividad motora es muy reducida (Guzik-Lendrum et al., 2013).

III. LA H⁺-ATPasa VACUOLAR

1. DEFINICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR

El pH de los orgánulos que componen la vía secretora y endocítica no es homogéneo, ya que va disminuyendo a medida que avanzamos a hacia el destino final del *cargo* (**Fig. 12**). De esta manera en el RE, al igual que en el núcleo y el citosol, encontramos un pH de 7.2. En cambio, una vez llegamos al complejo de Golgi ya encontramos un pH más ácido. De hecho, el complejo de Golgi presenta un gradiente de pH que disminuye desde la cara *cis* hasta llegar a la región *trans* y al TGN, de manera que en las cisternas *cis* tenemos valores de pH de 6.7 y una vez en el TGN disminuye hasta valores de pH 6. Finalmente, los gránulos de secreción pueden llegar a tener un pH de 5.2 (Paroutis et al., 2004; Wu et al., 2001). En la vía endocítica, también encontramos este gradiente de pH. En el interior de los endosomas tempranos hay un pH de 6.3, en los tardíos se llega a valores de 5.5 y finalmente los lisosomas presentan el pH más ácido de la célula con valores de 4.7 (Demaurex, 2002; Wu et al., 2000). Este gradiente de pH permite crear ambientes diferenciados en cada compartimento y mantener la compartimentación funcional de cada uno, ya que procesos como las modificaciones post-traduccionales o el tráfico intracelular son altamente dependientes del mismo (Maeda y Kinoshita, 2010; Weisz, 2003).

El principal responsable de la generación de este gradiente de pH es la **H⁺-ATPasa vacuolar** (V-ATPasa). Este holoenzima es un complejo formado por múltiples subunidades que transporta de protones a través de las membranas consumiendo ATP. Esta bomba se expresa en todas las células eucariotas (Breton y Brown, 2007; Demarex, 2002) y se distribuye por orgánulos de la vía secretora y endocítica, desde el complejo de Golgi, hasta los endosomas, lisosomas y vesículas de secreción (Chanson y Taiz, 1985; Glickman et al., 1983; Hurley y Taiz, 1989; Moriyamas y Nelsons, 1989; Young y Qiao, 1988; Zhang y Schneider, 1983) (**Fig. 12**). Se

ha visto que la V-ATPasa está enriquecida en los *lipid rafts*; los dominios ricos en colesterol y esfingomielina extraídos de membranas de Golgi muestran que algunas de las proteínas que se encuentran de manera mayoritaria son subunidades de la V-ATPasa (Gkantiragas et al., 2001). No se sabe con certeza como se pueden generar distintos valores de pH en cada compartimento, considerando que la V-ATPasa es la misma en todos ellos; se habla de posibles diferencias en la densidad de la bomba, en la eficiencia de translocación de protones o mecanismos de regulación de la actividad V-ATPasa específicos de cada compartimento (Casey et al., 2010).

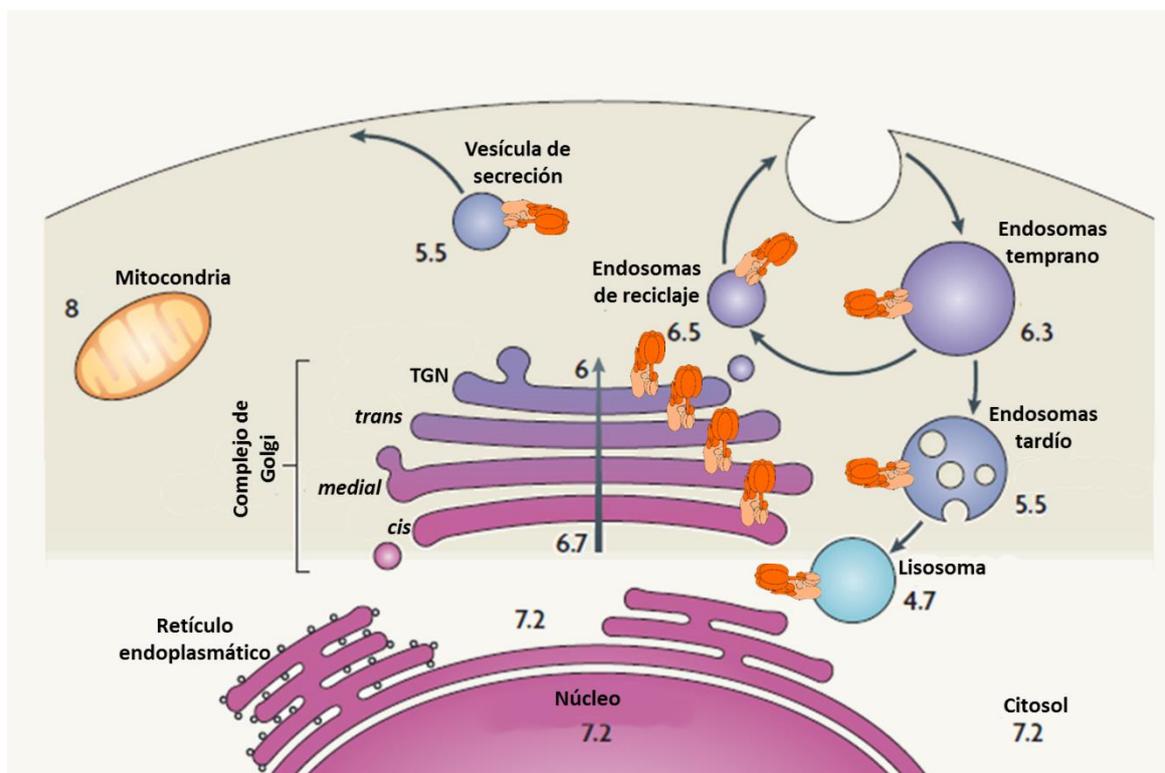


Figura 12. Gradiente de pH de la vía secretora-endocítica y distribución de la V-ATPasa. Esquema en el que se indica el pH de los distintos compartimentos intracelulares. Podemos ver como el pH disminuye a medida que avanzamos hacia el destino final del cargo tanto en la vía secretora como la endocítica. La V-ATPasa se distribuyen a lo largo del complejo de Golgi y también en los endosomas, lisosomas y vesículas de secreción (modificada de Casey et al., 2010).

La V-ATPasa también se encuentra en la membrana plasmática en ciertos tipos celulares especializados, como las células intercaladas renales (Wagner et al., 2004), los osteoclastos (Blair et al., 1989), las células del epidídimo y de los vasos deferentes (Breton et al., 1996), las células interdentes del oído interno (Stanković et al., 1997) y en las células intestinales de

insecto. Estos tipos celulares participan activamente en la regulación del pH extracelular, el cual es necesario para mantener la función fisiológica adecuada.

2. ESTRUCTURA Y ENSAMBLADO DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR

La V-ATPasa es un complejo rotatorio formado por múltiples subunidades divididas en dos dominios: el V₁ y el V₀. El **dominio V₁** es periférico, se sitúa en la cara citoplasmática de la membrana y es el responsable de la hidrólisis del ATP. El **dominio V₀** es transmembrana y es el encargado de la translocación de protones al lumen de los orgánulos (**Fig. 13A**).

La V-ATPasa está emparentada funcional y mecánicamente con la ATP-sintetasa de la mitocondria (F-ATPasa). Ambas están organizadas en dos dominios similares y su mecanismo de acción conlleva rotación (Yoshida et al., 2001). Sin embargo, mientras que la V-ATPasa hidroliza ATP para la translocación de protones, en el caso de la ATP-sintetasa la translocación de protones conlleva la síntesis ATP. Podríamos decir que la V-ATPasa es más cercana estructuralmente a las ATPasa de las arqueobacterias (A-ATPasa) (Cross y Müller, 2004), como por ejemplo la Na⁺-ATPasa de *Enterococcus hirae* (Murata et al., 2005) y la H⁺-ATPasa de *Thermus thermophilus* (Imamura et al., 2003).

2.1. El dominio V₀

El dominio V₀ es un complejo de 260 KDa que en levaduras está formado por seis subunidades distintas: a, d, e, c, c', c'' (las subunidades del dominio V₀ se representan por letras minúsculas) (Breton y Brown, 2007; Forgac, 2007; Kane, 2006). En las células de mamífero no encontramos la subunidad c' y en su lugar se ha descrito una subunidad accesoria, la Ac45 (Supek et al., 1994).

Las **subunidades c, c' y c''** o subunidades proteolipídicas son altamente hidrofóbicas y se agrupan formando un anillo (Powell et al., 2000). Todas ellas presentan en una de sus hélices transmembrana un residuo único de glutamina que se protoniza de manera reversible durante el transporte de protones (**Tabla 1**). La presencia de este residuo es esencial para la translocación (Nishi y Forgac, 2002). El anillo formado por estas subunidades consta de cuatro o cinco copias de la subunidad c y una copia única de las subunidades c' y c'', aunque el número exacto de cada una todavía permanece incierto (Jefferies et al., 2008) (**Fig.13B**). Este anillo rota en sentido contra horario (Hirata et al., 2003).

Para la translocación de protones también es crucial la **subunidad a**. Esta proteína contiene un extremo amino-terminal hidrofílico orientado hacia el citoplasma que interacciona con las subunidades del dominio V_1 (Leng et al., 1999). En cambio, su extremo carboxi-terminal es hidrofóbico y en una de sus hélices contiene otro residuo esencial para la translocación de protones, una arginina (Kawasaki-Nishi et al., 2001b). La conformación del extremo carboxi-terminal deja abiertos dos hemi-poros en la membrana por los cuales podrán pasar los protones (Vik et al., 2000) (**Fig. 13A**). En levaduras se han descrito dos genes que codifican para diferentes isoformas de esta subunidad la VPH1 y la STV1, las cuales se dirigen respectivamente a la vacuola o al complejo de Golgi (Kawasaki-Nishi et al., 2001a; Kawasaki-Nishi et al., 2001c). En cambio, en mamíferos se han descrito cuatro isoformas (a1, a2, a3, a4) que presentan especificidad de tejido (Wagner et al., 2004) y de localización subcelular (Marshansky y Futai, 2008; Pietrement et al., 2006; Toyomura et al., 2003) (**Tabla 1**).

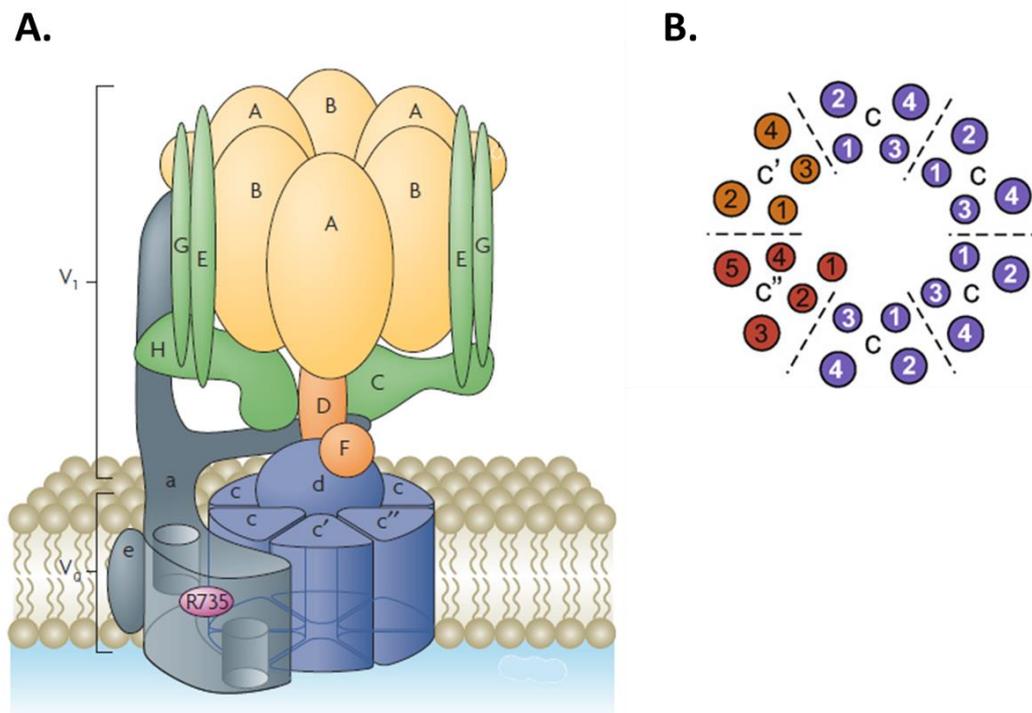


Figura 13. Estructura V-ATPasa. **A.** La V-ATPasa está compuesta por el dominio V_1 ; en naranja el hexámero central formado por las subunidades A y B, que se encargan de la unión y la hidrólisis del ATP; en naranja oscuro las subunidades D y F, que forman el stalk central que conecta con el dominio V_0 ; en verde el stalk periférico compuesto por las subunidades G, E, H y C. En tonos azules representado el dominio V_0 : en azul claro el anillo proteolipídico, formado por las subunidades c, y la subunidad d que conecta con el dominio V_1 ; en azul oscuro las subunidades a y e (modificado de Forgac, 2007). **B.** Representación esquemática de la organización de las subunidades c para formar el anillo proteolipídico, vista desde la cara citosólica de la membrana. Cada subunidad está representada de un color distinto. Los números corresponden a las hélices hidrofóbicas de cada subunidad (modificado de Jefferies et al., 2008).

Por último están las **subunidades e y d**. La primera es altamente hidrofóbica y se encuentra en la membrana junto a la subunidad a (**Fig.13A**), su función es desconocida pero es esencial para la translocación de protones en levaduras (Sambade y Kane, 2004). Por otra parte, la subunidad d tiene forma de tapón y se sitúa justo encima del anillo proteolipídico, conectando así el dominio V_0 con el dominio V_1 , esta conexión es imprescindible para que se dé la rotación del anillo (Iwata et al., 2004)(**Fig. 13A**). Se han descrito dos isoformas de la subunidad d: la subunidad d1 que es ubicua y la d2 que se encuentra en los riñones, pulmones, osteoclastos y en el epidídimo (Pietrement et al., 2006; Smith et al., 2002; Smith et al., 2005) (**Tabla 1**).

2.2. El dominio V_1

El dominio V_1 es un complejo de 650 KDa formado por ocho subunidades distintas (A-H; representadas por letras mayúsculas) en estequiometría de $A_3B_3C_1D_1E_2F_1G_2H_{1-2}$. Como hemos dicho anteriormente, en este dominio es donde reside la actividad ATPasa (Breton y Brown, 2007; Forgac, 2007).

Las **subunidades A y B** están agrupadas formando un hexámero con tres copias de cada una situadas alternativamente (**Fig. 13A**). Los sitios de unión del ATP se encuentran en la interfase entre ambas subunidades. Tres de estos sitios de unión son catalíticos y están situados mayormente en la subunidad A, mientras que los otros tres no son catalíticos y se sitúan en la subunidad B. A pesar de que la función de los dominios de unión a ATP no catalíticos no está bien caracterizada, se cree que podrían estar jugando un papel en la regulación de la V-ATPasa (MacLeod et al., 1998; Vasilyeva et al., 2000). Por otra parte, se ha visto que los sitios de unión catalíticos de la subunidad A tienen un papel muy importante en la regulación de la actividad de la bomba (Shao y Forgac, 2004; Shao et al., 2003), ya que son la única región de la proteína que no tiene homología con la subunidad α de la F-ATPasa, de ahí que se denomine región no homóloga (Hirata et al., 1990) (**Tabla 1**).

El resto de subunidades del dominio V_1 están distribuidas en dos tipos de ejes o *stalks* que conectan ambos dominios: el periférico y el central. El *stalk* central está formado por las **subunidades D y E**; su función es transmitir la energía generada durante la hidrólisis del ATP al anillo proteolipídico para promover su rotación (Arata et al., 2002)(**Tabla 1**). En cambio, el *stalk* periférico, formado por las **subunidades G, E, H y C**, evita la rotación del hexámero A_3B_3 durante la hidrólisis del ATP, además de ayudar a mantener unidos el complejo catalítico y el transmembrana (Drory et al., 2004; Inoue y Forgac, 2005a; Wilkens et al., 2004)(**Tabla 1**). Así pues, podemos determinar que el complejo de la V-ATPasa contiene una fracción móvil

formada por el anillo proteolipídico, la subunidad d y el *stalk* central, y una porción fija formado por el hexámero A₃B₃, el *stalk* periférico y las subunidades a y e (**Fig. 13A**).

Tabla 1. Características de las subunidades de la V-ATPasa

Subunidad	Peso molecular (KDa)	Gen en levaduras	Isoformas en mamíferos	Función de la subunidad	Referencias
<i>Dominio V₁</i>					
A	70	VMA1		Hidrólisis del ATP, regulación vía dominio no homólogo, estator	(Shao y Forgac, 2004) (Shao et al., 2003)
B	60	VMA2	B1 (riñón y epidídimo), B2 (ubicua)	Unión a ATP, unión actina y aldosa, estator	(Nelson et al., 1992) (Paunescu et al., 2004) (Puopolo et al., 1992) (Lu et al., 2004) (Holliday et al., 2000)
C	40	VMA5	C1 (ubicua), C2 (riñón, pulmón y epidídimo)	Reguladora, unión a actina, estator	(Inoue y Forgac, 2005a) (Drory et al., 2004) (Pietrement et al., 2006) (Smith et al., 2002) (Sun-Wada et al., 2003b) (Sun-Wada et al., 2003a) (Chen et al., 2004) (Vitavska et al., 2005) (Arata et al., 2002)
D	34	VMA8		<i>Satlk</i> central, rotación	
E	33	VMA4	E1 (espermatozoide) y E2 (ubicua)	Unión a RAVE y aldosa, estator	(Arata et al., 2002) (Sun-Wada et al., 2002) (Smardon et al., 2002) (Forgac, 2007)
F	14	VMA7		<i>Satlk</i> central, rotación	
G	13	VMA10	G1 (ubicua), G2 (cerebro) y G3 (epidídimo y riñón)	Unión a RAVE, estator	(Pietrement et al., 2006) (Smith et al., 2002) (Sun-Wada et al., 2003a) (Crider et al., 1997) (Murata et al., 2002) (Smardon et al., 2002) (Wilkens et al., 2004)
H	50	VMA13		Estator	
<i>Dominio V₀</i>					
a	100	VPH1 (vacuola) STV1 (Golgi)	a1 (ubicua), a2 (riñón, epidídimo, pulmón, bazo), a3 (osteoclastos y riñón), a4 (riñón, epidídimo y oído)	Transporte de H ⁺ , <i>traqeting</i> , unión a aldosa, estator	(Kawasaki-Nishi et al., 2001a; Kawasaki-Nishi et al., 2001b; Kawasaki-Nishi et al., 2001c; Vik et al., 2000) (Wagner et al., 2004) (Marshansky y Futai, 2008) (Toyomura et al., 2003)
d	38	VMA6	d1 (ubicua), d2 (riñones, pulmón, osteoclastos y epidídimo)	Eficiencia de translocación, rotación	(Iwata et al., 2004) (Smith et al., 2005) (Pietrement et al., 2006) (Smith et al., 2002)
e	9	VMA9		Desconocida	(Sambade y Kane, 2004)
c	17	VMA3		Transporte de H ⁺ , rotación	(Hirata et al., 2003; Nishi y Forgac, 2002; Powell et al., 2000)
c'	17	VMA11	No hay gen en mamíferos		
c''	21	VMA16			
Ac45	45	No hay gen		Desconocida	(Supek et al., 1994)

Algunas de las subunidades del dominio V₁ también presentan distintas isoformas (Breton y Brown, 2007). Por ejemplo, la subunidad B presenta dos: la subunidad B1, descubierta inicialmente en riñón (Nelson et al., 1992) pero se encuentra también en el epidídimo (Paunescu et al., 2004), y la subunidad B2, descubierta inicialmente en el cerebro pero con una distribución ubicua en todos los tejidos (Puopolo et al., 1992). Las subunidades C y E también

presentan dos isoformas. La subunidad C1 es ubicua, mientras que la expresión de la C2 está restringida a riñón, pulmón y epidídimo (Pietrement et al., 2006; Smith et al., 2002; Sun-Wada et al., 2003a; Sun-Wada et al., 2003b). La subunidad E1 es específica del acrosoma de los espermatozoides y la E2 es ubicua (Sun-Wada et al., 2002). Finalmente, se han descrito tres isoformas para la subunidad G: la G1 de expresión ubicua, la G2 específica de cerebro, y la G3 localizada en el epidídimo y en el riñón (Crider et al., 1997; Murata et al., 2002) (**Tabla 1**).

2.2.1. Interacción entre el citoesqueleto de actina y la H⁺-ATPasa vacuolar

La interacción del citoesqueleto de actina y la V-ATPasa fue descrita por primera vez en osteoclastos empleando ensayos de colocalización, co-inmunoprecipitación y microscopía electrónica donde se observó que la actina, la miosina II y la V-ATPasa formaban un complejo en la membrana plasmática (Lee et al., 1999). Además, se vio que la V-ATPasa de otras procedencias (aislada a partir de medula ósea de ratón o de tejido renal bovino) también interaccionaba con los filamentos de actina. En ensayos posteriores se describió que una de las subunidades que interaccionaba directamente con la actina era la **subunidad B** ya que poseía un dominio de unión a actina en su extremo amino-terminal. En el caso de la subunidad B1, este dominio ocupa 106 aa y, en la isoforma B2, 112 aa; en ambos casos muestra una alta afinidad para la actina filamentosa (Holliday et al., 2000). Al menos en osteoclastos, el dominio de unión a actina se sitúa en una región de 44 aa, que incluye un segmento de 11 aa que guarda homología con la proteína de unión a actina profilina (Chen et al., 2004). Este dominio está implicado en el transporte de la V-ATPasa entre la membrana plasmática y las vesículas intracelulares durante la activación de los osteoclastos (Holliday et al., 2005). En levaduras parece tener un papel independiente de la función enzimática de la bomba, ya que su mutación no conlleva cambios en la funcionalidad de la ATPasa (Zuo et al., 2008).

Pero la subunidad B no es la única que interacciona directamente con la actina. Ensayos con la **subunidad C** purificada han mostrado que ésta se une directamente tanto a la G-actina como a la F-actina. La capacidad de unión a actina reside en los dos extremos de la proteína, indicando la presencia de al menos dos dominios de unión a actina en esta subunidad (Vitavska et al., 2005). La capacidad de unión a actina de la subunidad C aumenta cuando está integrada en el complejo V-ATPasa (Vitavska et al., 2003). La subunidad C por si sola tiene la capacidad de prevenir la despolimerización de actina, así como de promover el entrecruzamiento de los filamentos (Vitavska et al., 2005).

En resumen, la subunidad B contiene en su extremo amino-terminal un dominio de unión a actina de 44 aa con afinidad por la actina filamentosa, mientras que la subunidad C contiene al

menos dos dominios de unión a actina, uno en cada extremo, y tienen afinidad para la F-actina y la G-actina.

2.3. Ensamblaje y localización de la H^+ -ATPasa vacuolar

El complejo de la V-ATPasa empieza su ensamblaje en el RE y finaliza en el complejo de Golgi. En levaduras se han identificado cuatro chaperonas que ayudan al ensamblaje del dominio V_0 en el RE: Vma12p, Vma21p, Vma22p y Pkr1p (Graham et al., 2003). Todavía no se han encontrado los homólogos a estas chaperonas en eucariotas. En primer lugar, la chaperona **Vma21p** promueve el ensamblaje del anillo proteolipídico y la unión de la subunidad d a su cara citosólica. Este proceso se da gracias a la interacción de la chaperona con la subunidad c' (Malkus et al., 2004). Por otra parte, las chaperonas **Vma12p** y **Vma22p** forman un complejo que interacciona con la subunidad a para promover su unión al anillo. Finalmente, la chaperona **Pkr1p** incrementa la eficiencia de ensamblaje del dominio V_0 y facilita su exportación (Davis-Kaplan et al., 2006) (**Fig. 14**).

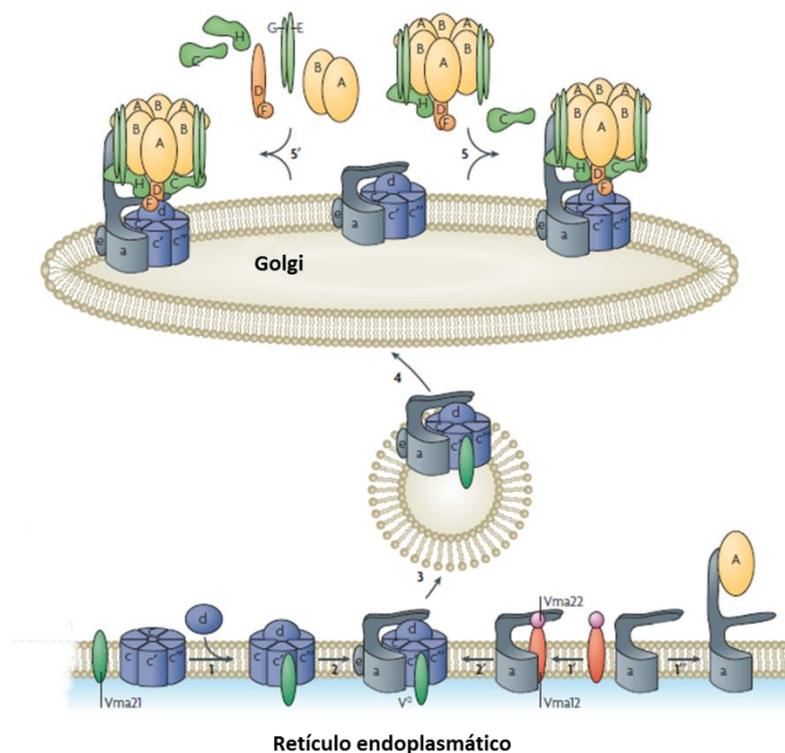


Figura 14. Ensamblaje de la V-ATPasa en levaduras. El dominio V_0 (representado en tonos azules) se ensambla en el RE. (1) La chaperona Vma21 promueve el ensamblaje del anillo proteolipídico y la subunidad d. (1', 2', 2) La subunidad a se une al resto de subunidades del dominio V_0 gracias a la acción de las chaperonas Vma22 y Vma12. (1'') Alternativamente la subunidad a puede formar un semi-complejo con la subunidad A. (3, 4) Transporte del

dominio V_0 al complejo de Golgi donde se ensamblara con el dominio V_1 . (5') En el caso del dominio V_1 se ensamblan todas las subunidades exceptuando la subunidad C, todas las subunidades del dominio V_1 son necesaria para el correcto ensamblaje exceptuando la subunidad H (5') (modificado Forgac, 2007)

Puede darse la formación de un semi-complejo compuesto por la subunidad A del dominio V_1 y subunidad a del dominio V_0 antes de la salida del RE, aunque ambos dominios son capaces de ensamblarse completa- e independientemente sin necesidad de asociarse previamente (Kane, 2006). En el dominio V_1 todas sus subunidades, exceptuando la subunidad C, se ensamblan sin necesidad de asociarse con el dominio V_0 . La única subunidad que no es esencial para el completo ensamblaje del complejo V-ATPasa, incluyendo ambos dominios, es la subunidad H (Ho et al., 1993) (**Fig. 14**).

Una vez la V-ATPasa está completamente ensamblada, su localización final viene determinada básicamente por la subunidad a. En levaduras existen dos isoformas de esta subunidad, la VPH1 y STV1; la primera se encuentra en la vacuola mientras que la segunda la encontramos en el complejo de Golgi. Parece ser que diferencias de secuencia en el extremo amino-terminal son las responsables de dirigir el complejo a un orgánulo o a otro (Kawasaki-Nishi et al., 2001a; Kawasaki-Nishi et al., 2001c). Por otra parte, en mamíferos existen cuatro isoformas de la subunidad a (a1-a4) con especificidad de tejido y de localización subcelular (Marshansky y Futai, 2008). Así pues, en el caso de los osteoclastos, la subunidad a3 se transporta desde los lisosomas hasta la membrana plasmática durante su diferenciación, mientras que las subunidades a1 y a2 se dirigen al complejo de Golgi (Toyomura et al., 2003). En cambio, en las células intercaladas renales de ratón, las subunidades a1-a3-a4 se localizan en la membrana plasmática y la a2 en los endosomas tempranos. En estas últimas, ni la subunidad a1 ni la a2 se han localizado en el complejo de Golgi (Hurtado-Lorenzo et al., 2006). Sin embargo, mutaciones en la subunidad a2 comportan una grave alteración de las funciones de Golgi en el síndrome de cutis laxa (véase descripción más adelante), lo que sugiere su localización en este orgánulo (Kornak et al., 2008). La isoforma a4 se ha localizado específicamente en la membrana apical de las células del epidídimo (Pietrement et al., 2006). Finalmente, la subunidad a1 también se ha localizado en las vesículas sinápticas y en la membrana presináptica a raíz de la fisión de las vesículas (Morel et al., 2003). Por otra parte, estudios de co-inmunoprecipitación en extractos de riñón han mostrado que la subunidad B2 interacciona con las subunidades a1, a2 y a4, mientras que la subunidad B1 solo interacciona con la subunidad a4 (Sun-Wada et al., 2003a) (**Fig. 15**), lo que explicaría por qué la subunidad B1 solo la encontramos localizada en la membrana plasmática.

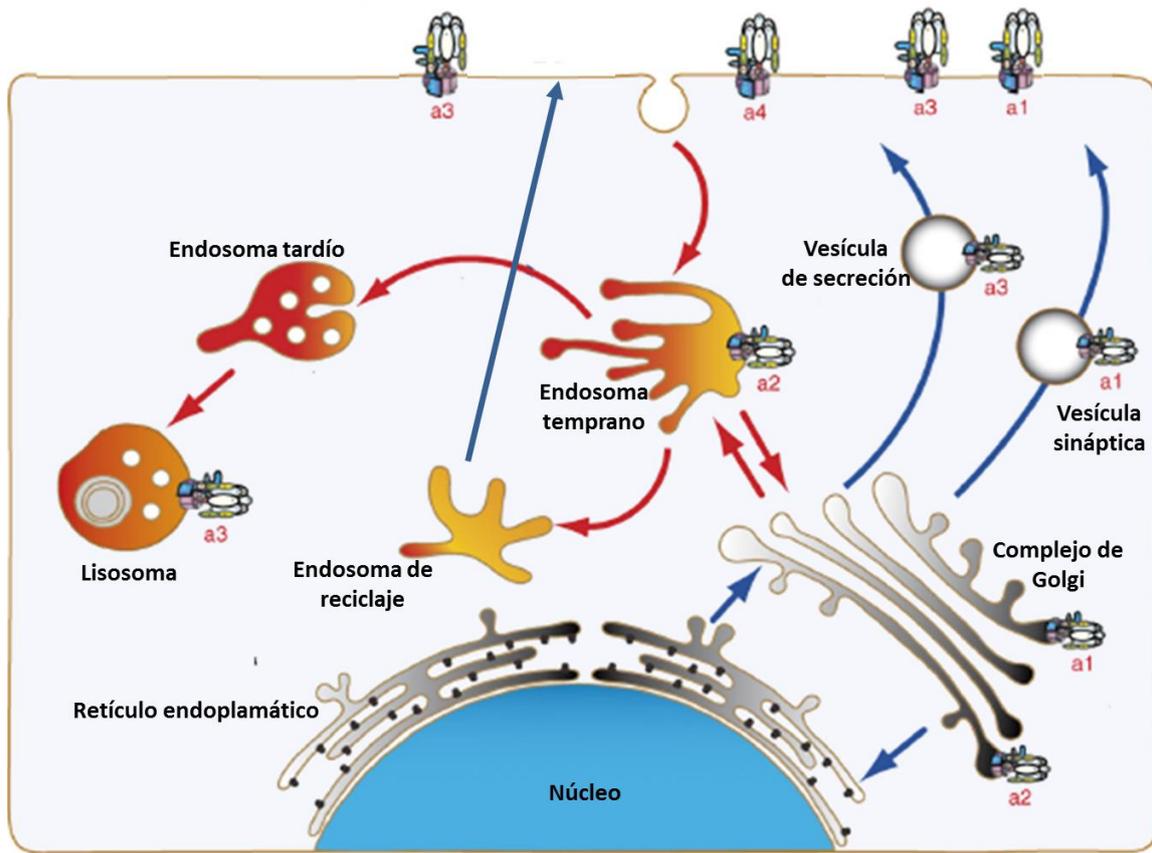


Figura 15. Distribución de las diferentes isoformas de la subunidad *a* en los compartimentos intracelulares. Representación esquemática de la distribución de las diferentes isoformas de la subunidad *a* en los compartimentos intracelulares de las células eucariotas (modificado de Marshansky y Futai, 2008).

2.4. Mecanismo de translocación de protones

Como hemos dicho anteriormente, la energía generada por la hidrólisis del ATP se transforma en un movimiento rotacional de la fracción móvil del complejo, que permite el paso de protones desde el citosol al lumen del orgánulo (Forgac, 2007) (**Fig. 16**). La hidrólisis del ATP en el dominio V_1 causa la rotación del *stalk* central (subunidades D y F), que se transmite a la subunidad d y esta promueve la rotación del anillo proteolipídico. Por otro lado, la subunidad a y el hexámero A_3B_3 permanecen en una posición fija gracias a la sujeción del *stalk* periférico.

La subunidad a posee dos hemi-poros, uno en contacto con el citoplasma y otro en contacto con el lumen de los orgánulos (Vik et al., 2000). El primero permitirá el paso de protones desde el citoplasma hacia las subunidades proteolipídicas, y su rotación posibilitará la protonación de la glutamina (Nishi y Forgac, 2002). Finalmente, la arginina del hemi-poro

luminal de la subunidad a promoverá la desprotonación de la glutamina y el paso del protón hacia el lumen del orgánulo (Kawasaki-Nishi et al., 2001a). Actualmente, se cree que las hélices transmembrana, tanto de la subunidad a como de las subunidades proteolipídicas giran sobre su propio eje para que los residuos esenciales entren en contacto. Los inhibidores específicos de la V-ATPasa bafilomicina y concanamicina ejercen su acción mediante el bloqueo de este movimiento (Bowman y Bowman, 2002; Bowman y Bowman, 2005; Huss et al., 2002).

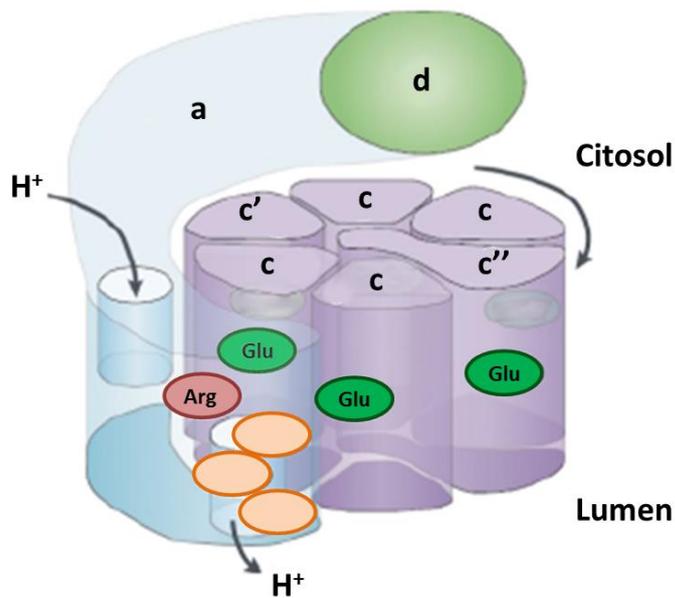


Figura 16. Mecanismo de translocación de protones. Los protones entran por el hemi-poro de la subunidad a en contacto con el citosol, la rotación del anillo proteolipídico permitirá que estos protones entren en contacto con la glutamina (Glu, en verde) para que sea protonada. Al seguir la rotación del anillo la glutamina contactará con la arginina de la subunidad a (Arg, en rojo) que recibirá los protones y los enviará al interior de los orgánulos (modificado de (Nishi y Forgac, 2002).

3. FUNCIONES DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR

La función básica de la V-ATPasa es la translocación de protones y por lo tanto la acidificación de orgánulos intracelulares y, en el caso de células especializadas, del medio extracelular. Hay multitud de procesos intracelulares que requieren de un ambiente ácido para su correcta ejecución. Dado que la V-ATPasa es el elemento principal encargado de generar este ambiente, su función está relacionada con una gran variedad de procesos intracelulares. No obstante, esta bomba también tiene funciones independientes de la acidificación. A continuación repasamos los procesos celulares más relevantes en los que participa la V-ATPasa.

3.1. Funciones de la H⁺-ATPasa vacuolar en el tráfico intracelular

La V-ATPasa fue identificada por primera vez en los lisosomas y en las vacuolas de hongos y plantas. En primera instancia, su función se relacionó con la generación del pH ácido necesario para la degradación de macromoléculas (Kakinuma et al., 1981).

Hoy en día sabemos que las V-ATPasas intracelulares son especialmente relevantes para determinados procesos del tráfico intracelular (Jefferies et al., 2008; Nishi y Forgac, 2002). Es bien sabido que el ambiente ácido de determinados compartimentos promueve la **liberación de ligando y receptor (Fig. 17)**. Esto tiene especial importancia en la vía endocítica, ya que determinará el reciclaje de los receptores hacia la membrana plasmática y proporcionará un mecanismo para controlar la densidad del receptor en la superficie celular, así como regular la captación de ligando (Maxfield y McGraw, 2004). Para el envío de enzimas lisosomales sintetizados *de novo* desde el complejo de Golgi hacia los lisosomas se usa una estrategia similar. Este proceso conlleva la unión de los enzimas con el receptor manosa-6-fosfato en el TGN y el posterior transporte de este complejo a los endosomas tardíos, donde el bajo pH (pH≈5.5) permitirá la disociación y el reciclaje del receptor hacia el *trans*-Golgi.

Un ambiente ácido en los endosomas permite que las vías de endocitosis y reciclaje funcionen correctamente (Chapman y Munro, 1994; Reaves y Banting, 1994). En los últimos años se ha visto que la actividad de la V-ATPasa está relacionada con la **formación de ITs (Fig. 17)**. Para la formación de vesículas COPI en los endosomas tempranos se requiere el reclutamiento de la GTPasa Arf6 y de su activador ARNO, éste proceso es pH dependiente (Hurtado-Lorenzo et al., 2006; Maranda et al., 2001). Se ha propuesto que la subunidad α_2 del dominio V_0 podría actuar como un sensor de pH y sólo cuando el lumen del orgánulo fuera ácido interaccionaría con Arf6 promoviendo su reclutamiento (Marshansky, 2007). Este mecanismo implica al pH en la regulación del transporte desde los endosomas tempranos a los tardíos a través del control de la formación de ITs. Asimismo, el reclutamiento de Arf1 a las membranas de los endosomas, otra GTPasa involucrada en el transporte de ITs COP, se ha relacionado con el pH (Gu y Gruenberg, 2000).

Recientemente, se ha implicado al anillo proteolipídico del dominio V_0 en la **fusión de membranas** durante el tráfico intracelular (**Fig. 17**). Esta función de la V-ATPasa sería totalmente independiente de su papel en la translocación de protones. Estudios de la fusión de vacuolas en levaduras muestran que, posteriormente al reconocimiento de las SNARE, la interacción entre dos dominios V_0 (uno de la membrana donadora y otro de la aceptora) permitiría la fusión de las dos bicapas lipídicas gracias a las subunidades altamente hidrofóbicas que presenta (Peters et al., 2001). Estudios de la fusión de vesículas sinápticas en

Drosophila melanogaster (Di Giovanni et al., 2010; Hiesinger et al., 2005) o de la exocitosis en *Caenorhabditis elegans* (Liégeois et al., 2006) apoyan esta idea por la que el dominio V_0 ayudaría a la fusión de las vesículas con la membrana aceptora.

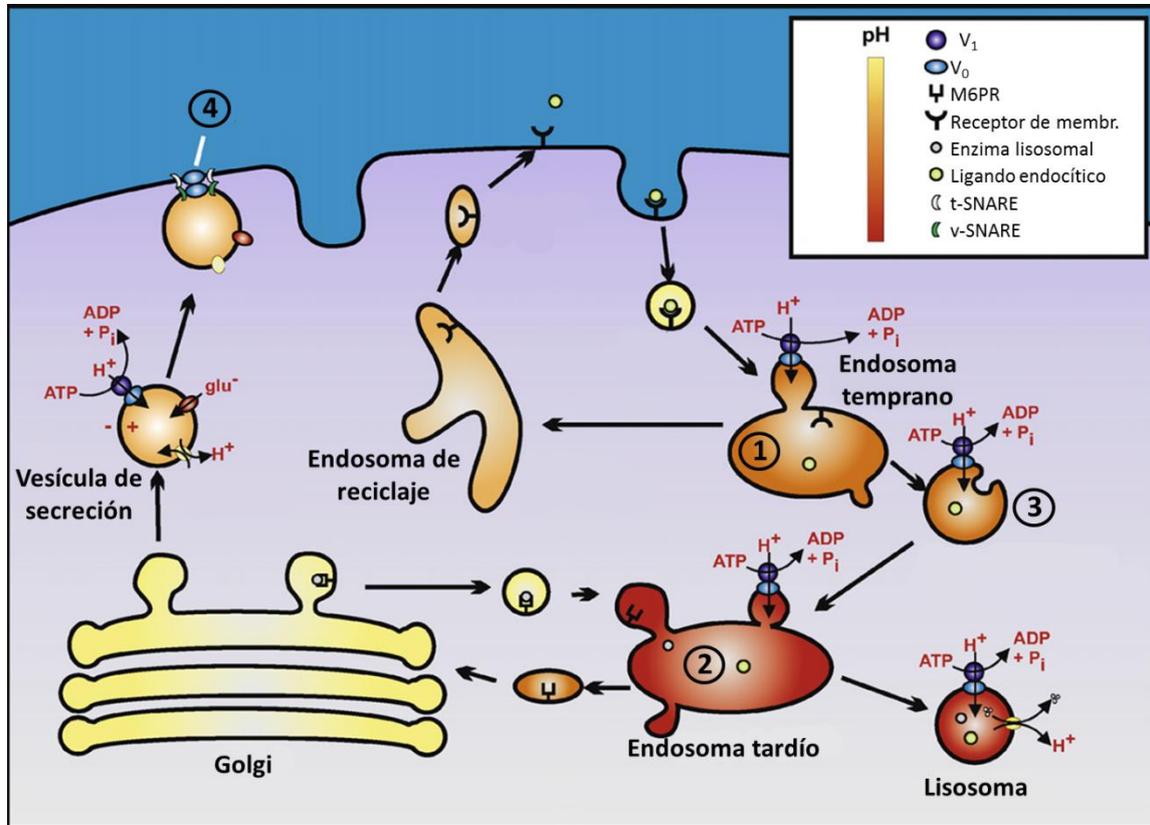


Figura 17. Funciones de la V-ATPasa intracelular. (1) El ambiente ácido de los endosomas tempranos permite la liberación del ligando de los receptores de membrana. (2) El mismo sistema es usado para liberar los enzimas dirigidos al lisosoma del receptor manosa-6-fosfato (M6PR) en los endosomas tardíos. (3) La V-ATPasa también puede mediar la formación de ITs en los endosomas tempranos. (4) El dominio V_0 puede ejercer un papel en la fisión de membranas durante el transporte vesicular (modificado de Jefferies et al., 2008)

3.1.1. Funciones de la H^+ -ATPasa vacuolar en el complejo de Golgi

Como hemos dicho anteriormente el complejo de Golgi presenta un gradiente de pH que va disminuyendo a medida que avanzamos a través del eje *cis-trans*. Si bien la V-ATPasa es la principal responsable de la translocación de protones para generar este gradiente en el Golgi existen otros canales que contribuyen en la homeostasis del pH (ver apartado otros mecanismos de regulación del pH intra-Golgi). El mantenimiento de este gradiente es imprescindible para que ciertas funciones del Golgi se den correctamente, como la glicosilación o la secreción. Asimismo, en enfermedades como cáncer o cutis laxa se dan

alteraciones de estos procesos causados por alteraciones en la homeostasis del pH de Golgi (Maeda y Kinoshita, 2010; Orłowski y Grinstein, 2007; Rivinoja et al., 2012).

En referencia a la **glicosilación** y su dependencia del pH, se ha visto que al disipar el gradiente de pH, ya sea con inhibidores específicos de la V-ATPasa como la bafilomicina o con componentes básicos que neutralizan el pH de toda la célula como el cloruro de amonio, comporta una redistribución de las glicosiltransferasas residentes de Golgi hacia los compartimentos endosomales o la superficie celular (Axelsson et al., 2001), con la consiguiente alteración de la glicosilación de las proteínas. En concordancia con esto, la inhibición de la V-ATPasa implica alteraciones tanto en la síntesis como en el transporte de proteoglicanos (Grøndahl et al., 2009). Las alteraciones en la glicosilación de proteínas son marcas distintivas de muchas enfermedades, como por ejemplo cáncer. Variaciones en la glicosilación pueden afectar a interacciones célula-célula o célula-matriz, lo que puede inducir cambios en el comportamiento celular como: aumento de proliferación, invasión o metástasis (Ono y Hakomori, 2004; Zhao et al., 2008). Se ha visto que en ciertos procesos cancerígenos las células presentan un pH de Golgi más elevado, lo que podría estar causando estas alteraciones en la glicosilación (Rivinoja et al., 2006).

El **tráfico de membranas** asociado al complejo de Golgi también es pH dependiente. En células de mamífero el tratamiento con bafilomicina A o concanamicina inhibe el transporte desde el aparato de Golgi hacia el RE y el transporte post-Golgi (Muroi et al., 1993; Palokangas et al., 1994; Yilla et al., 1993), lo mismo ocurre con la depleción de alguna de las subunidades del dominio V_0 (Sobota et al., 2009). Resultados parecidos se han observado en levaduras (Huang y Chang, 2011).

Cutis laxa es una enfermedad autosómica recesiva que refleja las funciones de la V-ATPasa en el complejo de Golgi. Se trata de una enfermedad causada por una mutación en el gen que codifica por la subunidad $\alpha 2$ de la V-ATPasa, esta mutación provoca un aumento en el pH de Golgi, lo que desencadena en una disminución del tráfico post-Golgi y una alteración de la glicosilación proteica (Huchtagowder et al., 2009; Kornak et al., 2008).

3.2. Funciones de la H^+ -ATPasa vacuolar en la membrana plasmática

Como hemos dicho anteriormente la V-ATPasa también localiza en la membrana plasmática de determinados tipos celulares especializados, por lo tanto, su función vendrá determinada por la función propia del tipo celular.

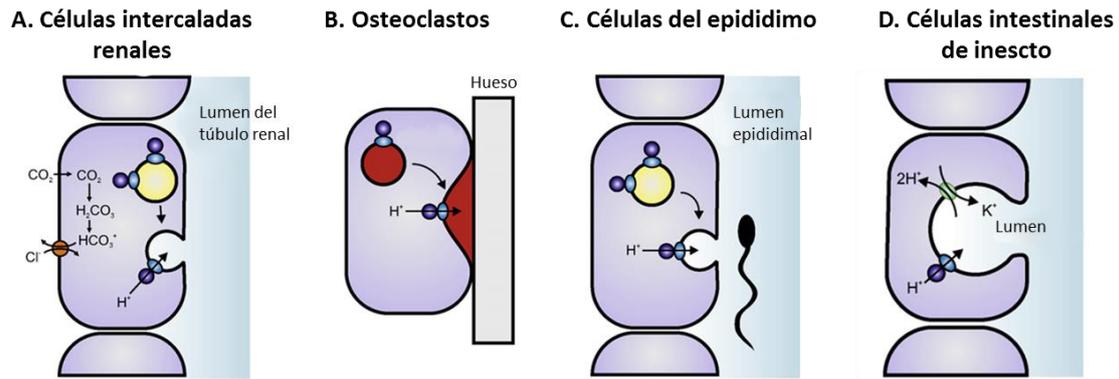


Figura 18. Funciones de la V-ATPasa en la membrana plasmática. A. Las células renales intercaladas presentan V-ATPasa en la membrana plasmática ya que la acidificación del lumen del túbulo renal es imprescindible para la correcta función renal. B. Los osteoclastos secretan protones para disolver el hueso. C. La maduración de los espermatozoides requiere un ambiente ácido, por ese motivo las células de epidídimo presentan V-ATPasa en la membrana plasmática. D. Los insectos necesitan transportar protones al lumen del intestino para poder absorber los aa (modificado de Jefferies et al., 2008).

Por ejemplo, en las **células intercaladas renales**, la V-ATPasa en la membrana plasmática permite retirar protones del citosol transformando el ácido carbónico en bicarbonato y así expulsarlo a través de su propio transportador (Brown y Breton, 2000) (**Fig. 18**). Asimismo, mutaciones en los genes que codifican para las subunidades B del dominio V_1 comportan graves defectos en la acidificación renal que puede desencadenar en acidosis metabólica (Karet et al., 1999; Smith et al., 2000).

La función de la V-ATPasa en la membrana plasmática es también esencial para la reabsorción ósea. Este proceso implica el anclaje de los **osteoclastos** a la superficie del hueso para crear un pequeño compartimento cerrado sobre la superficie ósea (**Fig. 18**). Los osteoclastos envían la V-ATPasa a la membrana plasmática que limita con este espacio con el fin de acidificarlo y favorecer la actividad de las hidrolasas ácidas secretadas disolviendo el componente orgánico de la matriz ósea (Li et al., 1999; Toyomura et al., 2003). Mutaciones en el dominio de unión a actina de la subunidad B de la V-ATPasa alteran la translocación de la bomba a la membrana plasmática y por lo tanto afectan al proceso de reabsorción ósea (Holliday et al., 2005).

La maduración y almacenamiento de los espermatozoides en el tracto reproductor masculino son también procesos altamente sensibles al pH. La V-ATPasa localizada en la membrana apical de las **células del epidídimo y de los vasos deferentes** y es la encargada de

generar un pH ácido en el lumen del tracto (Brown y Breton, 2000; Pietrement et al., 2006) (Fig. 18).

En algunos **insectos**, la función de la V-ATPasa ayuda a mantener una alta concentración de potasio en su intestino, lo que es necesario para la absorción de aa. La V-ATPasa incrementa la concentración de protones en el espacio extracelular y permite que el canal antiportero de H^+/K^+ puedan entrar iones potasio dentro de la célula en contra del gradiente (Wieczorek et al., 2000) (Fig. 18).

4. REGULACIÓN DE LA H^+ -ATPasa VACUOLAR

Como acabamos de ver hay multitud de procesos intra- y extracelulares que son altamente sensibles al pH. Consecuentemente, la actividad de la V-ATPasa, como fuente principal de protones, debe estar altamente regulada para que el pH en cada compartimento sea el correcto. Los mecanismos de regulación de la V-ATPasa los podemos agrupar en tres grupos: (1) El direccionamiento y reciclaje de la V-ATPasa, (2) la eficiencia de translocación de protones con la hidrólisis del ATP, y (3) la disociación de los dominios V_1 - V_0 .

4.1. Direccionamiento y reciclaje de la H^+ -ATPasa vacuolar

Hay diversas subunidades de la V-ATPasa que presentan múltiples isoformas, la mayoría de ellas no muestran especificidad para un compartimento intracelular en concreto sino que parecen ser específicas de tejido. Sin embargo, tal como hemos dicho anteriormente, la única subunidad con isoformas específicas para los distintos compartimentos intracelulares que se ha encontrado es la subunidad a. En el caso de las levaduras, existen dos isoformas la VPH1 y la STV1; la primera se localiza en la vacuola, en cambio, la segunda se encuentra en los compartimentos distales del complejo de Golgi, o bien, ciclando entre los endosomas prevacuolares y el complejo de Golgi (Kawasaki-Nishi et al., 2001a). Mediante la generación de quimeras, combinando ambas isoformas, se ha visto que el extremo amino-terminal de la subunidad a es el que determina la localización de la V-ATPasa portadora de cada isoforma (Kawasaki-Nishi et al., 2001c). Además, los complejos portadores de cada una de estas isoformas presentan diferencias en la eficiencia de translocación de protones y en la disociación del dominio V_1 por falta de glucosa. Por lo tanto, la especificidad de localización de cada una de ellas y sus características funcionales parecen estar relacionadas con las necesidades del orgánulo donde van dirigidas. Las células de mamífero, en cambio, presentan

cuatro isoformas de la subunidad a (a1, a2, a3, a4) que se localizan en los distintos orgánulos y en la membrana plasmática de las células especializadas, como hemos mencionado anteriormente (Marshansky y Futai, 2008).

Se conocen como células acidificadoras ricas en V-ATPasa aquellas células que presentan una alta densidad de la bomba en la membrana plasmática, lo que acidificará el espacio extracelular. La regulación de este proceso se da a través del reciclaje de la bomba mediante su internalización vesicular. Las vesículas encargadas de esta internalización no están recubiertas ni de clatrina (Brown y Orci, 1986) ni de caveolina (Breton et al., 1998) y parecen contener básicamente subunidades de la V-ATPasa (Brown et al., 1987). Ello sugiere que la propia V-ATPasa jugaría un papel en su propio transporte. En referencia a esto, algunas de las subunidades de la V-ATPasa son homólogas a las SNARE. De hecho se ha visto que la subunidad c del dominio V_0 interacciona con las proteínas sinaptobrevina y sinaptofisina en las vesículas sinápticas (Galli et al., 1996), al igual que en las células epiteliales renales la V-ATPasa interacciona con la syntaxina 1A (Li et al., 2005). Además, la proteína SNAP-23 (en las células epiteliales renales) (Banerjee et al., 2001) y la v-SNARE celubrevina (en las células del epidídimo) (Breton et al., 2000) son necesarias para la exo/endocitosis de las vesículas ricas en V-ATPasa, y por lo tanto, necesarias para la acidificación extracelular. Asimismo, como hemos mencionado anteriormente, se ha visto que el anillo proteolipídico del dominio V_0 participa en la fusión de la membrana plasmática y las vesículas (Peters et al., 2001). Todos estos indicios apuntan a que la V-ATPasa podría estar involucrada en su propio transporte y reciclaje.

En el caso de los osteoclastos, el citoesqueleto de actina tiene un papel muy importante para el reciclaje de la V-ATPasa desde la membrana plasmática a las vesículas intracelulares (Holliday et al., 2000). El dominio de unión a actina localizado en el extremo amino-terminal de la subunidad B (Lee et al., 1999) media la internalización de la V-ATPasa desde la membrana plasmática hacia las vesículas durante la inactivación de los osteoclastos (Chen et al., 2004). Se ha visto que al inactivar los osteoclastos con inhibidores de la fosfatilinositol-3-quinasa (PI3K) la V-ATPasa se relocaliza en vesículas intracelulares situadas debajo de la membrana y aumenta significativamente su interacción con el citoesqueleto de actina

4.2. Eficiencia de translocación de protones con la hidrólisis del ATP

Para la regulación de la acidificación *in vivo* se ha propuesto un mecanismo por el cual la V-ATPasa regularía la eficiencia de translocación de protones con la hidrólisis del ATP, es decir, que dependiendo de la situación el número de protones translocados por una molécula de ATP podría variar (Nishi y Forgac, 2002) (**Fig. 19**). En levaduras, se han identificado varias

subunidades implicadas en la modulación de la actividad de la V-ATPasa a través de este mecanismo. Como ya se ha dicho estos organismos expresan dos isoformas de la subunidad a, codificadas por los genes VHP1 y STV1. La eficiencia de translocación del complejo variará en función de la isoforma que tenga incorporada, de manera que las V-ATPasas del complejo de Golgi translocarían menos protones que las de la vacuola con el mismo consumo de ATP (Kawasaki-Nishi et al., 2001a). Esto se debe a las diferencias que presentan en su carboxi-terminal (Kawasaki-Nishi et al., 2001c).

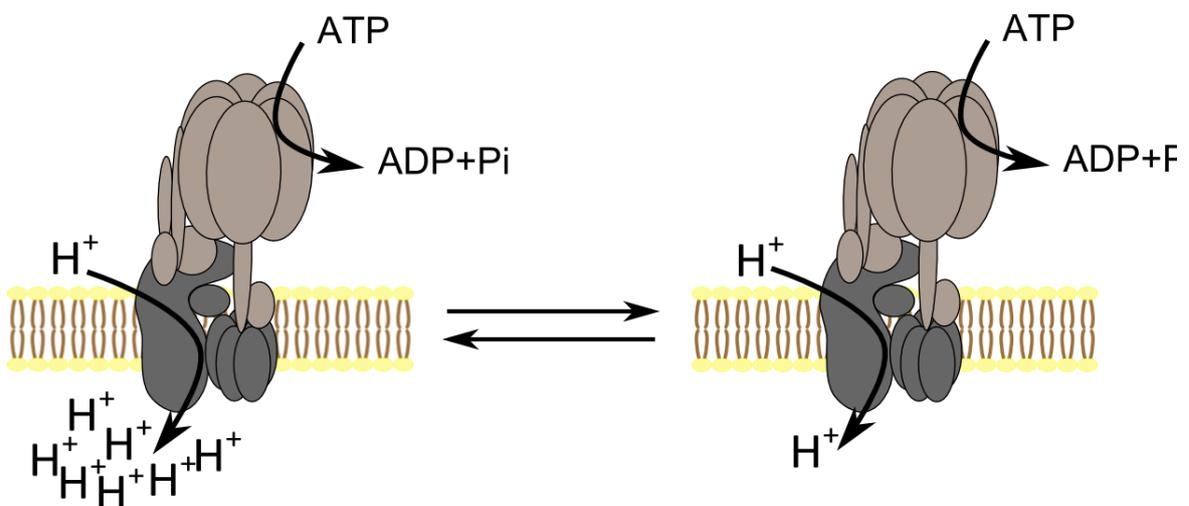


Figura 19. Eficiencia de translocación de protones con la hidrólisis del ATP. No en todos los casos un mismo consumo de moléculas de ATP conlleva el mismo número de protones translocados al lumen de los orgánulos.

Además de la subunidad a del dominio V_0 hay otras subunidades de la V-ATPasa implicadas en la regulación de la eficiencia de translocación. Se ha visto que mutaciones en las subunidades d del dominio V_0 (Owegi et al., 2006), en la región no homologa de la subunidad A (Shao et al., 2003) o en la subunidad D del dominio V_1 (Xu y Forgac, 2001) pueden alterar la eficiencia de translocación. Curiosamente, dependiendo de la región mutada de cada una de las subunidades, la V-ATPasa mostraba un incremento o una disminución en la eficiencia de translocación lo que permite la modulación del transporte de protones a la alza o a la baja dependiendo de la situación.

Finalmente, la subunidad H del dominio V_1 también muestra capacidad para inhibir la hidrólisis del ATP en levaduras. En este caso se ha visto que, después de la disociación de los dos dominios de la V-ATPasa por falta de glucosa (ver siguiente apartado), el dominio V_1 libre en el citosol tiene la actividad ATPasa inhibida. Estudios con mutantes de levaduras muestran

que ciertas mutaciones de la subunidad H permiten que el dominio V_1 libre en el citosol retenga la capacidad de hidrolizar el ATP (Parra et al., 2000). La subunidad H sufre una serie de cambios conformacionales durante la disociación del dominio V_1 que acaban inhibiendo la actividad ATPasa del mismo (Diab et al., 2009). Se cree que en el dominio V_1 desasociado la subunidad H ejerce de puente entre el *satlk* periférico y el fijo lo que conlleva la inhibición de la hidrólisis del ATP (Jefferies y Forgac, 2008). Por lo tanto, parece que esta subunidad optimiza la energía del dominio V_1 liberado.

4.3. Disociación reversible de los dominios V_1 y V_0 de la H^+ -ATPasa vacuolar

El mecanismo de regulación de la V-ATPasa más importante es la disociación de los dominios V_1 y V_0 . Este mecanismo se caracteriza por la separación de los dos dominios de la V-ATPasa, y por lo tanto, la liberación del dominio V_1 al citosol inhibiendo así la hidrólisis del ATP y la consiguiente translocación de protones (Kane, 2006; Kane, 2012) (**Fig. 20**).

El desensamblaje de la V-ATPasa por disociación del dominio V_1 - V_0 fue descrito por primera vez en levaduras (Kane, 1995) y en células del intestino de *Manduca sexta* (Sumner et al., 1995). En ambos casos se vio que la falta de glucosa inducía la liberación del dominio V_1 al citosol, y que al añadir glucosa de nuevo volvía a asociarse rápidamente al dominio V_0 . En levaduras, este proceso es extremadamente rápido ya que tanto la disociación como la reasociación de los dos dominios se completa a los cinco minutos; esta rapidez se debe a que ninguno de los dos procesos necesita de la síntesis *de novo* de proteínas. En el caso de la reasociación son los propios dominios V_1 que se han liberado previamente al citosol los que vuelven a unirse a los dominios V_0 (Kane, 1995). El dominio V_1 liberado permanece soluble en el citosol como un solo complejo, la única subunidad que se separa de este dominio después de la disociación es la subunidad C (Inoue y Forgac, 2005b). La disociación de los dominios no es un proceso de todo o nada, levaduras cultivadas en medios pobres en fuentes de carbono muestran un nivel intermedio de asociación de los dos dominios (Kane, 2012). Se cree que la V-ATPasa en un estado basal está en un constante ensamblaje-desensamblaje de sus dominios y que la falta de glucosa desplaza el equilibrio hacia un mayor desensamblaje de la V-ATPasa.

Este mecanismo de regulación de la V-ATPasa se encuentra conservado en las células de mamíferos. Por ejemplo, para la maduración de las células dendríticas es necesaria la acidificación de los lisosomas para poder procesar los antígenos. La disminución del pH de los lisosomas va acompañada de un aumento en el ensamblaje de la V-ATPasa, es decir, que la regulación del pH en estos orgánulos es a través del control de la asociación de los dominios V_1 - V_0 (Trombetta et al., 2003). Otro caso similar ocurre en las células epiteliales tipo II del

alveolo (Chintagari et al., 2010). La disociación por falta de glucosa también se ha descrito en las células renales (Nakamura, 2004; Sautin et al., 2005).

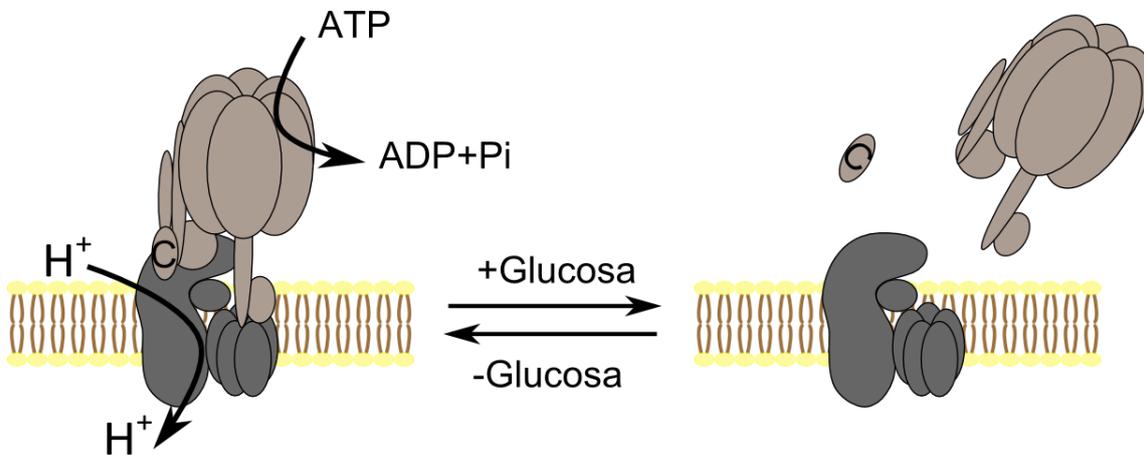


Figura 20. Disociación reversible del dominio V_1 y V_0 como respuesta a los niveles de glucosa. La falta de glucosa induce la liberación del dominio V_1 al citosol con la consecuente inhibición de la hidrólisis de ATP y de la translocación de protones, la subunidad C del dominio V_1 se separa del resto de subunidades de este dominio. La adición de glucosa de nuevo conlleva la reasociación de los dos dominios.

4.3.1. Implicaciones estructurales de la disociación de los dominios V_1 y V_0 de la H^+ -ATPasa vacuolar

La liberación del dominio V_1 al citosol obviamente conlleva una serie de cambios estructurales del complejo V-ATPasa. Concretamente, la subunidad C es especialmente relevante ya que como hemos dicho anteriormente esta subunidad es la única del dominio V_1 que se desprende del resto durante la disociación (Diepholz et al., 2008). Estudios estructurales muestran que esta subunidad interacciona con las subunidades del *stalk* periférico E y G y con la subunidad a del dominio V_0 cuando la V-ATPasa se encuentra ensamblada. En cambio, al desensamblarse la subunidad C deja de interactuar con todas ellas, lo que hace que la subunidad C sea una excelente candidata para ejercer como subunidad reguladora de la asociación de los dos dominios (Inoue y Forgac, 2005a; Oot y Wilkens, 2010). No está claro el mecanismo por el cual la subunidad C es liberada, aunque se ha visto que durante el reasociación ésta subunidad se fosforila de manera transitoria (Voss et al., 2007).

Hay otras subunidades que ejercen un papel importante durante la disociación de la V-ATPasa. Por ejemplo, la región no homóloga de la subunidad A parece ser la promotora del

desensamblaje por falta de glucosa. Por un lado, mutaciones en esta región inhiben la disociación en respuesta a la falta de glucosa (Shao et al., 2003), y por otra, esta región es capaz por sí sola de unirse al dominio V_0 dependiendo de los niveles de glucosa en el medio (Shao y Forgac, 2004). Mutaciones en la subunidad d también se han relacionado con la disociación de la bomba (Owegi et al., 2006). Finalmente, en levaduras, los complejos V-ATPasa que contienen la isoforma STV1 de la subunidad a presentan un grado de asociación entre los dos dominios menor que aquellos complejos que contienen la isoforma VPH1 (Kawasaki-Nishi et al., 2001a).

Es importante tener presente que la inhibición farmacológica de la V-ATPasa bloquea la disociación de los dos dominios. Se ha visto que al inhibir la actividad de la bomba, ya sea con inhibidores farmacológicos o a través de mutaciones del dominio V_0 , el dominio V_1 no se disocia en respuesta a la falta de glucosa. Se cree que este fenómeno se debe a que la inhibición del dominio V_0 no permite que se den los cambios conformacionales necesarios para la liberación del dominio V_1 (Parra y Kane, 1998; Shao y Forgac, 2004; Xie et al., 2004).

4.3.2. Señales inductoras de la disociación de los dominios V_1 y V_0 de la H^+ -ATPasa vacuolar

Se piensa que la disociación reversible del dominio V_1 - V_0 por ausencia de glucosa es un mecanismo de ahorro de energía en carencia de nutrientes, pero ¿cuál es el mecanismo por el que la V-ATPasa “detecta” que hay niveles bajos de glucosa? Se desconoce la respuesta pero son muchas las moléculas que se han implicado en esta señalización.

En primer lugar, tanto en levaduras como en células de mamífero se ha visto que la V-ATPasa interacciona con enzimas glucolíticos como la **aldosa**. En concreto son las subunidades E, B y a las encargadas de mediar esta interacción, la cual aumenta al añadir glucosa al medio (Lu et al., 2001; Lu et al., 2007). Mutaciones del enzima que impiden su unión con la V-ATPasa conllevan la disociación de los dos dominios, pero aquellas mutaciones que afectan a la actividad enzimática de la aldosa no suponen un problema para la asociación de ambos dominios (Lu et al., 2007). Estos resultados sugieren que la aldosa podría actuar como sensor de los niveles de glucosa. Sin embargo, la aldosa no es el único enzima glucolítico que interacciona con la V-ATPasa ya que se ha descrito que la subunidad a del dominio V_0 se une a la **fosfofructoquinasa** (PFK) (Su et al., 2003). La acidosis renal causada por una mutación de la subunidad a4 está causada por la falta de interacción de esta subunidad con la PFK (Su et al., 2008), por lo que esta enzima también podría estar actuando como un sensor de los niveles de glucosa.

Hay otras vías por las cuales se podría estar regulando la disociación reversible dependiente de glucosa. Por ejemplo, como hemos dicho anteriormente, la subunidad C se fosforila de

manera reversible durante su reasociación y la quinasa encargada de esta fosforilación es la **proteína quinasa A (PKA)**. En estudios realizados en insectos se ha visto que la PKA fosforila la subunidad C libre como un solo polipéptido o bien cuando está formando parte del complejo V_1 , pero nunca cuando los dos dominios se encuentran asociados. No obstante, la reasociación de los dos dominios no requiere que la subunidad C esté fosforilada (Voss et al., 2007). Por otra parte, estudios en levaduras muestran que un aumento de la actividad de PKA impide la disociación del dominio V_1 - V_0 por falta de glucosa (Bond y Forgac, 2008). Teniendo en cuenta estos resultados podríamos pensar que la PKA actúa como sensor de los niveles de glucosa y regula el ensamblaje de la V-ATPasa a través de la fosforilación de la subunidad C. No obstante en levaduras no se ha detectado la fosforilación de la subunidad C, lo que pone en duda esta hipótesis (Kane, 2012). Alternativamente, hay estudios que apuntan a que la PKA actuaría después de que el dominio V_1 se haya desasociado. En este caso sería la disminución del pH citosólico (debido al aumento de metabolitos de la glicosilación) lo que dispararía la disociación del dominio V_1 (Dechant y Peter, 2010). Sin embargo, este modelo no tiene en cuenta que el aumento de la actividad PKA protege ante los efectos de la falta de glucosa sobre el desensamblaje de la V-ATPasa.

Otra quinasa que se ha implicado en la regulación de la disociación reversible de los dominios V_1 - V_0 es la **fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)** (Nakamura, 2004; Sautin et al., 2005). Estos estudios fueron los primeros en describir el desensamblaje de la V-ATPasa en células de mamífero, en concreto en las células renales. En ellos se muestra que la reasociación del dominio V_1 por la adición de glucosa depende de la actividad de PI3K. La inhibición de este enzima implica el bloqueo de la reasociación del dominio V_1 al añadir glucosa.

El citoesqueleto también ha sido implicado en este proceso, de hecho, la integridad de los **microtúbulos** es necesaria para que el dominio V_1 se disocie al retirar la glucosa del medio. Estudios realizados en levaduras muestran que, mientras la disrupción de los microtúbulos no causa el desensamblaje de la V-ATPasa ni impide su ensamblaje, sí parecen ser necesarios para la liberación del dominio V_1 (Xu y Forgac, 2001). Sin embargo, no se ha descrito ningún dominio de unión a microtúbulos en ninguna subunidad de la V-ATPasa.

El **complejo RAVE** (del inglés, *regulator of H^+ -ATPase of vacuolar and endosomal membranes*) fue el primero en implicarse en el ensamblaje de los dominios V_1 - V_0 desasociados en levaduras. Este complejo interactúa con la V-ATPasa y regula la asociación de los dos dominios al añadir glucosa (Seol et al., 2001). Consecuentemente, se han encontrado homólogos de determinadas subunidades del complejo RAVE en células eucariotas, en concreto las rabconectinas han sido descritas en *D. melanogaster* (Yan et al.,

2009) y en células de mamífero (Sethi et al., 2010) como reguladoras del pH de los compartimentos intracelulares a través del control de la V-ATPasa.

Para acabar se ha postulado que el **microambiente que rodea la V-ATPasa** también puede estar jugando un papel importante en el nivel de asociación de los dominios V_1 - V_0 . Retener el complejo de la V-ATPasa, con la misma composición a nivel de isoformas de sus subunidades, en determinados orgánulos hace variar su respuesta ante la falta de glucosa (Qi y Forgac, 2007). En concordancia con esto, en la vía endocítica se ha visto que la localización de la V-ATPasa en los **lipids rafts** regula el nivel de asociación entre los dos dominios de la V-ATPasa (Lafourcade et al., 2008).

5. OTROS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL pH INTRA-GOLGI

El complejo de Golgi recibe el aporte continuo de membrana (en forma de vesículas o tubulos) con un ambiente interno diferente al suyo, estando además expuesto al tránsito de canales iónicos dirigidos a otros orgánulos y al tránsito de proteínas ya activas procedentes del RE (Rivinoja et al., 2012). Todo ello puede fácilmente alterar el pH intra-Golgi. Por este motivo el Golgi presenta un sistema sofisticado para la regulación de la concentración de protones, y por lo tanto del pH. La V-ATPasa es la principal encargada, pero en las membranas de Golgi se encuentran otros canales que participan en la homeostasis del pH (**Fig. 21**).

En primer lugar, encontramos canales que aportan cargas negativas en forma de aniones al lumen de Golgi, lo que ayuda a mantener el potencial de membrana a pesar del continuo aporte de H^+ por parte de la V-ATPasa (Paroutis et al., 2004). La depleción de estos canales hace aumentar el potencial de membrana que inhibe la actividad de la V-ATPasa (Glickman et al., 1983), por este motivo se los considera reguladores del pH, ya que manteniendo el potencial de membrana mantienen a su vez la actividad de la V-ATPasa. Uno de estos canales es el **canal aniónico regulador del pH de Golgi (GPHR) (Fig. 21)**, el cual transporta Cl^- al interior del complejo de Golgi. Mutaciones en este canal retrasan el transporte post-Golgi, causan alteraciones en la glicosilación de proteínas, desorganizan la estructura de Golgi y aumentan su pH (Maeda et al., 2008), todos ellos típicos efectos producidos al inhibir directamente la V-ATPasa. En el complejo de Golgi encontramos otros dos canales fisiológicamente idénticos al GPHR: **GOLAC-1** y **GOLAC-2** (del inglés, *Golgi anion channel*) (Nordeen et al., 2000; Thompson et al., 2002). Otro canal aniónico es el **CFTR** (del inglés, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), un canal clorhídrico regulado por AMP cíclico que se localiza en la región trans del complejo de Golgi, en el TGN, en endosomas y pre-lisosomas. Existen dos

isoformas del canal clorhídrico regulado por voltaje (**CIC**) localizadas en el complejo de Golgi: el CIC-3B en mamíferos (Gentsch et al., 2003; Schwappach et al., 1998) y el Gef1 en levaduras, pero su papel en la regulación del pH todavía no está claro.

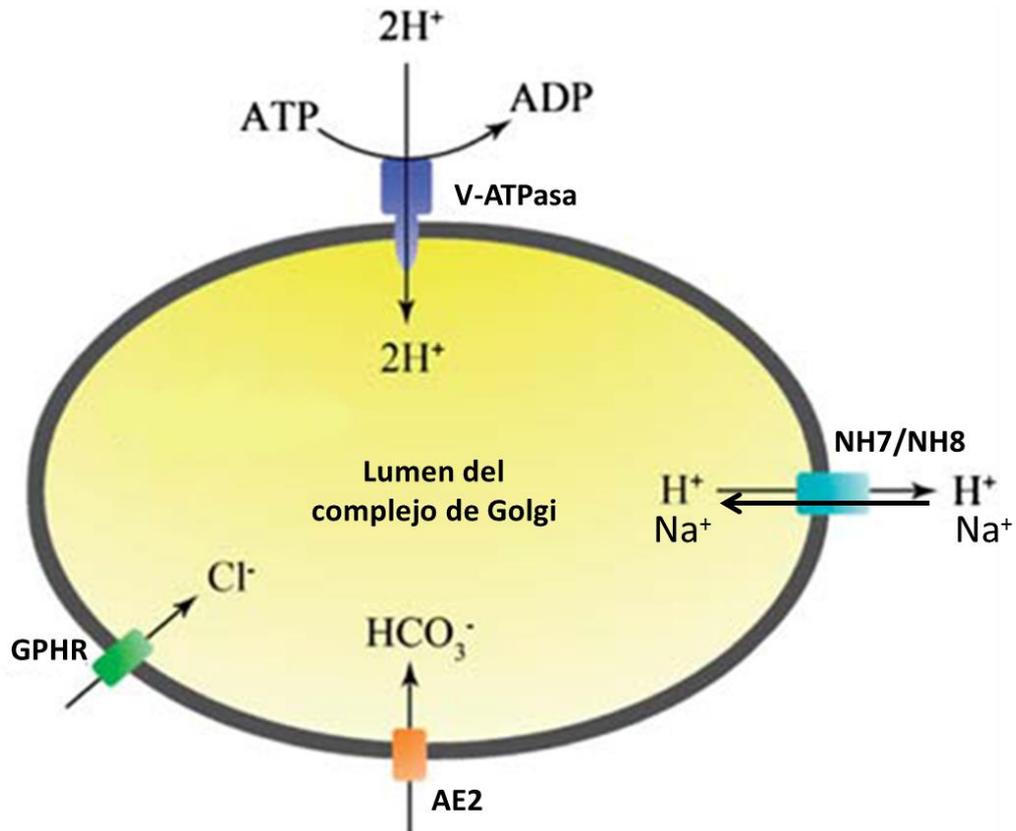


Figura 21. Otros mecanismos de regulación del pH intra-Golgi. La V-ATPasa aporta la mayoría de protones al interior de complejo de Golgi. El canal GPHR aporta Cl⁻ al interior de Golgi para mantener el potencial de membrana. El aporte de HCO₃⁻ por parte del canal AE2 permite tamponar a los protones. Los canales NH7 y NH8 extraen protones gracias al co-transporte de Na⁺ (modificada de Rivinoja et al., 2012).

Otro mecanismo de regulación del pH de Golgi es el transporte de moléculas tamponadoras como el HCO₃⁻. Este anión en el lumen de Golgi se protona y se convierte en CO₂ y H₂O, los cuales difunden pasivamente por la membrana y permiten el flujo de salida de H⁺ (Demaurex, 2002). Este mecanismo fue identificado por primera vez en la membrana plasmática, aunque más recientemente se ha descrito un homólogo del canal AE1 de la membrana del eritrocito en el complejo de Golgi, se trata del **AE2** (Holappa et al., 2001) (**Fig. 21**).

Para la generación del gradiente de pH de la vía secretora se postula que, aparte de un aumento de la densidad de la V-ATPasa a lo largo de la vía, también podría ir acompañado de una disminución en el flujo de salida de protones (Wu et al., 2001). Este flujo de salida se puede dar por difusión pasiva de protones a través de la membrana, por el transporte de moléculas

tamponadoras (como acabamos de ver), o bien por la acción de intercambiadores catiónicos que sacan un protón a la vez que introducen un catión a favor de gradiente (Demaurex, 2002). En el complejo de Golgi se localizan dos isoformas de canal intercambiador Na^+/H^+ , el **NH7** y el **NH8 (Fig. 21)**. La sobreexpresión de estos intercambiadores conlleva un aumento en el aporte de sodio y potasio, a la vez, que una disminución de la acidificación del complejo de Golgi (Nakamura et al., 2005).

**ANTECEDENTES,
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El citoesqueleto de actina tiene un papel fundamental en la organización del complejo de Golgi (Egea et al., 2013). De hecho, estudios de nuestro grupo han demostrado que, entre otras funciones, son responsables directos de mantener la forma aplanada de las cisternas. Demostramos que los microfilamentos aportan estabilidad mecánica a las cisternas, puesto que su despolimerización conlleva la dilatación y fragmentación de las éstas, al igual que la depleción de la β III-espectrina (Lázaro-Diéguéz et al., 2006; Salcedo-Sicilia et al., 2013). Reforzando esta idea, estudios recientes empleando técnicas de microscopía confocal *in vivo* y pinzas ópticas, demuestran que alrededor del complejo de Golgi se encuentra un citoesqueleto de actina que le aporta rigidez (Egea y Serra-Peinado, 2014; Guet et al., 2014). Postulamos que la participación del citoesqueleto de actina en el mantenimiento de la forma aplanada de las cisternas podría deberse, al menos en parte, a que éste estuviera regulando la homeostasis iónica del interior del Golgi, evitando la previsible dilatación espontánea de las cisternas causada por el elevado contenido proteico y el consiguiente aumento osmótico. En este sentido, proteínas de unión a actina como la ADF/cofilina interaccionan con la ATPasa de calcio SPCA1 en el TGN regulando su función transportadora (von Blume et al., 2011). Sabemos además que la despolimerización de la actina produce un incremento significativo del pH intra-Golgi y que la dilatación y fragmentación de las cisternas también acontece al inhibir farmacológicamente la V-ATPasa (Lázaro-Diéguéz et al., 2006).

Los microfilamentos no sólo mantienen la morfología de Golgi, sino que también están implicados en el transporte retrógrado (desde el complejo de Golgi hacia el RE) y en el transporte post-Golgi, lo que también influye en su morfología. Las vesículas COPI están asociadas a actina (Valderrama et al., 2000) y la miosina II participa en la formación de ITs retrógrados (Durán et al., 2003). Por otra parte, hemos descrito que la alteración de la dinámica de actina retrasa la salida de *cargo* del complejo de Golgi (Lázaro-Diéguéz et al., 2007). Curiosamente, estas dos vías de transporte también se ven afectadas al inhibir farmacológicamente la V-ATPasa (Palokangas et al., 1994; Yilla et al., 1993).

Teniendo en cuenta todos estos resultados, hipotetizamos que la participación de la actina en el mantenimiento de la morfología aplanada de las cisternas y en el transporte intracelular podría estar mediada, al menos en parte, por la regulación de la actividad de la V-ATPasa. La actina regularía la concentración de protones en el interior del complejo de Golgi y por lo tanto su pH, el cual es necesario para el correcto procesamiento y transporte de lípidos y proteínas, y al mismo tiempo se evitaría un potencial desajuste osmótico que provocaría la dilatación y/o fragmentación de las cisternas.

Se sabe que las subunidades B y C del dominio V_1 de la V-ATPasa contienen dominios de unión a actina (Chen et al., 2004; Vitavska et al., 2005), a través de los cuales se podría regular

la funcionalidad de la bomba. Lo que proponemos es que los microfilamentos, gracias a su unión con estos dominios, ayudarían a mantener asociados los dominios V_1 y V_0 de la V-ATPasa y por consiguiente su funcionalidad. Por ello, si alteramos la dinámica fisiológica de la actina se produciría la disociación de los dominios de la V-ATPasa inactivando la bomba, lo que produciría a su vez la dilatación de las cisternas y defectos en el transporte secretor (**Fig. 22**).

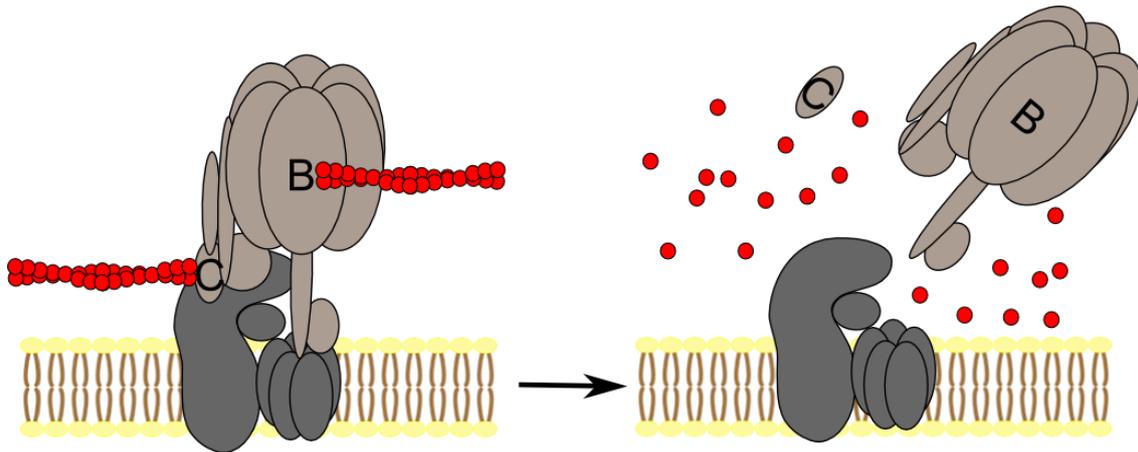


Figura 22. Hipótesis de trabajo. Los filamentos de actina, gracias a su interacción con la subunidad B y C del dominio V_1 , ayudarían a mantener unidos los dominios V_1 - V_0 de la V-ATPasa. Al despolimerizar los microfilamentos esperaríamos que el dominio V_1 se liberara al citosol con la consiguiente inactivación de V-ATPasa.

Para determinar si esta hipótesis es cierta nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la distribución subcelular de la H^+ -ATPasa vacuolar en el complejo de Golgi.
2. Estudiar si los microfilamentos participan en la asociación de los dominios V_1 y V_0 de la H^+ -ATPasa vacuolar empleando drogas que perturban la dinámica de actina.
3. Determinar la función de los dominios de unión a actina de la subunidad B y C del dominio V_1 de la H^+ -ATPasa vacuolar en el complejo de Golgi.
4. Estudiar la relevancia de las subunidades A y B del dominio V_1 en la funcionalidad de la H^+ -ATPasa vacuolar en el complejo de Golgi.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES**1. REACTIVOS**

A continuación se detallan los reactivos utilizados, su descripción, la concentración de uso y su procedencia.

Reactivo	Descripción	Concentración	Procedencia
Subunidad B de la toxina Colérica-HRP	Toxina bacteriana con capacidad de unión al gangliósido GM1	0.45 µg/ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)
Faloidina-FTIC	Micotoxina que se une a los filamentos de actina estabilizándolos	0.5 µg/ml	Sigma-Aldrich
Microesferas de sefarosa-Proteína A	Esferas de agarosa recubiertas de proteína A	-	Santa Cruz (Delware, CA, EEUU)
Ditiobis[succinimidilpropionat] (DSP)	Entrecruzador de aminas	1 mM	Thermo scientific (Rockford, IL, EEUU)
Latrunculina B	Toxina que inhibe la polimerización de los filamentos de actina	0.5 µm-1 µm	Calbiochem (Darmstadt, Alemania)
Jasplakinolide	Toxina que estabiliza la polimerización de los filamentos de actina	0.5 µm-1 µm	Invitrogen (Paisley, Reino Unido)
Cicloheximida	Antibiótico que inhibe la síntesis proteica	100 µg/ml	Sigma-Aldrich
Nigericina	Antibiótico perfora la membrana (ionóforo)	10 µM	Sigma-Aldrich
Monensina	Antibiótico perfora la membrana (ionóforo)	10 µM	Sigma-Aldrich
Brefeldina A	Metabolito fúngico que desorganiza la estructura de Golgi y bloquea su función	5 µg/ml	Sigma-Aldrich

2. ANTICUERPOS

Las siguientes tablas muestran los anticuerpos primarios y secundarios empleados para inmunofluorescencia y/o western blot indicando la especie, la dilución de trabajo y su procedencia.

Materiales y métodos

*Especie en la que se han producido los anticuerpos

Anticuerpo primario	Especie*	Dilución trabajo IF	Dilución trabajo WB	Procedencia
GM130	Ratón	1:1000	-	Transduction Laboratories (Lexington, KY, EEUU)
Golgina97	Ratón	1:300	-	Molecular Probes (Invitrogen)
Manosidasas II	Conejo	1:100	-	Millipore (Temelula, CA, EEUU)
TGN46	Oveja	1:500	-	Serotech (Oxford, Reino Unido)
Receptor de transferrina	Ratón	-	1:25000	Molecular Probes
RhoGDI	Conejo	-	1:1000	Santa Cruz
Actina	Ratón	-	1:25000	Sigma-Aldrich
Caveolina-1	Ratón	-	1:1000	Transduction Laboratories
GFP	Conejo	-	1:25000	Invitrogen
Subunidad A (Dominio V ₁)	Ratón	1:200	1:1000	Abnova (Taipei, Taiwan)
Subunidad B (Dominio V ₁)	Conejo	1:500	1:1000	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Subunidad C (Dominio V ₁)	Conejo	-	1:1000	Santa Cruz
Subunidad a (Dominio V ₀)	Conejo	-	1:4000	Santa Cruz

*Especie contra la que reaccionan los anticuerpos

Anticuerpo primario	Especie*	Dilución trabajo IF	Dilución trabajo WB	Procedencia
Alexa488	Conejo	1:500	-	Invitrogen
Alexa488	Oveja	1:500	-	Invitrogen
Alexa488	Ratón	1:500	-	Invitrogen
Alexa546	Oveja	1:500	-	Invitrogen
Cy2	Ratón	1:250	-	Jackson Laboratories (West Grove, PA, EEUU)
Cy3	Conejo	1:250	-	Jackson Laboratories
Cy3	Ratón	1:250	-	Jackson Laboratories
HRP-Conejo	Conejo	-	1:3000	Promega (Eugene, OR, EEUU)
HRP-Ratón	Ratón	-	1:3000	Promega

3. PLÁSMIDOS

En esta tabla se detallan los distintos vectores de expresión utilizados así como su procedencia.

Plásmido	Vector	Procedencia
GFP-Subunidad B	pEGFP	-
GFP-Subunidad B (Δ ABD)	pEGFP	-
TGN-pHluorin	pHluorin	Dr. J. Llopis (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, España)
Golgi-pHluorin	pHluorin	Dr. J. Llopis (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, España)
ts045VSVG-GFP	pEGFP	Dr. E.L. Snapp (Albert Einstein College of Medicine, NY, USA)

II. MÉTODOS

1. LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES

Las células HeLa y las HeLa que expresaban constitutivamente GFP-VSV-Gts045 crecieron en medio DMEM (del inglés *dulbecco modified medium nutrient mixture*) suplementado con al 10% (v/v) suero bovino fetal (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) inactivado, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 μ g/ml), piruvato sódico (1 mM) y L-glutamina (2 mM). Tanto el DMEM como el FBS son de Invitrogen. Las células crecieron a 37°C en atmosfera saturada de agua y al 5% de CO₂.

2. TÉCNICAS MORFOLÓGICAS

2.1. Inmunocitoquímica y microscopía de epifluorescencia

Las inmunofluorescencias se realizaron en células sembradas al 50-70% de confluencia sobre cubreobjetos de vidrio estériles. La fijación se realizó con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS (del inglés *Phosphate Buffer Saline*) durante 15 min. Después de lavar con PBS tres veces, los grupos aldehído del PFA se bloquearon con la solución 50 mM NH₄Cl pH 7.4 en PBS durante 20 min. A continuación, las células se permeabilizaron durante 10 min con solución de bloqueo [0.1% saponina disuelta en PBS que contenía un 1% de albúmina sérica bovina (BSA,

del inglés *bovine serum albumin*]). Los anticuerpos primarios se diluyeron en solución de bloqueo (1% BSA en PBS) y se incubaron 1h a temperatura ambiente, seguidamente se realizó la incubación de los anticuerpos secundarios (disueltos en PBS con 1% de BSA) durante 45 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaron con PBS y se montaron en el medio de montaje acuoso Mowiol. Las preparaciones se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 y las imágenes se captaron con cámara Orca-ER CCD (Hamamatsu Photonics, Japón). Para los estudios de colocalización se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Alemania). El procesamiento se llevó a cabo con el programa ImageJ 1.45K (NIH, Bethesda, MD, EEUU).

2.2. Análisis cuantitativo de las imágenes

2.2.1. Cuantificación de la colocalización de la GFP-subunidad B con los marcadores del complejo de Golgi

Para cuantificar el grado de colocalización entre la GFP-subunidad B y los marcadores de Golgi usamos un programa de análisis de imagen ImageJ 1.45K. Previamente se fijaron los parámetros para poder comparar las imágenes entre sí. Para analizar el nivel de colocalización de las proteínas en función de su intensidad de marcaje, seguimos dos criterios: el primero basado en el porcentaje de píxeles verdes (GFP-subunidad B) que colocalizaban con píxeles rojos (marcadores de Golgi), el segundo basado en el umbral mínimo de señal de ambos marcadores. Finalmente, cuantificamos el número de píxeles en verde que solapaban con píxeles rojos respecto al número total de píxeles verdes de cada célula.

2.2.2. Cuantificación de la morfología del complejo de Golgi

Para cuantificar la morfología del complejo de Golgi se utilizó el índice de compactación usando el programa de análisis de imagen ImageJ 1.45K. Para ello, definimos la región de interés, el complejo de Golgi, y se midió el perímetro y el área de cada partícula que lo formaba que fuera mayor de 3 píxeles. La circularidad del complejo de Golgi se calculó a partir de la fórmula $4\pi[\sum(\text{áreas})/\sum(\text{perímetros})]^2$ (Bard et al., 2003).

3. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

3.1. Medida de la vida media de la H⁺-ATPasa vacuolar en el complejo de Golgi

Se crecieron células en placas de 6 pocillos y se transfectaron durante 24 h con el plásmido GFP-B. Pasado el tiempo de transfección las células fueron tratadas con 100 µg/ml de cicloheximida para inhibir la síntesis proteica y evitar así que la GFP-B sintetizada *de novo* enmascarase la pérdida de fluorescencia de Golgi, y así poder medir la cantidad de V-ATPasa que se moviliza del complejo de Golgi durante 1 h. Una vez aplicado el tratamiento se adquirieron imágenes cada 5 min durante 1 hora mediante microscopia confocal *in vivo*. Para la adquisición de las imágenes se utilizó el equipo Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Alemania) con sistema de control de temperatura y CO₂, el objetivo 63x con aceite de inmersión, se excitó con el láser de 488 nm, el rango de detección era de 500-600 nm y un *pinhole* de 4.94 unidades Airy. Todos los experimentos se realizaron a 37°C y al 5% de CO₂.

El análisis de las imágenes se realizó con el programa ImageJ. Para determinar la cantidad de V-ATPasa en el complejo de Golgi al inicio y al fin del experimento se midió la intensidad de fluorescencia del complejo de Golgi respecto la fluorescencia total de la célula al inicio (0 min) y al fin (60 min). El análisis estadístico se realizó mediante el test *t*-Student.

3.2. FRAP inverso

Los experimentos de FRAP inverso (del inglés, *fluorescence recovery after photobleaching*) se realizaron con el equipo Leica TCS SL con sistema de control de temperatura y CO₂. Todos los experimentos se realizaron a 37°C y al 5% de CO₂. Se crecieron células en placas de 6 pocillos y se transfectaron con la GFP-subunidad B durante 24 h. Para la adquisición de las imágenes se usó: el objetivo 63x con aceite de inmersión, se excitó con el láser de 488 nm, el rango de detección era de 500-600 nm y un *pinhole* de 4.94 unidades Airy para minimizar las alteraciones de la fluorescencia debidas a la salida de foco de la GFP-subunidad B. Todo el marcaje del citoplasmático (exceptuando el Golgi) de las células transfectadas se blanqueó con 50-80 emisiones del láser 488 nm a máxima potencia. Las imágenes de la recuperación de la fluorescencia después del foto-blanqueamiento se adquirieron cada 5 s durante 15 min.

El análisis de las imágenes se hizo con el programa ImageJ. Se midió la fluorescencia de la región no blanqueada (el complejo de Golgi). La fluorescencia relativa en cada tiempo se calculó como:

$$I_{rel} = I_t/I_0$$

Dónde, I_t es la intensidad de fluorescencia de la región no blanqueada en cada tiempo, y I_0 es la intensidad de fluorescencia de la región no blanqueada inicial. La curva de pérdida de fluorescencia se ajustó a la ecuación de pérdida exponencial en dos fases con el programa Graphpad Prism v.5.0. (Graphpad software, San Diego, CA) y se representó como la fluorescencia que permanece en el complejo de Golgi vs. tiempo. La fracción móvil (FM) se calculó como:

$$FM = F_{pre} - F_{fin}$$

Dónde, F_{pre} es la intensidad de fluorescencia inicial y F_{fin} la intensidad final. El análisis estadístico fue realizado por el test *t*-Student, one-tailed.

3.3. Medidas de pH del complejo de Golgi

Para medir el pH del Golgi y del TGN se usó el equipo Leica TCS-SP5. Todos los experimentos se realizaron a 37°C y al 5% de CO₂. Se crecieron células HeLa en placas de 6 pocillos y se transfectaron con los plásmidos GalT-pHluorin (Galactosiltransferasa y GFP sensible a pH), para las medidas de pH del Golgi, y con TGN-pHluorin (TGN38 y GFP sensible a pH), para las medidas de pH del TGN, durante 18 h. Para medir la fluorescencia ratiométrica de la GalT-pHluorina o de la TGN-pHluorina asociada respectivamente al Golgi o al TGN, se excitó con los láseres de 470 y 405 nm y se detectó la emisión a 508 nm, con un *pinhole* de 1 unidad Avary.

Para realizar la curva patrón, las células se incubaron con cinco tampones ajustados a diferentes pHs (6, 6.5, 7, 7.5 y 8) que contenían: 70 mM NaCl, 70 mM KCl, 1.5 mM K₂HPO₄, 1 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 10 mM MES, 2 mM CaCl₂, 10 mM Glucosa, 10 μM Nigericina y 10 μM Monensina. Se adquirieron imágenes excitando a 405 y 470 nm, y la intensidad de fluorescencia ratiométrica para cada pH sirvió para representar la curva patrón.

Para las medidas de pH en las células silenciadas se transfectaron los constructos de la pHluorina en las últimas 18h de silenciamiento y pasado este tiempo se adquirieron las imágenes tal y como hemos descrito. Para los tratamientos farmacológicos se transfectaron los constructos de la pHluorina durante 18 h y posteriormente se aplicó el tratamiento el tiempo indicado, pasado este tiempo de adquirieron las imágenes.

El análisis de las imágenes se realizó con el programa ImageJ 1.45K. Se midió la fluorescencia del del Golgi en cada condición al excitar a 405 nm o a 478 nm y la ratio ($\text{Ratio}_{405/478}$) se calculó como:

$$\text{Ratio}_{405/478} = I_{405}/I_{478}$$

Dónde, I_{405} es la intensidad de fluorescencia del Golgi al excitar la pFluorina a 405 nm, y I_{478} es la intensidad al excitar a 478 nm. Para la curva patrón los valores la $\text{Ratio}_{405/478}$ se representaron vs. pH según una ecuación exponencial (Miesenbock et al., 1998).

4. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1. Extractos celulares y western blot

Los extractos celulares se obtuvieron a partir de placas confluentes. Se lavaron las células dos veces con PBS y se añadió el tampón de lisis frío (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, pH 7.4) con inhibidores de proteasas (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aproptinina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 5 μM pepstatina A) y fosfatasas (2 mM Ortovanadato sódico, 1 mM PMSF) y se rasparon las células para pasarlas a un *ependorf*. Las muestras se pasaron 10 veces por una jeringa de insulina (25G) y se incubaron 30 min en hielo. Después se centrifugaron a 1000 xg durante 10 min, se descartó el *pellet* y el sobrenadante obtenido se cuantificó por concentración de proteína con el método Lowry, utilizando el *kit DC protein assay* de Bio-Rad. Luego se añadió tampón de carga 5x con 10% de β -mercaptoetanol al volumen de muestra que contenía la cantidad de proteína deseada para una concentración final del tampón de carga de 1x, finalmente las muestras se hirvieron 5 min.

Para la electroforesis las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al porcentaje pertinente (volumen/volumen) y se procedió a la electroforesis. A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman, Maidstone, Kent, Reino Unido) que posteriormente se bloquearon con 5% BSA disuelta en tampón TBS (del inglés, *Tris Buffer Saline*, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) durante 1h. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en PBS con 1% de BSA y 0.0025% de azida sódica durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron con tampón TBST (del inglés *Tris Buffer Saline Tween*, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) y se incubaron con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *Horse Radish Peroxidase*) durante 1 h TBS-2.5% de BSA. Después de los

lavados, las membranas se incubaron durante 1 min a temperatura ambiente con el reactivo *Western blotting luminol reagent* (Santa Cruz). Las bandas proteicas de la membrana se visualizaron por exposición de una película *Hyperfilm* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppala, Suecia) y sus intensidades se midieron por densitometría de la película usando el software ImageJ 1.45K.

4.2. Inmunoprecipitación

Células HeLa crecida en placas de 60 cm² se lisaron en 200 µl de tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.6% CHAPS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1.5% octil β-D-glucopiranosido y 10% glicerol) que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las células se homogenizaron pasándolas 10 veces por una jeringa de 25G y se incubaron 30 min en hielo. Luego, se centrifugaron a 14000 xg durante 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante (lisado total).

Para los experimentos de inmunoprecipitación, la misma cantidad de lisado total (100 µg) fue incubado toda la noche a 4°C con 30 µl de microsferas de sefarosa recubiertas de proteína A (lisados pre-lavados). Paralelamente, 30 µl de microsferas de sefarosa recubiertas de proteína A se incubaron 2 h a 4°C con el anticuerpo de interés para generar las inmunoesferas. Posteriormente, se mezclaron los lisados pre-lavados y las inmunoesferas y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las inmunoesferas con sus complejos asociados se lavaron 3 veces con tampón TA (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM azida sódica, 1 mM PMSF, 1 mM EGTA). Las proteínas se eludieron de las inmunoesferas añadiendo 20 µl de tampón de carga para western blot 5x (10% β-mercaptoetanol). Todas las muestras fueron procesadas para *western blot* (Sautin et al., 2005).

4.3. Extracción de membranas de Golgi enriquecidas

Para la obtención de membranas de Golgi enriquecidas de hígado de rata, hembras Wistar estuvieron en ayunas 24h. Después de ser sacrificadas se extrajeron los hígados y se trocearon en 200 ml de tampón fosfato 0.5 M pH 6.7 frío con 0.5 M de sacarosa. Los trozos de hígado fueron exprimidos para eliminar toda la sangre posible. Posteriormente, se eliminó el exceso de tampón y los trozos de hígado fueron homogenizados pasándolos por una malla de 150 µm. Se añadieron 13 ml del homogenizado encima de un gradiente discontinuo de sacarosa que fue centrifugado a 28.000 rpm durante 1 h a 4°C (Rotor SW-28, Beckman Coulter Inc., Brea, CA). Se recogieron con una pipeta Pasteur 2-3 ml de las fracciones de Golgi que se encontraban entre las concentraciones 0.5 M y 0.86 M de sacarosa. Estas fracciones fueron

diluidas en tampón 0.25 M de sacarosa y centrifugadas a 7000 rpm durante 30 min a 4°C (Rotor SW-28). Se descartó el sobrenadante y los *pellets* fueron resuspendidos en 2 ml de tampón fosfato 0.25 M de sacarosa y centrifugados a 7000 rpm durante 30 min a 4°C. Se descartaron otra vez los sobrenadantes, el *pellet* final se resuspendió en 4.5 ml de tampón fosfato 0.25 M sacarosa. Seguidamente se hicieron alícuotas de la resuspensión que se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C. Las fracciones enriquecidas en membranas de Golgi se comprobaron por *western blot* determinando el enriquecimiento de la proteína residente de Golgi GM130.

4.4. Fraccionamiento subcelular membrana-citosol

Las fracciones citosólicas y de membrana procedentes de células HeLa control o tratadas con Latrunculin B (1 µM, 90 min) o jasplakinolide (1 µM, 90 min) se obtuvieron a partir de placas de 60 cm² con células confluentes, en las que añadimos 5 veces más el volumen celular de tampón XB (20 mM HEPES pH 7.7, 150 mM KCl) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (véase apartado de preparación de lisados celulares). Las células se lisaron mecánicamente pasándolas por una jeringa de insulina (25G) y se centrifugaron a 1000 xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se sometió a centrifugación a 60000 rpm durante 1 h a 4°C (rotor MLA-130, Beckman Coulter Inc, Brea, CA). El sobrenadante obtenido corresponde a la fracción citosólica, mientras que el *pellet* corresponde a la fracción de membrana. Se recogió el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en tampón XB y sometido a centrifugación a 60000 rpm durante 1 h a 4°C (rotor MLA-130). Esta vez se descartó el sobrenadante y el *pellet*, correspondiente a la fracción de membrana se disolvió en tampón RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato sódico, 2.5 mM pirofosfato sódico, 1 mM β-glicerofosfato). Todas las fracciones se analizaron por *western blot* tal y como se ha detallado anteriormente.

4.5. Fraccionamiento de F/G-actina

Células HeLa crecidas en placas de 60 cm² tratadas con latrunculina B (1 µM, 90 min) o con jasplakinolide (1 µM, 90 min) se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron 30 min con PBS-1mM Ditiobis[succinimidilpropionato] (DSP) y 250 nM Faloidina-TRITC, se volvieron a lavar las células con PBS. Posteriormente, se boqueó el efecto del DSP incubando las células 15 min con PBS-20 mM Tris-HCl (pH 7.5)- 250 nM Faloidina-TRITC. Seguidamente, se lisaron las células en tampón de lisis (50 mM PIPES, pH 6.9, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5% glicerol, 0,1% NP-40, 0,1% Tritón X-

100, 0,1% Tween 200, 1% 2-mercaptoetanol y 0.001% antifoam C y 250 nM Faloidina-TRITC) con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los lisados fueron centrifugados a 1000 xg durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue sometido a centrifugación a 45.000 rpm durante 1 h a temperatura ambiente (rotor MLA-130, Beckman Coulter Inc, Brea, CA). Se recogió el sobrenadante (que contenía la fracción de G-actina) y el *pellet* (correspondiente a la fracción de F-actina) se resuspendió en el mismo volumen del sobrenadante y con el mismo tampón. Ambas fracciones fueron analizadas por *western blot*.

4.6. Aislamiento de membranas resistentes a detergente

Se crecieron células HeLa en placas de 60 cm^2 y se usaron 5 placas por condición. Cuando las células habían llegado a confluencia se aplicaron los tratamientos con latrunculina B (1 μM , 90 min) o se cultivaron 4 h en ausencia de suero y glucosa. Posteriormente, se lavaron las placas 3 veces con PBS, y se recogieron las células en 1 ml de tampón HES (20 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 250 mM sacarosa), que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasa, se homogenizaron pasándolas por una jeringa de 22G 10 veces. Las muestras fueron centrifugadas a 67.000 rpm durante 90 min a 4°C (rotor MLA-130, Beckman Coulter Inc, Brea, CA). El sobrenadante se descartó y el *pellet* se resuspendió en 1 ml de tampón MBS (25 mM MES pH 6.5, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100), que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasa, el *pellet* se incubó durante 20 min a 4°C. Posteriormente se pasó por una jeringa de 22G 10 veces. Entonces preparamos un gradiente discontinuo de sacarosa: Al fondo se añadió 1 ml del *pellet* resuspendido más 1 ml de tampón MBS-80% sacarosa mezclado, seguidamente, se añadieron 2 ml de tampón MBS-30% de sacarosa, y finalmente, 1 ml de tampón MBS-5% de sacarosa. Los gradientes fueron centrifugados a 35.000 rpm durante 17 h a 4°C (rotor SW55 Ti, Beckman Coulter Inc, Brea, CA). Al día siguiente, se recogieron las fracciones de 500 μl empezando por la parte superior del tubo. La proteína de cada fracción se precipitó añadiendo el mismo volumen de acetona e incubando las muestras toda la noche a -20°C. La proteína precipitada se resuspendió en 100 μl de tampón de carga para *western blot* 1x (que contenía 10% de β -mercaptoetanol) y se analizaron por *western blot*.

4.7. Transfección con ADN plasmídico

Los plásmidos fueron transfectados con FuGene HD (Promega) o con Lipofectamine (Invitrogene). Para la transfección con FuGene HD se mezcló 1 μg de ADN por 1 μl de FuGene HD en 100 μl de OptiMEM (Gibco). La transfección con Lipofectamine se mezclaron 2 μg de

DNA, 3 µl de Lipofectamine y 100 µl de OptiMEM, la mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente. Ambas mezclas se añadieron a las células en suspensión que posteriormente fueron sembradas en la placa correspondiente. Exceptuando la transfección de la GFP-subunidad B que fue durante 24 h, el resto de experimentos se realizaron entre las 12 y 18 h de transfección.

4.8. Transfección con ARN de interferencia

Se transfectó 20 nM ARN de interferencia (siRNA) usando Lipofectamine a las células en suspensión. En resumen, las mezclas de siRNA se prepararon mezclando 100 pmoles siRNA, 5 µl de Lipofectamine y 100 µl de OptiMEM, la mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente. Esta mezcla fue añadida a 2 ml de células en suspensión en una placa de 6 pozillos. Después de 5-6 h, cuando las células ya se habían adherido, se aspiró el medio de cultivo que contenía la mezcla de siRNA se reemplazó por medio fresco. Al día siguiente, 24 h después de la transfección, las células fueron subcultivadas. Los experimentos se realizaron a las 72 h de la transfección. La mezcla de siRNAs que se usaron para inhibir la expresión de la subunidad A y de la subunidad B se adquirieron en Invitrogen y Dharmacon (ON-TARGET^{plus} SMARTpool), respectivamente. Como control se utilizó una mezcla de cuatro siRNAs con secuencias que no codificaban para ninguna proteína (siRNA *non-targeting*), adquirida de Dharmacon. Las secuencias para los siRNA contra la subunidad A y contra la subunidad B se encuentran en la siguiente tabla:

	Subunidad A	Subunidad B
Secuencia desde 5' a 3'	GCUGCUAGAGAAGCCUCUAUUUAUA	GCACUUAUGUUUACGGUAU
	GGUCCUGGCAUUAUGGGAGCCAUUU	UAUUCAAUGGAUCGGGAAA
	CCUCUAUAAACUUCCUCAUGAAA	GGGAGAAACGGCUCGAUUA
		CAGCUGAAUUUCUGGCGUA

4.9. Generación de constructos de la subunidad B

La subunidad B con la etiqueta GFP en el extremo amino-terminal (GFP-B) se amplificó del plásmido que codificaba para la subunidad B sin etiqueta (Origene Technologies, SC119083, Rockville, MD) con los cebadores sentido y anti-sentido: 5'-ACGTAAGCTTATGGCGCTGCGGGCG-3' y 5'-436 ACGTGGATCCCTAATGCTTTGCAGA-3'. El producto de la PCR fue subclonado en el vector pEGFP-C3 después de ser cortado con los enzimas restricción HindIII y BamHI. Para la subunidad B con la GFP en el extremo carboxi-terminal (B-GFP), la subunidad B fue amplificada

a partir del plásmido de la subunidad B sin etiqueta con los cebadores sentido y anti-sentido: 5'-AGCTAAGCTTAGACAAGATGGCGCTGCGGGC-3' y 5'-AGCTGGATCCATGCTTTGCAGAGTCTCGAGG-3'. El producto de la PCR fue subclonado en el vector pEGFP-N3 después de ser cortado con los enzimas restricción HindIII y BamHI. Finalmente, la subunidad B sin el dominio de unión a actina unida a la etiqueta GFP fue amplificada a partir del plásmido de la subunidad B sin etiqueta con los cebadores sentido y anti-sentido: 5'-AGCTAAGCTTGTGAGTTTACT-3' y 5'-AGCTGGATCCCAAAGCATTAG-3'. El producto de la PCR fue subclonado en el vector pEGFP-C1 después de ser cortado con los enzimas restricción HindIII y BamHI.

5. ENSAYOS DE TRANSPORTE INTRACELULAR

5.1. Ensayos de transporte con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G)

Para los experimentos de transporte de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular o VSV-G, transfectamos células HeLa entre 12-18h con la ts045VSVG-GFP. Para los ensayos de transporte desde el RE hasta el complejo de Golgi, las células se incubaron toda la noche a 40°C (temperatura no permisiva), de manera que la proteína G no adquiere la conformación correcta y queda retenida en el RE. 30 min antes del cambio de temperatura se añadió en el medio cicloheximida (100 µg/ml) para inhibir la síntesis de proteínas. Después, las células se incubaron a 32°C, temperatura permisiva que permite el correcto plegamiento del VSV-G y su consecuente salida del RE. Las células se fijaron a distintos tiempos (0, 5, 15, 30 min) con PFA 4% y se procesaron por inmunofluorescencia. Para los ensayos de transporte del VSV-G desde el complejo de Golgi hasta la membrana plasmática, las células se incubaron toda la noche a 40°C. Al día siguiente se pasaron a 20°C durante 2 h, para permitir la salida de la glicoproteína G del RE y acumularla en el complejo de Golgi, 30 min antes del siguiente cambio de temperatura se añadió la cicloheximida (100 µg/ml). Finalmente, las células se pasaron a 32°C y se siguió el transporte del VSV-G desde el complejo de Golgi hasta la membrana plasmática. Las células se fijaron a distintos tiempos (0, 30, 60, 90 min) con PFA 4% y se procesaron por inmunofluorescencia.

Para los ensayos bioquímicos para medir la llegada del VSV-G al complejo de Golgi se usaron células HeLa que expresaban constitutivamente VSV-G-GFPts045. Usamos la enzima endo-β-acetilglucosaminidasa H (endo-H, New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU), una glicosilasa recombinante que corta los residuos de elevado contenido en manosa que

contienen las proteínas cuando salen del RE, en cambio no puede cortar los residuos de N-glicanos más complejos que presentan las proteínas después de haber sido modificadas en el complejo de Golgi. Para realizar el ensayo se incubaron las células 24 h a 40°C, después de pasaron a 32°C para permitir su salida del RE. A distintos tiempos (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min), se lisaron las células con 0.5% de SDS y se desnaturalizaron a 100°C durante 10 min. 20 µg de proteína se trató con otro tampón desnaturalizante que contenía DTT y se volvió a hervir 10 min a 100°C. Después se incubó la muestra con la enzima endo-H a 37°C durante 1 h, se añadió tampón de carga para *western blot* 5x con 10% de β-mercaptoetanol y se procesaron para *western blot*, tal y como hemos descrito anteriormente.

5.2. Ensayos de transporte de proteínas solubles
marcadas con azufre radioactivo

Las células HeLa se sembraron en placas de 6 pocillos tratadas con poli-D-lisina, se incubaron en DMEM sin metionina (Met) ni cisteína (Cys) durante 30 min y posteriormente se marcaron radioactivamente con 20 µCi de la mezcla [³⁵S]Met/Cys (EasyTag™ EXPRESS³⁵S Protein Labeling mix, PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU), por cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Luego, las células se lavaron con DMEM completo frío para eliminar la radioactividad no incorporada, y se incubaron a 18 °C durante 3 h para acumular las proteínas sintetizadas *de novo* y marcadas con [³⁵S]Met/Cys en el complejo de Golgi. Después, las células se lavaron en PBS con 5 % BSA y se pasaron a 37 °C. Para determinar la secreción, 100 µl del medio de las células se recogió a los 60 min y se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético (TCA, del inglés *trichloroacetic acid*) al 20 % (centrifugación?). A continuación se lavaron con acetona fría (no es deixa evaporar l'acetona abans d'afegir NaOH?) y se incubaron toda la noche con 1 M de NaOH (volum?) para resuspender el *pellet*, al día siguiente se añadió 1 M HCl (volum?) para neutralizar la solución y se cuantificaron con el contador de centello. Para determinar la incorporación total de [³⁵S]Met/Cys en la célula, las células se lisaron con 0.1 N NaOH en 0.1 % de SDS, se trataron con TCA y se procesaron como se ha dicho anteriormente. Como control positivo (negativo?), las células se trataron con brefelina A (BFA, 5 µg/ml).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se representan como la media \pm desviación estándar (SD) y se analizaron mediante la prueba t de *Student* de dos colas usando el programa Graphpad Prism V.5.0. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR EN EL COMPLEJO DE GOLGI

Antecedentes y Objetivo

El complejo de Golgi presenta un gradiente de pH que decrece a medida que avanzamos por el eje *cis-trans* (Paroutis et al., 2004). En las membranas del complejo de Golgi localizan varios elementos moleculares que regulan la concentración de protones en su interior, siendo el más importante la V-ATPasa (Rivinoja et al., 2012). La localización de la V-ATPasa en el complejo de Golgi es conocida desde hace tiempo (Chanson y Taiz, 1985; Glickman et al., 1983; Hurley y Taiz, 1989; Moriyamas y Nelsons, 1989; Young y Qiao, 1988; Zhang y Schneider, 1983), pero cómo la misma bomba (V-ATPasa) es capaz de generar un gradiente de pH a lo largo de *stack* todavía no está claro. Se postulan diferencias en la densidad de la V-ATPasa entre las diferentes regiones y/o distintos mecanismos de regulación de la actividad ATPasa específicos para cada región (Casey et al., 2010). En esta primera parte del trabajo hemos estudiado la distribución subcelular de la V-ATPasa a lo largo del complejo de Golgi y el tiempo de residencia en este orgánulo. El objetivo era confirmar su presencia en el complejo de Golgi, y al mismo tiempo determinar si el gradiente de pH viene dado por un aumento en la densidad de la bomba. Por otra parte, también hemos estudiado si la inactivación de la V-ATPasa, mediante el silenciamiento de una de sus subunidades (la subunidad B), afecta la morfología del Golgi, dados nuestros resultados al inhibir farmacológicamente la V-ATPasa (Lázaro-Diéguez et al., 2006).

1.1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR A LO LARGO DEL COMPLEJO DE GOLGI

La primera aproximación que hicimos para confirmar la localización de la V-ATPasa en el complejo de Golgi fue bioquímica. Comprobamos mediante la técnica de *western blot* (WB) que las subunidades A y B (del dominio V₁) y la subunidad a (del dominio V₀) estaban presentes en fracciones enriquecidas en membranas de Golgi extraídas de hígado de rata (**Fig. 23**). Comparamos los niveles de estas subunidades en lisados de células HeLa y en membranas de Golgi, y vimos que la subunidad que estaba más enriquecida en las membranas de Golgi respecto los lisados totales era la subunidad a (**Fig. 23**). Este resultado era esperable ya que las subunidades A y B pertenecen al dominio V₁ que se encuentra ciclando entre la membrana y el

Resultados

citósol. Estos resultados corroboran la localización de la V-ATPasa en el complejo de Golgi descrita anteriormente (Glickman et al., 1983).

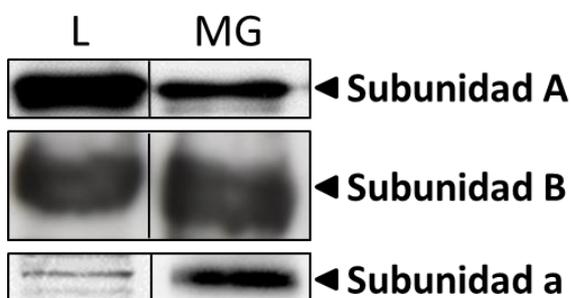


Figura 23. Localización de la V-ATPasa en las membranas del complejo de Golgi. WB de lisados totales de células HeLa (L) y fracciones enriquecidas en membranas del complejo de Golgi extraídas de hígado de rata (MG), marcados con los anticuerpos específicos contra la subunidades A y B del dominio V_1 y la subunidad a del dominio V_0 de la V-ATPasa.

Para estudiar en detalle la distribución de la V-ATPasa en el complejo de Golgi llevamos a cabo experimentos de colocalización con marcadores de las distintas regiones del complejo de Golgi. En primer lugar, testamos los anticuerpos comerciales contra la subunidad A y B. A pesar de que por microscopía de fluorescencia ambos anticuerpos mostraban un marcaje perinuclear y en estructuras puntiformes (muy acorde con la distribución de la V-ATPasa a lo largo de la vía secretora) este marcaje no disminuía ni desaparecía (**Fig. suplementaria 1**) al silenciar las respectivas subunidades por transfección con ARN de interferencia específicos (siRNA)(**Fig. 41**, ver apartado III). Indicándonos que el marcaje que mostraban ambos anticuerpos era inespecífico.

Ya que no disponíamos de anticuerpos contra la V-ATPasa que fueran fiables para su uso por IF procedimos a clonar la subunidad B del dominio V_1 en un vector GFP. Realizamos dos constructos diferentes, uno en el que incorporamos la etiqueta GFP en el extremo carboxi-terminal de la subunidad B (B-GFP) y otro en el que el GFP se incorporaba en el extremo amino-terminal (GFP- B). De ambos constructos obtuvimos varios clones que transfectamos en células HeLa, comprobamos por WB que se expresaban correctamente y que además eran reconocidos por los anticuerpos contra la subunidad B y contra GFP con el peso molecular esperado (**Fig. 24**). Seguidamente, pasamos a comprobar si la subunidad B sobrepresada se integraba en el complejo endógeno de la V-ATPasa. Para ello transfectamos ambos plásmidos en células HeLa y inmunoprecipitamos las subunidades B sobrepresadas con anticuerpos específicos contra el GFP. Por WB comprobamos si la subunidad A endógena estaba interaccionando con la subunidad B unida al GFP (carboxi y amino-terminal)

immunoprecipitada. Vimos que sólo la subunidad B con la GFP unido al extremo amino-terminal mostraba interacción con la subunidad A (**Fig. 25B**), mientras que la subunidad B con el GFP en el carboxi-terminal no lo hacía (**Fig. 25A**). Por ello, concluimos que sólo la GFP-B se integraba en el complejo V-ATPasa y, por lo tanto, será la única que utilizaremos en experimentos posteriores.

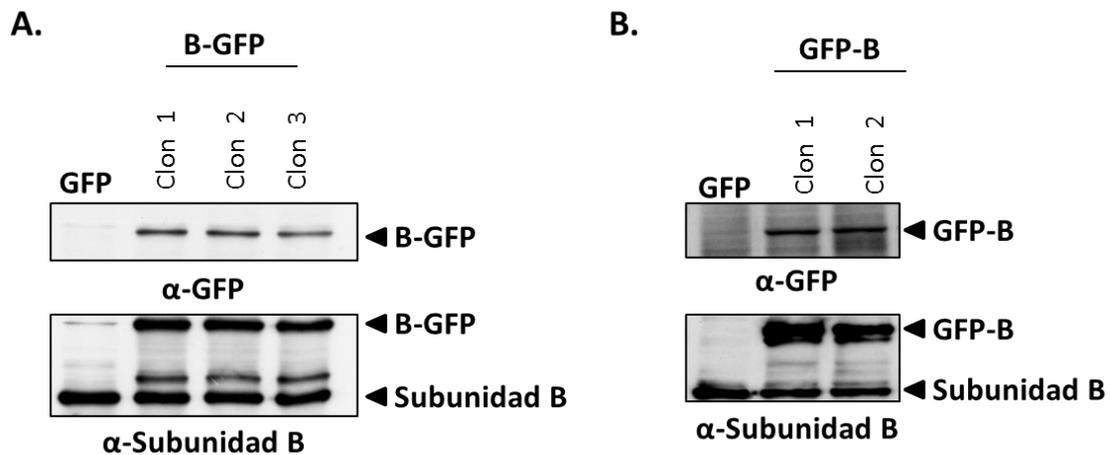


Figura 24. Comprobación de los clones obtenidos de la subunidad B unidos a GFP. WB de células HeLa transfectadas durante 24 h con el vector GFP (GFP) como control, o bien, con los distintos clones obtenidos durante el proceso de clonaje de (A) la subunidad B con el GFP en el carboxi-terminal (B-GFP) y (B) la subunidad B con el GFP en el amino-terminal (GFP-B). Las membranas se incubaron con anticuerpos específicos contra el GFP, reconociendo la subunidad B sobrexpresada, y contra la subunidad B, que reconoce la subunidad B sobrexpresada con un peso molecular superior a la subunidad B endógena.

A continuación estudiamos la localización de la GFP-B en células HeLa. Mediante microscopía confocal realizamos estudios de colocalización con marcadores de los compartimentos proximales (GM130) y distales (Golgina97 y TGN46) del complejo de Golgi (**Fig. 26**). Vimos que la GFP-B solapaba con todos los marcadores de Golgi (**Fig. 26 A**), pero colocalizaba en mayor medida con los marcadores de las regiones distales (**Fig. 26 B**). Este resultado nos muestra que la V-ATPasa se encuentra en todo el complejo de Golgi pero más enriquecida en los compartimentos distales, distribución que correlaciona con el gradiente de pH que presenta este orgánulo. A parte del marcaje de Golgi, también observamos que la GFP-B se distribuía en estructuras puntiformes repartidas por el citosol, que posiblemente corresponden a componentes endocíticos y vesículas de transporte.

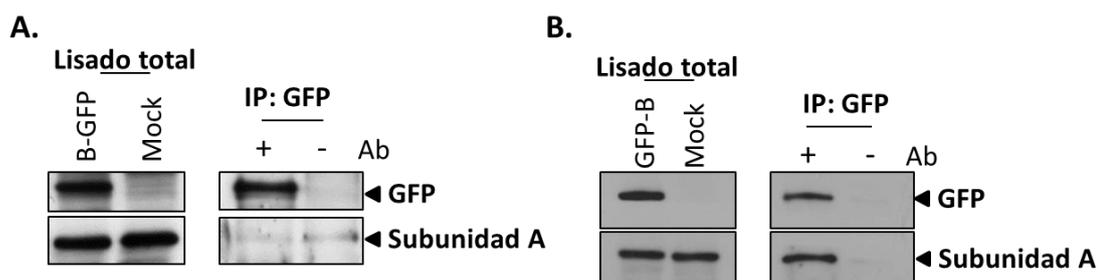
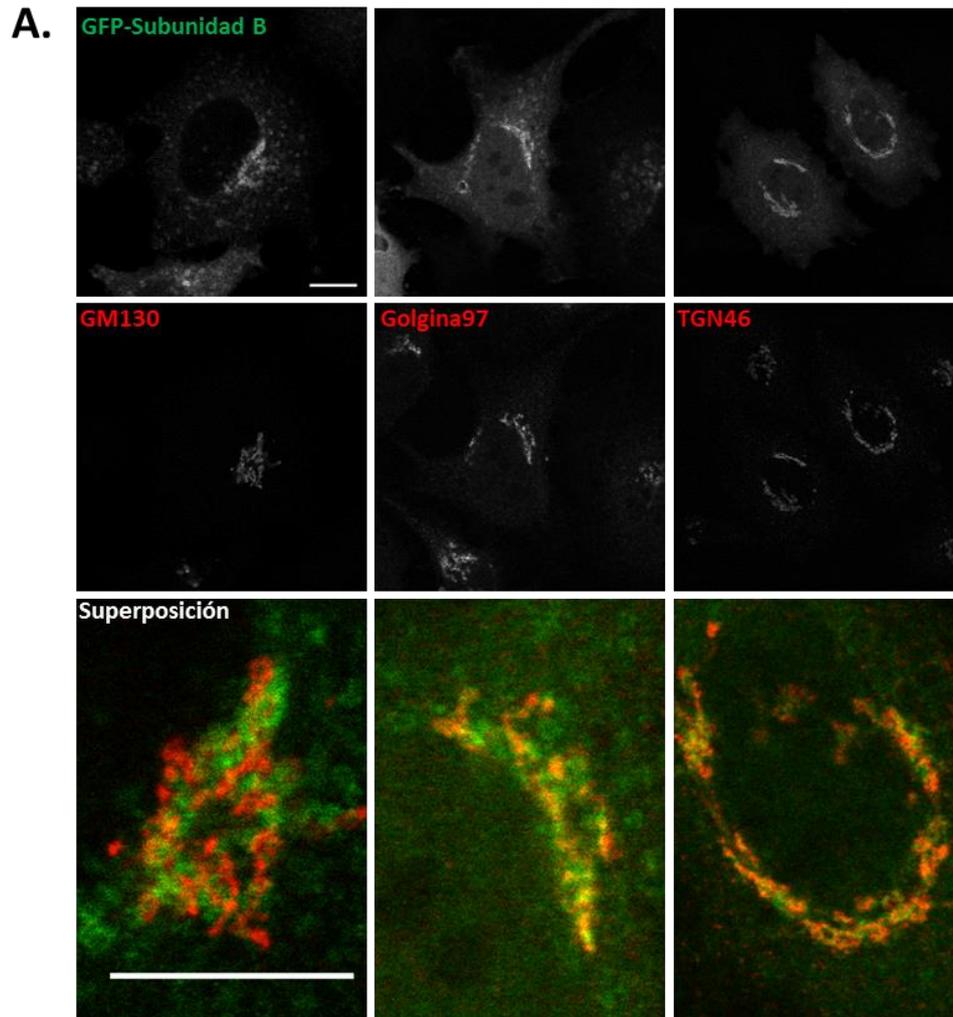


Figura 25. Integración de la GFP-subunidad B pero no de la subunidad B-GFP en el complejo V-ATPasa. WB de células HeLa no transfectadas (MOCK) o transfectadas durante 24 h con la subunidad B-GFP (B-GFP) (A) o con la GFP-subunidad B (GFP-B) (B). Posteriormente se inmunoprecipitando con anticuerpos específicos contra la GFP. Las membranas se marcaron con anticuerpos específicos contra la subunidad A. Observamos que la subunidad A endógena sólo se encuentra en el precipitado de las células transfectadas con la GFP-B (la GFP unida al extremo amino-terminal).

La V-ATPasa se sintetiza en el RE y es transportada al complejo de Golgi donde completa su ensamblaje (Graham et al., 2003). De allí se dirige a la membrana plasmática y/o compartimentos endocíticos. Con el fin de averiguar el tiempo que la V-ATPasa reside en el complejo de Golgi antes de dirigirse a los siguientes orgánulos, realizamos un ensayo de transporte de la V-ATPasa *in vivo*. Para hacerlo transfectamos células HeLa con la GFP-B y medimos su señal de fluorescencia en el complejo de Golgi durante 1 hora. Justo antes de empezar el ensayo las células fueron tratadas con cicloheximida (un inhibidor de la síntesis proteica) para evitar que la GFP-B sintetizada *de novo* enmascarase la esperada caída de fluorescencia del Golgi. Vimos que al cabo de 1 hora, la fluorescencia en el complejo de Golgi apenas se había reducido un 10% (Fig. 27). Este resultado sugiere que podría existir una gran porción de V-ATPasa residente en el complejo de Golgi, o bien que su vida media en este orgánulo fuese muy larga.



B.

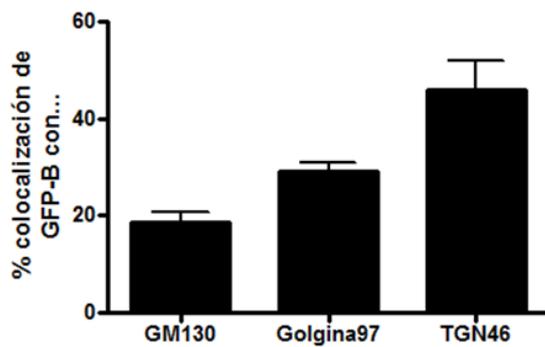


Figura 26. La V-ATPasa está enriquecida en los compartimentos distales del complejo de Golgi. A. Colocalización de la V-ATPasa con marcadores de distintas regiones de Golgi. Las células HeLa fueron transfectadas durante 24 h con la GFP- B y procesadas por IF usando anticuerpos contra el cis- (GM130), trans-Golgi (Golgina97) y TGN (TGN46). Las imágenes superpuestas

muestran la colocalización a de la V-ATPasa con los distintos anticuerpos (píxeles amarillos). Barra, 10 μ m. **B.** Análisis cuantitativo de las imágenes mostradas en el panel A. Cada columna representa los píxeles verdes (GFP-subunidad B) que colocalizan con los rojos (marcadores de Golgi) respecto al total de píxeles verdes.

Resultados

Dado que nuestro grupo había descrito previamente que la inhibición farmacológica de la V-ATPasa alteraba la ultraestructura de Golgi (Lázaro-Diéguez et al., 2006), estudiamos si el silenciamiento de la subunidad B del dominio V_1 de la V-ATPasa también tenía efectos sobre morfología de Golgi (realizamos el silenciamiento tal y como se detalla en el apartado III, **Fig. 41**). Para ello marcamos con anticuerpos específicos para diferentes regiones del complejo de Golgi (GM130 para el *cis*, Golgina97 para el *trans* y TGN para el TGN46) en células control y células silenciadas por la subunidad B (**Fig. 28A**). Posteriormente, calculamos el índice de compactación de cada región en ambas condiciones (**Fig. 28B**), este índice se basa en el área y el perímetro de cada partícula marcada (Bard et al., 2003). No encontramos diferencias significativas en el nivel de compactación de las distintas regiones entre las células control y las células silenciadas, por lo que concluimos que la inactivación de la V-ATPasa por el silenciamiento de la subunidad B no implicaba alteraciones en la morfología de Golgi, al menos a nivel de microscopía óptica.

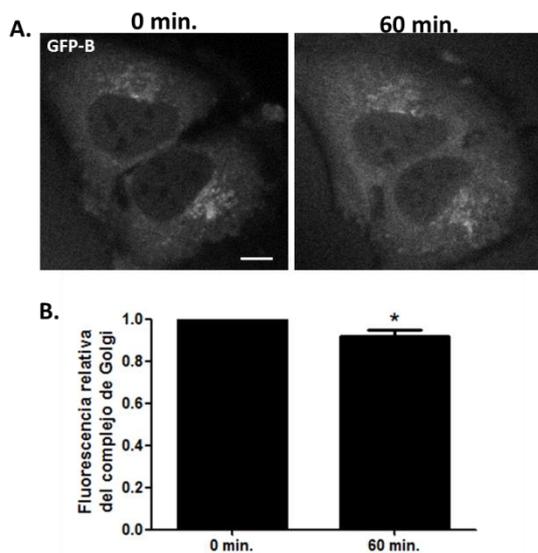


Figura 27. Tiempo de residencia de la V-ATPasa en el complejo de Golgi. **A.** Células HeLa transfectadas durante 24 h con la GFP-subunidad B antes y después del tratamiento con cicloheximida durante 1 h. Las células transfectadas fueron observadas por microscopía confocal in vivo durante 1 h d tratamiento con cicloheximida. Barra, 10 μ m. **B.** Análisis cuantitativo de las imágenes del panel A. Cada columna representa la intensidad de fluorescencia de del complejo de Golgi marcado con la GFP-subunidad B antes y después del tratamiento.

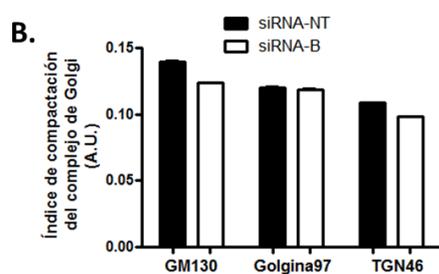
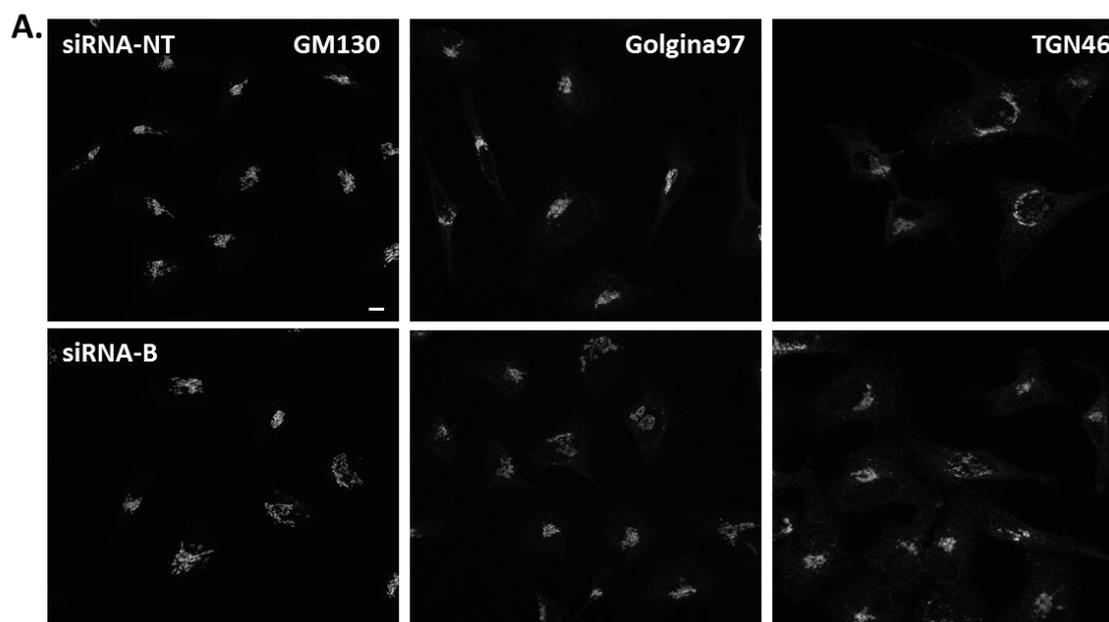


Figura 28. El silenciamiento de la subunidad B no altera la morfología del complejo de Golgi. **A.** Células HeLa transfectadas con siRNA contra la subunidad B (siRNA-B) o con siRNA non-targeting (siRNA-NT) durante 72 h y procesadas por IF con anticuerpos contra el cis- (GM130), trans-Golgi (Golgina97) y TGN (TGN46). Barra, 10 μ m. **B.** Análisis

cuantitativo del índice de compactación de las diferentes regiones de Golgi en células control (siRNA-NT) y células silenciadas por la subunidad B (siRNA-B). Los valores son la media \pm SD de tres experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de compactación de las células control respecto las silenciadas en ninguno de los marcadores de Golgi.

2. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS MICROFILAMENTOS EN LA ASOCIACIÓN DE LOS DOMINIOS V₁ Y V₀ DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR

Antecedentes y Objetivo

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la despolimerización de los filamentos de actina y la inactivación farmacológica de la V-ATPasa tienen efectos similares sobre la morfología, el pH y la función secretora del complejo de Golgi. En referencia a la morfología del Golgi, tanto el tratamiento con latrunculina B como la inhibición de la V-ATPasa con bafilomicina producen las mismas alteraciones a nivel ultraestructural dilatando las cisternas y compactando el Golgi (Lázaro-Diéguez et al., 2006). Asimismo, la función secretora

del Golgi también se ve igualmente afectada en ambas condiciones. Por un lado, estudios utilizando FRAP inverso muestran que la alteración de la dinámica de actina afecta a la salida de *cargo* del complejo de Golgi (Lazaro-Dieguez et al., 2007) y por otra, varios estudios demuestran que la actividad de la V-ATPasa es necesaria para el transporte intra-Golgi y post-Golgi (Huang y Chang, 2011; Muroi et al., 1993; Palokangas et al., 1994; Sobota et al., 2009; Yilla et al., 1993). Si tenemos en cuenta estas similitudes, sumadas al hecho que la despolimerización de actina induce un aumento significativo del pH Golgi (Lázaro-Diéguez et al., 2006), es fácil asociar el citoesqueleto de actina con la regulación de la V-ATPasa en el complejo de Golgi. Nosotros proponemos que los microfilamentos ayudarían a mantener la asociación de los dominios V_1 y V_0 de la V-ATPasa a través de su interacción con los dominios de unión a actina de las subunidades B y C. Por lo tanto, la despolimerización de actina conllevaría la disociación de ambos dominios (**Fig. 22**). En este apartado estudiamos el efecto de la despolimerización de actina sobre la asociación de los dominios V_1 - V_0 y la localización del dominio V_1 así como, el mecanismo por el cual el citoesqueleto de actina podría regular el ensamblaje de la V-ATPasa.

El dominio de unión a actina de la subunidad B tiene una alta afinidad para la F-actina, hecho que se ha demostrado tanto en ensayos *in vitro* (Holliday et al., 2000) como *in vivo* en el estudio de la interacción de la V-ATPasa con la actina en la membrana plasmática de los osteoclastos (Chen et al., 2004; Holliday et al., 2005). En cambio, la subunidad C tiene afinidad tanto para la F-actina como la G-actina, tal y como se ha demostrado en ensayos *in vitro* (Vitavska et al., 2003; Vitavska et al., 2005). Sin embargo, poco se sabe de la interacción de la V-ATPasa con la actina en las endomembranas.

2.1. LOS MICROFILAMENTOS MANTIENEN ASOCIADOS LOS DOMINIOS V_1 Y V_0 DE LA H^+ -ATPasa VACUOLAR

Para determinar si los microfilamentos participan en la asociación de los dos dominios de la V-ATPasa llevamos a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación en células HeLa tratadas con latrunculina B, agente despolimerizante de microfilamentos, o bien con jasplakinolide, agente estabilizante de microfilamentos. Además, como control positivo, incubamos las células 4 horas en medio sin suero y sin glucosa (-Glu/FBS), pues se ha descrito que en estas condiciones el dominio V_1 se desacopla del dominio V_0 (Sautin et al., 2005).

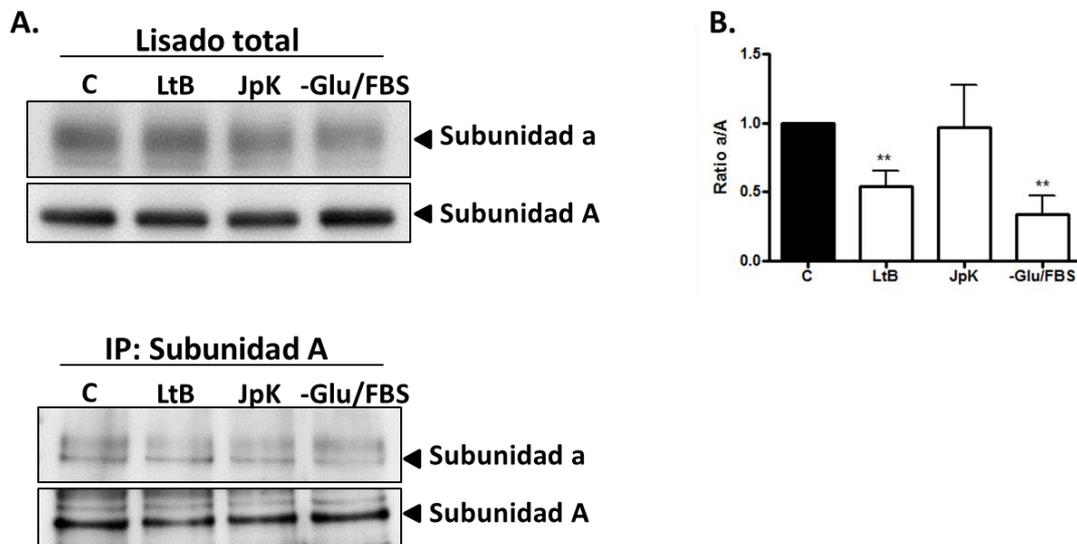


Figura 29. La despolimerización de los microfilamentos produce una menor interacción de los dominios V_1 y V_0 de la V-ATPasa (I). **A.** Célula HeLa tratadas con latrunculina B (LtB; 500 nM durante 90 min), jasplakinolide (Jpk; 500 nM durante 90 min) o cultivadas sin suero ni glucosa FBS (-Glu/FBS; durante 4 h) fueron lisadas y procesadas por WB (lisado total), o sujetas a inmunoprecipitación con anticuerpos contra la subunidad A y posteriormente procesadas por WB para determinar la cantidad de subunidad a (dominio V_0) que interaccionaba con la subunidad A (dominio V_1) en cada condición. **B.** Análisis cuantitativo de la ratio entre la subunidad del dominio V_0 respecto la del dominio V_1 (ratio a/A) de cuatro experimentos independientes. Los resultados están representados como la media \pm SD. La significancia respecto al control según la t-student, $**p \leq 0.01$.

Inmunoprecipitamos la subunidad A del dominio V_1 y detectamos por WB la cantidad de subunidad a del dominio V_0 que seguía interaccionando después del tratamiento con latrunculina B, jasplakinolide o tras 4 horas en ausencia de suero y glucosa. Cuantificamos la cantidad de subunidad a (V_0) presente en el precipitado respecto la subunidad A (V_1) que habíamos bajado. Observamos que tanto en el control positivo (medio sin suero y sin glucosa) como en las células tratadas con latrunculina la interacción entre ambos dominios disminuía significativamente. En cambio, en las células tratadas con jasplakinolide no se observaron diferencias (**Fig. 29**). Seguidamente, realizamos el mismo ensayo pero esta vez inmunoprecipitamos la subunidad B (V_1) y detectamos por WB la subunidad a (V_0). Obtuvimos los mismos resultados, la falta de suero y glucosa al igual que el tratamiento con latrunculina B inducían una bajada significativa en la interacción de los dos dominios (**Fig. 30**). Por lo tanto, concluimos que la despolimerización de los filamentos de actina comporta una disminución en la interacción de los dominios V_1 y V_0 .

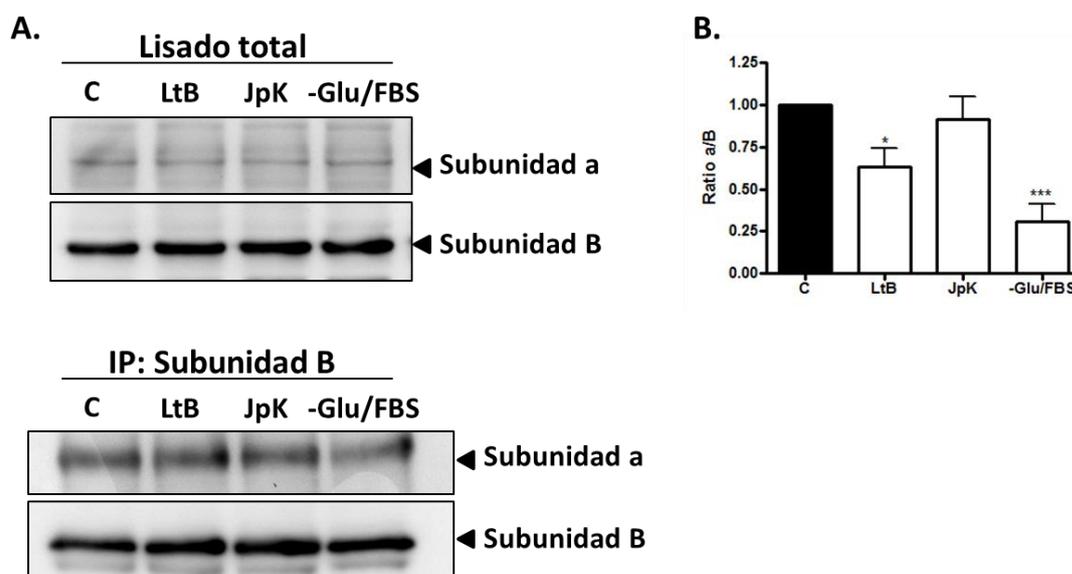


Figura 30. La despolimerización de los microfilamentos produce una menor interacción de los dominios V_1 y V_0 de la V-ATPasa (II). **A.** Célula HeLa tratadas con latrunculina B (LtB; 1 μ M durante 90 min), jasplakinolide (Jpk; 1 μ M durante 90 min) o cultivadas sin suero ni glucosa FBS (-Glu/FBS; durante 4 h) fueron lisadas y procesadas por WB (lisado total), o sujetas a inmunoprecipitación con anticuerpos contra la subunidad B y posteriormente procesadas por WB para determinar la cantidad de subunidad a (dominio V_0) que interaccionaba con la subunidad B (dominio V_1) en cada condición. **B.** Análisis cuantitativo de la ratio entre la subunidad del dominio V_0 respecto la del dominio V_1 (ratio a/B) de cuatro experimentos independientes. Los resultados están representados como la media \pm SD. La significancia respecto al control según la t-student, * $p \leq 0.05$ o *** $p \leq 0.001$.

Si nuestra hipótesis fuera cierta, esta menor interacción debería ir acompañada de un desplazamiento del dominio V_1 desde las (endo)membranas al citosol. Para comprobarlo, realizamos fraccionamientos celulares para separar fracciones enriquecidas en membranas y en citosol en células HeLa tratadas con latrunculina B y jasplakinolide. Determinamos la pureza de las fracciones mediante la detección del receptor de transferrina y de Rho-GDI, como marcadores de membrana y citosol, respectivamente. Determinamos por WB la distribución de las subunidades A y B en las dos fracciones (**Fig. 31A**), observamos que la cantidad de ambas subunidades en el citosol respecto su presencia en las membranas aumentaba de manera significativa en las células tratadas con latrunculina B pero no con jasplakinolide (**Fig. 31B y C**). Por lo tanto, la despolimerización de actina promueve el enriquecimiento del dominio V_1 en el citosol.

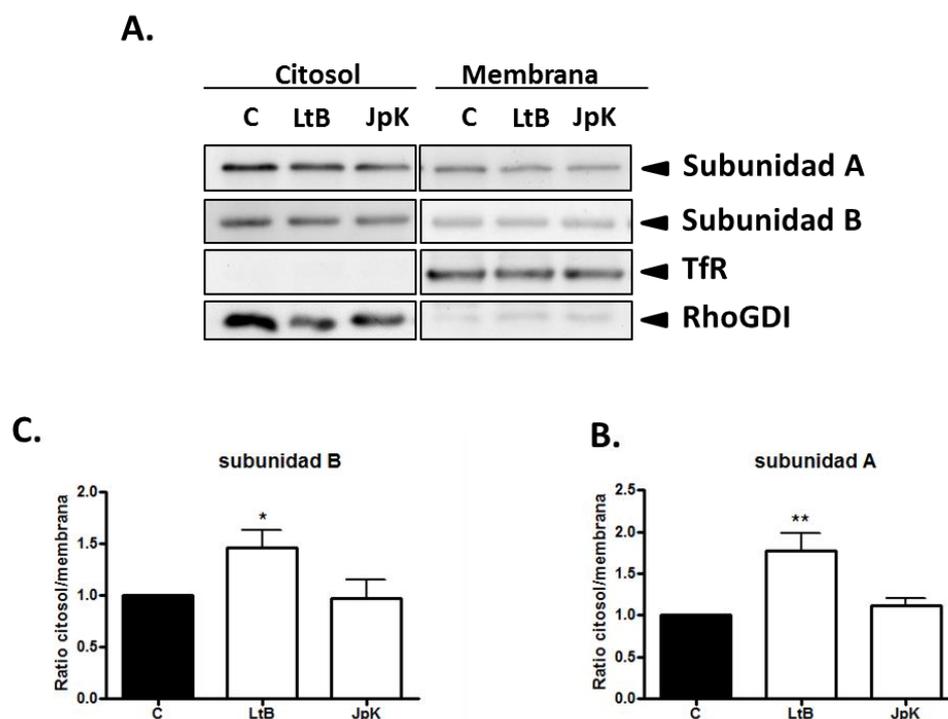


Figura 31. El dominio V_1 se enriquece en el citosol al despolimerizar los microfilamentos. **A.** Lisados totales de células HeLa no tratadas (control/C) o tratadas con latrunculina B (LtB; $1\mu\text{M}$ durante 90 min) o jasplakinolide (JpK; $1\mu\text{M}$ durante 90 min) fueron sometidos a ultracentrifugación. El pellet (fracción de membrana) y el sobrenadante (fracción de citosol) de cada condición fueron procesados por WB marcando con anticuerpos específicos contra el receptor de transferrina (TfR, marcador de membrana), Rho-GDI (Rho-GDI, marcador de citosol) y contra las subunidades A y B del dominio V_1 de la V-ATPasa. **B y C.** Análisis cuantitativo de la cantidad de subunidad A (B) y de subunidad B (C) presente en el citosol respecto su cantidad en membrana. Los resultados están representados como la media \pm SD de cuatro experimentos independientes. La significancia respecto al control según la t-student, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Estos resultados indican que la despolimerización de actina induce la disociación del dominio V_1 , pero al ser experimentos realizados en lisados totales de células HeLa son indicativos de la disociación en las V-ATPasas presentes en todas las membranas de la célula. Para estudiar este fenómeno específicamente en el complejo de Golgi, decidimos realizar ensayos de FRAP inverso con la GFP-B, ya que ésta localiza en el complejo Golgi. Como la subunidad B corresponde al dominio V_1 , al producirse la disociación deberíamos ver su desplazamiento desde la membrana de Golgi hacia al citosol, y por lo tanto una disminución de la fluorescencia de Golgi. Realizamos ensayos de FRAP inverso en células tratadas con latrunculina B y como control positivo las células en ausencia de suero y glucosa. En las imágenes secuenciales de microscopía confocal observamos que, mientras que en las células

Resultados

control la fluorescencia del complejo de Golgi emitida por la GFP-B se mantenía más o menos estable a lo largo del tiempo, en las células tratadas con latrunculina B y en -Glu/FBS ésta disminuía a lo largo de los 15 min de tratamiento (**Fig. 32A**). La cuantificación muestra que la pérdida de fluorescencia del control positivo y las células tratadas con latrunculina B es parecida ya que la cantidad de subunidad B que se desplazada desde el Golgi al citosol en ambos casos es la misma (la fracción móvil). Sin embargo, el tratamiento con latrunculina induce un desplazamiento de la subunidad B mucho más rápido, hecho que viene dado por el tiempo en que la mitad de la fracción móvil desaparece del complejo de Golgi (vida media), el cual es mucho menor en las células tratadas con latrunculina B que en las células -Glu/FBS (**Fig. 32 B y C**).

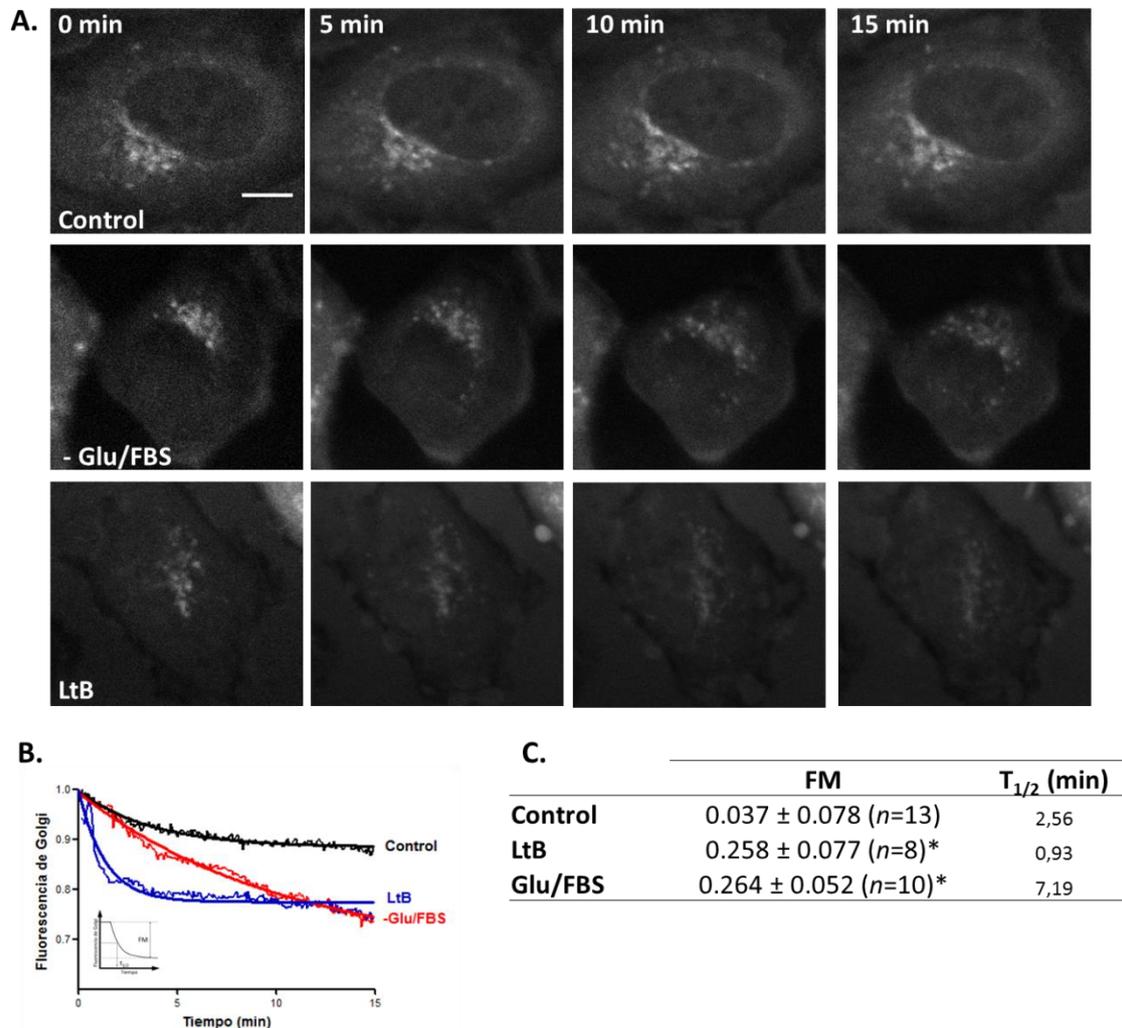


Figura 32. La despolimerización de actina promueve la liberación de la GFP- B desde el complejo de Golgi hacia el citosol. A. Imágenes secuenciales representativas del FRAP inverso (post-blanqueado) de células HeLa transfectadas con GFP-subunidad B no tratadas (Control), cultivadas sin suero y sin glucosa (-Glu/FBS) o tratadas con latrunculina B (LtB, 500 nM). Barra, 10 μ m. **B.** Curvas que muestran la pérdida de fluorescencia del complejo de Golgi marcado

con la GFP-B. Los valores de la fluorescencia del complejo de Golgi fueron obtenidos cada 5 sec durante 15 min. **C.** Cuadro en el que se indican la fracción móvil (FM) y la vida media ($T_{1/2}$ en min) de la GFP-B en el complejo de Golgi. La significancia respecto al control según la t-student, $*p \leq 0.05$.

2.2. INTERACCIÓN DIRECTA DE LA ACTINA CON LA SUBUNIDAD C PERO NO CON LA SUBUNIDAD B DE LA H^+ -ATPasa VACUOLAR

Dado que la despolimerización de los microfilamentos produce la disociación de los dominios V_1 - V_0 , nos propusimos estudiar el mecanismo por el cual el citoesqueleto de actina estaba regulando la actividad V-ATPasa. Nuestra primera aproximación fue determinar si la actina estaba interaccionando directamente con la V-ATPasa en nuestro modelo de estudio. Ya que sabemos que dos de sus subunidades del dominio V_1 presentan afinidad por la actina, pero no hay nada descrito de su interacción en las endomembranas.

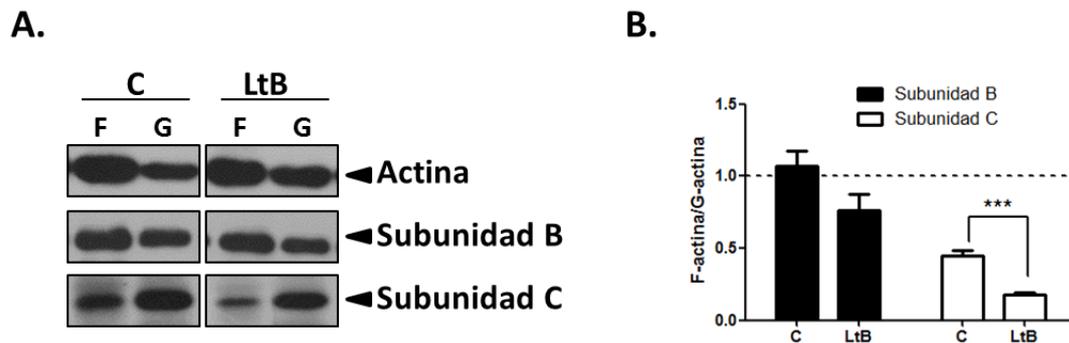


Figura 33. Afinidad de la subunidad B y la subunidad C del dominio V_1 de la V-ATPasa por la F-actina y la G-actina. **A.** Células HeLa control y tratadas con latrunculina B (LtB; $1 \mu M$, 90 min) fueron lisadas y sometidas a ultracentrifugación para separar la F-actina de la G-actina. Ambas fracciones fueron procesadas por WB y marcadas con anticuerpos específicos contra la actina y contra las subunidades B y C. **B.** Análisis cuantitativo de cantidad de la subunidad B o la subunidad C presente en la fracción de F-actina respecto la fracción de G-actina en cada una de las condiciones. Los resultados están representados como la media \pm SD de tres experimentos independientes. La significancia respecto la condición control según la t-student, $***p \leq 0.001$.

Se ha descrito que la subunidad B solo interacciona con la F-actina (Holliday et al., 2000), mientras que la subunidad C interacciona con la F y la G-actina (Vitavska et al., 2005). Mediante un fraccionamiento que permite separar la F-actina de la G-actina detectamos por

WB la distribución de las subunidades B y C en ambas fracciones. Por un lado, vimos que la subunidad B se repartía de igual forma entre las dos fracciones, a diferencia de lo que está descrito no parecía mostrar mayor afinidad por un tipo u otro de actina. Por lo contrario, la subunidad C se encontraba enriquecida en la fracción G-actina (**Fig. 33**). Adicionalmente, tratamos células HeLa con latrunculina B para desplazar la actina hacia la fracción G-actina. Vimos que la distribución de la subunidad B entre las dos fracciones no cambiaba en las células tratadas, sugiriendo que esta subunidad no estaba interactuando con la actina. Sin embargo, la subunidad C se desplazaba de manera significativa hacia la fracción G-actina en las células tratadas con latrunculina B, lo que sugería que esta subunidad sí que estaba interactuando con la actina (**Fig. 33**).

Alternativamente, realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación para determinar de forma más directa la interacción de la actina con ambas subunidades. Mediante el uso de anticuerpos específicos inmunoprecipitamos la actina y por WB miramos si las subunidades B y C estaban interactuando con la actina inmunoprecipitada. Tal y como sugerían los resultados de los fraccionamientos, observamos que a diferencia de la subunidad B, la subunidad C se encontraba interactuando con la actina (**Fig. 34**). Realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación inversos a los anteriores, inmunoprecipitando por separado las subunidades B y C y detectando la presencia de actina por WB. En el caso de la subunidad B efectivamente no vimos actina en el inmunoprecipitado, confirmándonos que esta subunidad no interactúa con la actina (**Fig. 35**). Lamentablemente, en el caso de la subunidad C los anticuerpos no eran aptos para inmunoprecipitación (**Fig. suplementaria 2**).

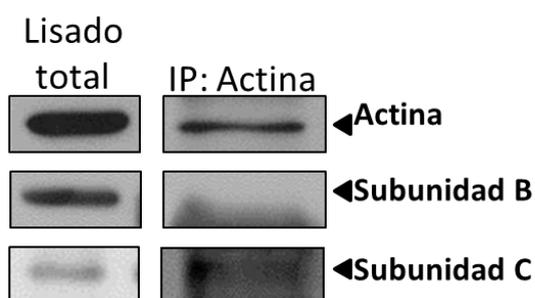


Figura 34. Interacción de la actina con la subunidad C pero no con la subunidad B del dominio V_1 de la V-ATPasa. Células HeLa lisadas y procesadas por WB (lisado total), o bien, sujetas a inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra la actina y procesados por WB para determinar si la subunidad B y/o la subunidad C interactuaban con la actina. Solo se detectó la subunidad C en el inmunoprecipitado de actina. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

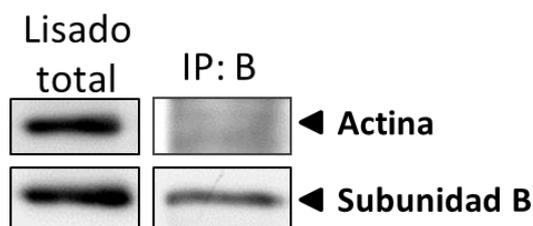


Figura 35. La subunidad B del dominio V_1 de la V-ATPasa no interacciona con la actina. Células HeLa lisadas y procesadas por WB (lisado total), o bien, sujetas a inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra la subunidad B y procesados por WB para determinar la presencia de actina. No se detectó actina en el inmunoprecipitado de subunidad B en ninguno de los tres experimentos que se realizaron.

2.3. REGULACIÓN DE LA ACTINA SOBRE LA H^+ -ATPasa VACUOLAR A TRAVÉS DE LA ORGANIZACIÓN DE LAS BALSAS LIPÍDICAS

Se ha demostrado que la V-ATPasa se localiza en los dominios de membrana ricos en colesterol y esfingomielina, las balsas lipídicas. De hecho, hay estudios que demuestran que, a nivel de las membranas del Golgi, varias de las subunidades de la V-ATPasa son de las proteínas más abundantes en los denominados complejos derivados de Golgi insolubles al detergente (GICs, del inglés *Golgi-derived detergent-insoluble complexes*) (Gkantiragas et al., 2001). Además, se ha propuesto que la localización de la V-ATPasa en estos dominios estaría relacionada con el nivel de asociación de los dos dominios (Lafourcade et al., 2008). Por ese motivo estudiamos si el tratamiento con latrunculina B reducía la presencia de las subunidades del dominio V_1 en las balsas lipídicas.

Para comprobarlo aislamos los dominios ricos en colesterol de células HeLa control y tratadas con latrunculina B. Estos dominios son resistentes a la solubilización por detergentes no iónicos a bajas temperaturas (como el Tritón), por ello reciben también el nombre de DRMs (del inglés, *Detergent Resistant Membranes*). Esta característica bioquímica permite aislarlos por densidad a partir de un gradiente discontinuo de sacarosa. Medimos por WB la cantidad de subunidad B (dominio V_1) presente en los DRMs respecto la cantidad de subunidad a (dominio V_0). Localizamos las fracciones correspondientes a DRMs mediante los marcadores caveolina-1 y el gangliósido GM-1. Los resultados nos mostraron que la ratio de subunidad B/subunidad a en los DRMs de las células tratadas con latrunculina B era significativamente inferior a la obtenida en las células control (**Fig. 36**, primeras dos líneas del WB). También observamos que en el caso de las células tratadas con latrunculina B los DRMs aparecían más dispersos (**Fig. 36**, cuadro rojo). Esto sugiere que los microfilamentos serían necesarios para el mantenimiento de la organización de las balsas lipídicas, tal como se indica en otros estudios

Resultados

(Chichili y Rodgers, 2009). Consecuentemente, la desorganización de las balsas lipídicas al despolimerizar la actina conllevaría indirectamente la disociación de los dominios V_1 y V_0 .

Como control positivo, aislamos DRMs en células cultivadas con y sin suero-glucosa. En este caso también vimos que proporción de subunidad B (V_1) respecto la subunidad a (V_0) en las fracciones que contenían los DRMs disminuía en las células cultivadas sin suero y sin glucosa (Fig. 37, primeras dos líneas del WB). A diferencia del anterior, los DRMs permanecían en las mismas fracciones en ambas condiciones (Fig. 37, cuadro rojo).

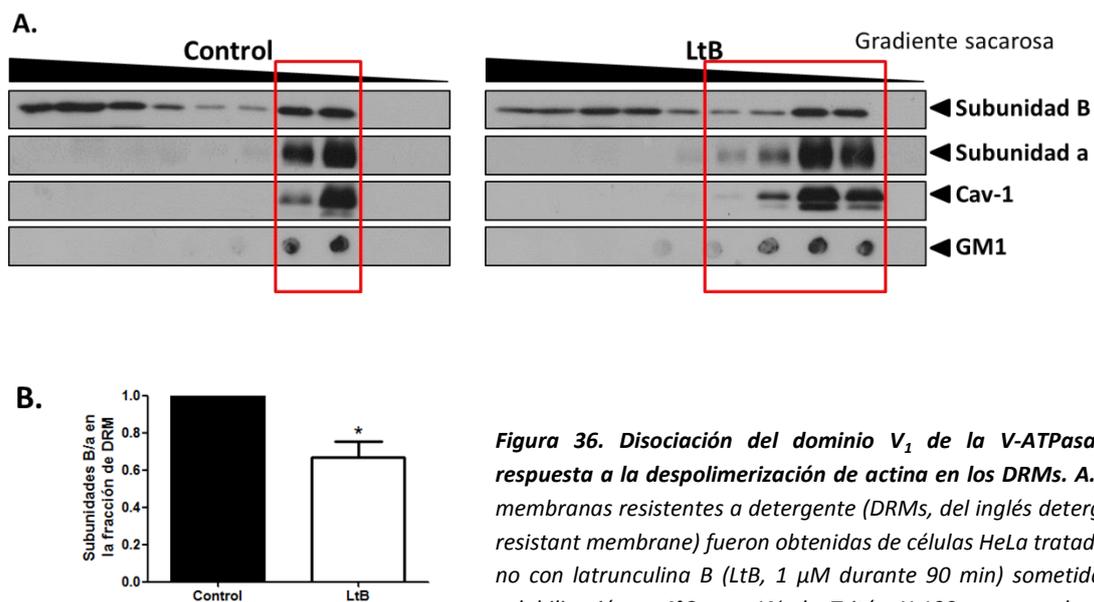


Figura 36. Disociación del dominio V_1 de la V-ATPasa en respuesta a la despolimerización de actina en los DRMs. **A.** Las membranas resistentes a detergente (DRMs, del inglés detergent resistant membrane) fueron obtenidas de células HeLa tratadas o no con latrunculina B (LtB, 1 μM durante 90 min) sometidas a solubilización a 4°C con 1% de Tritón X-100 y separadas por densidad por ultracentrifugación de un gradiente de sacarosa (Tal y como se indica en materiales y métodos). Las diferentes fracciones se obtuvieron desde la parte superior del gradiente y procesadas por WB marcando las subunidades B y a de la V-ATPasa, para conocer su distribución, y la caveolina-1 (cav-1), para localizar los DRMs. El gangliósido GM1 (marcador de DRMs) fue procesado por Dot-Blot y visualizado gracias a la incubación con toxina colérica conjugada con HRP. **B.** Análisis cuantitativo de la cantidad de subunidad B respecto la subunidad a en los DRMs. Los resultados están representados como la media ± SD de tres experimentos independientes. La significancia respecto el control según la t-student, * $p \leq 0.05$.

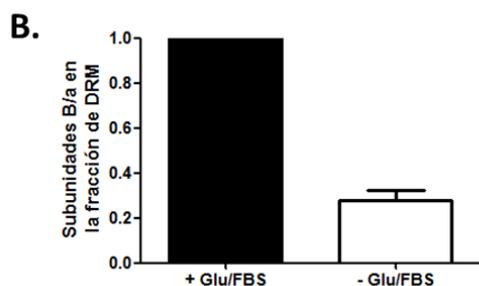
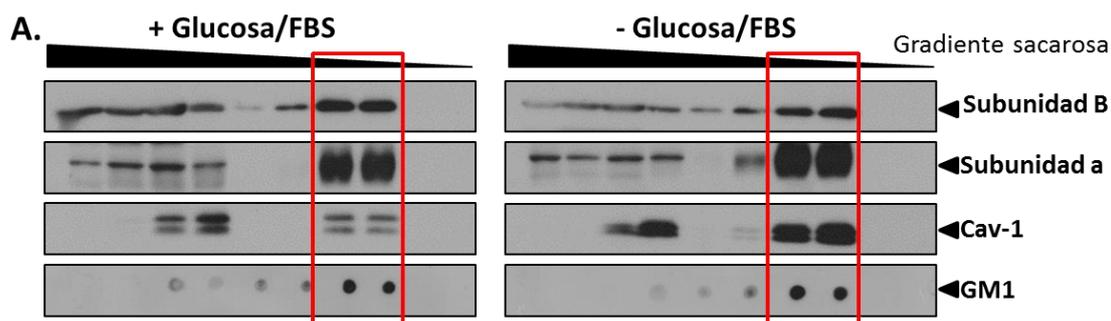


Figura 37. Disociación del dominio V_1 de la V-ATPasa en respuesta a la falta de suero y glucosa en los DRMs. A.

Las membranas resistentes a detergente (DRMs, del inglés detergent resistant membrane) fueron obtenidas de células HeLa cultivadas en presencia (+Glucosa/FBS) o ausencia (-Glucosa/FBS) de suero y glucosa durante 4h

sometidas a solubilización a 4°C con 1% de Tritón X-100 y separadas por densidad por ultracentrifugación de un gradiente de sacarosa (Tal y como se indica en materiales y métodos). Las diferentes fracciones fueron obtenidas desde la parte superior del gradiente y procesadas por WB marcando las subunidades B y a de la V-ATPasa, para conocer su distribución, y la caveolina-1 (cav-1), para localizar los DRMs. El gangliósido GM1 (marcador de DRM) fue procesado por Dot-Blot y visualizado gracias a la incubación con toxina colérica conjugada con HRP. **B.** Análisis cuantitativo de la cantidad de subunidad B respecto la subunidad a en los DRMs. Los resultados están representados como la media \pm SD.

3. RELEVANCIA DE LAS SUBUNIDADES A Y B EN LA FUNCIONALIDAD DE LA H^+ -ATPasa VACUOLAR EN EL COMPLEJO DE GOLGI

Antecedentes y Objetivo

La subunidad A del dominio V_1 es la encargada de la hidrólisis del ATP (Shao y Forgac, 2004), mientras que la subunidad B contiene dominios de unión a ATP no catalíticos (Vasilyeva et al., 2000) y un dominio de unión a actina (Chen et al., 2004). Hemos examinado la implicación de estas dos subunidades en la función de la V-ATPasa en el complejo de Golgi, midiendo su pH y el transporte secretor, en células silenciadas para las dichas subunidades.

La implicación de la V-ATPasa en el transporte intracelular asociado al complejo de Golgi ha sido estudiada básicamente mediante el uso de agentes farmacológicos que inhiben el dominio V_0 (Palokangas et al., 1994), o bien, con el silenciamiento de subunidades del dominio V_0 (Sobota et al., 2009). Poco se sabe de la implicación de las subunidades del dominio V_1 en

este proceso. Hemos comparado el efecto del silenciamiento de dos subunidades del dominio V_1 , una que posee un dominio de unión a actina (subunidad B) y otra que posee la capacidad hidrolítica del ATP (subunidad A) en el transporte asociado al complejo de Golgi. Queríamos determinar si la depleción de ambas subunidades es equivalente, o bien si el dominio de unión a actina de la subunidad B ejerce un papel en la funcionalidad de la V-ATPasa en el complejo de Golgi distinto al de la subunidad A.

3.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES A Y B DEL DOMINIO V_1 DE LA H^+ -ATPasa EN EL pH DEL COMPLEJO DE GOLGI

Para estudiar la implicación de las subunidades A y B en la funcionalidad de la V-ATPasa en el Golgi medimos su pH en células silenciadas por cada una de las subunidades, ya que el pH es reflejo directo de la función de la V-ATPasa. Para ello usamos un sensor fluorescente, la pHluorina. Utilizamos dos plásmidos que codificaban para la pHluorina conjugada con dos proteínas residentes de Golgi: la Galactosiltransferasa y el TGN38, dirigidos respectivamente al *trans*-Golgi (Golgi-pHluorina) y al TGN (TGN-pHluorina) (**Fig. 38A**). La pHluorina es una proteína GFP mutada que varía su emisión de fluorescencia en función del pH a consecuencia de los cambios conformacionales que sufre. Así pues, al ser excitada a 405 nm su emisión a 508 nm aumenta al incrementar el pH. Por lo contrario, al excitarla a 478 nm, su emisión a 508 nm disminuye al aumentar el pH (**Fig. 38B**). Así pues, medimos el pH a partir de la ratio entre la intensidad de fluorescencia emitida a 508 nm cuando excitamos a 405 nm respecto a la emitida cuando excitamos a 478 ($\text{Ratio}_{405/478}$) (**Fig. 38**) (Miesenbock et al., 1998).

Para determinar los valores de la $\text{ratio}_{405/478}$ que correspondían a cada pH, realizamos una curva patrón para cada constructo. Para ello incubamos células HeLa transfectadas con Golgi-pHluorina o TGN-pHluorina con tampones a diferentes pH conocidos (pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8) que contenían ionóforos (monensina y nigericina) para permitir su entrada al complejo de Golgi. Medimos la intensidad de fluorescencia de Golgi excitando a 405 y 478 nm, calculamos los valores de la ratio para cada pH y representamos la curva patrón para cada constructo (**Fig. 39**). Para cada experimento hicimos una curva patrón propia.

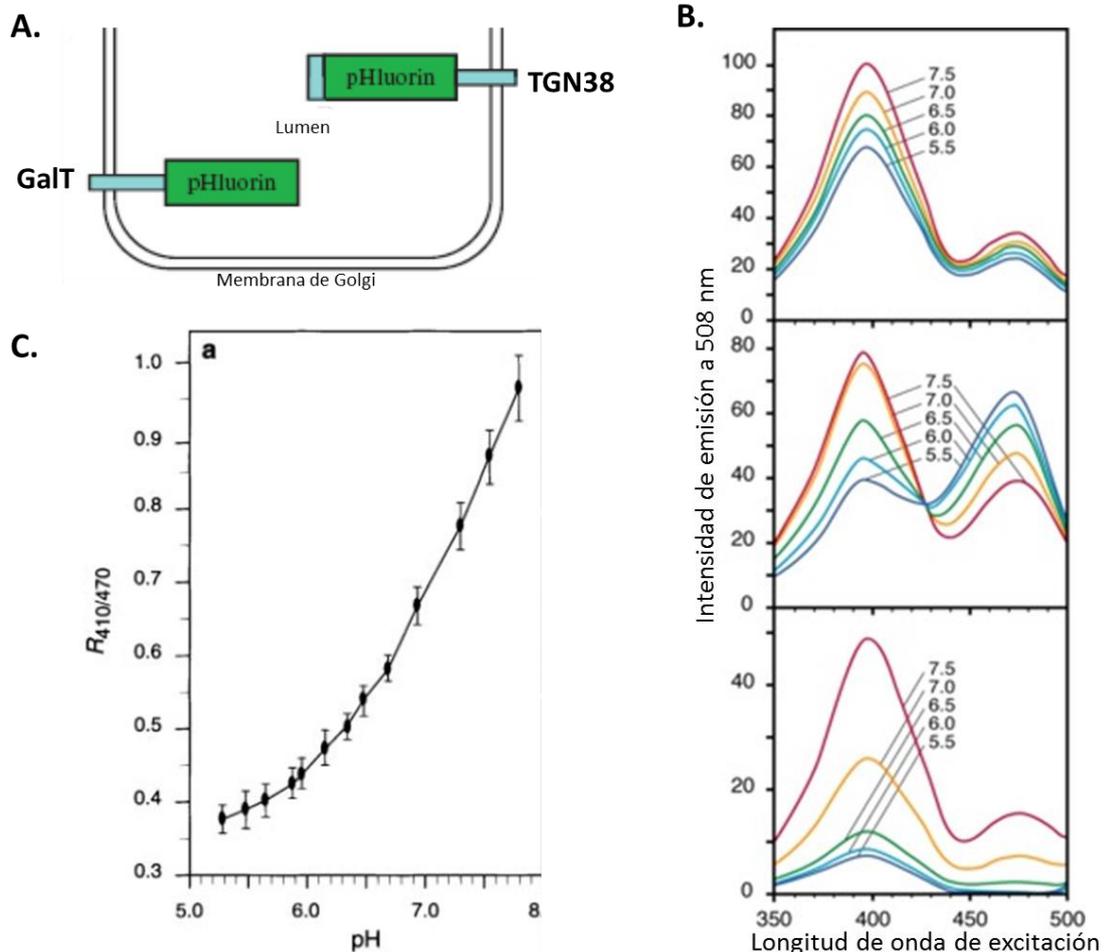


Figura 38. Representación esquemática del ensayo para medir el pH intra-Golgi. A. Representación esquemática de los constructos formados por el sensor pHluorina conjugada con proteínas residentes del complejo de Golgi (GALT, galactosiltransferasa; TGN38). B. Intensidades de emisión a 508 nm de la pHluorina al ser excitada a 405 nm y 478 nm en diferentes pH (5.5-7.5). C. Curva patrón de la ratio de la fluorescencia obtenida a 508 nm al excitarla a 405 nm respecto a excitarla a 478 nm a diferentes pH. (modificada de Miesenbock et al., 1998)

En primer lugar, medimos el pH de las células tratadas durante 1 hora con bafilomicina A1 100 nM (inhibidor específico de la V-ATPasa) o con de cloruro de amonio 50 mM (base débil que penetra en los orgánulos ácidos neutralizándolos por completo). El objetivo de estas medidas era, por una parte, comprobar que empleábamos la pHluorina correctamente y por otra, determinar si las condiciones que estábamos usando para los tratamientos eran eficaces neutralizando el pH del complejo Golgi. Observamos que el pH del TGN era significativamente menor que el del *trans*-Golgi. Sin embargo, en ambos casos obtuvimos valores de pH inferiores a los descritos en la literatura (Casey et al., 2010). Por otra parte, comprobamos que tanto el

tratamiento con bafilomicina como con cloruro de amonio incrementaban el pH del complejo de Golgi hasta valores cercanos al pH fisiológico (7.4) (Fig. 40).

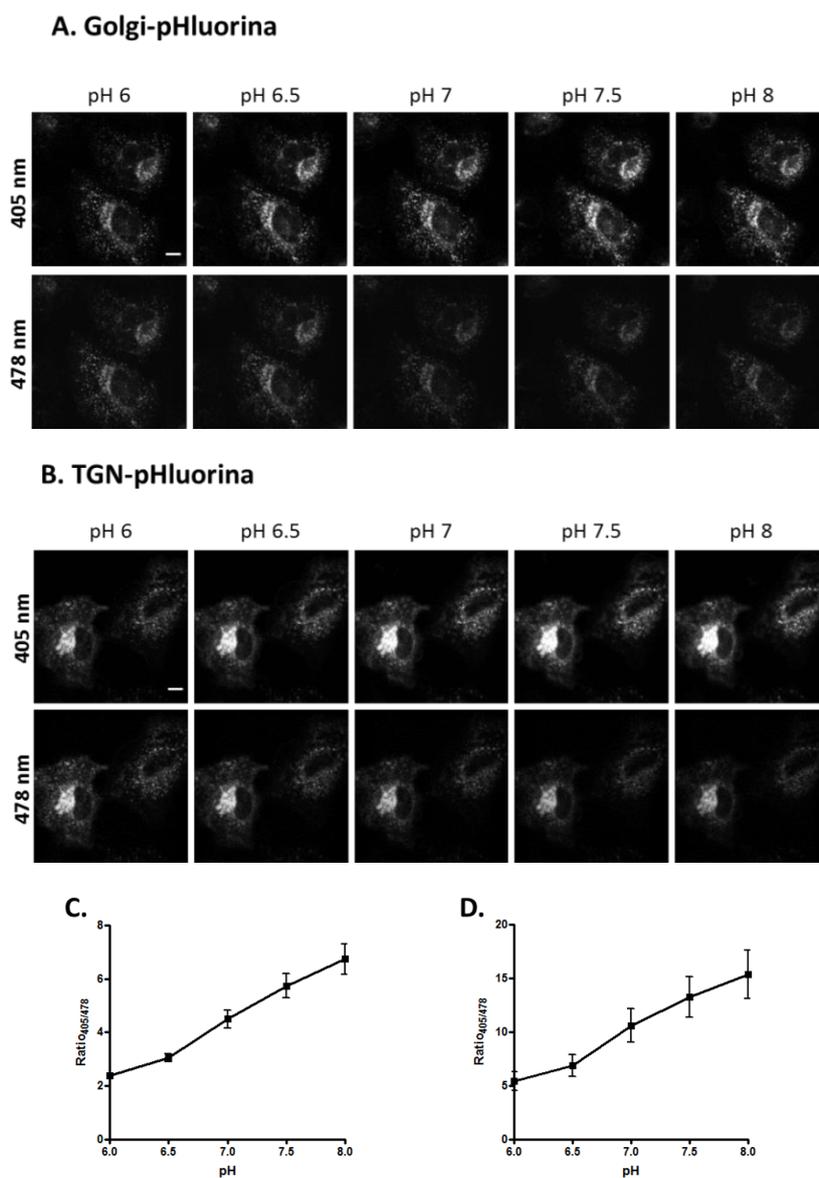


Figura 39. Curva patrón de la ratio_{405/478} a diferentes pH de la Golgi-pHluorina y la TGN-pHluorina. A y B. Imágenes representativas de la fluorescencia emitida a 508 nm por la Golgi-pHluorina (A) y la TGN-pHluorina (B) al excitarlas a 408 (primera fila) o 478 nm (segunda fila) a los pH indicados. Barra, 10 μ m. **C y D.** Curva patrón de la ratio de la fluorescencia emitida a 508 nm respecto a la emitida a 478 nm al excitar a 508 nm a los pH indicados para la Golgi-pHluorina (C) y la TGN-pHluorina (D). Los resultados representan la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes.

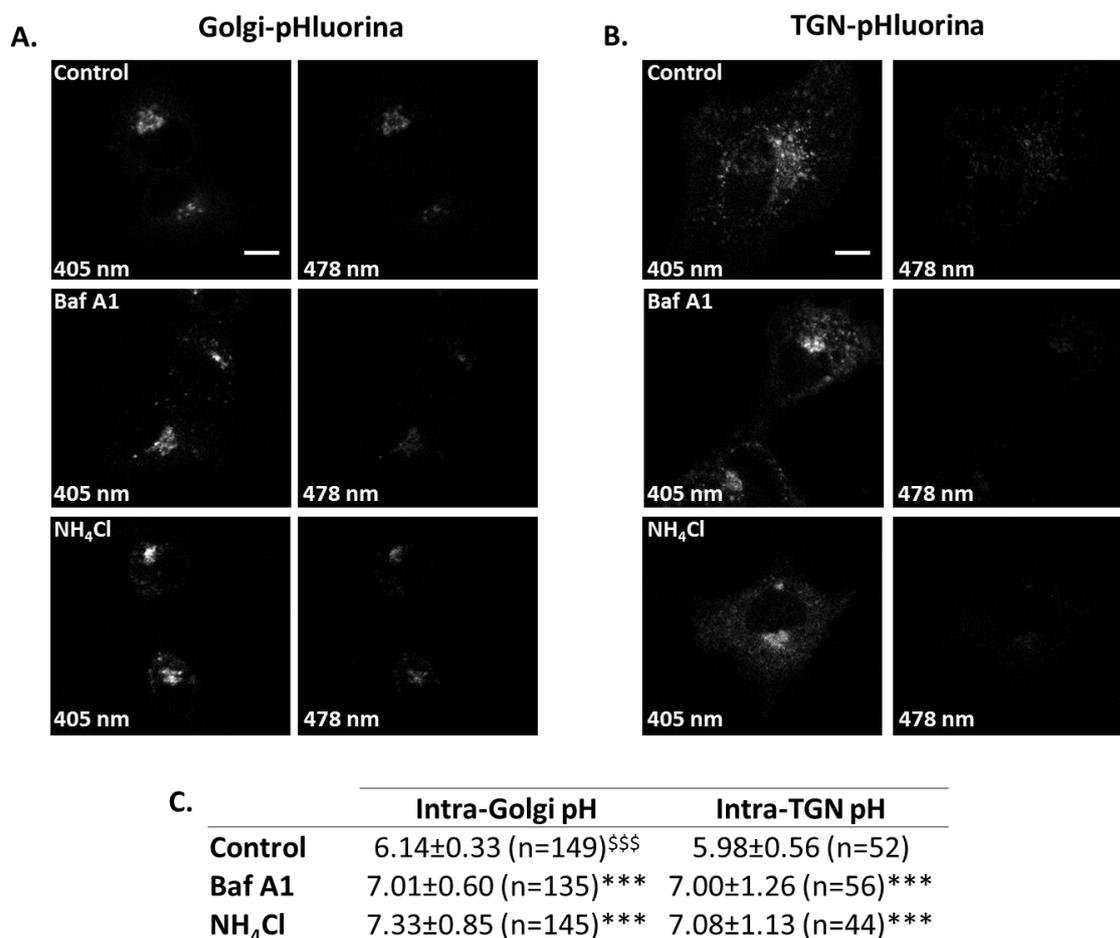


Figura 40. Los tratamientos con bafilomicina A1 o cloruro de amonio neutralizan el pH de Golgi. A y B. Imágenes representativas de la fluorescencia emitida a 508 nm por la Golgi-pHluorina (A) y la TGN-pHluorina (B) al excitarlas a 408 (primera columna) o a 478 nm (segunda columna) en células HeLa tratadas con bafilomicina A1 (Baf A1, 100 nM durante 1h) o cloruro de amonio (NH₄Cl, 25 mM durante 15 min). Barra, 10 μm. **C.** Valores de pH del Golgi y del TGN en las condiciones indicadas obtenidos con las medidas ratiométricas de intensidad de fluorescencia de la Golgi-pHluorina y la TGN-pHluorina, respectivamente. n representa el número de células analizado de tres experimentos independientes. Se muestran las medias ± SD. La significancia respecto la condición control según la t-student, ***p ≤ 0.001. Según la t-student el pH de Golgi es significativamente diferente al pH del TGN con una significancia de ^{\$\$\$}p ≤ 0.001.

Con la finalidad de caracterizar el papel de la subunidad A y de la subunidad B en la actividad V-ATPasa, silenciamos su expresión mediante la transfección de siRNA específicos. El silenciamiento de ambas subunidades fue realizado mediante la transfección durante 72 horas de una combinación de siRNAs dirigidos a diferentes regiones del ARN mensajero de cada subunidad (siRNA-A y siRNA-B) (ver apartado 4.8 de materiales y métodos). Como control, utilizamos una combinación de cuatro siRNAs que no codificaban para ninguna proteína (siRNA

Resultados

non-targeting, siRNA-NT). Analizamos por WB la expresión de ambas subunidades en lisados de células HeLa y observamos una reducción de aproximadamente el 80% en la expresión para ambas subunidades (**Fig. 41**).

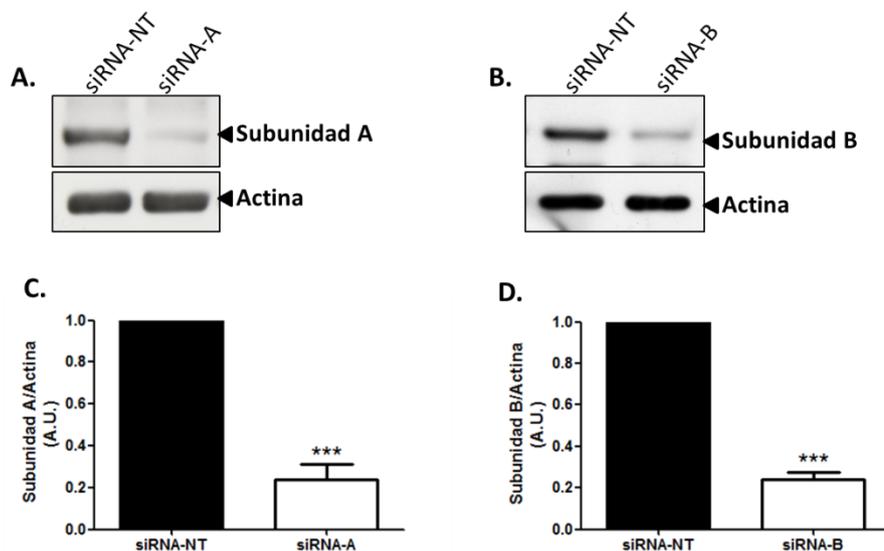


Figura 41. Silenciamiento de las subunidades A y B del dominio V_1 de la V-ATPasa. A y B. Lisados totales de células HeLa transfectadas durante 72 h con siRNA control (*non-targeting*, siRNA-NT) o siRNAs contra la subunidad A (siRNA-A) (A) o la subunidad B (siRNA-B) (B) se procesaron para WB utilizando anticuerpos específicos para las respectivas subunidades. **C y D.** Análisis cuantitativo de la cantidad de subunidad A (C) o de subunidad B (D) respecto al control de carga (actina) en cada una de las condiciones. Los resultados representan las medias \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Significancia estadística respecto la condición control según la *t*-student, *** $p \leq 0.001$.

Una vez optimizado el silenciamiento de las subunidades, medimos el pH del complejo de Golgi y del TGN en células silenciadas para la subunidad A y para la subunidad B. En ambos casos vimos que en la situación control (siRNA-NT) el pH del TGN era significativamente más ácido que el del *trans*-Golgi, tal y como cabría esperar. Consecuentemente, el silenciamiento de ambas subunidades inducía un aumento significativo del pH de los dos compartimentos del complejo de Golgi (**Fig. 42 y 43**) y por lo tanto, ambas subunidades parecían ser necesarias para mantener la actividad de la V-ATPasa en el complejo de Golgi. A pesar de reducir la expresión de ambas subunidades a niveles similares, el silenciamiento de la subunidad B neutralizaba completamente el pH, mientras que el de la subunidad A no.

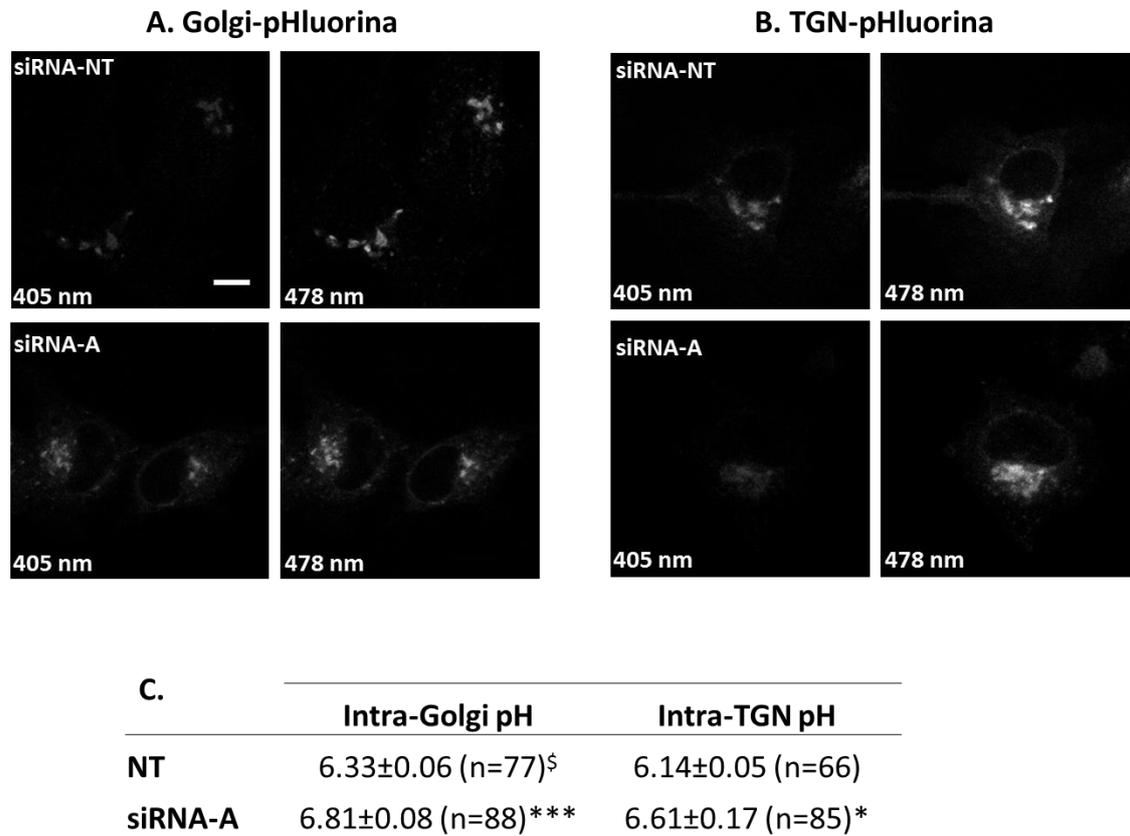


Figura 42. El silenciamiento de la subunidad A incrementa el pH de Golgi. A y B. Imágenes representativas de la fluorescencia emitida a 508 nm por la Golgi-pHluorina (A) y la TGN-pHluorina (B) al excitarlas a 408 (primera columna) o 478 nm (segunda columna) de células HeLa transfectadas 72 h con siRNA non-targeting (siRNA-NT) o con siRNA contra la subunidad A (siRNA-A). Barra, 10 μ m. **C.** Valores de pH del Golgi y del TGN en las condiciones indicadas obtenidos con las medidas ratiométricas de intensidad de fluorescencia de la Golgi-pHluorina y la TGN-pHluorina, respectivamente. n representa el número de células analizado de tres experimentos independientes. Se muestran las medias \pm SD. La significancia respecto la condición control (siRNA-NT) según la t-student, * $p \leq 0.05$ y *** $p \leq 0.001$. Según la t-student en una situación control el pH de Golgi es significativamente diferente al pH del TGN con una significancia de [§] $p \leq 0.05$.

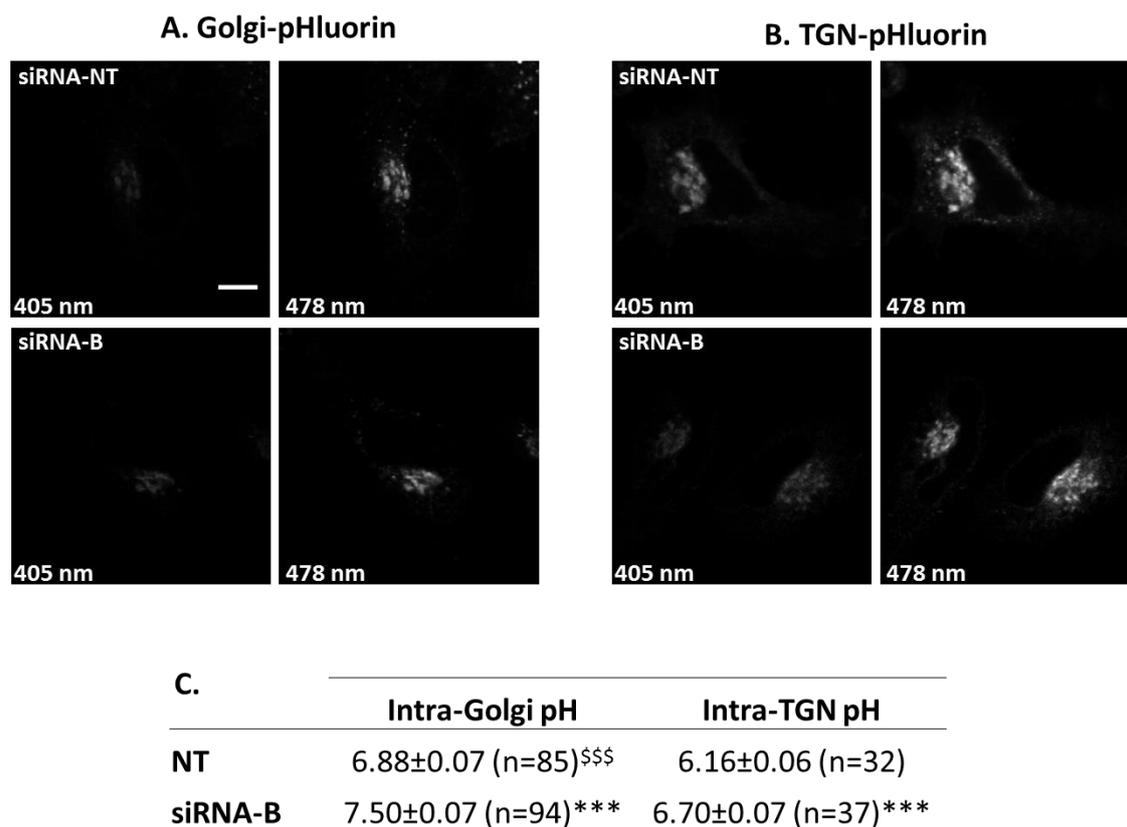


Figura 43. El silenciamiento de la subunidad B neutraliza el pH de Golgi. A y B. Imágenes representativas de la fluorescencia emitida a 508 nm por la Golgi-pHluorina (A) y la TGN-pHluorina (B) al excitarlas a 408 (primera columna) o 478 nm (segunda columna) de células HeLa transfectadas 72 h con siRNA non-targeting (siRNA-NT) o con siRNA contra la subunidad B (siRNA-B). Barra, 10 μ m. **C.** Valores de pH del Golgi y del TGN en las condiciones indicadas obtenidos con las medidas ratiométricas de intensidad de fluorescencia de la Golgi-pHluorina y la TGN-pHluorina, respectivamente. n representa el número de células analizado de tres experimentos independientes. Se muestran las medias \pm SD. La significancia respecto la condición control (siRNA-NT) según la t-student, *** $p \leq 0.001$. Según la t-student en situación control el pH de Golgi es significativamente diferente al pH del TGN con una significancia de ^{\$\$\$} $p \leq 0.001$.

3.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES A Y B DEL DOMINIO V_1 DE LA H^+ -ATPasa EN EL TRANSPORTE PROTEICO EN EL COMPLEJO DE GOLGI

Otra estrategia que usamos para comparar la implicación de las subunidades A y B en la función de la V-ATPasa del complejo de Golgi fue estudiar el efecto que tenían sus respectivos silenciamientos en el transporte secretor del complejo de Golgi, ya que se trata de un proceso muy sensible a cambios en el pH (Rivinoja et al., 2012).

En primer lugar y como referencia inicial, estudiamos el efecto de la neutralización farmacológica del pH de Golgi en el transporte anterógrado de proteínas transmembrana y solubles. Para ello usamos dos estrategias, por una parte, inhibimos la actividad de la V-ATPasa tratando las células con bafilomicina A1 y por otra, neutralizamos el pH sin afectar la actividad V-ATPasa mediante el tratamiento con cloruro de amonio.

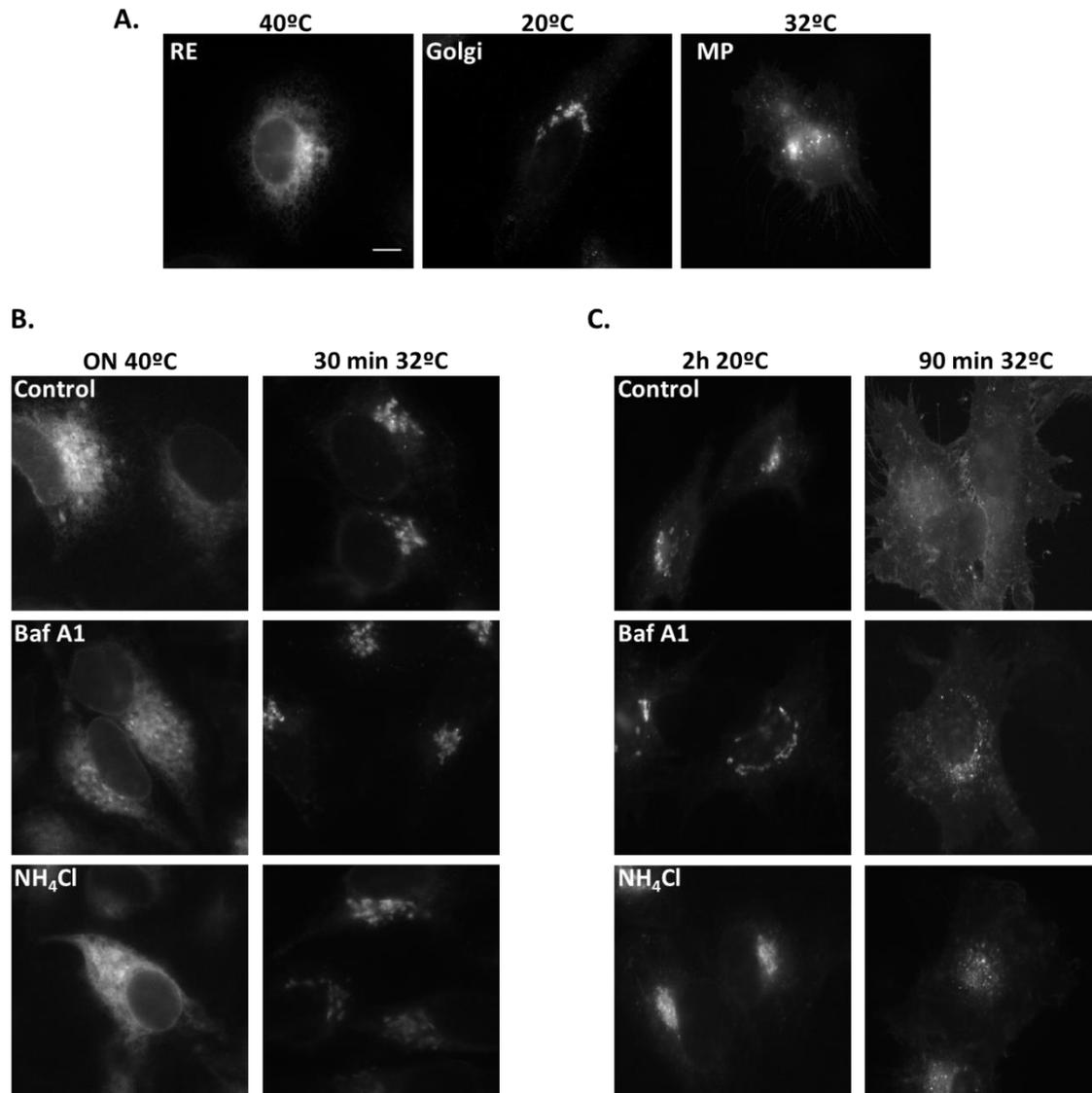


Figura 44. La neutralización farmacológica del pH de Golgi bloquea el transporte post-Golgi del VSV-G. A. Imágenes representativas del transporte intracelular del VSV-G. A 40°C la proteína G no se pliega correctamente y queda retenida en el RE. A 20°C la proteína es transportada al complejo de Golgi donde queda retenida. La incubación posterior a 32°C sincroniza la salida del VSV-G del complejo de Golgi. **B.** Células HeLa transfectadas con VSV-G-GFP se incubaron toda la noche a 40°C. Antes de cambiarlas a 32°C fueron tratadas con 100 nM de

Resultados

bafilomicina A1 (Baf A1) o con 25 mM de cloruro de amonio (NH₄Cl). Después del cambio de temperatura las células se fijaron a distintos tiempos (0, 5, 15, 30 min) C. Células HeLa transfectadas con el VSV-G-GFP se incubaron toda la noche a 40°C, posteriormente 2h a 20°C, en los últimos 15 min de la incubación a 20°C, se añadió 100 nM de bafilomicina A1 (Baf A1) o 25 mM de cloruro de amonio (NH₄Cl) y finalmente se pasaron a 32°C para iniciar el transporte post-Golgi. Las células se fijaron a distintos tiempos (0, 30, 60, 90 min). Barra, 10 µm.

Para seguir el transporte de proteínas transmembrana utilizamos la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular unida a un GFP o VSV-G-GFP. Existe una variante termosensible de esta proteína (ts045-VSV-G) que nos permite sincronizar su transporte desde el RE. Así pues, al incubar las células a 40°C (temperatura no permisiva) la glicoproteína G no se pliega correctamente y queda retenida en el RE. En cambio, si incubamos las células a la temperatura permisiva (32°C) la proteína adquiere la conformación correcta lo que le permite salir del RE y seguir toda la vía secretora hasta llegar a la membrana plasmática. Diseñamos dos ensayos de transporte del VSV-G. Para estudiar el transporte del RE al complejo de Golgi, incubamos las células toda la noche a 40°C y al día siguiente las pasamos a 32°C, siguiendo la cinética de transporte del VSV-G desde el RE al Golgi. Por otra parte, para estudiar el transporte post-Golgi, retuvimos el VSV-G en el RE incubando las células toda la noche a 40°C y al día siguiente las incubamos 2 h a 20°C, para acumular el VSV-G en el complejo de Golgi. Finalmente, incubamos las células a 32°C para seguir la cinética de transporte de la glicoproteína G desde el complejo de Golgi hasta la membrana plasmática (**Fig. 44 A**).

Realizamos estos ensayos con células tratadas con de bafilomicina A1 (100 nM) o con cloruro de amonio (25 mM) y vimos que estos tratamientos no afectaban a la cinética de transporte del VSV-G desde el RE al complejo de Golgi. A los 30 min tanto en las células control como en las tratadas todo el VSV-G había llegado al complejo de Golgi (**Fig. 44B**). Resultado que coincide con lo descrito en la literatura, indicando que este transporte no es dependiente ni de pH ni de la actividad de la V-ATPasa. En cambio, sí que vimos diferencias en el transporte post-Golgi. Mientras que en la células control a los 90 min prácticamente toda la proteína había llegado a la membrana plasmática, en las células tratadas con bafilomicina o cloruro de amonio la VSV-G seguía retenida en el complejo de Golgi (**Fig. 44C**). Así pues, concluimos que la salida de *cargo* del complejo de Golgi requiere un pH ácido el cual viene generado por la V-ATPasa.

También estudiamos el efecto de estos tratamientos en el transporte de proteínas solubles o lumbales. Para ello, marcamos las proteínas (en los aa metionina y cisteína) con azufre radioactivo [³⁵S]. Acumulamos las proteínas en el complejo de Golgi incubando las células a 19°C y examinamos su secreción midiendo la radioactividad presente en el medio. Vimos que

después de 60 min la radioactividad en el medio de las células tratadas con bafilomicina o cloruro de amonio era significativamente inferior al de las células control, mostrando un claro retraso en el transporte post-Golgi de proteínas solubles. Curiosamente, el efecto del cloruro de amonio era mayor que el de la bafilomicina (**Fig. 45**).

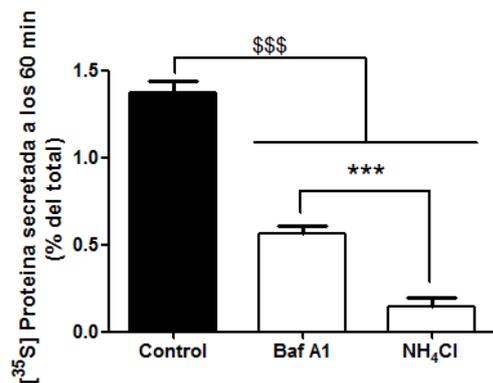


Figura 45. La neutralización del pH de Golgi disminuye la secreción de proteínas solubles. Células HeLa tratadas con 100 nM de bafilomicina A1 (Baf A1) o con 25 mM de cloruro de amonio (NH₄Cl), marcadas con [³⁵S] Met/Cys, se incubaron 3 h a 19°C para acumular las proteínas sintetizadas de novo en el complejo de Golgi, y seguidamente se incubaron a 37°C. A los 60 min se precipitaron las proteínas del sobrenadante y de los lisados totales y se cuantificaron en el contador de centello. Los valores representados son las medias \pm SD de tres experimentos independientes. La significancia respecto la condición control según la t-student, *** $p \leq 0.001$ y \$\$\$ $p \leq 0.001$.

Una vez confirmado que el transporte post-Golgi tanto de proteínas solubles como de proteínas transmembrana era dependiente de la actividad de la V-ATPasa y/o del pH, pasamos a estudiar el efecto del silenciamiento de las subunidades A y B en este tipo de transporte. Ambos silenciamientos comportaban una alteración de la actividad V-ATPasa (como hemos visto con las medidas de pH), y por lo tanto, era de esperar que ambos alterasen también el transporte post-Golgi. Utilizamos los mismos ensayos de transporte que en las células tratadas con bafilomicina y cloruro de amonio.

Vimos que el transporte del VSV-G desde el RE al complejo de Golgi no se alteraba por el silenciamiento de ninguna de las subunidades (**Fig. 46**). Para confirmar que no existían alteraciones en la llegada de la VSV-G al complejo de Golgi, realizamos un ensayo de adquisición de resistencia a la enzima endoglicosilasa H (endo H) en las células silenciadas por la subunidad B. Esta enzima corta los residuos glucídicos ricos en manosa que contienen las proteínas al salir del RE, pero es incapaz de hacerlo si estos están recubiertos de residuos más complejos que se adquieren al llegar complejo de Golgi. Para este ensayo utilizamos una línea de células HeLa que expresaba VSV-G-GFP de manera constitutiva. Vimos que las células

Resultados

silenciadas no presentaban diferencias respecto a los controles en la adquisición de la resistencia a endoH (Fig. 47).

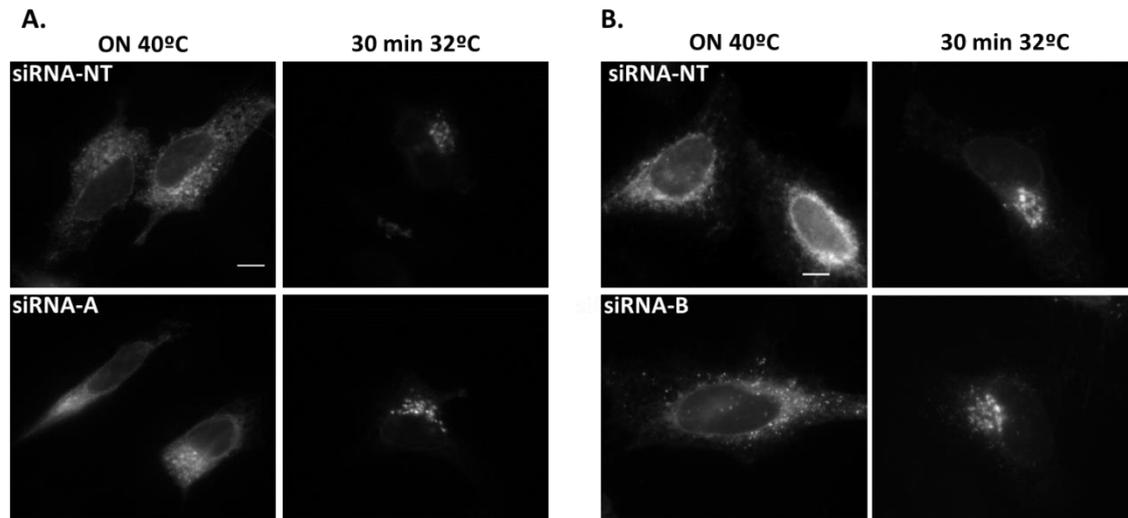


Figura 46. El transporte anterógrado del RE al complejo de Golgi no se ve afectado por el silenciamiento de las subunidades A y B del dominio V_1 de la V-ATPasa. Células HeLa fueron transfectadas 72 h con siRNA non-targeting (siRNA-NT), siRNA contra la subunidad A (siRNA-A) (A) o siRNA contra la subunidad B (siRNA-B) (B). Después de las 72 h, las células se transfectaron con VSV-G-GFP, se incubaron toda la noche a 40°C, y al día siguiente se pasaron a 32°C y se fijaron a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30 min). Barra, 10 μ m.

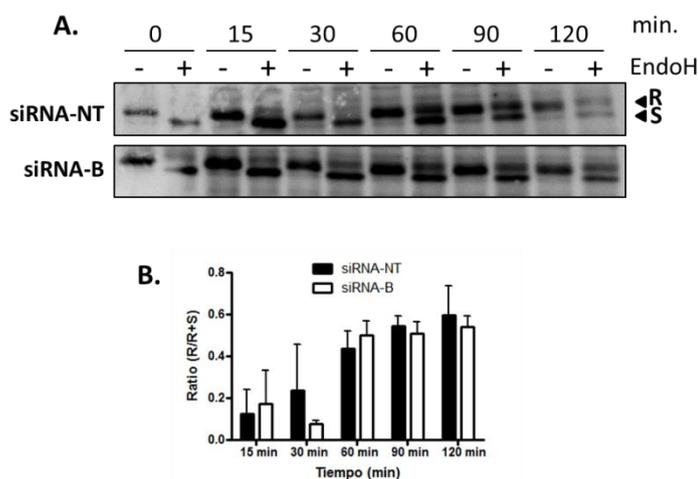


Figura 47. El silenciamiento de la subunidad B no afecta a la llegada del VSV-G al complejo de Golgi desde el RE. A. Ensayo bioquímico del transporte del VSV-G utilizando el ensayo Endo H. Células HeLa que expresaban constitutivamente VSV-G-GFP se transfectaron 72 h con siRNA control (siRNA-NT) o con siRNA contra la subunidad B (siRNA-B) y se

incubaron 24 h a 40°C. Después, las células se pasaron a 32°C para inducir la salida del VSV-G del RE, se lisaron a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90, 120 min) y se trataron con el enzima endo H. Posteriormente los lisados se procesaron para WB y se marcaron con anticuerpos específicos contra GFP. Las puntas de flecha indican la proteína resistente (R) y sensible (S) al enzima endo H. B. Análisis cuantitativo de la proteína resistente respecto la total (R/R+S) en cada tiempo. Se representan la medias \pm SD de tres experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas.

Seguidamente, ensayamos el transporte post-Golgi de la VSV-G de igual manera al descrito para los agentes farmacológicos. Curiosamente, mientras que en las células control y las silenciadas por la subunidad A a los 90 min prácticamente toda la proteína ya había llegado a la membrana plasmática, en las células silenciadas por la subunidad B esta seguía retenida en el complejo de Golgi (**Fig. 48**). Asimismo, observamos que la secreción de proteínas solubles marcadas con radioactividad en las células silenciadas por la subunidad B era significativamente inferior a las células control. En cambio, las células silenciadas para la subunidad A no mostraban diferencias de secreción respecto las control (**Fig. 49**).

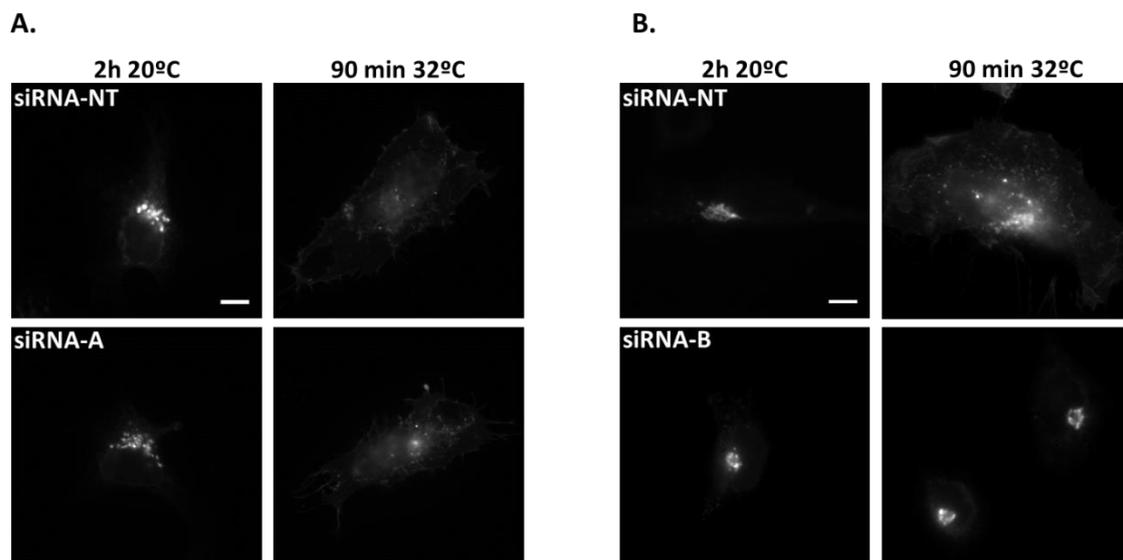


Figura 48. El silenciamiento de la subunidad B bloquea el transporte post-Golgi pero el silenciamiento de la subunidad A no. Células HeLa fueron transfectadas 72 h con siRNA non-targeting (siRNA-NT), siRNA contra la subunidad A (siRNA-A) (A) o siRNA contra la subunidad B (siRNA-B) (B). Después de las 72 h las células se transfectaron con VSV-G-GFP, se incubaron toda la noche a 40°, después 2 h a 20°C, se pasaron a 32°C y se fijaron a diferentes tiempos (0, 30, 60, 90 min). Vimos que solo el silenciamiento de la subunidad B bloqueaba la salida del VSV-G del complejo de Golgi. Barra, 10 μ m.

El conjunto de estos resultados nos muestran que el silenciamiento de la subunidad B tiene efectos mayores sobre la actividad de la V-ATPasa y en sus funciones secretoras. Para determinar si los efectos del silenciamiento eran específicos, comprobamos si el silenciamiento de la subunidad A o de la subunidad B afectaban los niveles de expresión de la subunidad B o la subunidad A, respectivamente. Observamos que los niveles de subunidad A no se veían afectados por el silenciamiento de la subunidad B. En cambio, los niveles de

subunidad B se veían ligeramente disminuidos con el silenciamiento de la subunidad A (**Fig. suplementaria 3**).

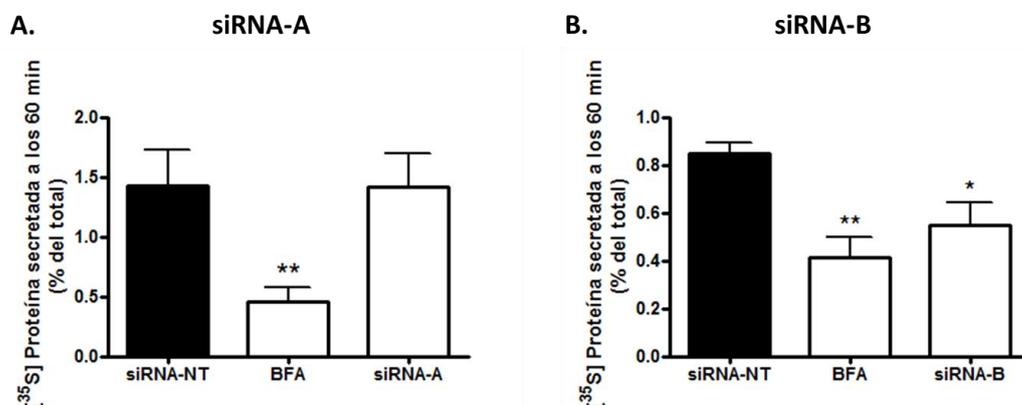


Figura 49. Solo el silenciamiento de la subunidad B del dominio V_1 de la V-ATPasa reduce la secreción de proteínas solubles. Células HeLa se transfectaron 72 h con siRNA non-targeting (siRNA-NT), siRNA contra la subunidad A (siRNA-A) (**A**) o siRNA contra la subunidad B (siRNA-B) (**B**). Después se marcaron con [³⁵S] Met/Cys, se incubaron 3 h a 19°C para acumular la compleja de Golgi las proteínas sintetizadas de novo y luego se pasaron a 37°C. A los 60 min las proteínas del sobrenadante y de los lisados totales se precipitaron y se cuantificaron en el contador de centello. Como control positivo las células se trataron con Brefeldina A (BFA). Los valores representados son las medias \pm SD de tres experimentos independientes. La significancia respecto la condición control según la t-student, * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$.

3.3. EFECTOS DE LA DEPLECIÓN DEL DOMINIO DE UNIÓN A ACTINA DE LA SUBUNIDAD B DEL DOMINIO V_1 SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE LA H^+ -ATPasa VACUOLAR

Dado que habíamos observado que el silenciamiento de la subunidad B tenía mayores efectos en el transporte post-Golgi, nos propusimos estudiar si la depleción del dominio de unión a actina de esta subunidad era la responsable de generar estos efectos. Se sabe que este dominio posee una función localizadora en la membrana plasmática durante la inactivación de los osteoclastos (Holliday et al., 2005). A pesar de que no habíamos encontrado interacción entre la actina y esta subunidad, nos propusimos estudiar si el dominio de unión a actina de la subunidad B tenía un papel en la localización de la V-ATPasa en el complejo de Golgi.

Para abordar este estudio clonamos en un vector GFP un mutante de la subunidad B sin su extremo amino-terminal (GFP-subunidad B (Δ ABD)), donde se ha descrito que se localiza el dominio de unión a actina (Holliday et al., 2000). Obtuvimos varios clones de esta subunidad y los transfectamos en células HeLa. Comprobamos por WB si estos mutantes eran reconocidos por los anticuerpos específicos tanto contra la etiqueta GFP como contra la subunidad B. Observamos que todos ellos eran reconocidos por ambos anticuerpos, además los clones deficientes para el dominio de unión a actina mostraban un peso molecular inferior a la GFP-B silvestre, debido a la depleción del dominio amino-terminal (**Fig. 50**).

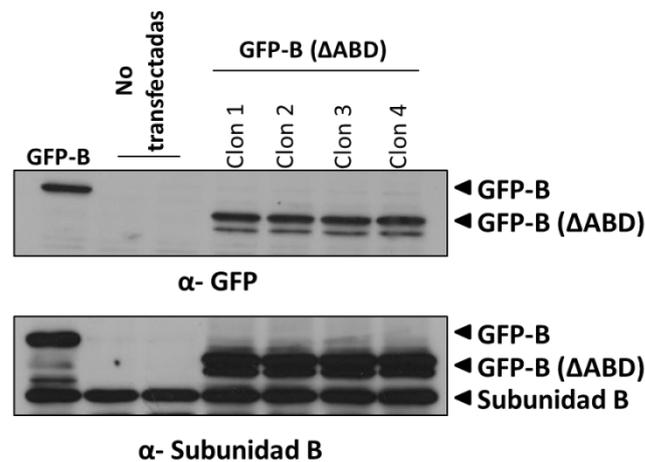


Figura 50. Comprobación de los clones obtenidos de la GFP- B(Δ ABD). WB de células HeLa transfectadas durante 24 h con el vector GFP (GFP), no transfectadas, o transfectadas con los distintos clones obtenidos durante el proceso de clonaje de la GFP-subunidad B(Δ ABD). El WB fue marcado con anticuerpos específicos contra el GFP, que reconoce la subunidad B sobrexpresada, y contra la subunidad B, que reconoce la subunidad B sobrexpresada con un peso molecular superior a la subunidad B endógena. También destacar que la GFP-subunidad B(Δ ABD) presenta un peso molecular inferior a la forma silvestre debido a la eliminación del amino-terminal.

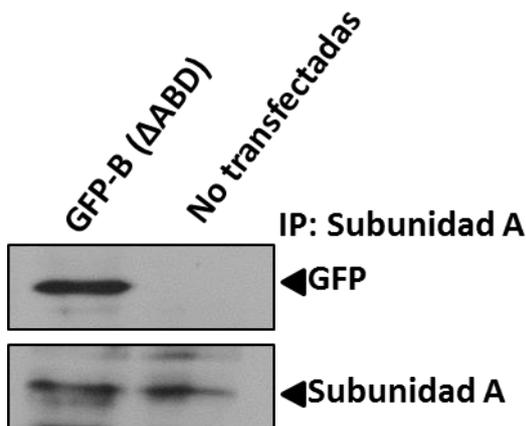


Figura 51. Integración en el complejo V-ATPasa de la GFP-B(Δ ABD). WB de Células HeLa transfectadas durante 24 h con la GFP-subunidad B(Δ ABD) y células no transfectadas sujetas a inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra la subunidad A. El WB fue marcado con anticuerpos específicos contra la GFP para ver la interacción de la proteína sobrexpresada con la subunidad A endógena.

Resultados

Como en el caso de la GFP-B silvestre, comprobamos si la GFP-B(Δ ABD) era capaz de incorporarse en el complejo V-ATPasa endógeno. En este caso procedimos a inmunoprecipitar la subunidad A endógena y comprobar por WB, mediante el marcaje con anticuerpos contra el GFP, si la forma mutante de la subunidad B estaba interaccionando con la subunidad A endógena. Efectivamente éste fue el caso (**Fig. 51**).

Finalmente, transfectamos células HeLa con la GFP-B silvestre o con la GFP-B(Δ ABD) y comparamos su distribución por microscopia confocal. En el caso de la GFP-B silvestre vimos que se distribuía en estructuras puntiformes repartidas por el citosol y que estaba concentrada en la región perinuclear, marcaje que solapaba con el marcador de Golgi TGN46, tal y como habíamos comprobado anteriormente (**Fig. 52** primera fila). En cambio, la distribución de la GFP-B(Δ ABD) parecía ser citosólica sin ningún patrón de marcaje en concreto, y en ningún caso mostraba solapamiento con el marcador de Golgi TGN46 (**Fig. 52** primera fila). Este resultado apunta a que el dominio de unión a actina de la subunidad B podría estar ejerciendo un papel en la localización de la V-ATPasa. Debemos mencionar que la sobreexpresión de la GFP-B(Δ ABD) producía un aumento de la muerte celular.

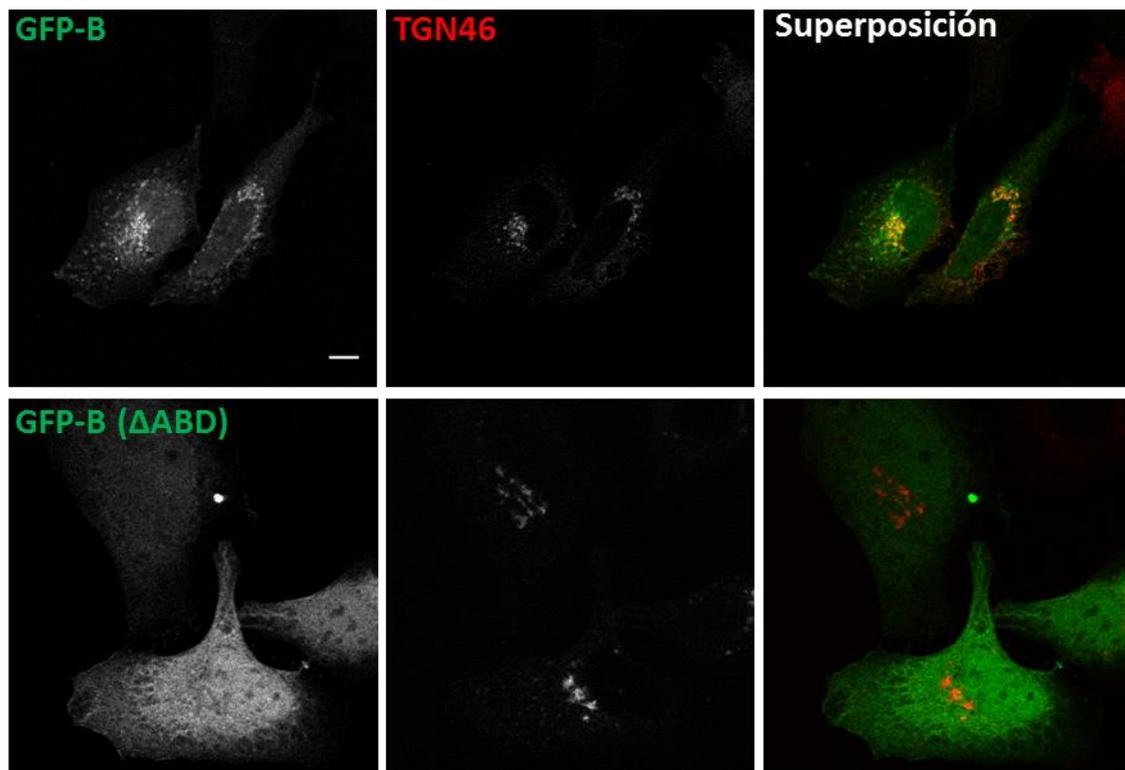


Figura 52. La GFP-subunidad B(Δ ABD) no localiza en el complejo de Golgi. Células HeLa transfectadas con la GFP-subunidad B o la GFP-subunidad B(Δ ABD) durante 24 h fueron procesadas por IF marcando con anticuerpos específicos contra la el marcador de Golgi TGN46. Las fotos fueron tomadas con microscopia confocal. Barra, 10 μ m.

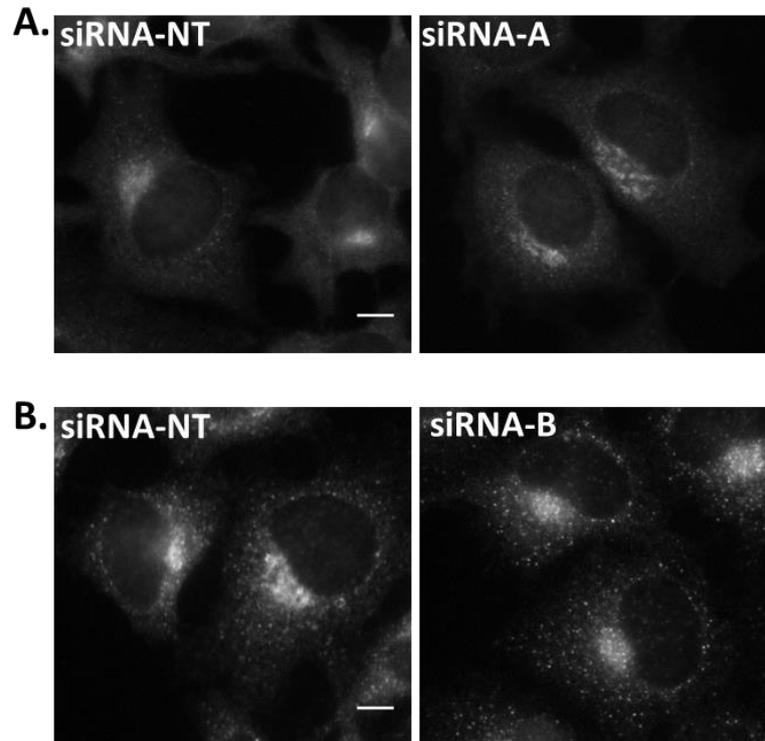
4. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1. Inespecificidad de los anticuerpos contra las subunidades A y B ensayados por inmunofluorescencia. A. Células HeLa transfectadas con siRNA contra la subunidad A (siRNA-A) o con siRNA non-targeting (siRNA-NT) durante 72 h y procesadas por IF con anticuerpos contra la subunidad B. **B.** Células HeLa transfectadas con siRNA contra la subunidad B (siRNA-B) o con siRNA non-targeting (siRNA-NT) durante 72 h y procesadas por IF con anticuerpos contra la subunidad B. Barra, 10 μ m. No observamos diferencias de marcaje con ninguno de los anticuerpos entre las células control y las silenciadas.

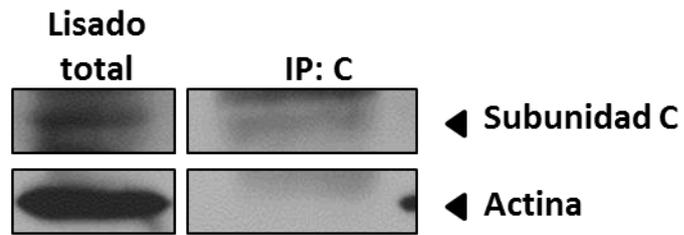


Figura suplementaria 2. Incapacidad para inmunoprecipitar la subunidad C con los anticuerpos comerciales. Células HeLa fueron lisadas y procesadas por WB (lisado total), o bien, sujetas a inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra la subunidad C y procesados por WB para determinar si la actina estaba interaccionando. No conseguimos inmunoprecipitar la subunidad C.

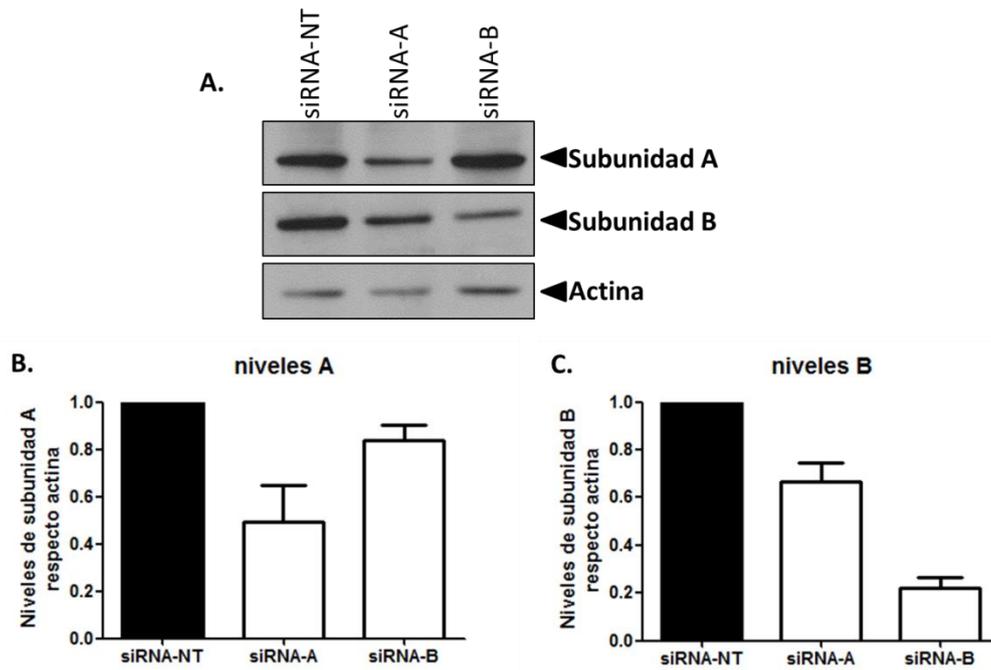


Figura Suplementaria 3. Niveles de las subunidades A y B en las células silenciadas respectivamente para las subunidades B y A. **A.** Células HeLa fueron transfectadas 72 h con siRNA control (siRNA-NT), con siRNA contra la subunidad A (siRNA-A) y siRNA contra la subunidad B (siRNA-B). Tras las 72 h las células fueron lisadas y procesadas para WB en que se marcaron la subunidad A, la subunidad B y la actina. **B y C.** Análisis cuantitativo de la cantidad de subunidad A (A) y subunidad B (B) presente en todas la muestras respecto el control de carga de actina. Se representan las medias \pm SD de dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

El complejo de Golgi es el encargado de centralizar y distribuir el *cargo* procedente de las diferentes vías para enviarlo a su destino final. Es de suponer entonces que la osmolaridad en el interior de las cisternas es elevada debido al alto contenido de proteínas en tránsito procedentes de la fusión de ITs derivados del RE y de los endosomas. Para que pueda mantenerse la forma aplanada de las cisternas se necesita un sistema que regule la osmolaridad, evitando la esperable dilatación espontánea de las cisternas debida al alto contenido proteico. Al mismo tiempo, el lumen del Golgi necesita de un ambiente iónico determinado para la correcta ejecución de algunas de sus funciones y en este sentido el pH es uno de los factores más importantes a tener en cuenta (Schapiro y Grinstein, 2000).

La predecible dilatación espontánea de las cisternas de Golgi se evita gracias a la presencia de proteínas que aportan estabilidad mecánica como es el caso de las golginas, las GRASPs (del inglés *Golgi reassembly protein*) (Ramirez y Lowe, 2009) y el citoesqueleto (Thyberg y Moskalewski, 1999; Egea et al. 2013,). Asimismo, en las membranas de Golgi se encuentran diferentes canales y transportadores iónicos que participan en el mantenimiento de la morfología a través del control de la concentración de diversos iones y por lo tanto de la osmolaridad.

En esta tesis demostramos que el citoesqueleto de actina participa en el mantenimiento de la morfología y funciones del complejo de Golgi en parte regulando la actividad de la V-ATPasa. Hemos visto que los microfilamentos son necesarios para la asociación de los dominios V_1 y V_0 de la V-ATPasa y proponemos dos mecanismos por los cuales la actina regularía esta asociación: uno directo, a través de la interacción con la subunidad C del dominio V_1 y otro indirecto, manteniendo la organización de los *lipid raft* donde la V-ATPasa reside.

I. LA H^+ -ATPasa VACUOLAR EN EL COMPLEJO DE GOLGI

En la primera parte de este trabajo hemos confirmado la localización de la V-ATPasa en el complejo de Golgi y hemos definido la distribución subcelular de la bomba a lo largo del *stack*. Mediante estudios de colocalización por microscopía confocal vimos que la V-ATPasa se encuentra distribuida a lo largo de todo el complejo de Golgi estando enriquecida en sus regiones más distales, o sea en el *trans*-Golgi y el TGN. Esta distribución correlaciona bien con el gradiente de pH del orgánulo.

Como sabemos, la vía endocítica y la vía secretora presentan un gradiente de pH que disminuye conforme nos acercamos al destino final del *cargo* (Paroutis et al., 2004). La composición de la V-ATPasa en los diferentes orgánulos, a nivel de isoformas de cada

subunidad es prácticamente la misma. De hecho, la única subunidad que presenta isoformas específicas para los distintos compartimentos intracelulares es la subunidad a (dominio V_0). En mamíferos, se han descrito cuatro isoformas para la subunidad a que se localizan en los diferentes orgánulos, aunque la especificidad para cada orgánulo parece depender del tipo celular (Marshansky y Futai, 2008). A diferencia de las levaduras, en donde las dos isoformas de la subunidad a (VPH1 y STV1) determinan la localización de la V-ATPasa y sus características funcionales (Kawasaki-Nishi et al., 2001a; Kawasaki-Nishi et al., 2001b), en las células de mamífero no se han descrito diferencias funcionales entre las cuatro isoformas de la subunidad. Por lo tanto, si la composición a nivel de isoformas no es la responsable de crear diferencias en la actividad V-ATPasa y por lo tanto generar diferentes pHs en cada compartimento, ¿cuál es el mecanismo por el que la misma V-ATPasa dependiendo de dónde se encuentre es capaz de generar diferentes concentraciones de protones dando lugar a distintos pHs? Se ha postulado que podrían existir mecanismos de regulación específicos en cada orgánulo o bien diferencias en cuanto a la densidad de la bomba (Casey et al., 2010). Nuestros resultados indican que un aumento en la densidad de la V-ATPasa en las regiones más distales del complejo de Golgi explicaría un menor pH. Sin embargo, este resultado no excluye que puedan existir mecanismos de regulación de la V-ATPasa que sean específicos para cada región que ayudaran a formar este gradiente, como por ejemplo diferencias en la eficiencia de translocación de protones o en el grado de asociación de los dominios V_1 y V_0 .

Para confirmar la localización de la V-ATPasa en el complejo de Golgi hemos realizado dos aproximaciones: una bioquímica y otra morfológica. En la primera, hemos detectado varias de sus subunidades en fracciones enriquecidas en membranas de Golgi. En estos experimentos vimos que, a pesar de que todas las subunidades corresponden a un mismo complejo, la única subunidad que aparecía claramente enriquecida en las membranas de Golgi era la subunidad a (dominio V_0). Esto podría deberse a que las otras dos subunidades examinadas, las subunidades A y B del dominio V_1 , se encuentran en parte en el citosol ya que se sabe que ciclan continuamente entre las membranas y el citosol (Kane, 2006). Por lo tanto, en las membranas de Golgi sólo vemos la fracción de dominio V_1 que se encuentra en ese instante asociado a las membranas (y no vemos el que está libre en el citosol). También debemos tener en cuenta que la V-ATPasa está presente en otros compartimentos intracelulares (endo/lisosomales), por lo que su enriquecimiento en la fracción de membranas de Golgi respecto al lisado total no tiene que ser absoluto.

Por lo que se refiere a la aproximación morfológica, sobreexpresamos la subunidad B con una etiqueta GFP. Somos conscientes de que la sobreexpresión de una proteína no es la mejor estrategia para determinar su localización ya que el mero hecho de sobreexpresarla puede

alterar su distribución endógena. Además, la adición de una etiqueta como el GFP puede afectar a la conformación y/o su funcionalidad de la proteína, y más aún si estamos hablando de una proteína que forma parte de un complejo multiproteico como el caso de la V-ATPasa. A pesar de todo ello, optamos por la sobreexpresión ya que los anticuerpos de que disponíamos contra las subunidades de la V-ATPasa no funcionaban adecuadamente por IF.

De los dos constructos que generamos de la subunidad B, sólo el que presentaba la etiqueta GFP en el extremo amino-terminal interaccionaba con la subunidad A endógena. El extremo amino-terminal de la subunidad B se encuentra encarado hacia el citosol, y en cambio el extremo carboxi-terminal lo hace hacia la membrana. Por lo tanto es lógico suponer que si la GFP se sitúa en el extremo amino-terminal no impida (al menos de forma significativa) su integración en el complejo V-ATPasa. Aunque los experimentos de IP indican que la GFP-B se integra en el complejo V-ATPasa, no podemos estar totalmente seguros de que los complejos V-ATPasa que contienen esta subunidad exógena sean completamente funcionales. La vía más directa para determinarlo sería medir el pH de Golgi en las células que sobreexpresan la GFP-B. Pero las herramientas fluorescentes (pHluorina) de las que disponíamos para las medidas de pH solapaban con el GFP y no las pudimos usar. No obstante, vemos que la GFP-B localizaba en complejo de Golgi y en estructuras puntiformes repartidas por el citosol, y muy probablemente correspondían a endosomas y lisosomas (dado su marcaje en forma de anillo). En resumen, estos datos nos indican que la GFP-B está en las endomembranas y probablemente asociada al dominio V_0 , con lo cual, y a pesar de no poder medir el pH, la consideramos una buena herramienta para seguir la distribución de la V-ATPasa y estudiar su dinámica intracelular.

En este primer apartado también nos planteamos como objetivo determinar el tiempo que la V-ATPasa reside en el complejo de Golgi. Sabemos que las subunidades del dominio V_0 se ensamblan en el RE, mientras que en el complejo de Golgi es donde los dominios V_1 y V_0 se acoplan y la V-ATPasa empieza a ser funcional (Forgac, 2007). Lo que nosotros nos preguntamos fue si la V-ATPasa que vemos en el complejo de Golgi estaba solamente en tránsito a otros destinos (compartimentos endocíticos) o bien había una porción que era residente en el complejo de Golgi. Nuestros resultados muestran que sólo un 10% de la V-ATPasa del complejo de Golgi desaparece al cabo de 1 h, lo que sugiere que la mayoría de V-ATPasa que vemos en este orgánulo reside largo tiempo en él antes de dirigirse a otros destinos. No logramos hacer experimentos suficientemente largos en el tiempo para poder ver la desaparición de toda la V-ATPasa del complejo de Golgi (revelada por GFP-B) y así determinar su vida media en el complejo de Golgi, ya que la cicloheximida comprometía la viabilidad celular. Sería interesante estudiar mediante ensayos bioquímicos o ensayos de iFRAP

la dinámica de la V-ATPasa intracelular, determinando no sólo su vida media sino también su tiempo de residencia en los diferentes orgánulos, y averiguar si la proporción de V-ATPasa que llega al complejo de Golgi proveniente de la vía endocítica es significativa. Este tipo de estudios nos podrían dar más información acerca de cómo se genera el gradiente de pH en la vía secretora y endocítica.

Por otro lado, estudios previos de nuestro grupo demostraron que la inhibición farmacológica de la V-ATPasa producía a nivel ultraestructural la dilatación y fragmentación de las cisternas de Golgi, al igual que la despolimerización de los microfilamentos (Lázaro-Diéguez et al., 2006). Nuestros resultados muestran que la inactivación de la V-ATPasa mediante el silenciamiento de la subunidad B no tiene efectos aparentes sobre la morfología del complejo de Golgi, a pesar de que el silenciamiento conlleva la completa inactivación de la V-ATPasa. De todos modos, faltaría estudiar los efectos del silenciamiento a nivel ultraestructural.

II. EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo demuestran que los microfilamentos son necesarios para mantener la asociación de los dominios V₁ y V₀ de la V-ATPasa. Hemos visto que el tratamiento con drogas que despolimerizan los microfilamentos, como la latrunculina B, inducen la disociación de los dos dominios con el consiguiente desplazamiento del dominio V₁ al citosol. En cambio, la estabilización de los microfilamentos, por acción del jasplakinolide, no parece tener efecto. Estos resultados indican pues que la actina regularía la actividad de la V-ATPasa, ya que ésta necesita tener los dos dominios asociados para mantener la actividad ATPasa (Diab et al., 2009)(Kane, 2006; Kane, 2012).

Esta función reguladora de la actina sobre la actividad de la V-ATPasa en el complejo de Golgi se ajustan bien con los resultados previos de nuestro grupo en dónde observamos que la despolimerización de actina producía un aumento del pH de Golgi (Lázaro-Diéguez et al., 2006). Además, si suponemos que el efecto de la despolimerización de actina sobre el pH es debido a la inactivación de la V-ATPasa por la disociación de sus dominios, también podemos explicar por qué la inhibición farmacológica de la V-ATPasa y la despolimerización de los microfilamentos tienen efectos similares sobre la ultraestructura de Golgi y el transporte post-Golgi (ambos causan la dilatación y fragmentación de las cisternas a la vez que alteran la salida de *cargo* del complejo de Golgi) (Lazaro-Dieguez et al., 2007; Lázaro-Diéguez et al., 2006;

Palokangas et al., 1994). Proponemos pues que los efectos de la despolimerización de actina en la morfología y función del complejo de Golgi se producen, al menos en parte, por alteraciones en la actividad de la V-ATPasa, y por lo tanto, como consecuencia del aumento en el pH de Golgi.

Mediante la inmunoprecipitación de dos subunidades distintas del dominio V_1 (las subunidades A y B) observamos que su interacción con el dominio V_0 disminuía significativamente al despolimerizar los filamentos de actina con latrunculina B. Como control positivo usamos células cultivadas en ausencia de suero y glucosa. La disociación de los dos dominios de la V-ATPasa en respuesta a la falta de glucosa fue observada por primera vez en levaduras (Kane, 1995) y posteriormente en células de mamífero (Sautin et al., 2005). Por ese motivo decidimos usarlo como control positivo de los experimentos de disociación de los dos dominios. Al igual que con la latrunculina, vimos que la ausencia de suero y glucosa también inducía una bajada significativa de la interacción de los dos dominios, resultado que corrobora lo descrito en trabajos anteriores y a su vez apoya los resultados obtenidos con las drogas anti-actina. No obstante, el por qué los dos dominios de la V-ATPasa se disocian en ausencia glucosa no está claro. Se cree que se trata de un mecanismo de ahorro energético ante una situación de falta de fuentes de carbono (Kane, 2012). Del mismo modo, se desconoce el mecanismo por el cual la célula detecta la ausencia de glucosa y se dispara la disociación de los dos dominios. Se han descrito varias moléculas implicadas en este proceso entre las que encontramos enzimas glucolíticas como la aldosa (Chen et al., 2004) o la fosfofructoquinasa (Su et al., 2003) además de otras quinasas como la PKA (Bond y Forgac, 2008) o la PI3K (Nakamura, 2004; Sautin et al., 2005).

Como cabría esperar, la reducción de la interacción de los dos dominios tras despolimerizar los microfilamentos va acompañada del enriquecimiento del dominio V_1 en el citosol. Gracias a la obtención de fracciones de citosol y de membranas de gran pureza vimos que las subunidades A y B del dominio V_1 sólo se desplazaban a la fracción citosólica tras el tratamiento con latrunculina pero no con jasplakinolide. Estos resultados apoyarían nuestra hipótesis por la que los microfilamentos son necesarios para mantener la asociación de los dos dominios, ya que el enriquecimiento del dominio V_1 en el citosol es reflejo de su disociación del dominio transmembrana V_0 . Obtuvimos resultados similares al aislar los dominios de membranas ricos en colesterol y esfingomiélin (lipid rafts) donde reside la V-ATPasa (Gkantiragas et al., 2001). Observamos que el dominio V_1 de la V-ATPasa deslocalizaba de los lipid rafts al despolimerizar los microfilamentos así como al cultivar las células en ausencia de suero y glucosa (control positivo). Curiosamente, en estos experimentos observamos que

mientras que el dominio V_0 solo se encontraba en los *lipid rafts*, el dominio V_1 se distribuía en otras fracciones del gradiente de sacarosa. Asumimos que ello se debe a que el dominio V_1 no siempre se encuentra asociado a las membranas ya que también hay una porción que se encuentra libre en el citosol (Kane, 2006).

Los experimentos realizados hasta el momento para determinar si la despolimerización de los filamentos de actina inducía la disociación de los dominios V_1 y V_0 se llevaron a cabo en lisados totales de células HeLa. Sabemos que la V-ATPasa se distribuye a lo largo de todos los orgánulos de la vía secretora y endocítica (Breton y Brown, 2007; Demaurex, 2002), y por lo tanto los resultados podían ser reflejo de la disociación de la V-ATPasa en todas las endomembranas donde se localiza y no sólo en las del complejo de Golgi. Para seguir la disociación del dominio V_1 específicamente en el complejo de Golgi realizamos ensayos de FRAP inverso (iFRAP) que permite visualizar la disociación a partir de la deslocalización de la GFP-B del complejo de Golgi. Tanto la despolimerización de actina como la falta de suero y glucosa inducían la deslocalización de la GFP-B del complejo de Golgi, lo que demuestra que la disociación de los dominios V_1 y V_0 inducido por la despolimerización de la actina (y también por ausencia de glucosa) acontece al menos en el complejo de Golgi.

Hay que decir que la fracción de GFP-B que se deslocaliza de las membranas de Golgi tras ambos tratamientos era pequeña, menor de lo que obtuvimos en los ensayos bioquímicos en lisados totales. Pensamos que ello se debe a que los tiempos y las concentraciones de los tratamientos en los experimentos de iFRAP eran inferiores a los empleados en las aproximaciones bioquímicas. También puede deberse a que la proporción de dominio V_1 que se disocia en las membranas de Golgi sea inferior al que ocurre en los otros orgánulos. Para determinarlo y a su vez confirmar la disociación del dominio V_1 en el complejo de Golgi sería necesario aislar membranas de Golgi de células tratadas y determinar la cantidad de dominio V_1 presente en las membranas en cada condición.

A pesar de que la fracción de GFP-B que deslocalizaba tras los tratamientos con latrunculina y por ausencia de glucosa y suero era muy similar en ambos casos, la cinética que seguían era muy diferente. Así la despolimerización de los microfilamentos deslocaliza la GFP-B del complejo de Golgi mucho más rápidamente que la ausencia de glucosa y suero. Tal y como hemos mencionado anteriormente, podría ser que la disociación de los dos dominios en ausencia de glucosa requiera la activación de varias vías de señalización (Kane, 2012) y, en cambio, el papel de los microfilamentos en el mantenimiento de la asociación de los dos dominios de la V-ATPasa sea meramente de anclaje o sujeción mecánica, con lo que tras la

despolimerización la disociación del dominio V_1 sería mucho más rápida que la mediada por una vía de señalización.

1. MECANISMO DIRECTO

Visto que la despolimerización de los filamentos de actina produce la disociación de los dominios V_1 y V_0 de la V-ATPasa, estudiamos si este efecto se debía a que los microfilamentos proporcionaban un anclaje mecánico directo con el dominio V_1 . Se ha descrito que tanto la subunidad B como la subunidad C del dominio V_1 contienen dominios de unión a actina. En referencia a la primera, se ha visto que en su extremo amino-terminal posee un dominio de unión a F-actina que guarda homología con la proteína profilina (Chen et al., 2004). Estudios en osteoclastos han puesto de manifiesto que la unión de la F-actina con la subunidad B es crucial para la endocitosis de la V-ATPasa de la membrana plasmática a vesículas intracelulares lo que conlleva la inactivación de los osteoclastos (Holliday et al., 2005). En referencia a la subunidad C, su unión con el citoesqueleto de actina se ha estudiado empleando proteínas purificadas y se ha visto que ambos extremos de la proteína presentan afinidad tanto para la F-actina como la G-actina (Vitavska et al., 2003; Vitavska et al., 2005). Sin embargo, la relevancia funcional de dichas interacciones no está clara. Hasta el momento, poco se sabe también de la interacción de estas dos subunidades con la actina en las endomembranas. Ya que en nuestros estudios de localización de la V-ATPasa en las células HeLa no vimos que se encontrase en la membrana plasmática, asumimos que la interacción de la actina con las subunidades B y C debía tener lugar en endomembranas.

Nuestros resultados sugieren que sólo la subunidad C estaría interaccionando con la actina en las células HeLa y en el caso de que exista interacción con la subunidad B, no hemos sido capaces de detectarla. Por otra parte, con nuestros resultados no podemos asegurar de forma estricta que la interacción de la actina con la subunidad C sea directa, ya que podría existir una proteína intermediaria que estuviera mediando esta unión. De todos modos, proponemos que uno de los mecanismos por los cuales los microfilamentos de actina participarían en el mantenimiento de la asociación de los dos dominios de la V-ATPasa, es a través de su unión directa con la subunidad C, proporcionando la sujeción y estabilidad mecánica necesarias para mantener asociados los dos dominios de la V-ATPasa. Confirmando esta interpretación hay estudios que sugieren que la subunidad C tiene un papel clave en la asociación de los dominios V_1 - V_0 (Wilkens et al., 2004) puesto que interacciona con ambos (Drory et al., 2004) y además es la única subunidad que, tras la disociación de la V-ATPasa, queda completamente libre, no acompañando al resto de subunidades del dominio V_1 (Diepholz et al., 2008).

La evidencia más clara de que la subunidad C interactuaba con la actina en nuestro modelo celular es que al inmunoprecipitarla observábamos la subunidad C en el inmunoprecipitado. Lamentablemente el anticuerpo de la subunidad C no era apto para inmunoprecipitación, con lo que no pudimos corroborar el resultado anterior con la co-inmunoprecipitación inversa. No obstante, los resultados de los fraccionamientos de F/G-actina confirmaron dicha interacción. Al enriquecer la fracción de G-actina tras el tratamiento con latrunculina B, la subunidad C también se enriquecía significativamente en esta fracción, sugiriendo que esta subunidad mostraba más afinidad para la actina globular, tal y como ya indicaban los resultados en la situación control. El hecho que la subunidad C muestre más afinidad por la G-actina no parece encajar *a priori* con nuestra idea de que la F-actina ayude a mantener la asociación de los dos dominios de la V-ATPasa gracias a su unión con la subunidad C. Sin embargo, nuestros resultados no descartan que esta subunidad interactúe con la F-actina, y la mayor afinidad por la G-actina podría desplazar la subunidad C del complejo de la V-ATPasa en una situación en la que la actina estuviera localmente despolimerizada. Por lo tanto, la ausencia o el desplazamiento de subunidad C del el complejo V-ATPasa facilitaría la disociación de los dos dominios. Del mismo modo, la unión de la G-actina con la subunidad C en el citosol podría dificultar que la subunidad C se reincorporase al complejo V-ATPasa debido a la reasociación de ambos dominios.

En referencia a la subunidad B, no podemos afirmar que se una también a la actina porque no hemos detectado interacción alguna entre ambas en los experimentos de inmunoprecipitación. Además, en los fraccionamientos de F/G-actina, la subunidad B se distribuye entre ambas fracciones de manera equitativa y no parece mostrar más afinidad para un tipo de actina que por otra, por lo que la distribución entre ambas fracciones no se ve alterada tras el tratamiento con latrunculina B. Todos estos resultados nos indican que o bien la subunidad B no interactúa con la actina en nuestro modelo celular, o por lo contrario, sí que lo hace pero esta interacción es tan rápida y/o débil que no somos capaces de detectarla. Sería muy interesante poder estudiar la interacción de la actina con ambas subunidades mediante ensayos de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) ya que nos permitiría conocer en detalle la dinámica de interacción de la actina con la V-ATPasa y, al tratarse de una técnica mucho más sensible, nos permitiría detectar la interacción aunque fuera muy transitoria y/o débil.

2. MECANISMO INDIRECTO

Tal como hemos mencionado anteriormente, la V-ATPasa se localiza en los dominios de membrana ricos en colesterol y esfingomielina (*lipid rafts*). En concreto se ha visto que los dominios de las membranas de Golgi ricos en estos lípidos presentan un enriquecimiento de varias subunidades de la V-ATPasa (Gkantiragas et al., 2001). Por otra parte, la acumulación de colesterol en los endosomas tardíos conlleva un aumento de la asociación de los dos dominios de la V-ATPasa en estos orgánulos además de afectar al pH (Lafourcade et al., 2008), lo que sugiere que el nivel de asociación de la V-ATPasa podría depender de su localización en los *lipid rafts*.

Al aislar los dominios de membrana ricos en colesterol y esfingomielina (*lipid rafts* o DRMs) observamos que tras el tratamiento con latrunculina B estos parecen presentar una cierta desorganización. Hay diversos estudios que indican que el citoesqueleto de actina podría estar implicado en el mantenimiento de la organización de los *lipids rafts* (Chichili y Rodgers, 2009). Lo que proponemos es que los microfilamentos regularían también la asociación de los dos dominios de la V-ATPasa indirectamente a través del mantenimiento de la organización de los *lipid rafts* en el complejo de Golgi. Al despolimerizar los filamentos de actina, los *lipid rafts* se desorganizarían y esto induciría la disociación de los dos dominios de la V-ATPasa.

No obstante, el papel de la actina en la organización de los *lipids rafts* solo se ha estudiado a nivel de la membrana plasmática. Sin embargo, nosotros vemos que la V-ATPasa sigue la desorganización de los marcadores de DRMs (caveolina y GM-1) y no tenemos evidencias de que la V-ATPasa se localice en la membrana plasmática en nuestras células. Por lo tanto, podría ser que los microfilamentos también estuvieran manteniendo la organización de los dominios ricos en colesterol y esfingomielina en las endomembranas, y en consecuencia regulando la actividad de la V-ATPasa. Este mecanismo indirecto de regulación de la actividad V-ATPasa por parte de la actina no excluye el mecanismo directo a través de la interacción con la subunidad C.

Somos coincidentes de que los resultados de disociación de los dos dominios de la V-ATPasa en los *lipid rafts* aislados de células HeLa no son suficientemente concluyentes para afirmar el mecanismo indirecto que proponemos. Para ello, sería necesario estudiar la organización de los dominios ricos en colesterol y esfingomielina de membranas de Golgi aisladas tras la despolimerización de los filamentos de actina, lo que nos permitiría determinar también el nivel de asociación de los dos dominios de la V-ATPasa. Por otra parte, sería muy interesante estudiar el pH del complejo de Golgi tras reducir los niveles de colesterol en sus membranas, así como el nivel de asociación del dominio V₁ (GFP-B) bajo estas condiciones. **III.**

III. LA IMPLICACIÓN DEL DOMINIO V₁ DE LA H⁺-ATPasa VACUOLAR EN TRÁFICO INTRACELULAR ASOCIADO AL COMPLEJO DE GOLGI

Es conocido desde hace tiempo que la actividad de la V-ATPasa es necesaria para el tráfico intracelular de membranas, pues la generación de un ambiente ácido en el complejo de Golgi es imprescindible tanto para el transporte intra-Golgi como post-Golgi (Muroi et al., 1993; Palokangas et al., 1994; Yilla et al., 1993). En estos estudios, para bloquear la actividad de la V-ATPasa se emplearon inhibidores farmacológicos específicos dirigidos contra el dominio V₀ o bien se silenciaron alguna de las subunidades del mismo dominio (Sobota et al., 2009). Sin embargo, poco se sabe de la implicación de las subunidades del dominio V₁ en el transporte intracelular. En esta parte del trabajo hemos estudiado la implicación de las subunidades A y B del dominio V₁ en el transporte desde el RE al complejo de Golgi y en el transporte post-Golgi de proteínas solubles y transmembrana. Ambas subunidades forman parte del hexámero central del dominio V₁ donde reside la actividad ATPasa (Drory y Nelson, 2006). Mientras que la subunidad A es la encargada mayoritaria de la hidrólisis del ATP, la subunidad B facilita su unión (MacLeod et al., 1998; Vasilyeva et al., 2000) y como ya hemos dicho anteriormente posee un dominio de unión a actina (Holliday et al., 2000).

En primer lugar y para determinar la implicación de las subunidades A y B en la actividad de la V-ATPasa medimos el pH de Golgi y del TGN en células silenciadas. La V-ATPasa es la principal encargada de la translocación de protones al interior de este orgánulo, y por lo tanto las medidas del pH de Golgi reflejan la actividad de la bomba. Vimos que el silenciamiento de cada subunidad por separado aumentaba significativamente el pH de Golgi y del TGN, indicándonos que ambas eran necesarias para mantener la actividad V-ATPasa en el complejo de Golgi. Sin embargo, el efecto del silenciamiento de la subunidad B en la alcalinización del pH de Golgi era mucho mayor que la producida tras el silenciamiento de la subunidad A. Además, tras ambos silenciamientos, el pH intra-Golgi se alcalinizaba más que el TGN. En un primer momento, podríamos pensar que este resultado es contradictorio dado que la V-ATPasa está enriquecida en las regiones distales del complejo de Golgi, por lo que esperaríamos que su inactivación tuviera mayores efectos en estos compartimentos. Sin embargo, no debemos olvidar que en el complejo de Golgi existen otros canales iónicos que participan también en la regulación del pH y muchos de ellos se encuentran enriquecidos en el TGN (Rivinoja et al., 2012). Por consiguiente, pensamos que los efectos de los silenciamientos de las subunidades A y B sobre el pH son menores en el TGN porque éste posee otros mecanismos que regulan la homeostasis de protones.

Visto que el silenciamiento de ambas subunidades alteraba la actividad de la V-ATPasa estudiamos a continuación su efecto en el transporte proteico secretor. Vimos que ninguno de los dos silenciamientos afectaba al transporte de proteínas desde el RE al complejo de Golgi. En trabajos anteriores en donde se usaban inhibidores farmacológicos de la V-ATPasa, ya se demostró que esta vía de transporte no era dependiente de la actividad de la V-ATPasa (Palokangas et al., 1994). Se cree que la inactivación de la V-ATPasa no afecta a la salida de *cargo* del RE porque la bomba todavía no es funcional ya que sólo es en el complejo de Golgi en donde los dos dominios de la V-ATPasa se ensamblan completamente y empieza así la translocación de protones (Forgac, 2007).

En referencia al transporte post-Golgi observamos que, mientras que el silenciamiento de la subunidad A no afectaba a la salida de *cargo* tanto soluble como transmembrana, el silenciamiento de la subunidad B bloqueaba severamente la salida de proteínas transmembrana y reducía significativamente la secreción de proteínas solubles. Esta diferencia fue realmente sorprendente, ya que las dos parecían ser necesarias para mantener la actividad de la V-ATPasa en el complejo de Golgi (tal y como hemos visto con las medidas de pH). No obstante, el silenciamiento de la subunidad B tenía efectos más severos sobre el pH de Golgi, así pues podría ser que el aumento del pH intra-Golgi producido por tras el silenciamiento de la subunidad A no fuera suficiente como para afectar el transporte post-Golgi.

¿Por qué el silenciamiento de la subunidad B tiene efectos más severos sobre el pH y transporte asociado al complejo de Golgi? Sabemos que ambos silenciamientos inducen una reducción en la expresión muy similar (alrededor del 80%) y además comprobamos que el silenciamiento de la subunidad B no afectaba a la expresión de la subunidad A. Así pues, pensamos que la subunidad B por sí misma podría tener alguna implicación funcional que la subunidad A no tiene. Una de las diferencias entre ambas subunidades es que la subunidad B posee un dominio de unión a actina en su extremo amino-terminal (Chen et al., 2004). Así que nos propusimos estudiar específicamente si el dominio de unión a actina de la subunidad B tenía alguna relevancia sobre la regulación de la V-ATPasa. Para ello, generamos un constructo de la subunidad B a la que le faltaba el extremo amino-terminal (GFP-B(Δ ABD)). Éramos conscientes de que no habíamos sido capaces de encontrar interacción entre la actina y la subunidad B, lo cual podría invalidar en cierto modo que el dominio de unión a actina de esta subunidad pudiera tener una relevancia funcional en la actividad de la V-ATPasa en nuestras células. Sin embargo, como hemos mencionado, la unión de la actina con la subunidad B se ha descrito en la V-ATPasa de la membrana plasmática (Holliday et al., 2000), donde el citoesqueleto de actina presenta una organización completamente diferente de la que

presenta en el complejo de Golgi o en las endomembranas (Chhabra y Higgs, 2007; Egea et al., 2013). Por lo tanto cabía esperar que la interacción de la actina con la subunidad B también fuera diferente en las endomembranas. Estudiar los efectos de la sobreexpresión de este mutante sobre la actividad de la V-ATPasa también nos podía aportar información de si la actina podría estar interaccionando con la subunidad B (aunque no hayamos sido capaces de detectarlo).

Observamos que GFP-B(Δ ABD) presentaba una distribución citoplasmática y nunca aparecía el complejo de Golgi, sugiriendo que el dominio de unión a actina de la subunidad B podría tener una función localizadora. Esta idea correlacionaría con la función del mismo dominio en los osteoclastos, donde se ha visto que está implicado en el reciclaje de la V-ATPasa hacia las vesículas intracelulares durante la inactivación de la reabsorción ósea (Chen et al., 2004). No obstante, según nuestros resultados, no podemos descartar que la eliminación del dominio de unión a actina esté afectando a la conformación de la subunidad B y que la haga afuncional, independientemente de su unión o no con la actina. Sin embargo, hemos encontrado interacción entre este mutante y la subunidad A endógena, lo que nos sugiere que podría estar formando parte del complejo endógeno de la V-ATPasa y por lo tanto descartaría el mal plegamiento del mutante, aunque somos conscientes que este resultado no es concluyente.

Para acabar de determinar si la ausencia del dominio de unión a actina de la subunidad B afecta a la función de la V-ATPasa en el complejo de Golgi a través de su implicación en la localización de la bomba harían falta más experimentos. Por una parte, sería muy interesante estudiar si este mutante altera el pH de Golgi y/o el transporte intracelular, indicándonos que realmente la eliminación de este dominio conlleva una afectación de la actividad V-ATPasa en este orgánulo. Por otro lado, haría falta también profundizar en el estudio de la integración de esta subunidad en el complejo V-ATPasa y en su distribución subcelular.

RESUMEN

Proponemos que los microfilamentos ayudan a mantener la asociación del dominio V_1 y V_0 de la V-ATPasa y por lo tanto su funcionalidad en el complejo de Golgi mediante dos mecanismos, uno directo y otro indirecto, siendo ambos no excluyentes entre sí.

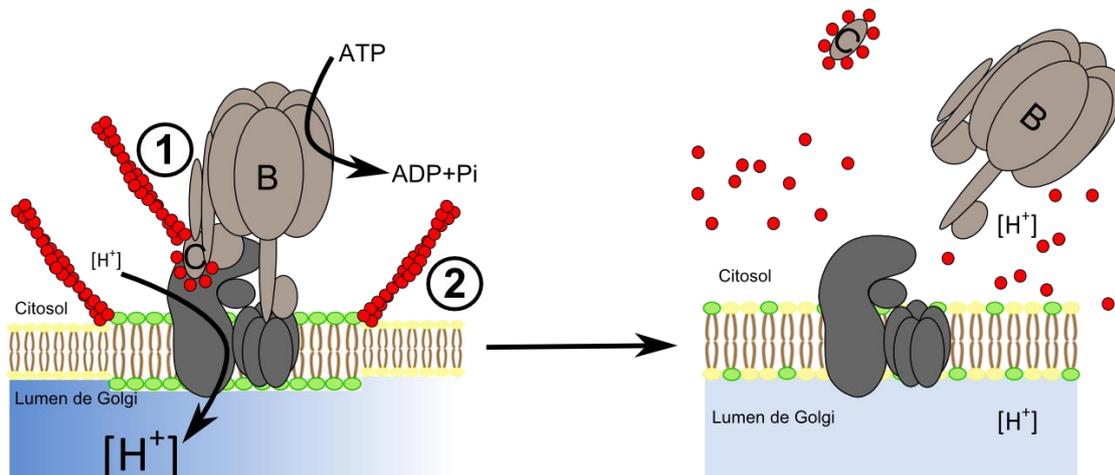


Figura 53. Modelo propuesto de los mecanismos por los cuales los filamentos de actina regulan la actividad de la V-ATPasa. Los filamentos de actina (rojo) ayudan a mantener la asociación de los dominios V_1 (gris claro) y V_0 (gris oscuro) de la V-ATPasa, y por tanto su función, mediante dos mecanismos: (1) Directo, aportando soporte mecánico gracias a la unión de los filamentos de actina con la subunidad C. (2) Indirecto, manteniendo la organización de las balsas lipídicas (en verde) donde reside la V-ATPasa.

En primer lugar, los microfilamentos mantendrían la unión de los dos dominios de la V-ATPasa a través de su interacción con la subunidad C del dominio V_1 , aportando el soporte mecánico necesario para una eficiente asociación de los dos dominios. En una situación en la que la G-actina aumentara por despolimerización de microfilamentos, la alta afinidad de la subunidad C por la actina monomérica haría que ésta se desprendiese del complejo de la V-ATPasa y en consecuencia el dominio V_1 se desacoplara del V_0 , con la consiguiente disminución funcional de la bomba. Al mismo tiempo, los filamentos de actina participarían en el mantenimiento de la organización de los dominios ricos en colesterol y esfingomiélna de las membranas del complejo de Golgi, lo que favorecería que se mantuvieran asociados los dos dominios de la V-ATPasa en las balsas lipídicas.

CONCLUSIONES

- 1.** La H⁺-ATPasa vacuolar se distribuye a lo largo del complejo de Golgi estando más enriquecida en los compartimentos distales. Esta localización diferencial dentro del Golgi correlaciona con el gradiente de pH.
- 2.** Los filamentos de actina regulan la dinámica asociación de los dominios V₁ y V₀ de la H⁺-ATPasa vacuolar y por consiguiente, su funcionalidad en el complejo de Golgi.
- 3.** El mecanismo por el cual la actina regula la asociación de los dominios V₁-V₀ de la H⁺-ATPasa vacuolar parece ser directo, a través de su interacción con la subunidad C del dominio V₁, e indirecto, manteniendo la integridad de las balsas lipídicas.
- 4.** Las subunidades A y B del dominio V₁ son esenciales para la actividad de la H⁺-ATPasa vacuolar en el complejo de Golgi, si bien ambas tienen una diferente relevancia en cuanto al transporte post-Golgi.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguda, A. H., Burtnick, L. D. y Robinson, R. C.** (2005). The state of the filament. *EMBO Rep.* **6**, 220–6.
- Ahuja, R., Pinyol, R., Reichenbach, N., Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M. M. y Qualmann, B.** (2007). Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell* **131**, 337–50.
- Aktories, K. y Barth, H.** (2004). Clostridium botulinum C2 toxin--new insights into the cellular up-take of the actin-ADP-ribosylating toxin. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 557–64.
- Alberts, A. S.** (2002). Quick guide related Formin homology proteins. *Curr. Biol.* 796.
- Allingham, J. S., Klenchin, V. a y Rayment, I.** (2006). Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2119–34.
- Almeida, C. G., Yamada, A., Tenza, D., Louvard, D., Raposo, G. y Coudrier, E.** (2011). Myosin 1b promotes the formation of post-Golgi carriers by regulating actin assembly and membrane remodelling at the trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* **13**, 779–89.
- Arata, Y., Baleja, J. D. y Forgac, M.** (2002). Localization of subunits D, E, and G in the yeast V-ATPase complex using cysteine-mediated cross-linking to subunit B. *Biochemistry* **41**, 11301–7.
- Aridor, M., Weissman, J., Bannykh, S., Nuoffer, C. y Balch, W. E.** (1998). Cargo Selection by COPII Budding during Export from the ER. *J. Cell Biol.* **141**, 61–70.
- Axelsson, M. a, Karlsson, N. G., Steel, D. M., Ouwendijk, J., Nilsson, T. y Hansson, G. C.** (2001). Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins. *Glycobiology* **11**, 633–44.
- Baker, J. P. y Titus, M. a** (1998). Myosins: matching functions with motors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 80–6.
- Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B. y Imhof, B. a** (1998). Actin dynamics in living mammalian cells. *J. Cell Sci.* **111**, 1649–58.

- Banerjee, a, Li, G., Alexander, E. a y Schwartz, J. H.** (2001). Role of SNAP-23 in trafficking of H⁺-ATPase in cultured inner medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, 775–81.
- Bannykh, S. I. y Balch, W. E.** (1997). Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *J. Cell Biol.* **138**, 1–4.
- Bard, F., Mazelin, L., Péchoux-Longin, C., Malhotra, V. y Jurdic, P.** (2003). Src regulates Golgi structure and KDEL receptor-dependent retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **278**, 46601–6.
- Barlowe, C.** (1998). COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 67–76.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M. y Schekman, R.** (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895–907.
- Beck, K. a, Buchanan, J. a, Malhotra, V. y Nelson, W. J.** (1994). Golgi spectrin: identification of an erythroid beta-spectrin homolog associated with the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **127**, 707–23.
- Beck, K. a, Buchanan, J. a y Nelson, W. J.** (1997). Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **110**, 1239–49.
- Benting, J. H., Rietveld, a G. y Simons, K.** (1999). N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* **146**, 313–20.
- Bindschadler, M., Osborn, E. a, Dewey, C. F. y McGrath, J. L.** (2004). A mechanistic model of the actin cycle. *Biophys. J.* **86**, 2720–39.
- Bishop, a L. y Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348**, 241–55.
- Blair, H., Teitelbaum, S., Ghiselli, R. y Gluck, y S.** (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Sci.* **245**, 855–857.

- Blázquez, M. y Shennan, K. I.** (2000). Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway. *Biochem. Cell Biol.* **78**, 181–191.
- Bond, S. y Forgac, M.** (2008). The Ras/cAMP/protein kinase A pathway regulates glucose-dependent assembly of the vacuolar (H⁺)-ATPase in yeast. *J. Biol. Chem.* **283**, 36513–21.
- Bonifacino, J. S. y Glick, B. S.** (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153–66.
- Bonifacino, J. S. y Traub, L. M.** (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395–447.
- Bowman, B. J. y Bowman, E. J.** (2002). Mutations in subunit C of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site. *J. Biol. Chem.* **277**, 3965–72.
- Bowman, E. J. y Bowman, B. J.** (2005). V-ATPases as drug targets. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 431–5.
- Brandizzi, F. y Barlowe, C.** (2013). Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 382–92.
- Brandstaetter, H., Kendrick-Jones, J. y Buss, F.** (2012). Myo1c regulates lipid raft recycling to control cell spreading, migration and Salmonella invasion. *J. Cell Sci.* **125**, 1991–2003.
- Breton, S. y Brown, D.** (2007). New insights into the regulation of V-ATPase-dependent proton secretion. *Am J Physiol Ren. Physiol* **2790**, 1–10.
- Breton, S., Smith, P., Lui, B. y Brown, D.** (1996). Acidification of the male reproductive tract by a pumping H-ATPase. *Nat. Med.* **2**, 470–472.
- Breton, S., Lisanti, M. P., Tyszkowski, R., McLaughlin, M. y Brown, D.** (1998). Basolateral Distribution of Caveolin-1 in the Kidney: Absence from H⁺-ATPase-coated Endocytic Vesicles in Intercalated Cells. *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 205–214.
- Breton, S., Nsumu, N. N., Galli, T., Sabolic, I., Smith, P. J. y Brown, D.** (2000). Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin inhibits proton secretion in the male reproductive tract. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278**, F717–25.

- Brown, D. y Breton, S.** (2000). H(+)V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epididymis/vas deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways. *J. Exp. Biol.* **203**, 137–45.
- Brown, D. y Orci, L.** (1986). The “coat” of kidney intercalated cell tubulovesicles does not contain clathrin. *Am. J. Physiol.* **250**, 605–608.
- Brown, D., Gluck, S. y Hartwig, J.** (1987). Structure of the novel membrane-coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H+ATPase. *J. Cell Biol.* **105**, 1637–48.
- Bubb, M. R.** (2000). Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization. *J. Biol. Chem.* **275**, 5163–5170.
- Bubb, M. R., Senderowicz, A. M. J., Sausville, E. y Duncan, K. L. K.** (1994). Jasplakinolide, a Cytotoxic Natural Product, Induces Actin Polymerization and Competitively the Binding of Phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14869–14871.
- Buss, F., Spudich, G. y Kendrick-Jones, J.** (2004). Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 649–76.
- Campellone, K. G., Webb, N. J., Znameroski, E. a y Welch, M. D.** (2008). WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* **134**, 148–61.
- Campelo, F. y Malhotra, V.** (2012). Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 407–27.
- Cancino, J. y Luini, A.** (2013). Signaling circuits on the Golgi complex. *Traffic* **14**, 121–34.
- Cao, H., Weller, S., Orth, J. D., Chen, J., Huang, B., Chen, J.-L., Stamnes, M. y McNiven, M. a** (2005). Actin and Arp1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nat. Cell Biol.* **7**, 483–92.
- Capitani, M. y Sallese, M.** (2009). The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett.* **583**, 3863–71.

- Carlsson, A. E.** (2010). Actin dynamics: from nanoscale to microscale. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 91–110.
- Carreno, S., Engqvist-Goldstein, A. E., Zhang, C. X., McDonald, K. L. y Drubin, D. G.** (2004). Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **165**, 781–8.
- Casey, J. R., Grinstein, S. y Orlowski, J.** (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 50–61.
- Chanson, A. y Taiz, L.** (1985). Evidence for an ATP-Dependent Proton Pump on the Golgi of Corn Coleoptiles. *plant physiol* **78**, 232–240.
- Chapman, R. E. y Munro, S.** (1994). Retrieval of TGN proteins from cell surface requires endosomal acidification. *EMBO* **13**, 2305–2312.
- Chen, S.-H., Bubb, M. R., Yarmola, E. G., Zuo, J., Jiang, J., Lee, B. S., Lu, M., Gluck, S. L., Hurst, I. R. y Holliday, L. S.** (2004a). Vacuolar H⁺-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B. *J. Biol. Chem.* **279**, 7988–98.
- Chen, J.-L., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. y Stamnes, M.** (2004b). Cytosol-derived proteins are sufficient for Arp2/3 recruitment and ARF/coatamer-dependent actin polymerization on Golgi membranes. *FEBS Lett.* **566**, 281–6.
- Chhabra, E. S. y Higgs, H. N.** (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1110–21.
- Chichili, G. R. y Rodgers, W.** (2009). Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2319–28.
- Chintagari, N. R., Mishra, A., Su, L., Wang, Y., Ayalew, S., Hartson, S. D. y Liu, L.** (2010). Vacuolar ATPase regulates surfactant secretion in rat alveolar type II cells by modulating lamellar body calcium. *PLoS One* **5**, e9228.
- Cohen, D., Müsch, a y Rodriguez-Boulan, E.** (2001). Selective control of basolateral membrane protein polarity by cdc42. *Traffic* **2**, 556–64.

- Colón-Franco, J. M., Gomez, T. S. y Billadeau, D. D.** (2011). Dynamic remodeling of the actin cytoskeleton by FMNL1 γ is required for structural maintenance of the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **124**, 3118–26.
- Conner, S. D. y Schmid, S. L.** (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37–44.
- Cope, M. J., Whisstock, J., Rayment, I. y Kendrick-Jones, J.** (1996). Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure* **4**, 969–87.
- Coudrier, E. y Almeida, C. G.** (2011). Myosin 1 controls membrane shape by coupling F-Actin to membrane. *Bioarchitecture* **1**, 230–235.
- Crider, B. P., Andersen, P., White, A. E., Zhou, Z., Li, X., Mattsson, J. P., Lundberg, L., Keeling, D. J., Xie, X.-S., Stone, D. K., et al.** (1997). Subunit G of the Vacuolar Proton Pump. *J. Biol. Chem.* **272**, 10721–10728.
- Cross, R. L. y Müller, V.** (2004). The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Lett.* **576**, 1–4.
- Davis-Kaplan, S. R., Compton, M. a, Flannery, A. R., Ward, D. M., Kaplan, J., Stevens, T. H. y Graham, L. a** (2006). PKR1 encodes an assembly factor for the yeast V-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **281**, 32025–35.
- De Arruda, M. V, Watson, S., Lin, C. S., Leavitt, J. y Matsudaira, P.** (1990). Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J. Cell Biol.* **111**, 1069–79.
- De Matteis, M. A. y Luini, A.** (2008). Exiting the Golgi complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 273–84.
- De Matteis, M. A. y Luini, A.** (2011). Mendelian disorders of membrane trafficking. *N. Engl. J. Med.* **365**, 927–38.
- De Oca, G., Lezama, R. A., Mondragón, R., Castillo, A. M. y Meza, I.** (1997). Myosin I interactions with actin filaments and trans-Golgi-derived vesicles in MDCK cell monolayers. *Arch. Med. Res.* **28**, 321–328.

- Dechant, R. y Peter, M.** (2010). The N-terminal domain of the V-ATPase subunit "a" is regulated by pH in vitro and in vivo. *EMBO* **5**, 4–8.
- Defacque, H., Egeberg, M., Habermann, A., Diakonova, M., Christian, R., Mangeat, P., Voelter, W., Marriott, G., Pfannstiel, J., Faulstich, H., et al.** (2000). Involvement of ezrin / moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. *EMBO* **19**, 199–212.
- Demaurex, N.** (2002). pH Homeostasis of cellular organelles. *News Physiol. Sci.* **17**, 1–5.
- DerMardirossian, C. y Bokoch, G. M.** (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* **15**, 356–63.
- Devarajan, P., Stabach, P. R., Mann, a S., Ardito, T., Kashgarian, M. y Morrow, J. S.** (1996). Identification of a small cytoplasmic ankyrin (AnkG119) in the kidney and muscle that binds beta I sigma spectrin and associates with the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **133**, 819–30.
- Di Campli, a, Valderrama, F., Babià, T., De Matteis, M. a, Luini, a y Egea, G.** (1999). Morphological changes in the Golgi complex correlate with actin cytoskeleton rearrangements. *Cell Motil. Cytoskeleton* **43**, 334–48.
- Di Giovanni, J., Boudkazi, S., Mochida, S., Bialowas, A., Samari, N., Lévêque, C., Youssef, F., Brechet, A., Iborra, C., Maulet, Y., et al.** (2010). V-ATPase membrane sector associates with synaptobrevin to modulate neurotransmitter release. *Neuron* **67**, 268–79.
- Diab, H., Ohira, M., Liu, M., Cobb, E. y Kane, P. M.** (2009). Subunit interactions and requirements for inhibition of the yeast V1-ATPase. *J. Biol. Chem.* **284**, 13316–25.
- Diepholz, M., Venzke, D., Prinz, S., Batische, C., Flörchinger, B., Rössle, M., Svergun, D. I., Böttcher, B. y Féthière, J.** (2008). A different conformation for EGC stator subcomplex in solution and in the assembled yeast V-ATPase: possible implications for regulatory disassembly. *Structure* **16**, 1789–98.
- Dippold, H. C., Ng, M. M., Farber-Katz, S. E., Lee, S.-K., Kerr, M. L., Peterman, M. C., Sim, R., Wiharto, P. a, Galbraith, K. a, Madhavarapu, S., et al.** (2009). GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4- phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell* **139**, 337–51.

- Doherty, G. J. y McMahon, H. T.** (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857–902.
- Drory, O. y Nelson, N.** (2006). The emerging structure of vacuolar ATPases. *Physiology* **21**, 317–25.
- Drory, O., Frolow, F. y Nelson, N.** (2004). Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function. *EMBO* **5**, 1148–52.
- Dubois, T., Paléotti, O., Mironov, A. a, Fraasier, V., Stradal, T. E. B., De Matteis, M. A., Franco, M. y Chavrier, P.** (2005). Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* **7**, 353–64.
- Durán, J. M., Valderrama, F., Castel, S., Magdalena, J., Tomás, M., Hosoya, H., Renau-Piqueras, J., Malhotra, V. y Egea, G.** (2003). Myosin motors and not actin comets are mediators of the actin-based Golgi-to-endoplasmic reticulum protein transport. *Mol. Biol. Cell* **14**, 445–59.
- Egea, G.** (2001). Train trip into the cell: the Golgi Apparatus as the central station of the intracellular membrane traffic. *Cienc. al Día Int.* **4**, 1–20.
- Egea, G. y Ríos, R. M.** (2007). The role of the cytoskeleton in the structure and function of the Golgi apparatus. In *The Golgi apparatus-State of the art Camillo's Golgi discovery*, pp. 270–300.
- Egea, G. y Serra-Peinado, C.** (2014). Golgi Apparatus: Finally Mechanics Comes to Play in the Secretory Pathway. *Curr. Biol.* **24**, 741–743.
- Egea, G., Lázaro-Diéguéz, F. y Vilella, M.** (2006). Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 168–78.
- Egea, G., Serra-Peinado, C., Salcedo-Sicilia, L. y Gutiérrez-Martínez, E.** (2013a). Actin acting at the Golgi. *Histochem. Cell Biol.* **140**, 347–60.
- El Sayed, K. a, Youssef, D. T. a y Marchetti, D.** (2006). Bioactive natural and semisynthetic latrunculins. *J. Nat. Prod.* **69**, 219–23.

- Erickson, J. y Chun-jiang Zhang, R.** (1996). Mammalian Cdc42 Is a Brefeldin A-sensitive Component of the Golgi Apparatus. *J. Biol. Chem.* **271**, 26850–26854.
- Estrada, L., Caron, E. y Gorski, J. L.** (2001). Fgd1, the Cdc42 guanine nucleotide exchange factor responsible for faciogenital dysplasia, is localized to the subcortical actin cytoskeleton and Golgi membrane. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 485–95.
- Etienne-Manneville, S. y Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–35.
- Evangelista, M., Zigmond, S. y Boone, C.** (2003). Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J. Cell Sci.* **116**, 2603–11.
- F. Gu, C.M. Crump, y G. T.** (2001). Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1067–1084.
- Farber-Katz, S. E., Dippold, H. C., Buschman, M. D., Peterman, M. C., Xing, M., Noakes, C. J., Tat, J., Ng, M. M., Rahajeng, J., Cowan, D. M., et al.** (2014). DNA damage triggers Golgi dispersal via DNA-PK and GOLPH3. *Cell* **156**, 413–27.
- Farquhar, M. G. y Palade, G. E.** (1998). The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* **8**, 2–10.
- Fath, K. R.** (2005). Characterization of myosin-II binding to Golgi stacks in vitro. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 222–35.
- Fath, K. R. y Burgess, D. R.** (1993). Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein. *J. Cell Biol.* **120**, 117–27.
- Field, C., Li, R. y Oegema, K.** (1999). Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 68–80.
- Fischer, R. S. y Fowler, V. M.** (2003). Tropomodulins : life at the slow end. *Trends Cell Biol.* **13**, 593–601.
- Forgac, M.** (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 917–29.

- Gad, A. K. B., Nehru, V., Ruusala, A. y Aspenström, P.** (2012). RhoD regulates cytoskeletal dynamics via the actin nucleation-promoting factor WASp homologue associated with actin Golgi membranes and microtubules. *Mol. Biol. Cell* **23**, 4807–19.
- Galli, T., McPherson, P. S. y Pietro Camilli, D.** (1996). The V(0) Sector of the V-ATPase, Synaptobrevin, and Synaptophysin Are Associated on Synaptic Vesicles in a Triton X-100-resistant, Freeze-thawing Sensitive, Complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 2193–2198.
- Gentsch, M., Cui, L., Mengos, A., Chang, X.-B., Chen, J.-H. y Riordan, J. R.** (2003). The PDZ-binding chloride channel CIC-3B localizes to the Golgi and associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-interacting PDZ proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 6440–9.
- Girod, a, Storrie, B., Simpson, J. C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L. M., Lord, J. M., Nilsson, T. y Pepperkok, R.** (1999). Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* **1**, 423–30.
- Gkantiragas, I., Brügger, B., Stüven, E., Kaloyanova, D., Li, X. Y., Löhr, K., Lottspeich, F., Wieland, F. T. y Helms, J. B.** (2001). Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1819–33.
- Glick, B. S. y Luini, A.** (2011). Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005215.
- Glick, B. S. y Malhotra, V.** (1998). The curious status of the Golgi apparatus. *Cell* **95**, 883–9.
- Glickman, J., Croen, K., Kelly, B., Al-awqati, Q. y Kelly, S.** (1983). Golgi membranes contain an electrogenic H⁺ pump in parallel to a chloride conductance. *J. Cell Biol.* **97**, 1303–8.
- Goddette, D. W. y Frieden, C.** (1985). The binding of cytochalasin D to monomeric actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 1087–1092.
- Goddettes, D. W. y Frieden, C.** (1986). Actin Polymerization. The Mechanisms of Action of Cytochalasin D. *J. Biol. Chem.* **261**, 15974–15980.
- Graham, L., AR, Flannery, A. y Stevens, T.** (2003). Structure and assembly of the yeast V-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **35**, 301–12.

- Grøndahl, F., Tveit, H. y Prydz, K.** (2009). Neutralization of endomembrane compartments in epithelial MDCK cells affects proteoglycan synthesis in the apical secretory pathway. *Biochem. J.* **418**, 517–28.
- Gu, F. y Gruenberg, J.** (2000). ARF1 Regulates pH-dependent COP Functions in the Early Endocytic Pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 8154–8160.
- Guet, D., Mandal, K., Pinot, M., Hoffmann, J., Abidine, Y., Sigaut, W., Bardin, S., Schauer, K., Goud, B. y Manneville, J.-B.** (2014). Mechanical Role of Actin Dynamics in the Rheology of the Golgi Complex and in Golgi-Associated Trafficking Events. *Curr. Biol.* **24**, 1700–1711.
- Guzik-Lendrum, S., Heissler, S. M., Billington, N., Takagi, Y., Yang, Y., Knight, P. J., Homsher, E. y Sellers, J. R.** (2013). Mammalian myosin-18A, a highly divergent myosin. *J. Biol. Chem.* **288**, 9532–48.
- Harris, E. S. y Higgs, H. N.** (2004). Actin cytoskeleton: formins lead the way. *Curr. Biol.* **14**, 520–2.
- Harris, K. P. y Tepass, U.** (2010). Cdc42 and vesicle trafficking in polarized cells. *Traffic* **11**, 1272–9.
- Hauri, H.-P. y Schweizer, A.** (1992). The endoplasmic reticulum—Golgi intermediate compartment. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 600–608.
- Hehnly, H., Longhini, K. M., Chen, J.-L. y Stamnes, M.** (2009). Retrograde Shiga toxin trafficking is regulated by ARHGAP21 and Cdc42. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4303–12.
- Heimann, K., Percival, J. M., Weinberger, R., Gunning, P. y Stow, J. L.** (1999). Specific Isoforms of Actin-binding Proteins on Distinct Populations of Golgi-derived Vesicles. *J. Biol. Chem.* **274**, 10743–10750.
- Heuvingh, J., Franco, M. y Chavrier, P.** (2007). ARF1-mediated actin polymerization produces movement of artificial vesicles. *PNAS* **104**, 16928–16933.
- Hiesinger, P. R., Fayyazuddin, A., Mehta, S. Q., Rosenmund, T., Schulze, K. L., Zhai, R. G., Verstreken, P., Cao, Y., Zhou, Y., Kunz, J., et al.** (2005). The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell* **121**, 607–20.

- Hille-rehfeld, A.** (1995). Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 177–194.
- Hirata, R., Ohsumk, Y., Nakano, a, Kawasaki, H., Suzuki, K. y Anraku, Y.** (1990). Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H(+)-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 6726–33.
- Hirata, T., Iwamoto-Kihara, A., Sun-Wada, G.-H., Okajima, T., Wada, Y. y Futai, M.** (2003). Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G and C subunits. *J. Biol. Chem.* **278**, 23714–9.
- Ho, M. N., Hirata, R., Umemoto, N., Ohya, Y., Takatsuki, a, Stevens, T. H. y Anraku, Y.** (1993). VMA13 encodes a 54-kDa vacuolar H(+)-ATPase subunit required for activity but not assembly of the enzyme complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 18286–92.
- Holappa, K., Suokas, M., Soininen, P. y Kellokumpu, S.** (2001). Identification of the Full-length AE2 (AE2a) Isoform as the Golgi-associated Anion Exchanger in Fibroblasts. *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 259–269.
- Holliday, L. S., Lu, M., Lee, B. S., Nelson, R. D., Solivan, S., Zhang, L. y Gluck, S. L.** (2000). The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H⁺-ATPase contains a filamentous actin binding site. *J. Biol. Chem.* **275**, 32331–7.
- Holliday, L. S., Bubb, M. R., Jiang, J., Hurst, I. R. y Zuo, J.** (2005). Interactions between vacuolar H⁺-ATPases and microfilaments in osteoclasts. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 419–23.
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. y Kabsch, W.** (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44–49.
- Huang, C. y Chang, A.** (2011). pH-dependent cargo sorting from the Golgi. *J. Biol. Chem.* **286**, 10058–65.
- Hucthagowder, V., Morava, E., Kornak, U., Lefeber, D. J., Fischer, B., Dimopoulou, A., Aldinger, A., Choi, J., Davis, E. C., Abuelo, D. N., et al.** (2009). Loss-of-function mutations

- in ATP6V0A2 impair vesicular trafficking, tropoelastin secretion and cell survival. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2149–65.
- Hurley, D. y Taiz, L.** (1989). Immunocytochemical Localization of the Vacuolar H⁺-ATPase in Maize Root Tip Cells. *plant physiol* **89**, 391–395.
- Hurtado-Lorenzo, A., Skinner, M., El Annan, J., Futai, M., Sun-Wada, G.-H., Bourgoin, S., Casanova, J., Wildeman, A., Bechoua, S., Ausiello, D. a, et al.** (2006). V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat. Cell Biol.* **8**, 124–36.
- Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gassel, M., Dröse, S., Zeeck, A., Altendorf, K. y Wieczorek, H.** (2002). Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *J. Biol. Chem.* **277**, 40544–8.
- Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M. y Yokoyama, K.** (2003). Evidence for rotation of V1-ATPase. *PNAS.* **100**, 2312–5.
- Inoue, T. y Forgac, M.** (2005). Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V1 domain and subunit a of the V0 domain. *J. Biol. Chem.* **280**, 27896–903.
- Iwata, M., Imamura, H., Stambouli, E., Ikeda, C., Tamakoshi, M., Nagata, K., Makyio, H., Hankamer, B., Barber, J., Yoshida, M., et al.** (2004). Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase. *PNAS.* **101**, 59–64.
- Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M. y Naim, H. Y.** (2003). Distinct Cytoskeletal Tracks Direct Individual Vesicle Populations to the Apical Membrane of Epithelial Cells. *Curr. Biol.* **13**, 607–612.
- Jacobs, T. y Hall, C.** (2005). Rho GAPs — Regulators of Rho GTPases and More. In *RHO Family GTPases SE - 5* (ed. Manser, E.), pp. 93–112. Springer Netherlands.
- Jaffe, A. B. y Hall, A.** (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247–69.

- Jefferies, K. C. y Forgac, M.** (2008). Subunit H of the vacuolar (H⁺) ATPase inhibits ATP hydrolysis by the free V1 domain by interaction with the rotary subunit F. *J. Biol. Chem.* **283**, 4512–9.
- Jefferies, K. C., Cipriano, D. J. y Forgac, M.** (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 33–42.
- Jones, A. T.** (2007). Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J. Cell. Mol. Med.* **11**, 670–84.
- Kakinuma, Y., Ohsumi, Y. y Anraku, Y.** (1981). H⁺-translocating Adenosine Triphosphatase in Vacuolar Membranes of. **256**, 10859–10863.
- Kane, P. M.** (1995). disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**, 17025–17032.
- Kane, P. M.** (2006). The Where , When , and How of Organelle Acidification by the Yeast Vacuolar H-ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 177–191.
- Kane, P. M.** (2012). Targeting Reversible Disassembly as a Mechanism of Controlling V-ATPase Activity. *Curr Protein Pept Sci* **13**, 117–123.
- Kang, Q., Wang, T., Zhang, H., Mohandas, N. y An, X.** (2009). A Golgi-associated protein 4.1B variant is required for assimilation of proteins in the membrane. *J. Cell Sci.* **122**, 1091–9.
- Karet, F. E., Finberg, K. E., Nelson, R. D., Nayir, a, Mocan, H., Sanjad, S. a, Rodriguez-Soriano, J., Santos, F., Cremers, C. W., Di Pietro, a, et al.** (1999). Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat. Genet.* **21**, 84–90.
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. y Forgac, M.** (2001a). Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and in vivo dissociation. *J. Biol. Chem.* **276**, 17941–8.
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. y Forgac, M.** (2001b). Arg-735 of the 100-kDa subunit a of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation. *PNAS.* **98**, 12397–402.

- Kawasaki-Nishi, S., Bowers, K., Nishi, T., Forgac, M. y Stevens, T. H.** (2001c). The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 47411–20.
- Keller, P., Toomre, D., Díaz, E., White, J. y Simons, K.** (2001). Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat. Cell Biol.* **3**, 140–9.
- Képès, F., Rambourg, A. y Satiat-Jeunemaître, B.** (2005). Morphodynamics of the secretory pathway. *Int. Rev. Cytol.* **242**, 55–120.
- Kerkhoff, E.** (2006). Cellular functions of the Spir actin-nucleation factors. *Trends Cell Biol.* **16**, 477–83.
- Kerkhoff, E., Simpson, J. C., Leberfinger, C. B., Otto, I. M., Doerks, T., Bork, P., Rapp, U. R., Raabe, T. y Pepperkok, R.** (2001). The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr. Biol.* **11**, 1963–8.
- Kirchhausen, T.** (2007). Making COPII coats. *Cell* **129**, 1251–2.
- Kirkbride, K. C., Hong, N. H., French, C. L., Clark, E. S., Jerome, W. G. y Weaver, A. M.** (2012). Regulation of late endosomal/lysosomal maturation and trafficking by cortactin affects Golgi morphology. *Cytoskeleton.* **69**, 625–43.
- Kornak, U., Reynders, E., Dimopoulou, A., van Reeuwijk, J., Fischer, B., Rajab, A., Budde, B., Nürnberg, P., Foulquier, F., Lefebvre, D., et al.** (2008). Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. *Nat. Genet.* **40**, 32–4.
- Kreis, T. E. y Pepperkok, R.** (1994). Coat proteins in intracellular membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 533–537.
- Kroschewski, R., Hall, a y Mellman, I.** (1999). Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat. Cell Biol.* **1**, 8–13.
- Kuehn, M. J., Herrmann, J. M. y Schekman, R.** (1998). COPII–cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* **391**, 187–190.

- Ladinsky, M. S., Mastronarde, D. N., McIntosh, J. R., Howell, K. E. y Staehelin, L. a** (1999). Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J. Cell Biol.* **144**, 1135–49.
- Lafourcade, C., Sobo, K., Kieffer-Jaquinod, S., Garin, J. y van der Goot, F. G.** (2008). Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One* **3**, 2758.
- Lázaro-Diéguéz, F., Jiménez, N., Barth, H., Koster, A. J., Renau-Piqueras, J., Llopis, J. L., Burger, K. N. J., Egea, G., Lazaro-Dieguéz, F. y Jimenez, N.** (2006). Actin filaments are involved in the maintenance of Golgi cisternae morphology and intra-Golgi pH. *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**, 778–91.
- Lázaro-Diéguéz, F., Colonna, C., Cortegano, M., Calvo, M. M., Martínez, S. E., Egea, G., Lazaro-Dieguéz, F. y Martinez, S. E.** (2007). Variable actin dynamics requirement for the exit of different cargo from the trans-Golgi network. *FEBS Lett.* **581**, 3875–3881.
- Lebreton, S., Paladino, S. y Zurzolo, C.** (2008). Selective Roles for Cholesterol and Actin in Compartmentalization of Different Proteins in the Golgi and Plasma Membrane of Polarized Cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 29545–29553.
- Lee, B. S., Gluck, S. L. y Holliday, L. S.** (1999). Interaction between Vacuolar H⁺-ATPase and Microfilaments during Osteoclast Activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 29164–29171.
- Lee, M. C. S., Miller, E. a, Goldberg, J., Orci, L. y Schekman, R.** (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 87–123.
- Lénárt, P., Bacher, C. P., Daigle, N., Hand, A. R., Eils, R., Terasaki, M. y Ellenberg, J.** (2005). A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature* **436**, 812–8.
- Leng, X.-H., Nishi, T. y Forgac, M.** (1999). Transmembrane Topography of the 100-kDa a Subunit (Vph1p) of the Yeast Vacuolar Proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **274**, 14655–14661.
- Lewis, M. J. y Pelham, H. R. B.** (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* **348**, 162–163.

- Li, Y. P., Chen, W., Liang, Y., Li, E. y Stashenko, P.** (1999). Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat. Genet.* **23**, 447–51.
- Li, G., Yang, Q., Alexander, E. a y Schwartz, J. H.** (2005). Syntaxin 1A has a specific binding site in the H3 domain that is critical for targeting of H⁺-ATPase to apical membrane of renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C665–72.
- Liégeois, S., Benedetto, A., Garnier, J.-M., Schwab, Y. y Labouesse, M.** (2006). The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **173**, 949–61.
- Lippincott-schwartz, J., Roberts, T. H. y Hirschberg, K.** (2000). Secretory Proteins Trafficking and Organelle Dynamics in Living Cells. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **16**, 557–89.
- Lowe, M.** (2011). Structural organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 85–93.
- Lu, M., Holliday, L. S., Zhang, L., Dunn, W. a y Gluck, S. L.** (2001). Interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase: evidence for direct coupling of glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump. *J. Biol. Chem.* **276**, 30407–13.
- Lu, M., Sautin, Y. Y., Holliday, L. S. y Gluck, S. L.** (2004). The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression, and activity of vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **279**, 8732–9.
- Lu, M., Ammar, D., Ives, H., Albrecht, F. y Gluck, S. L.** (2007). Physical interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump. *J. Biol. Chem.* **282**, 24495–503.
- Luna, A., Matas, O. B., Martínez-Menárguez, J. A., Mato, E., Durán, J. M., Ballesta, J., Way, M. y Egea, G.** (2002). Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. *Mol. Biol. Cell* **13**, 866–79.
- MacLeod, K. J., Vasilyeva, E., Baleja, J. D. y Forgac, M.** (1998). Mutational Analysis of the Nucleotide Binding Sites of the Yeast Vacuolar Proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**, 150–156.

- Maeda, Y. y Kinoshita, T.** (2010). The acidic environment of the Golgi is critical for glycosylation and transport. 1st ed. Elsevier Inc.
- Maeda, Y., Ide, T., Koike, M., Uchiyama, Y. y Kinoshita, T.** (2008). GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. *Nat Cell Biol* **10**, 1135–1145.
- Malhotra, V.** (2013). Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. *EMBO* **32**, 1660–4.
- Malkus, P., Graham, L. a, Stevens, T. H. y Schekman, R.** (2004). Role of Vma21p in assembly and transport of the yeast vacuolar ATPase. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5075–91.
- Maranda, B., Brown, D., Bourgoïn, S., Casanova, J. E., Vinay, P., Ausiello, D. a y Marshansky, V.** (2001). Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the Arf-nucleotide exchange factor ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *J. Biol. Chem.* **276**, 18540–50.
- Marsh, B. J. y Howell, K. E.** (2002). The mammalian Golgi — complex debates. *Nat. Rev.* **3**, 789–795.
- Marshansky, V.** (2007). The V-ATPase $\alpha 2$ -subunit as a putative endosomal pH-sensor. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1092–9.
- Marshansky, V. y Futai, M.** (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 415–26.
- Martinez, O., Antony, C., Pehau-Arnaudet, G., Berger, E. G., Salamero, J. y Goud, B.** (1997). GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *PNAS.* **94**, 1828–33.
- Matas, O. B., Martínez-Menárguez, J. A. y Egea, G.** (2004). Association of Cdc42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway with Golgi membranes. *Traffic* **5**, 838–46.
- Maxfield, F. R. y McGraw, T. E.** (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 121–32.
- Merrill, A. H.** (2002). De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 25843–6.

- Miesenbock, G., Angelis, D. A. De y Rothman, J. E.** (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**, 192–195.
- Mironov, a a, Weidman, P. y Luini, a** (1997). Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules. *J. Cell Biol.* **138**, 481–4.
- Mironov, a a, Beznoussenko, G. V, Nicoziani, P., Martella, O., Trucco, a, Kweon, H. S., Di Giandomenico, D., Polishchuk, R. S., Fusella, a, Lupetti, P., et al.** (2001). Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J. Cell Biol.* **155**, 1225–38.
- Mironov, A. a, Beznoussenko, G. V, Trucco, A., Lupetti, P., Smith, J. D., Geerts, W. J. C., Koster, A. J., Burger, K. N. J., Martone, M. E., Deerinck, T. J., et al.** (2003). ER-to-Golgi carriers arise through direct en bloc protrusion and multistage maturation of specialized ER exit domains. *Dev. Cell* **5**, 583–94.
- Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B. y Echard, a** (2010). Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* **12**, 645–54.
- Morel, N., Dedieu, J.-C. y Philippe, J.-M.** (2003). Specific sorting of the $\alpha 1$ isoform of the V-H+ATPase α subunit to nerve terminals where it associates with both synaptic vesicles and the presynaptic plasma membrane. *J. Cell Sci.* **116**, 4751–62.
- Moriyamas, Y. y Nelsons, N.** (1989). H⁺-translocating ATPase in Golgi Apparatus. Characterization as vacuolar H⁺-ATPase and subunit structures. *J. Biol. Chem.* **264**, 18445–18450.
- Munro, S. y Pelham, H. R. B.** (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899–907.
- Murata, Y., Sun-Wada, G.-H., Yoshimizu, T., Yamamoto, A., Wada, Y. y Futai, M.** (2002). Differential localization of the vacuolar H⁺ pump with G subunit isoforms (G1 and G2) in mouse neurons. *J. Biol. Chem.* **277**, 36296–303.
- Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A. G. W. y Walker, J. E.** (2005). Structure of the rotor of the V-Type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science* **308**, 654–9.

- Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M. y Takatsuki, A.** (1993). Folimycin (Concanamycin A), a Specific Inhibitor of V-ATPase, Blocks Intra-cellular Translocation of the Glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus before Arrival to the Golgi Apparatus. *Cell Struct. Funct.* **18**, 139–149.
- Müsch, a, Cohen, D. y Rodriguez-Boulan, E.** (1997). Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. *J. Cell Biol.* **138**, 291–306.
- Müsch, a, Cohen, D., Kreitzer, G. y Rodriguez-Boulan, E.** (2001). cdc42 regulates the exit of apical and basolateral proteins from the trans-Golgi network. *EMBO J.* **20**, 2171–9.
- Nakamura, S.** (2004). Glucose activates H(+)-ATPase in kidney epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C97–105.
- Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K. y Kanazawa, H.** (2005). Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J. Biol. Chem.* **280**, 1561–72.
- Nelson, R. D., Guo, X. L., Masood, K., Brown, D., Kalkbrenner, M. y Gluck, S.** (1992). Selectively amplified expression of an isoform of the vacuolar H(+)-ATPase 56-kilodalton subunit in renal intercalated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3541–5.
- Ng, M. M., Dippold, H. C., Buschman, M. D., Noakes, C. J. y Field, S. J.** (2013). GOLPH3L antagonizes GOLPH3 to determine Golgi morphology. *Mol. Biol. Cell* **24**, 796–808.
- Nickel, W.** (2005). Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* **6**, 607–14.
- Nilsson, T., Jackson, M. y Peterson, P. A.** (1989). Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **58**, 707–718.
- Nishi, T. y Forgac, M.** (2002). The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 94–103.
- Nordeen, M. H., Jones, S. M., Howell, K. E. y Caldwell, J. H.** (2000). GOLAC: an endogenous anion channel of the Golgi complex. *Biophys. J.* **78**, 2918–28.

- Nürnberg, A., Kitzing, T. y Grosse, R.** (2011). Nucleating actin for invasion. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 177–87.
- Oda, T., Namba, K. y Maéda, Y.** (2005). Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis. *Biophys. J.* **88**, 2727–36.
- Ono, M. y Hakomori, S.** (2004). Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. *Glycoconj. J.* **20**, 71–8.
- Oot, R. a y Wilkens, S.** (2010). Domain characterization and interaction of the yeast vacuolar ATPase subunit C with the peripheral stator stalk subunits E and G. *J. Biol. Chem.* **285**, 24654–64.
- Orci, L., Ravazzola, M., Volchuk, A., Engel, T., Gmachl, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T. H. y Rothman, J. E.** (2000). Anterograde flow of cargo across the golgi stack potentially mediated via bidirectional “percolating” COPI vesicles. *PNAS* **97**, 10400–5.
- Orlowski, J. y Grinstein, S.** (2007). Emerging roles of alkali cation/proton exchangers in organellar homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 483–92.
- Owegi, M. a, Pappas, D. L., Finch, M. W., Bilbo, S. a, Resendiz, C. a, Jacquemin, L. J., Warriar, A., Trombley, J. D., McCulloch, K. M., Margalef, K. L. M., et al.** (2006). Identification of a domain in the V0 subunit d that is critical for coupling of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **281**, 30001–14.
- Palade, G.** (1975). Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Sci.* **189** , 867.
- Palokangas, H., Metsikkö, K. y Väänänen, K.** (1994). Active vacuolar H⁺ATPase is required for both endocytic and exocytic processes during viral infection of BHK-21 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 17577–85.
- Paroutis, P., Touret, N. y Grinstein, S.** (2004). The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology.* **19**, 207–15.
- Parra, K. J. y Kane, P. M.** (1998). Reversible Association between the V 1 and V 0 Domains of Yeast Vacuolar H⁺-ATPase Is an Unconventional Glucose-Induced Effect. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7064–7074.

- Parra, K. J., Keenan, K. L. y Kane, P. M.** (2000). The H subunit (Vma13p) of the yeast V-ATPase inhibits the ATPase activity of cytosolic V1 complexes. *J. Biol. Chem.* **275**, 21761–7.
- Pathak, R., Delorme-walker, V. D., Howell, M. C., Anselmo, A. N., White, M. A., Bokoch, G. M. y Dermardirossian, C.** (2012). The Microtubule-associated Rho Activating Factor GEF-H1 interacts with Exocyst complex to regulate Vesicle Traffic. *Dev. Cell* **23**, 397–411.
- Patterson, G. H., Hirschberg, K., Polishchuk, R. S., Gerlich, D., Phair, R. D. y Lippincott-Schwartz, J.** (2008). Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell* **133**, 1055–67.
- Paunescu, T. G., Da Silva, N., Marshansky, V., McKee, M., Breton, S. y Brown, D.** (2004). Expression of the 56-kDa B2 subunit isoform of the vacuolar H(+)-ATPase in proton-secreting cells of the kidney and epididymis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C149–62.
- Percival, J. M., Hughes, J. A. I., Brown, D. L., Schevzov, G., Heimann, K., Vrhovski, B., Bryce, N., Stow, J. L. y Gunning, P. W.** (2004). Targeting of a Tropomyosin Isoform to Short Microfilaments Associated with the Golgi Complex. *Mol. Biol. Cell* **15**, 268–280.
- Perrin, B. J. y Ervasti, J. M.** (2010). The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton* **67**, 630–4.
- Peters, C., Bayer, M. J., Bühler, S., Andersen, J. S., Mann, M. y Mayer, a** (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* **409**, 581–8.
- Pfeffer, S. R.** (2010). How the Golgi works: a cisternal progenitor model. *PNAS*. **107**, 19614–8.
- Pietrement, C., Sun-Wada, G.-H., Silva, N. Da, McKee, M., Marshansky, V., Brown, D., Futai, M. y Breton, S.** (2006). Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol. Reprod.* **74**, 185–94.
- Piper, R. C. y Luzio, J. P.** (2007). Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 459–65.
- Pollard, T. D.** (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 451–77.

- Pollard, T. D. y Borisov, G. G.** (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453–65.
- Pollard, T. D. y Mooseker, M. S.** (1981). Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell Biol.* **88**, 654–9.
- Ponnambalam, S. y Baldwin, S. a** (2003). Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol. Membr. Biol.* **20**, 129–39.
- Popoff, V., Adolf, F., Brügger, B. y Wieland, F.** (2011). COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005231.
- Potter, B. A., Ihrke, G., Bruns, J. R., Weixel, K. M. y Weisz, O. A.** (2004). Specific N -Glycans Direct Apical Delivery of Transmembrane , but Not Soluble or Glycosylphosphatidylinositol-anchored Forms of Endolyn in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1407–1416.
- Powell, B., Graham, L. a y Stevens, T. H.** (2000). Molecular characterization of the yeast vacuolar H⁺-ATPase proton pore. *J. Biol. Chem.* **275**, 23654–60.
- Puius, Y. a, Mahoney, N. M. y Almo, S. C.** (1998). The modular structure of actin-regulatory proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 23–34.
- Puopolo, K., Kumamoto, C., Adachi, I., Magner, R. y Forgac, M.** (1992). Differential expression of the “B” subunit of the vacuolar H(+)-ATPase in bovine tissues. *J. Biol. Chem.* **267**, 3696–706.
- Qi, J. y Forgac, M.** (2007). Cellular environment is important in controlling V-ATPase dissociation and its dependence on activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 24743–51.
- Rabouille, C. y Klumperman, J.** (2005). Opinion: The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 812–7.
- Ramabhadran, V., Korobova, F., Rahme, G. J. y Higgs, H. N.** (2011). Splice variant-specific cellular function of the formin INF2 in maintenance of Golgi architecture. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4822–33.

- Rambourg, A. y Clermont, Y.** (1997). Three-dimensional structure of the Golgi apparatus in mammalian cells. In *The Golgi Apparatus* (ed. Berger, E. G. and Roth, J.), pp. 37–61. Birkhäuser Basel.
- Ramirez, I. B.-R. y Lowe, M.** (2009). Golgins and GRASPs: holding the Golgi together. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 770–9.
- Reaves, B. y Banting, G.** (1994). Vacuolar ATPase inactivation blocks recycling to the trans-Golgi network from the plasma membrane. *FEBS Lett.* **345**, 61–6.
- Rios, R. M. y Bornens, M.** (2003). The Golgi apparatus at the cell centre. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 60–66.
- Rivinoja, A., Kokkonen, N., Kellokumpu, I. y Kellokumpu, S.** (2006). Elevated Golgi pH in breast and colorectal cancer cells correlates with the expression of oncofetal carbohydrate T-antigen. *J. Cell. Physiol.* **208**, 167–74.
- Rivinoja, A., Pujol, F. M., Hassinen, A. y Kellokumpu, S.** (2012). Golgi pH, its regulation and roles in human disease. *Ann. Med.* **44**, 542–54.
- Robinson, M. S. y Bonifacino, J. S.** (2001). Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 444–53.
- Rodriguez-Boulán, E. y Müsch, A.** (2005). Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim. Biophys. Acta* **1744**, 455–64.
- Rodriguez-Boulán, E., Kreitzer, G. y Müsch, A.** (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 233–47.
- Rothman, J. E. y Wieland, F. T.** (1996). Protein Sorting by Transport Vesicles. *Sci.* **272**, 227–234.
- Safer, D., Sosnick, T. R. y Elzinga, M.** (1997). Thymosin Binds Actin in an Extended Conformation and Contacts both the Barbed and Pointed Ends. *Biochemistry* **36**, 5806–5816.
- Saito, S., Watabe, S., Ozaki, H., Fusetani, N. y Karaki, H.** (1994). Mycalolide B, a novel actin depolymerizing agent. *J. Biol. Chem.* **269**, 29710–4.

- Salcedo-Sicilia, L., Granell, S., Jovic, M., Sicart, A., Mato, E., Johannes, L., Balla, T. y Egea, G.** (2013). β III spectrin regulates the structural integrity and the secretory protein transport of the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **288**, 2157–66.
- Sambade, M. y Kane, P. M.** (2004). The yeast vacuolar proton-translocating ATPase contains a subunit homologous to the *Manduca sexta* and bovine e subunits that is essential for function. *J. Biol. Chem.* **279**, 17361–5.
- Sandvig, K., Pust, S., Skotland, T. y van Deurs, B.** (2011). Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 413–20.
- Sautin, Y. Y., Lu, M., Gaugler, A., Zhang, L. y Gluck, S. L.** (2005). Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Effects of Glucose on Vacuolar H⁺-ATPase Assembly, Translocation, and Acidification of Intracellular Compartments in Renal Epithelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 575–589.
- Schafer, D. A., Jennings, P. B. y Cooper, J. A.** (1996). Dynamics of Capping Protein and Actin Assembly In Vitro: Uncapping Barbed Ends by Polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* **135**, 169–179.
- Schapiro, F. B. y Grinstein, S.** (2000). Determinants of the pH of the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 21025–32.
- Schekman, R. y Orci, L.** (1996). Coat Proteins and Vesicle Budding. *Sci.* **271**, 1526–1533.
- Schoenenberger, C. a, Steinmetz, M. O., Stoffler, D., Mandinova, a y Aebi, U.** (1999). Structure, assembly, and dynamics of actin filaments in situ and in vitro. *Microsc. Res. Tech.* **47**, 38–50.
- Schuck, S. y Simons, K.** (2004). Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J. Cell Sci.* **117**, 5955–64.
- Schwappach, B., Stobrawa, S., Hechenberger, M., Steinmeyer, K. y Jentsch, T. J.** (1998). Golgi Localization and Functionally Important Domains in the NH₂ and COOH Terminus of the Yeast CLC Putative Chloride Channel Gef1p. *J. Biol. Chem.* **273**, 15110–15118.
- Seol, J. H., Shevchenko, a y Deshaies, R. J.** (2001). Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly. *Nat. Cell Biol.* **3**, 384–91.

- Sept, D. y McCammon, J. a** (2001). Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys. J.* **81**, 667–74.
- Sesso, a, de Faria, F. P., Iwamura, E. S. y Corrêa, H.** (1994). A three-dimensional reconstruction study of the rough ER-Golgi interface in serial thin sections of the pancreatic acinar cell of the rat. *J. Cell Sci.* **107**, 517–28.
- Sethi, N., Yan, Y., Quek, D., Schupbach, T. y Kang, Y.** (2010). Rabconnectin-3 is a functional regulator of mammalian Notch signaling. *J. Biol. Chem.* **285**, 34757–64.
- Seto, E. S., Bellen, H. J. y Lloyd, T. E.** (2002). When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev.* **16**, 1314–36.
- Shao, E. y Forgac, M.** (2004). Involvement of the nonhomologous region of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and in vivo dissociation. *J. Biol. Chem.* **279**, 48663–70.
- Shao, E., Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S. y Forgac, M.** (2003). Mutational analysis of the non-homologous region of subunit A of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **278**, 12985–91.
- Sheterline, P., Clayton, J. y Sparro, J.** (1995). Actin. Protein profile.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignal, E. y Rottner, K.** (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* **12**, 112–20.
- Smardon, A. M., Tarsio, M. y Kane, P. M.** (2002). The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **277**, 13831–9.
- Smith, a N., Skaug, J., Choate, K. a, Nayir, a, Bakkaloglu, a, Ozen, S., Hulton, S. a, Sanjad, S. a, Al-Sabban, E. a, Lifton, R. P., et al.** (2000). Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat. Genet.* **26**, 71–5.
- Smith, A. N., Borthwick, K. J. y Karet, F. E.** (2002). Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H(+)-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* **297**, 169–77.

- Smith, A. N., Jouret, F., Bord, S., Borthwick, K. J., Al-Lamki, R. S., Wagner, C. a, Ireland, D. C., Cormier-Daire, V., Frattini, A., Villa, A., et al.** (2005). Vacuolar H⁺-ATPase d2 subunit: molecular characterization, developmental regulation, and localization to specialized proton pumps in kidney and bone. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1245–56.
- Sobota, J. a, Bäck, N., Eipper, B. a y Mains, R. E.** (2009). Inhibitors of the V₀ subunit of the vacuolar H⁺-ATPase prevent segregation of lysosomal- and secretory-pathway proteins. *J. Cell Sci.* **122**, 3542–53.
- Spector, I., Shochet, N. R., Kashman, Y. y Groweiss, A.** (1983). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Sci.* **219**, 493–495.
- Spector, I., Braet, F., Shochet, N. R. y Bubb, M. R.** (1999). New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Tech.* **47**, 18–37.
- Stankewich, M. C., Tse, W. T., Peters, L. L., Ch'ng, Y., John, K. M., Stabach, P. R., Devarajan, P., Morrow, J. S. y Lux, S. E.** (1998). A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles. *PNAS* **95**, 14158–63.
- Stanković, K. M., Brown, D., Alper, S. L. y Adams, J. C.** (1997). Localization of pH regulating proteins H⁺ATPase and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in the guinea pig inner ear. *Hear. Res.* **114**, 21–34.
- Storrie, B.** (2005). Maintenance of Golgi apparatus structure in the face of continuous protein recycling to the endoplasmic reticulum: making ends meet. *Int. Rev. Cytol.* **244**, 69–94.
- Storrie, B., Micaroni, M., Morgan, G. P., Jones, N., Jeffrey, A., Wilkins, N., Pan, T. H. y Marsh, B. J.** (2012). Electron Tomography Reveals Rab6 Is Essential to the Trafficking of trans-Golgi Clathrin and COPI-Coated Vesicles and the Maintenance of Golgi Cisternal Number. *traffic* **13**, 727–744.
- Stow, J. L., Fath, K. R. y Burgess, D. R.** (1998). Budding roles for myosin II on the Golgi. *Trends Cell Biol.* **8**, 138–41.
- Su, Y., Zhou, A., Al-Lamki, R. S. y Karet, F. E.** (2003). The α -subunit of the V-type H⁺-ATPase interacts with phosphofructokinase-1 in humans. *J. Biol. Chem.* **278**, 20013–8.

- Su, Y., Blake-Palmer, K. G., Sorrell, S., Javid, B., Bowers, K., Zhou, A., Chang, S. H., Qamar, S. y Karet, F. E.** (2008). Human H⁺ATPase a4 subunit mutations causing renal tubular acidosis reveal a role for interaction with phosphofructokinase-1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F950–8.
- Sumner, J. P., Dow, J., Earley, F., Klein, U., Jager, D. y Wieczorek, H.** (1995). Regulation of Plasma Membrane V-ATPase Activity by Dissociation of Peripheral Subunits. *J. Biol. Chem.* **270**, 5649–53.
- Sun, H. Q., Yamamoto, M., Mejillano, M. y Yin, H. L.** (1999). Gelsolin, a Multifunctional Actin Regulatory Protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 33179–33182.
- Sun-Wada, G.-H., Imai-Senga, Y., Yamamoto, A., Murata, Y., Hirata, T., Wada, Y. y Futai, M.** (2002). A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *J. Biol. Chem.* **277**, 18098–105.
- Sun-Wada, G.-H., Yoshimizu, T., Imai-Senga, Y., Wada, Y. y Futai, M.** (2003a). Diversity of mouse proton-translocating ATPase: presence of multiple isoforms of the C, d and G subunits. *Gene* **302**, 147–53.
- Sun-Wada, G.-H., Murata, Y., Namba, M., Yamamoto, A., Wada, Y. y Futai, M.** (2003b). Mouse proton pump ATPase C subunit isoforms (C2-a and C2-b) specifically expressed in kidney and lung. *J. Biol. Chem.* **278**, 44843–51.
- Supek, F., Supekova, L., Mandiyan, S., Pan, Y. C., Nelson, H. y Nelson, N.** (1994). A novel accessory subunit for vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase from chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* **269**, 24102–6.
- Thompson, R. F. y Langford, G. M.** (2002). Myosin superfamily evolutionary history. *Anat. Rec.* **268**, 276–89.
- Thompson, R. J., Nordeen, M. H., Howell, K. E. y Caldwell, J. H.** (2002). A large-conductance anion channel of the Golgi complex. *Biophys. J.* **83**, 278–89.
- Thyberg, J. y Moskalewski, S.** (1999). Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp. Cell Res.* **246**, 263–79.

- Toyomura, T., Murata, Y., Yamamoto, A., Oka, T., Sun-Wada, G.-H., Wada, Y. y Futai, M.** (2003). From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H⁺ - ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 22023–30.
- Trombetta, E. S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M. y Mellman, I.** (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* **299**, 1400–3.
- Trucco, A., Polishchuk, R. S., Martella, O., Di Pentima, A., Fusella, A., Di Giandomenico, D., San Pietro, E., Beznoussenko, G. V, Polishchuk, E. V, Baldassarre, M., et al.** (2004). Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1071–81.
- Tsukita, S. y Yonemura, S.** (1999). Cortical Actin Organization: Lessons from ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 34507–34510.
- Tumbarello, D. a, Kendrick-Jones, J. y Buss, F.** (2013). Myosin VI and its cargo adaptors - linking endocytosis and autophagy. *J. Cell Sci.* **126**, 2561–70.
- Valderrama, F., Babià, T., Ayala, I., Kok, J. W., Renau-Piqueras, J. y Egea, G.** (1998). Actin microfilaments are essential for the cytological positioning and morphology of the Golgi complex. *Eur. J. Cell Biol.* **76**, 9–17.
- Valderrama, F., Luna, A., Babía, T., Martínez-Menárguez, J. a, Ballesta, J., Barth, H., Chaponnier, C., Renau-Piqueras, J. y Egea, G.** (2000). The golgi-associated COPI-coated buds and vesicles contain beta/gamma -actin. *PNAS* **97**, 1560–5.
- Van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A. M. y Sandvig, K.** (2003). Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol.* **13**, 92–100.
- Van Meer, G.** (2010). Membranes in Motion. *EMBO* **11**, 331–333.
- Vasilyeva, E., Liu, Q., MacLeod, K. J., Baleja, J. D. y Forgac, M.** (2000). Cysteine Scanning Mutagenesis of the Noncatalytic Nucleotide Binding Site of the Yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 255–260.
- Vavylonis, D., Yang, Q. y O’Shaughnessy, B.** (2005). Actin polymerization kinetics, cap structure, and fluctuations. *PNAS.* **102**, 8543–8.

- Vik, S. B., Long, J. C., Wada, T. y Zhang, D.** (2000). A model for the structure of subunit a of the Escherichia coli ATP synthase and its role in proton translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 457–66.
- Vitavska, O., Wieczorek, H. y Merzendorfer, H.** (2003). A novel role for subunit C in mediating binding of the H⁺-V-ATPase to the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **278**, 18499–505.
- Vitavska, O., Merzendorfer, H. y Wieczorek, H.** (2005). The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **280**, 1070–6.
- Von Blume, J., Alleaume, A.-M., Cantero-Recasens, G., Curwin, A., Carreras-Sureda, A., Zimmermann, T., van Galen, J., Wakana, Y., Valverde, M. A. y Malhotra, V.** (2011). ADF/cofilin regulates secretory cargo sorting at the TGN via the Ca²⁺ ATPase SPCA1. *Dev. Cell* **20**, 652–62.
- Voss, M., Vitavska, O., Walz, B., Wieczorek, H. y Baumann, O.** (2007). Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **282**, 33735–42.
- Wagner, C. a, Finberg, K. E., Breton, S., Marshansky, V., Brown, D. y Geibel, J. P.** (2004). Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol. Rev.* **84**, 1263–314.
- Warner, C. L., Stewart, A., Luzio, J. P., Steel, K. P., Libby, R. T., Kendrick-jones, J. y Buss, F.** (2003). Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice. *EMBO* **22**, 569–579.
- Weisz, O. A.** (2003). Organelle Acidification and Disease. *Traffic* **4**, 57–64.
- Welch, M. D. y Mullins, R. D.** (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 247–88.
- Wieczorek, H., Grber, G., Harvey, W. R., Huss, M., Merzendorfer, H. y Zeiske, W.** (2000). Structure and regulation of insect plasma membrane H⁽⁺⁾V-ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**, 127–35.
- Wieland, T. y Faulstich, H.** (1977). The action of phalloidin. *Curr Probl Clin Biochem* **7**, 11–4.

- Wilkins, S., Inoue, T. y Forgac, M.** (2004). Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase. Localization of subunit H by difference imaging and chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.* **279**, 41942–9.
- Wilson, D. W., Lewis, M. J. y Pelham, H. R.** (1993). pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J. Biol. Chem.* **268**, 7465–8.
- Wu, M. M., Llopis, J., Adams, S., McCaffery, J. M., Kulomaa, M. S., Machen, T. E., Moore, H. P. y Tsien, R. Y.** (2000a). Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein-biotin. *Chem. Biol.* **7**, 197–209.
- Wu, W. J., Erickson, J. W., Lin, R. y Cerione, R. a** (2000b). The gamma-subunit of the coatomer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature* **405**, 800–4.
- Wu, M. M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R. Y., Moore, H. P. y Machen, T. E.** (2001). Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 33027–35.
- Xie, X.-S., Padron, D., Liao, X., Wang, J., Roth, M. G. y De Brabander, J. K.** (2004). Salicylhalamide A inhibits the V0 sector of the V-ATPase through a mechanism distinct from bafilomycin A1. *J. Biol. Chem.* **279**, 19755–63.
- Xu, T. y Forgac, M.** (2001). Microtubules are involved in glucose-dependent dissociation of the yeast vacuolar [H⁺]-ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 24855–61.
- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Ono, S. y Matsumura, F.** (1998). Fascin , an Actin-bundling Protein , Induces Membrane Protrusions and Increases Cell Motility of Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 993–1006.
- Yan, Y., Deneff, N. y Schüpbach, T.** (2009). The vacuolar proton pump, V-ATPase, is required for notch signaling and endosomal trafficking in *Drosophila*. *Dev. Cell* **17**, 387–402.
- Yeaman, C., Le Gall, a H., Baldwin, a N., Monlauzeur, L., Le Bivic, a y Rodriguez-Boulan, E.** (1997). The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* **139**, 929–40.
- Yilla, M., Tan, a, Ito, K., Miwa, K. y Ploegh, H. L.** (1993). Involvement of the vacuolar H(+)-ATPases in the secretory pathway of HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 19092–100.

- Yoshida, M., Muneyuki, E. y Hisabori, T.** (2001). ATP synthase a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 669–77.
- Young, G. P. y Qiao, J.** (1988). Purification and reconstitution of the proton-translocating ATPase of Golgi-enriched membranes. *PNAS* **85**, 9590–9594.
- Zhang, F. y Schneider, D. L.** (1983). The bioenergetics of Golgi apparatus function: Evidence for an ATP-dependent proton pump. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**, 620–625.
- Zhao, Y.-Y., Takahashi, M., Gu, J.-G., Miyoshi, E., Matsumoto, A., Kitazume, S. y Taniguchi, N.** (2008). Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer Sci.* **99**, 1304–10.
- Zierath, J. y Lendahl, U.** (2013). Scientific Background Machinery Regulating Vesicle Traffic , A Major Transport System in our Cells.
- Zilberman, Y., Alieva, N. O., Miserey-Lenkei, S., Lichtenstein, A., Kam, Z., Sabanay, H. y Bershadsky, A.** (2011). Involvement of the Rho-mDia1 pathway in the regulation of Golgi complex architecture and dynamics. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2900–11.
- Zuo, J., Vergara, S., Kohno, S. y Holliday, L. S.** (2008). Biochemical and functional characterization of the actin-binding activity of the B subunit of yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J. Exp. Biol.* **211**, 1102–8.

ANEXOS

Manuscrito enviado a Journal of Cell Science

Dear Dr. Egea

This is an automatic message acknowledging your online submission to Journal of Cell Science.

Thank you for your submission. We will be in touch as soon as we have some news.

Best wishes,

The Editorial Office

MS ID#: JOCES/2014/164772

MS TITLE: ACTIN FILAMENTS REGULATE VACUOLAR H⁺-ATPase ACTIVITY AT THE GOLGI COMPLEX

AUTHORS: Carla Serra-Peinado, Adrià Sicart, Juan Llopis, and Gustavo Egea

ACTIN FILAMENTS REGULATE VACUOLAR H⁺-ATPase ACTIVITY AT THE GOLGI COMPLEX

Carla Serra-Peinado¹, Adrià Sicart^{1,4}, Juan Llopis³, Gustavo Egea^{1,2}

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

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

³Facultad de Medicina de Albacete and Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla-La Mancha, E-02008 Albacete, Spain

⁴ Current address: Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) Centre for the Biology of Disease and KU Leuven, Department of Human Genetics, Campus Gasthuisberg, 3000 Leuven, Belgium

Corresponding author: Gustavo Egea, Department de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, C/Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34-93-4021909. E-mail: gegea@ub.edu

Abstract

We previously reported that actin-depolymerizing agents alkalinise the Golgi stack and the trans-Golgi network (TGN). The main determinant of the fall in pH at the Golgi is the vacuolar-type H⁺-translocating ATPase (V-ATPase), whose V₁ domain subunits B and C bind actin. We have generated a GFP-tagged subunit B construct, which was enriched at distal Golgi compartments in HeLa cells. Subcellular fractionation, immunoprecipitation and inverse FRAP experiments showed that the actin depolymerisation disassociates V₁-V₀ domains, which entails subunit B translocation from Golgi membranes to the cytosol, and also induced the cytosolic translocation of subunit B as a result of the disruption of the detergent-resistant membrane (DRM) domains where V-ATPase mainly resides. However, unlike subunit C, subunit B did not co-immunoprecipitate with actin. We conclude that actin regulates the Golgi pH homeostasis maintaining the coupling of V₁-V₀ domains of V-ATPase through the binding of microfilaments to subunit C and preserving the integrity of DRM organization. These results establish the Golgi-associated V-ATPase activity as the molecular link between actin and the Golgi pH.

Introduction

The secretory pathway is characterized by progressive lumen acidification of its organelles, from almost neutral in the endoplasmic reticulum ER (pH \approx 7.1-7.2), along the *cis*-to-*trans* Golgi stack (pH \approx 6.7-6.0) to more acidic in the *trans*-Golgi network (TGN) and secretory vesicles/granules (pH \approx 5.0) (Casey et al., 2010; Paroutis et al., 2004; Wu et al., 2001). This pH gradient is crucial for post-translational modifications and membrane trafficking events (Maeda and Kinoshita, 2010; Weisz, 2003). The main molecular determinant of the progressive fall in pH along the secretory pathway is the vacuolar [H⁺]-ATPase (V-ATPase) (Forgac, 2007; Jefferies et al., 2008; Kane, 2006). V-ATPases are multisubunit complexes composed of two large domains: V₀ and V₁. The V₀ domain is a 260 KDa integral membrane complex made up of five subunits (*a*, *b*, *c*, *d*, and *e*; some in multiple copies), which mediates proton translocation; the V₁ domain is a 600-650 KDa peripheral complex composed of eight subunits (*A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* and *H*), which is responsible for the ATP hydrolysis that provides the mechanical force necessary for proton (H⁺) translocation (Drory and Nelson, 2006; Inoue et al., 2005; Jefferies et al., 2008; MacLeod et al., 1998). Whereas they are the primary source of proton delivery to endomembranes consuming ATP, the final steady-state pH in the secretory pathway is the result of the balance between active H⁺ pumping by the V-ATPase, passive H⁺ efflux through organelle endogenous H⁺ permeability, and differences in counter-ion conductance (Casey et al., 2010; Demaurex, 2002). How differences in the pH of individual secretory compartments are generated is not well understood. Differential V-ATPase density and/or local regulatory mechanisms in secretory organelles and subcompartments are possible (Marshansky and Futai, 2008). In this respect, V-ATPase-dependent proton translocation could be regulated by several mechanisms, which include: (a) differential V-ATPase subunit expression; (b) intracellular targeting and recycling of V-ATPase-containing transport carriers to and from the plasma membrane and endomembranes (mainly late endosomes and lysosomes); (c) modulation of the coupling ratio between ATP hydrolysis and proton pumping; and (d) the reversible association of the V₀ and V₁ domains (Breton and Brown, 2007). This latter phenomenon is characterized by the release of V₁ domain into the cytosol, leading to the inhibition of ATPase and proton transport activities (Kane, 2012). This mechanism was first identified in tobacco hornworm and yeast upon glucose deprivation (Kane, 1995), which was subsequently reported in mammalian cells (Nakamura, 2004; Sautin et al., 2005). When cells are cultured in the absence of glucose, a rapid dissociation of V₁ and V₀ domains occurs, which is completely reassembled after glucose re-addition, which obviates the need for *de novo* protein synthesis (Parra et al., 2000; Rubenstein and Schmidt, 2010).

Importantly, the cytoskeleton also seems to play a role in V-ATPase assembly and activity. In particular, microtubule integrity is necessary for the reversible dissociation of the two domains, since their disruption with nocodazole blocked the V_0 - V_1 dissociation in response to glucose depletion in yeast (Xu and Forgac, 2001). On the other hand, actin interacts with B and C subunits of V_1 domain, which both contain at least one actin-binding domain (Pérez-Sayáns et al., 2012; Zuo et al., 2008). Filamentous actin (F-actin) binds to the amino-terminal of the kidney and brain B1 and B2 subunit isoforms, respectively (Holliday et al., 2000). This actin interaction is necessary for the transport of the V-ATPase to the plasma membrane during osteoclast activation (Lee et al., 1999). Recombinant subunit C binds both filamentous (F) actin and globular (G) actin (Vitavska et al., 2003; Vitavska et al., 2005), but little is known about the functional relevance of the actin binding to V_1 subunits B and C.

The presence of an H^+ -translocating ATPase in Golgi membranes of animal and plant cells has long been known (Chanson and Taiz, 1985; Glickman et al., 1983; Hurley and Taiz, 1989; Moriyamas and Nelsons, 1989; Young and Qiao, 1988; Zhang and Schneider, 1983), and it is particularly enriched in lipid rafts (Gkantiragas et al., 2001). Besides V-ATPase, other ion channels have been reported in the Golgi, such as Golgi chloride channel GPHR (Golgi pH regulator) (Maeda et al., 2008), Golgi anion channels GOLAC-1 and GOLAC-2 (Thompson et al., 2002), and Na^+/H^+ exchanger isoforms NHE7 and NHE8 (Nakamura et al., 2005). The presence of all these ion channels, including V-ATPase, have contributed to our understanding of the importance of Golgi pH homeostasis in health and disease. In particular, both glycosylation and protein-sorting events are known to be highly sensitive to changes in intra-Golgi pH (Kornak et al., 2008; Muroi et al., 1993; Ono and Hakomori, 2004; Orłowski and Grinstein, 2007; Palokangas et al., 1994; Rivinoja et al., 2012; Sobota et al., 2009; Yilla et al., 1993; Zhao et al., 2008). In contrast, much less is known about the subcellular localization and regulatory mechanisms of V-ATPase in the Golgi.

Our group previously reported significant similarities between events occurring after microfilament disruption (with actin depolymerizing agents) (Lazaro-Dieguez et al., 2007; Lázaro-Diéguez et al., 2006; Valderrama et al., 2000) and those seen after the pharmacological inhibition of V-ATPase (with bafilomycin A1 and concanamycin A) (Lázaro-Diéguez et al., 2006; Palokangas et al., 1994). These similarities include: (a) membrane trafficking alterations in the Golgi-to-ER and post-Golgi protein transports; (b) the alkalisation of the Golgi complex, and (c) strong dilatation of cisternae, observed under the electron microscope. Knowing that B and C subunits of V_1 domain bind to F- and/or G-actin (Chen et al., 2004; Holliday et al., 2000; Vitavska et al., 2003; Vitavska et al., 2005), we hypothesized that actin could participate in

regulating Golgi pH homeostasis through the V-ATPase activity. In particular, we hypothesized that microfilaments are crucial to the maintenance of V₀ and V₁ domain association (Egea et al., 2006; Lázaro-Diéguez et al., 2006). In the present study, we provide experimental evidence that microfilaments do indeed maintain V₀ and V₁ domain association, via two mechanisms: a direct one, through the interaction between actin and subunit C, and an indirect one, based on the actin-dependent integrity of detergent-resistant membranes (DRM) where V-ATPase localizes.

RESULTS

Subunit B of the V₁ domain was enriched in distal Golgi complex compartments and supports post-Golgi protein transport

We first examined whether V-ATPase is indeed localized in the Golgi complex as previously reported. We first tested for the presence of V-ATPase in the Golgi complex of HeLa cells, as previously reported (Moriyamas and Nelsons, 1989) using a variety of commercially available antibodies against subunits of V₀ and V₁ domains. Anti-V₁ subunits A and B and anti-V₀ subunit a antibodies recognized bands of the appropriate molecular weight in Golgi fractions isolated from rat liver (Fig. 1A), but unfortunately they could not be used for immunocytochemistry. To overcome this drawback, we decided to clone subunits B and C tagged to GFP, since they both contain actin-binding domains (Lee et al., 1999; Vitavska et al., 2003). We succeeded for subunit B, which was tagged to GFP at the NH₂- or COOH-terminus (B-GFP and GFP-B, respectively). We next examined whether either GFP-tagged subunit B protein was integrated into V-ATPase holoenzyme. To this end, GFP-B or B-GFP coding plasmids were expressed in HeLa cells, and cell extracts were immunoprecipitated with anti-GFP-antibodies and revealed for subunit A by Western blotting. Endogenous subunit A co-immunoprecipitated with the expressed GFP-B (NH₂-tagged) form, but not with the B-GFP (COOH-tagged) form (supplementary Fig. 1). Consequently, thereafter we used only the GFP-B form.

We next examined the subcellular localization of expressed GFP-B in HeLa cells. Cells were transfected and fixed after several expression times (from 6 to 24 h). GFP-B was localized both to cytoplasmic vesicular structures that may corresponded to endosomes and lysosomes (identified by their annular fluorescence staining), and to a juxtannuclear and reticular structure identified as the Golgi complex by its colocalization with a variety of Golgi markers. Quantitative confocal image analysis showed that GFP-B mainly localizes in distal Golgi cisternae, as indicated by its strong colocalization with *trans* (Golgi97) and *trans*-Golgi network (TGN46) protein markers, in comparison with other more proximal Golgi markers (GM130)

(Fig. 1B and C). This subcellular colocalization of the V-ATPase correlates with the diminishing pH gradient recorded in the Golgi of HeLa cells (Table 1).

The pharmacological inhibition of V_0 sector subunits blocks V-ATPase activity and in turn alters the pH (Lázaro-Diéguez et al., 2006) and protein transport (Huang and Chang, 2011; Palokangas et al., 1994; Yilla et al., 1993), but little is known about the contribution of V_1 subunits. We then knocked-down the expression of subunit B using siRNA technology. HeLa cells transiently transfected with the transmembrane Cherry-VSV-G protein and silenced for subunit B (~80 % of silencing; supplementary S2) showed a large accumulation of Cherry-VSV-G at the Golgi 90 min after the temperature shift. In comparison, in non-targeting siRNA (NT) transfected cells the viral glycoprotein was already observed at the plasma membrane at 90 min (Fig. 2A). In contrast, ER-to-Golgi protein transport of VSV-G was not altered after subunit B depletion (supplementary S3A and B), which was in accordance with previous results obtained using V-ATPase pharmacological inhibitors (Palokangas et al., 1994).

In addition, the secretion of radioactive-labelled soluble proteins transported from the Golgi to the extracellular medium was also significantly blocked in knockdown cells (Fig. 2B). These impairments in protein transport caused by the depletion of subunit B may be attributable to the disruption of Golgi pH, since V-ATPase is the main supplier of protons in endomembranes, including the Golgi complex (Jefferies et al., 2008; Qi and Forgac, 2007). To explore this, we measured the pH both in the Golgi stack (Golgi pH) and in the TGN (TGN pH) using pHluorin-tagged sensors (Miesenbock et al., 1998). As expected, control cells showed that the pH at the TGN was lower than at the Golgi (Table 1), and knockdown cells displayed severe alkalization of both Golgi compartments. Curiously, the alkalization effect was stronger in the Golgi stack than at the TGN (Table 1). Overall, these results show that V-ATPase subunit B localizes in the Golgi, where it is necessary for post-Golgi trafficking, and its GFP-tagged form is incorporated into the V_1 domain visualized in the Golgi complex and vesicular compartments. GFP-B subunit is thus a tool that facilitates the study of the dynamics and molecular interactions of V-ATPase at the Golgi complex.

Latrunculin but not jasplakinolide induced the V_1 - V_0 disassociation of the V-ATPase at the Golgi complex

On one hand, we previously reported that actin depolymerisation raises the pH in the Golgi and alters Golgi-to-ER and post-Golgi trafficking (Lazaro-Dieiguez et al., 2007; Lázaro-Diéguez et al., 2006; Valderrama et al., 2000). These results are similar to those occurring after the pharmacological inhibition of V-ATPase using bafilomycin and concanamycin (Palokangas et

al., 1994). On the other hand, subunits B and C of V-ATPase V_1 domain interact *in vitro* with F-actin and/or G-actin (Holliday et al., 2000; Vitavska et al., 2005). Taking all these observations into account, we hypothesized that V-ATPase activity at the Golgi could be regulated by actin dynamics (Egea et al., 2006; Egea et al., 2013; Lázaro-Diéguez et al., 2006). To test this hypothesis, we first examined whether the V_1 - V_0 association is perturbed in the presence of actin toxins that either depolymerize (latrunculin B/LtB) or stabilize (jasplakinolide/JpK) actin. As a positive control, we cultured HeLa cells in the absence of glucose and foetal bovine serum (-Gluc/FBS), because this reversibly uncouples V-ATPase domains both in yeast (Kane, 1995) and in mammalian cells (Nakamura et al., 2004). Cells were treated with LtB (500 nM/90 min), JpK (500 nM/90 min) or -Gluc/FBS (4 h), lysed and immunoprecipitated with anti-subunit A or anti-subunit B antibodies and subjected to Western blotting for subunit a (which forms part of V_0 complex). The ratio between a/A subunits was significantly lower in LtB- and in -Glu/FBS-treated cells (but not in JpK-treated cells) when compared with untreated (control) (Fig. 3). Similar results were obtained when the ratio between a/B subunits was analysed (data not shown). Therefore, taking these results into account, we postulated that actin depolymerisation should lead to an enrichment of V_1 subunits in the cytosol. We obtained highly pure membrane and cytosol fractions (respectively identified by the presence of transferrin receptor/TfR and RhoGDI markers) from LtB- or JpK-treated cells and we evaluated the presence of subunits A and B in both fractions by Western blotting. Unlike JpK, LtB significantly increased both subunits in the cytosol (Fig. 4), which confirms the aforementioned hypotheses (Fig. 3).

Since we observed that GFP-B subunit localizes in the Golgi complex (Fig. 1B), we next used inverse FRAP time-lapse microscopy to determine whether actin depolymerisation induces the release of the GFP-B subunit from the Golgi, as a demonstration of the dissociation of V_1 - V_0 domains *in vivo*. Sequential pictures obtained from movies (supplementary movies) indeed showed the loss of the Golgi-associated GFP-B fluorescence after incubation of cells in the absence of glucose and FBS (-Gluc/FBS) and with LtB (Fig. 5A; also compare supplementary movies #2/-Glc/FBS and #3/LtB with supplementary movie #1/control). Quantitative image analysis showed that LtB and -Gluc/FBS caused a similar loss of the GFP-B fluorescence at the Golgi (Fig. 5B and mobile fraction/MF values shown in 5C). However, their respective kinetics were different, the loss being much faster for LtB than for -Gluc/FBS, as shown by their respective $T_{1/2}$ (Fig. 5C). Therefore, the actin depolymerisation alone was sufficient to induce the dissociation of Golgi-associated V-ATPase domains.

V_1 domain subunits B and C differed in their interaction with actin

It has been previously reported that actin interacts with B subunit both *in vitro* and *in vivo* in osteoblasts, where V-ATPase largely localizes to the plasma membrane and activity is crucial for the bone removal (Chen et al., 2004). To examine the extent to which microfilaments directly or indirectly interact with subunits B and C of the V-ATPase in our model (HeLa cells), we obtained F-actin and G-actin enriched fractions from untreated and LtB-treated cells, and subsequently used Western blotting to examine the presence of subunits B and/or C. In untreated cells, subunits B and C were present in both F- and G-actin fractions: subunit B was almost equally localized in both fractions and subunit C was more enriched in G-actin fraction. After LtB treatment, subunit C, unlike subunit B, showed a significant reduction of the F-/G-actin ratio, and was thus more enriched in G-actin fraction (Fig. 6A). Immunoprecipitation experiments with anti-actin antibodies and subsequent Western blotting for subunits B or C showed that indeed only subunit C interacted directly with actin (Fig. 6B). Reverse immunoprecipitation experiments confirmed that subunit B did not interact with actin (Fig. 6C). Unfortunately, this experiment could not be carried out for subunit C because the antibodies were unsuitable for immunoprecipitation. Overall, our results suggest that in HeLa cells the molecular interaction between actin and V-ATPase in endomembranes occurs directly through subunit C.

The abrogation of the actin-binding domain delocalized subunit B from the Golgi complex

Although we observed no direct interaction between actin and subunit B, we next explored the functional contribution of its actin-binding domain (ABD). To this end, we generated a GFP-tagged form of subunit B in which the ABD (localized in the NH₂ terminus) was deleted (GFP-B Δ ABD). When this construct was expressed in HeLa cells, it localized all over the cytoplasm but was never seen in the Golgi, in contrast to wild-type GFP-B (supplementary S4). Immunoprecipitation experiments showed that GFP-B Δ ABD mutant interacted with subunit A. GFP-B Δ ABD seems to act as a dominant negative mutant that misdirects most of the V-ATPase V₁ domain to the cytosol. This might block the V-ATPase activity, which may explain the abnormally high cell toxicity associated with the expression of this mutant.

Actin depolymerisation-induced V-ATPase V₁-V₀ domains disassociation was also caused by disruption of DRM

It has been reported that several V-ATPase subunits (subunits A, B, E, and accessory subunit) are major components in Golgi-derived detergent insoluble complexes (GIGs), which are the Golgi equivalent to sphingomyelin- and cholesterol-enriched domains isolated as detergent-

resistant membranes from total cell extracts (DRMs) (Gkantiragas et al., 2001). On the other hand, actin filaments are necessary to maintain the integrity of DRMs (Chichili and Rodgers, 2009). Then, we reasoned that besides its direct interaction with subunit C, actin could also indirectly regulate association of V_1 - V_0 domains by maintaining the integrity of DRMs. To test this possibility, we isolated total-DRM from control (untreated) and LtB-treated HeLa cells and examined the presence of V_0 and V_1 subunits a and B, respectively, in DRM and detergent-sensitive membrane (DSM) fractions. Unlike polarized epithelial cells (Breton and Brown, 2007), HeLa cells do not express V-ATPase at the plasma membrane, and therefore we assumed that the putative source of V-ATPase in DRMs would be endomembranes, mainly from the Golgi (Gkantiragas et al., 2001) and late endosomes (Lafourcade et al., 2008). DRMs were identified by the presence of caveolin-1 and the GM1 ganglioside. Subunit B distributed both in DSMs and DRMs (red square) (Fig. 7A), but subunit a was exclusively located in DRMs. This difference in distribution is explained because subunit B is synthesized in the cytosol and is not always coupled to V_0 sector. When HeLa cells were treated with LtB, DRMs were partially disrupted, as revealed by the presence of DRM markers in heavier sucrose fractions. Subunit B remained virtually insensitive to the LtB, but subunit a was redistributed, and consequently the ratio of B/a (V_1 - V_0) subunits in DRMs was significantly reduced (Fig. 7B). Therefore, these results suggest that actin indirectly regulates V_1 - V_0 association by maintaining the integrity of DRMs.

DISCUSSION

We report here that actin regulates the activity of the V-ATPase in the secretory pathway by controlling the association of V_1 - V_0 domains. We suggest that actin carries out such regulation through two non-mutually exclusive mechanisms: (a) its direct interaction with subunit C; and (b) indirectly maintaining the organization of lipid rafts, where V-ATPase mostly localizes.

Although V-ATPase localization at the Golgi complex is well-known (Chanson and Taiz, 1985; Glickman et al., 1983; Hurley and Taiz, 1989; Moriyamas and Nelsons, 1989; Young and Qiao, 1988; Zhang and Schneider, 1983), we here provide a more detailed picture of V-ATPase distribution along the Golgi stack (Fig. 1). Because commercially available antibodies were unsuitable for immunocytochemistry, we cloned V_1 domain subunit B, which, like subunit C, contains actin-binding sites (Lee et al., 1999). Importantly, expressed GFP-B (GFP tagged to its amino end) was effectively incorporated into the V_1 domain (Fig. S1), indicating that GFP-B is indeed a suitable tool for studying V-ATPase localization and dynamics. Expressed GFP-B localized V-ATPase in the Golgi complex, where it was visualized along all the compartments,

although it was more enriched in distal ones (Fig. 1C). This localization correlates with the pH gradient in the Golgi complex (Rivinoja et al 2011). Since the mechanisms that generate this pH gradient are unclear (Casey et al., 2010), our results suggest that a progressive increase in V-ATPase along the *cis-to-trans* Golgi axis is the main factor responsible for the progressive fall in pH.

Our group previously reported that the interference in actin dynamics induced by a variety of actin toxins blocks Golgi-to-ER and post-Golgi trafficking, alkalinizes the Golgi and induces Golgi cisternae swelling. All these were similar to the effects caused by the interference of V-ATPase activity with specific pharmacological agents targeted to V₀ domain, such as bafilomycin and concanamycin (Lazaro-Dieguez et al., 2007; Maeda and Kinoshita, 2010; Valderrama et al., 2000). Therefore, we postulated that one of the potential mechanisms by which actin participates in Golgi protein transport and flat cisternae morphology, as well as in the maintenance of pH, might be through the regulation of V-ATPase activity, taking into account that both V₁ domain subunit B and subunit C contain actin-binding domains (Lee et al., 1999; Vitavska et al., 2003). Studies on actin interaction with subunit B have focused on V-ATPase of the plasma membrane in osteoclasts and on the role of actin in the recycling of proton pump to and from intracellular membranes (Chen et al., 2004; Holliday et al., 2005). On the other hand, the interaction of subunit C with actin cytoskeleton was studied with recombinant proteins (Vitavska et al., 2003; Vitavska et al., 2005). However, little is known about the potential interaction of B and C subunits with actin filaments in the secretory pathway and the Golgi in particular. Our results show a direct interaction between actin and subunit C, since this subunit co-immunoprecipitated with actin and was enriched in G-actin fraction after LtB treatment (Fig. 6 A and B). This result supports the suggested role of subunit C directly connecting and modulating the interaction between V₁ and V₀ domains of the V-ATPase (Wilkins et al., 2004), and actin could regulate such a function. In this respect, we report that the interaction of the two domains is reduced by LtB (Fig. 3), and V₁ domain is concomitantly enriched in the cytosol (Fig. 4), which clearly indicates that actin filaments are necessary to maintain the association of the two domains. These biochemical observations were morphologically confirmed by iFRAP experiments, where we visualized the translocation of GFP-B from the Golgi to the cytoplasm (Fig. 5). Therefore, taken together, our results strongly suggest that actin could stabilize and/or reinforce functional V-ATPase V₁-V₀ domain association through its direct interaction with subunit C.

Unlike subunit C, co-immunoprecipitation experiments and F/G-actin fractionation did not show interaction between actin and subunit B (Fig. 6), in contrast with what is reported by others

(Chen et al., 2004; Holliday et al., 2000). The reason for this discrepancy is unknown, but it might be related to the different cellular models used. The high affinity binding of F-actin with subunits B1 and B2 isoforms has been shown in osteoclasts, where the localization of V-ATPase into ruffled membranes is crucial for bone reabsorption (Lee et al., 1999). It is important to highlight that expressed GFP-B in HeLa cells was visualized at the Golgi complex and lysosomes but not at the plasma membrane. It is worth noting that actin cytoskeleton organization and molecular machinery in the plasma membrane differ from those in the Golgi membranes (Chhabra and Higgs, 2007; Egea et al., 2013), and consequently the direct interaction between actin and the subunit B shown at the plasma membrane may not take place at the Golgi. In any case, subunit B is crucial for the activity of V-ATPase at the Golgi. This conclusion is based on the finding that silencing of subunit B raised Golgi and TGN pH (Table1), and significantly blocked post-Golgi transport (Fig. 2A) (but not ER-to Golgi transport (Fig. S3) of membrane (VSV-G glycoprotein) and luminal secretory cargo (Fig. 2B). The physiological significance of this blockade can be explained by the reduction of subunit B-associated ATP consumption of the V_1 domain (MacLeod et al., 1998; Vasilyeva et al., 2000). The question then arises as to the functional relevance of actin-binding sites of Golgi-associated B subunit. To this end, we generated a GFP-tagged subunit B lacking the actin-binding domain (GFP-B Δ ABD). This mutant exclusively localized in the cytosol and was not observed at the Golgi complex, suggesting that the ABD might carry some localization information for V_1 domain. We cannot rule out the possibility that cytosolic localization was caused by aberrant folding of the translated proteins. Co-immunoprecipitation assays showed that the mutant still interacts with endogenous subunit A, which could severely reduce the assembly of functional V_1 - V_0 domains in endomembranes (Kane, 2006). We observed that GFP-B Δ ABD expression was toxic for many cells (data not shown), suggesting that the subunit B mutant acted as a dominant negative, mislocalizing V_1 domain, thus preventing its functional interaction with V_0 and therefore impairing V-ATPase activity along the secretory pathway, and in the Golgi complex in particular.

It has been described that V-ATPase also localizes to the lipid rafts in the Golgi membranes (Gkantiragas et al., 2001). Our results demonstrate that actin depolymerisation induces V_1 - V_0 domain dissociation in these cholesterol and sphingomyelin enriched domains (Fig. 7). We also observed that LtB treatment induced partial disorganization of these domains. The role of actin cytoskeleton in the organization of lipid rafts has been described only in the plasma membrane (Chichili and Rodgers, 2009). Taking into account that V-ATPase revealed by GFP-B is in the Golgi complex and not in the plasma membrane and that the disruption of lipid rafts also affects

V₀ domain subunit a, we suggest that actin filaments also participate indirectly in the functional association of V₁-V₀ domain, thanks to their role in maintaining lipid raft organization in Golgi membranes.

In conclusion, we provide a mechanistic explanation to our previous observations that actin depolymerisation correlates with a rise in Golgi pH (Lázaro-Diéguez et al., 2006) showing that actin filaments regulate V-ATPase activity through the functional association of V₀ and V₁ domains. This new role of actin in the activity of the V-ATPase holoenzyme is compatible with other direct roles of actin in Golgi membranes such as membrane fission (Miserey-Lenkei et al., 2010) and calcium import (von Blume et al., 2011). Therefore, it is clear that actin participates in the Golgi architecture and transport functions at different levels (Egea et al., 2013).

MATERIAL AND METHODS

Antibodies and Reagents

Mouse monoclonal antibodies to GM130 and Golgin97 were from Transduction Laboratories (Lexington, KY) and Molecular probes, Life technologies (Paisley, UK), respectively. Sheep polyclonal anti-TGN46 was from Abcam (Cambridge, UK). Mouse monoclonal anti-Transferrin receptor, rabbit polyclonal anti-Rho-GDI, rabbit polyclonal anti-Actin and mouse monoclonal anti-Caveolin1 were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Santa Cruz (Santa Cruz, CA), Sigma-Aldrich and BD Transduction laboratories, respectively. Mouse monoclonal anti-GFP was from Molecular probes. Mouse monoclonal and polyclonal antibodies against subunits A or B2 from V-ATPase V₁ domain were from Abnova (Taipei, Taiwan) and Abcam, respectively. Rabbit polyclonal against subunit a1 from V₀ domain was from Santa Cruz. Cy3-conjugated rabbit secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) and Alex Fluor 488-conjugated or Alexa Fluor 546-conjugated anti-mouse, anti-rabbit, and anti-sheep antibodies were from Molecular probes, Life technologies. Peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Promega (Eugene, OR). Cholera Toxin B subunit, from *Vibrio cholera*-Peroxidase was from Sigma-Aldrich. Protein A-agarose beads were from Santa Cruz. Cycloheximide, Nigericin, Monensin, and FITC-Phalloidin were from Sigma-Aldrich. Latrunculin B and Mowiol were from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Jasplakinolide was from Invitrogen, Life technologies, and Dithiobis[succinimidylpropionate] (DSP) was from Thermo Scientific, Pierce Biotechnology (Rockford, IL). ³⁵S-Labeled protein labelling mix (³⁵S-EXPRESS) was from PerkinElmer Life Sciences.

Transfection of Plasmids and siRNA

Plasmids were transfected with FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, Eugene, OR) following the manufacturer's recommendations. siRNA pool for subunit B was purchased from Dharmacon (ON-TARGETplus SMARTpool, ref. L-011589-01-0005). siRNA (20 nM) were transfected in cells in suspension using Lipofectamine® 2000 Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Experiments were performed 72 h after treatment. All siRNA-mediated knockdown experiments were validated with a pool of four non-targeting siRNAs (Dharmacon, ref. D-001810-10-05)

Plasmids

Plasmids encoding pHluorin and pHluorin-TGN constructs (Miesenbock et al., 1998) were kindly provided by Juan L. Llopis (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain). Plasmid encoding Cherry-ts045VSV-G was kindly provided by K. Simons (Max Planck Institute, Dresden, Germany). The GFP-tagged subunit B in amino-terminal plasmid (GFP-B) was amplified from untagged subunit B plasmid (Origene Technologies, SC119083, Rockville, MD) with the forward and reverse primers as follows: 5'-ACGTAAGCTTATGGCGCTGCGGGCG-3' and 5'-ACGTGGATCCCTAATGCTTTGCAGA-3'. The PCR product was then subcloned into pEGFP-C3 vector after cutting with HindIII and BamHI restriction enzymes. For subunit B GFP-tagged in carboxy-terminal (B-GFP), subunit B was amplified from untagged subunit B plasmid with the forward and reverse primers: 5'-AGCTAAGCTTAGACAAGATGGCGCTGCGGGC-3' and 5'-AGCTGGATCCATGCTTTGCAGAGTCTCGAGG-3'. The PCR product was then subcloned into pEGFP-N3 vector after cutting with HindIII and BamHI restriction enzymes. The GFP-subunit B plasmid without the actin-binding domain was amplified from untagged subunit B plasmid with the forward and reverse primers as follows: 5'-AGCTAAGCTTGTGAGTTTACT-3' and 5'-AGCTGGATCCCAAAGCATTAG-3'. Then, the PCR product was subcloned into pEGFP-C1 vector after cutting with HindIII and BamHI restriction enzymes.

Immunofluorescence microscopy

HeLa cells were fixed and processed as previously described (Gutiérrez-Martínez et al., 2013). Working dilutions of antibodies were as follows: anti-GM130 (1:1000); anti-Golgin97 (1:300); anti-TGN46 (1:500). The images were processed using Image J software. Colocalization quantitative analysis was done by calculating the number of green pixels that colocalize with red

pixels divided by the total number of green pixels of each cell. Background subtraction was performed before the analysis.

iFRAP

Inverse fluorescence recovery after photobleaching (iFRAP) experiments were carried out using a Leica TCS SL with Argon and HeNe lasers attached to a Leica DMIRE2 inverted microscope equipped with an incubation system with temperature and CO₂ control. All experiments were performed at 37°C and 5% CO₂. Cells were grown on 35 mm dishes and transfected with GFP-subunit B and incubated for 24 h at 37°C. For visualization of GFP, images were acquired using a 63x oil immersion objective lens (NA 1.32), 488 nm laser line (20% powered), excitation beam splitter RSP 500, emission range detection: 500–600 nm with the confocal pinhole set at 4.94 Airy units to minimize changes in fluorescence due to protein-GFP moving away from the plane of focus. The whole cytoplasm staining (with the exception of the Golgi complex) of the GFP-subunit B transfected cell was photobleached using 50–80 scans with the 488 nm laser line at full power. Post-bleach images were monitored at 5 s intervals for 15 min. The excitation intensity was attenuated to approximately 5% of the half laser power to avoid significant photobleaching. To evaluate the results, the observed fluorescence equilibration in the unbleached region (the Golgi complex) was quantified using the ImageJ Software. For each time point, the loss of total fluorescent intensity in the unbleached region of interest was calculated as:

$$I_{rel}=(I_t)/(I_0),$$

where, I_t is the average intensity of unbleached region of interest at point t , and, I_0 is the average pre-bleach intensity of region of interest. Fitting of iFRAP curves was performed with Graphpad Prism Software v.5.0 (Graphpad Software, San Diego, CA) and modelled assuming two-phase exponential decay iFRAP, whereas they were equally well modelled with the one-phase exponential decay equation:

$$Y(\text{fluorescence decay}) = \text{Span} \cdot \exp(-K \cdot X) + \text{Plateau},$$

where Y started at span + plateau and decayed to plateau with a rate constant K . Half-time was calculated as: $0.69/K$. Afterwards, data were plotted as fluorescence intensity that remained in the Golgi vs time. Mobile fraction (MF) was calculated as:

$$MF \frac{1}{4} = F_{pre} - F_{end},$$

where F_{pre} was the initial fluorescence intensity and F_{end} the final recovered fluorescence intensity. Statistical analysis was performed by one-tailed Student's t test.

Golgi and TGN pH measurements

To measure the pH of the Golgi stack and the TGN, cells were grown on 35 mm dishes, and transfected with GalT-pHluorin (for the Golgi stack) or TGN38-pHluorin (for the TGN) and incubated overnight at 37°C. Golgi-associated Golgi-pHluorin or TGN-associated TGN-pHluorin ratiometric fluorescence intensities were measured. Thereafter, cells were incubated with seven different pH calibration buffers containing: 70 mM NaCl, 70 mM KCl, 1.5 mM K₂HPO₄, 1 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 10 mM MES, 2 mM CaCl₂, 10 mM Glucose, 0.01 mM Nigericin and 0.01 mM Monensin. These seven ratio measurements established a linear regression from which initial *in situ* Golgi or TGN pH measurements were extrapolated. Measurements were obtained with a Leica TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Germany). The excitation was performed with 470 nm and 405 nm filters, and emission was detected at 508 nm with the confocal pinhole set at 1 Airy unit.

Protein transport assays

To examine the VSV-G protein transport, HeLa cells were grown on 35-mm dishes, transfected with the respective pools of siRNAs, and incubated at 37°C for 72 hours. The cells were then transfected with Cherry-ts045VSV-G, seeded on coverslips and incubated overnight at 40°C. For post-Golgi transport assay, cells were incubated for 2 h at 20°C, and then shifted to 32°C to synchronize VSV-G transport. For the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi pathway, cells were shifted directly to 32°C. Cycloheximide (100 µg/ml) was added 30 min before the temperature shift. At the indicated times, cells were fixed and processed for immunofluorescence analysis.

To examine the VSV-G protein transport biochemically, stable HeLa cells that constitutively express VSV-G- GFP were grown on 35-mm dishes, transfected with the respective pools of siRNAs, and incubated at 37°C for 72 h. Cells were then incubated at 40°C for 24 h. Cycloheximide was added to a final concentration of 100 µg/ml (for the last 30 min), and cells were then shifted to 32°C to allow protein transport. At the indicated times, cells were solubilized with 0.5% SDS and 1% 2-mercaptoethanol (0.1 ml/dish) and heated to 100°C for 10 min. A portion of lysate was digested with Endo H following the manufacturer's protocol and then subjected to SDS-PAGE on 8% gels. VSV-G-GFP was visualized by immunoblotting with a polyclonal anti-GFP.

For the soluble protein secretion experiments, HeLa cells were starved for 30 min in Met/Cys-free medium and then pulse-labelled with 20 µCi of [³⁵S]-Met/Cys mix per well in a six-well plate for 10 min. Cells were then rinsed in cold complete medium and shifted to 19°C for 3 h to

allow accumulation at the Golgi of ^{35}S -labeled protein synthesized *de novo*. Thereafter, cells were washed twice with 5% BSA in PBS and then transferred to 37°C. To determine the kinetics of secretion, culture supernatants were collected at indicated times. ^{35}S -Labeled secreted proteins were precipitated with 20% trichloroacetic acid (TCA), washed in cold acetone, and quantified by scintillation counting. To determine total incorporation of [^{35}S]Met/Cys into cellular proteins, cells were lysed with 0.1 N sodium hydroxide in 0.1% sodium deoxycholate, treated with TCA, and processed as above. As a positive control, cells were treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of brefeldin A (BFA).

Isolation of Golgi membranes

Golgi-enriched fractions from rat liver were obtained as previously reported (Balch et al., 1984). Adult female Wistar rats were starved for 24 h. Rat livers were removed and placed into 200 ml of cold 0.5 M phosphate buffer pH 6.7 with 0.5 M sucrose. Livers were swirled, squeezed and cut into several pieces; excess buffer was removed and liver pieces were homogenized by gently pressing them through a 150- μm -mesh stainless sieve with the bottom of a conical flask. 13 ml of this homogenate was added to a discontinuous gradient and centrifuged in an SW-28 rotor at 28,000 rpm for 1 h at 4°C. 2-3 ml of the Golgi fractions was collected from between the 0.5 and 0.86 M sucrose fractions using a Pasteur pipette. Golgi fractions were diluted to 0.25 M sucrose and centrifuged at 7,000 rpm for 30 min at 4 °C in an SW-28 rotor. Pellets were resuspended in 2 ml of phosphate buffer containing 0.25 M sucrose and centrifuged again at 7,000 rpm for 30 min at 4 °C. The final pellet was resuspended in 4.5 ml of phosphate buffer with 0.25 M sucrose, aliquoted and frozen in liquid nitrogen. The purity of the Golgi-enriched fractions was checked by Western Blot by enrichment of Golgi marker GM130.

Subcellular (membrane and cytosol) fractionation

Cells were grown on 100 mm dishes. After treatments, cells were washed twice in PBS and scraped into XB buffer (20 mM Hepes, 150 mM KCl, pH 7.7) supplemented with protease inhibitors. Extracts were mechanically cracked with an insulin syringe and centrifuged at 1,000x g for 10 min to remove cell debris and nuclei. The supernatant was subsequently subjected to 60 min ultracentrifugation at 60,000 rpm using an MLA-130 rotor (Beckman Coulter Inc., Brea, CA) at 4°C. The resulting supernatant was the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in the same volume as the cytosolic fraction in XB buffer and again subjected to 60,000 rpm centrifugation for 60 min at 4°C. The resulting pellet (membrane fraction) was solubilized in radioimmune precipitation assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-

100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA plus protease inhibitors). All subcellular fractions were subjected to 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Immunoprecipitation and Western blotting experiments

Whole cell extracts (Total Lysates/TL) were obtained by adding 200 μ l of lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.6% CHAPS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1.5% octyl β -D-glucopyranoside and 10% glycerol) containing protein and phosphatase inhibitors (aprotinin, leupeptin and pepstatin A, and sodium orthovanadate and phenylmethylsulfonyl fluoride, respectively). Samples were passed 10 times through a 25G needle, incubated for 30 min on ice and centrifuged (14,000x g for 10 min at 4°C).

For immunoprecipitation experiments, equal amounts of total lysates (100 μ g) were incubated overnight at 4°C with 30 μ l of protein A-Sepharose beads (pre-cleaned lysates). In parallel, 30 μ l of protein A-Sepharose beads was incubated for 2h at 4°C with the antibody of interest (10 μ g) to generate the immunobeads, which were subsequently mixed with pre-cleaned lysates and incubated overnight at 4°C. The next day, beads were rinsed three times in TA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM sodium azide, 1 mM PMSF, 1 mM EGTA). Proteins were eluted from Sepharose beads by adding 20 μ l of loading buffer 5x (containing 10% β -mercaptoethanol). Subsequently, samples were processed for Western blotting (Sautin et al., 2005).

For Western blotting experiments, dilutions of the primary antibodies used were the following: for anti-subunit A, 1:1,000; anti-subunit B, 1:4,000; anti-subunit C, 1:1,1000; anti-subunit a, 1:4,000; anti-RhoGDI, 1:1,000; anti-transferrin receptor (TfR), 1:5,000; anti-GFP, 1:25,000; anti-actin, 1:25,000; anti-caveolin, 1:1,000. Band intensities were measured by densitometry scanning of the film using Image J software.

Filamentous/Globular-Actin isolation

After treatment, cells (grown on 100 mm dishes) were washed twice in PBS and incubated for 30 min in PBS containing 1 mM Dithiobis[succinimidylpropionate] (DSP) containing 250 nM of TRITC-Phalloidin, rinsed in PBS, and blocked for 15 min in 20 mM Tris-HCl (pH, 7.5) diluted in PBS containing 250 nM of TRITC-Phalloidin. Subsequently, cells were homogenized in lysis buffer (50 mM PIPES, pH 6.9, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5% (v/v) glycerol, 0,1% Nonidet P40, 0,1% Triton X-100, 0,1% Tween 200, 1% 2-mercaptoethanol and 0.001% antifoam C) containing 250 nM of TRITC-Phalloidin and protease inhibitors. Lysates were centrifuged at 1,000x g for 10 min at room temperature to remove cell debris and nuclei. Supernatants were collected and ultracentrifuged at 45,000 rpm for 1 h at room temperature using an MLA-130

rotor (Beckman Coulter Inc., Brea, CA). The pellet contained the F-actin fraction and the supernatant the G-actin fraction. Samples were subsequently analysed by immunoblotting.

DRM Fractionation

Cells were grown on five 100 mm plates per condition. After treatments, cells were washed three times in PBS, collected in 1 ml of HES buffer (20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose, pH 7.4) containing protease and phosphatase inhibitors and homogenized by passing 10 times through a 22G needle. Samples were ultracentrifuged at 67,000 rpm for 90 min at 4°C using an MLA-130 rotor (Beckman Coulter Inc., Brea, CA). The pellets were resuspended with 1 ml of MBS buffer (25 mM MES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 6.5) containing protease inhibitors, incubated for 20 min at 4°C and passed 10 times through a 22G needle. A discontinuous sucrose gradient was then prepared: at the bottom, 1 ml of resuspended pellet was mixed with 1 ml of MBS buffer-80% sucrose: Subsequently, 2 ml of MBS buffer-30% sucrose was added and, on the top, 1 ml of MBS buffer-5% sucrose. The gradients were ultracentrifuged at 35,000 rpm for 17 h at 4°C using an SW55 Ti rotor (Beckman Coulter Inc., Brea, CA). The next day, fractions (500 µl each) were collected from the top to the bottom. Protein was precipitated from each fraction by adding the same volume of acetone, and incubated overnight at -20°C. Thereafter, precipitated protein was resuspended with 100 µl of loading buffer 1x (containing 10% β-mercaptoethanol) and processed by Western Blot.

Acknowledgements. We thank Francisco Lázaro-Diéguéz for critical reading of the manuscript; Miriam Esgles-Izquierdo and Darya Gorbenko del Blanco (University of Barcelona School of Medicine, Barcelona, Spain), and Agustín Hernández (Universidad Pablo Olavide, Sevilla, Spain) and Yuri Y. Sautin (University of Florida College of Medicine) for technical advices in cloning and immunoprecipitation experiments, respectively; Maite Muñoz for general technical support and to the personnel in charge of Plataformes Tecnològiques (Campus Casanova) for technical support with confocal microscopy and pH measurements, and Robin Rycroft for editorial assistance. This study was supported by grants BFU2009-07186 and 2012-33932 to G.E. C.S.-P. is recipient of a predoctoral fellowship from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad.

REFERENCES

- Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A. and Rothman, J. E.** (1984). Reconstitution of the Transport of Protein between Successive Compartments of the Golgi Measured by the Coupled Incorporation of N-Acetylglucosamine. *Cell* **39**, 405–416.
- Breton, S. and Brown, D.** (2007). New insights into the regulation of V-ATPase-dependent proton secretion. *Am J Physiol Ren. Physiol* **2790**, 1–10.
- Casey, J. R., Grinstein, S. and Orlowski, J.** (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 50–61.
- Chanson, A. and Taiz, L.** (1985). Evidence for an ATP-Dependent Proton Pump on the Golgi of Corn Coleoptiles. *plant physiol* **78**, 232–240.
- Chen, S.-H., Bubb, M. R., Yarmola, E. G., Zuo, J., Jiang, J., Lee, B. S., Lu, M., Gluck, S. L., Hurst, I. R. and Holliday, L. S.** (2004). Vacuolar H⁺-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B. *J. Biol. Chem.* **279**, 7988–98.
- Chhabra, E. S. and Higgs, H. N.** (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1110–21.
- Chichili, G. R. and Rodgers, W.** (2009). Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2319–28.
- Demaurex, N.** (2002). pH Homeostasis of cellular organelles. *News Physiol. Sci.* **17**, 1–5.
- Drory, O. and Nelson, N.** (2006). The emerging structure of vacuolar ATPases. *Physiology* **21**, 317–25.
- Egea, G., Lázaro-Diéguez, F. and Vilella, M.** (2006). Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 168–78.
- Egea, G., Serra-Peinado, C., Salcedo-Sicilia, L. and Gutiérrez-Martínez, E.** (2013). Actin acting at the Golgi. *Histochem. Cell Biol.* **140**, 347–60.

- Forgac, M.** (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 917–29.
- Gkantiragas, I., Brügger, B., Stüven, E., Kaloyanova, D., Li, X. Y., Löhr, K., Lottspeich, F., Wieland, F. T. and Helms, J. B.** (2001). Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1819–33.
- Glickman, J., Croen, K., Kelly, B. and Al-awqati, Q.** (1983). Golgi Membranes Contain an Electrogenic H⁺ Pump in Parallel to a Chloride Conductance. *J. Cell Biol.* **97**, 1303–1308.
- Holliday, L. S., Lu, M., Lee, B. S., Nelson, R. D., Solivan, S., Zhang, L. and Gluck, S. L.** (2000). The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H⁺-ATPase contains a filamentous actin binding site. *J. Biol. Chem.* **275**, 32331–7.
- Holliday, L. S., Bubb, M. R., Jiang, J., Hurst, I. R. and Zuo, J.** (2005). Interactions between vacuolar H⁺-ATPases and microfilaments in osteoclasts. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 419–23.
- Huang, C. and Chang, A.** (2011). pH-dependent cargo sorting from the Golgi. *J. Biol. Chem.* **286**, 10058–65.
- Hurley, D. and Taiz, L.** (1989). Immunocytochemical Localization of the Vacuolar H⁺-ATPase in Maize Root Tip Cells. *plant physiol* 391–395.
- Inoue, T., Wang, Y., Jefferies, K., Qi, J., Hinton, A. and Forgac, M.** (2005). Structure and regulation of the V-ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 393–8.
- Jefferies, K. C., Cipriano, D. J. and Forgac, M.** (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 33–42.
- Kane, P. M.** (1995). disassembly and reassembly of yeast ATPase.pdf. *J. Biol. Chem.* **270**, 17025–17032.
- Kane, P. M.** (2006). The Where , When , and How of Organelle Acidification by the Yeast Vacuolar H-ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 177–191.
- Kane, P. M.** (2012). Targeting Reversible Disassembly as a Mechanism of Controlling V-ATPase Activity. *Curr Protein Pept Sci* **13**, 117–123.

Kornak, U., Reynders, E., Dimopoulou, A., van Reeuwijk, J., Fischer, B., Rajab, A., Budde, B., Nürnberg, P., Foulquier, F., Lefeber, D., et al. (2008). Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. *Nat. Genet.* **40**, 32–4.

Lafourcade, C., Sobo, K., Kieffer-Jaquinod, S., Garin, J. and van der Goot, F. G. (2008). Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One* **3**, 2758.

Lazaro-Dieguez, F., Colonna, C., Cortegano, M., Calvo, M., Martinez, S. E. and Egea, G. (2007). Variable actin dynamics requirement for the exit of different cargo from the trans-Golgi network. *FEBS Lett.* **581**, 3875–3881.

Lázaro-Diéguez, F., Jiménez, N., Barth, H., Koster, A. J., Renau-Piqueras, J., Llopis, J. L., Burger, K. N. J. and Egea, G. (2006). Actin filaments are involved in the maintenance of Golgi cisternae morphology and intra-Golgi pH. *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**, 778–91.

Lee, B. S., Gluck, S. L. and Holliday, L. S. (1999). Interaction between Vacuolar H⁺-ATPase and Microfilaments during Osteoclast Activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 29164–29171.

MacLeod, K. J., Vasilyeva, E., Baleja, J. D. and Forgac, M. (1998). Mutational Analysis of the Nucleotide Binding Sites of the Yeast Vacuolar Proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**, 150–156.

Maeda, Y. and Kinoshita, T. (2010). *The acidic environment of the Golgi is critical for glycosylation and transport*. 1st ed. Elsevier Inc.

Maeda, Y., Ide, T., Koike, M., Uchiyama, Y. and Kinoshita, T. (2008). GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. *Nat Cell Biol* **10**, 1135–1145.

Marshansky, V. and Futai, M. (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 415–26.

Miesenbock, G., Angelis, D. A. De and Rothman, J. E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Lett. to Nat.* **394**, 192–195.

- Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B. and Echard, A.** (2010). Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* **12**, 645–54.
- Moriyamas, Y. and Nelsons, N.** (1989). H⁺-translocating ATPase in Golgi Apparatus. *J. Biol. Chem.* **264**, 18445–18450.
- Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M. and Takatsuki, A.** (1993). Folimycin (Concanamycin A), a Specific Inhibitor of V-ATPase, Blocks Intra-cellular Translocation of the Glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus before Arrival to the Golgi Apparatus. *Cell Struct. Funct.* **149**, 139–149.
- Nakamura, S.** (2004). Glucose activates H⁽⁺⁾-ATPase in kidney epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C97–105.
- Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K. and Kanazawa, H.** (2005). Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J. Biol. Chem.* **280**, 1561–72.
- Ono, M. and Hakomori, S.** (2004). Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. *Glycoconj. J.* **20**, 71–8.
- Orlowski, J. and Grinstein, S.** (2007). Emerging roles of alkali cation/proton exchangers in organellar homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 483–92.
- Palokangas, H., Metsikkö, K. and Väänänen, K.** (1994). Active vacuolar H⁺ATPase is required for both endocytic and exocytic processes during viral infection of BHK-21 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 17577–85.
- Paroutis, P., Touret, N. and Grinstein, S.** (2004). The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda)*. **19**, 207–15.
- Parra, K. J., Keenan, K. L. and Kane, P. M.** (2000). The H subunit (Vma13p) of the yeast V-ATPase inhibits the ATPase activity of cytosolic V1 complexes. *J. Biol. Chem.* **275**, 21761–7.
- Pérez-Sayáns, M., Suárez-Peñaranda, J. M., Barros-Angueira, F., Diz, P. G., Gándara-Rey, J. M. and García-García, A.** (2012). An update in the structure, function, and regulation of V-ATPases: the role of the C subunit. *Brazilian J. Biol.* **72**, 189–98.

Qi, J. and Forgac, M. (2007). Cellular environment is important in controlling V-ATPase dissociation and its dependence on activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 24743–51.

Rivinoja, A., Pujol, F. M., Hassinen, A. and Kellokumpu, S. (2012). Golgi pH, its regulation and roles in human disease. *Ann. Med.* **44**, 542–54.

Rubenstein, E. M. and Schmidt, M. C. (2010). The glucose signal and metabolic p[H⁺]lux. **29**, 2473–2474.

Sautin, Y. Y., Lu, M., Gaugler, A., Zhang, L. and Gluck, S. L. (2005). Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Effects of Glucose on Vacuolar H⁺-ATPase Assembly, Translocation, and Acidification of Intracellular Compartments in Renal Epithelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 575–589.

Sobota, J. a, Bäck, N., Eipper, B. a and Mains, R. E. (2009). Inhibitors of the V₀ subunit of the vacuolar H⁺-ATPase prevent segregation of lysosomal- and secretory-pathway proteins. *J. Cell Sci.* **122**, 3542–53.

Thompson, R. J., Nordeen, M. H., Howell, K. E. and Caldwell, J. H. (2002). A large-conductance anion channel of the Golgi complex. *Biophys. J.* **83**, 278–89.

Valderrama, F., Luna, A., Babía, T., Martinez-Menárguez, J. a, Ballesta, J., Barth, H., Chaponnier, C., Renau-Piqueras, J. and Egea, G. (2000). The golgi-associated COPI-coated buds and vesicles contain beta/gamma -actin. *PNAS* **97**, 1560–5.

Vasilyeva, E., Liu, Q., MacLeod, K. J., Baleja, J. D. and Forgac, M. (2000). Cysteine Scanning Mutagenesis of the Noncatalytic Nucleotide Binding Site of the Yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 255–260.

Vitavska, O., Wiczorek, H. and Merzendorfer, H. (2003). A novel role for subunit C in mediating binding of the H⁺-V-ATPase to the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **278**, 18499–505.

Vitavska, O., Merzendorfer, H. and Wiczorek, H. (2005). The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **280**, 1070–6.

Von Blume, J., Alleaume, A.-M., Cantero-Recasens, G., Curwin, A., Carreras-Sureda, A., Zimmermann, T., van Galen, J., Wakana, Y., Valverde, M. A. and Malhotra, V. (2011). ADF/cofilin regulates secretory cargo sorting at the TGN via the Ca²⁺ ATPase SPCA1. *Cell* **20**, 652–62.

Weisz, O. A. (2003). Organelle Acidification and Disease. *Traffic* **4**, 57–64.

Wilkins, S., Inoue, T. and Forgac, M. (2004). Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase. Localization of subunit H by difference imaging and chemical cross-linking. *J. Biol. Chem.* **279**, 41942–9.

Wu, M. M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R. Y., Moore, H. P. and Machen, T. E. (2001). Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 33027–35.

Xu, T. and Forgac, M. (2001). Microtubules are involved in glucose-dependent dissociation of the yeast vacuolar [H⁺]-ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 24855–61.

Yilla, M., Tan, a, Ito, K., Miwa, K. and Ploegh, H. L. (1993). Involvement of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPases in the secretory pathway of HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 19092–100.

Young, G. P. and Qiao, J. (1988). Purification and reconstitution of the proton-translocating ATPase of Golgi-enriched membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 9590–9594.

Zhang, F. and Schneider, D. L. (1983). The bioenergetics of Golgi apparatus function: Evidence for an ATP-dependent proton pump. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**, 620–625.

Zhao, Y.-Y., Takahashi, M., Gu, J.-G., Miyoshi, E., Matsumoto, A., Kitazume, S. and Taniguchi, N. (2008). Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer Sci.* **99**, 1304–10.

Zuo, J., Vergara, S., Kohno, S. and Holliday, L. S. (2008). Biochemical and functional characterization of the actin-binding activity of the B subunit of yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J. Exp. Biol.* **211**, 1102–8.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. V-ATPase is present in Golgi membranes and enriched in distal Golgi compartments. (A) Western blotting analysis for the presence of subunits A and B of V_1 domain and subunit a of V_0 domain in HeLa cells lysates (L) and in Golgi-enriched fractions (GM) from rat liver. (B) HeLa cells transfected with GFP-subunit B construct (expressed for 24 h) were fixed and stained with antibodies against *cis*- (GM130), *trans*-Golgi (Golgin97), or TGN (TGN46) markers. Bar, 10 μ m. C. Quantitative analysis of results shown in B from at least 45 cells/marker of three independent experiments.

Figure 2. V-ATPase subunit B depletion blocks post-Golgi trafficking of transmembrane and soluble secretory proteins. (A) Non-targeting siRNA (NT siRNA) transfected HeLa cells were subsequently transfected with Cherry-ts045VSV-G and incubated overnight at 40°C and then at 20°C for 2h, showing the viral protein accumulated in the ER and in the Golgi, respectively. When cells were shifted from 20 °C to 32°C for 90 min, VSV-G is seen in transport carriers and at the plasma membrane. Bar, 10 μ m. (B) HeLa cells were transfected with NT siRNA or siRNA-B for 72 h. Then, cells were pulse-labelled with [³⁵S]-Met/Cys, incubated at 19°C for 3 h and shifted to 37°C for 60 min. Secreted proteins of the culture medium and cell lysates were precipitated and quantified by scintillation counting. As positive control, the secretion assay was performed in cells treated with brefeldin A (BFA, 5 μ g/ml). Results are the mean \pm SD from three independent experiments. Significant differences with respect to the control (NT siRNA) using Student's *t* test; **p*<0.05 and ***p*<0.01.

Figure 3. Actin depolymerisation induces the disassociation of V_0 and V_1 domains (I). (A) HeLa cells treated with latrunculin B (LtB; 500 nM for 90 min), jasplakinolide (Jpk; 500 nM for 90 min) or cells starved of glucose and FBS (-Glu/FBS; for 4 h) were lysed and subjected to Western Blot (input), or immunoprecipitation with anti-subunit A antibodies and Western blotting to subunits a or A. A representative experiment is shown. (B) Quantitative analysis showing the ratio between V_0 and V_1 subunits (ratio a/A) from four independent experiments. Results are represented as means \pm SD. Statistical analysis using Student's *t* test vs control; ***p* \leq 0.01.

Figure 4. Actin depolymerisation induces the disassociation of V_0 and V_1 domains (II). Post-nuclear supernatants of HeLa cells untreated (C) or treated with latrunculin B (LtB; 1 μ M for 90 min) or jasplakinolide (Jpk; 1 μ M for 90 min) were ultracentrifuged and the pellet

(membrane fraction) and the supernatant (cytosol fraction) were submitted to SDS-PAGE. Western blotting was revealed with antibodies to transferrin receptor (TfR; membrane protein marker), Rho Guanidine dissociation inhibitor (RhoGDI; a cytosolic protein markers), and to subunits A and B. Quantitative results are represented as means \pm SD from four independent experiments. Statistical analysis using Student's *t* test vs control; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 5. Actin depolymerisation promotes the release of GFP-B subunit from the Golgi to the cytosol. (A) Representative sequential images of time-lapse microscopy of GFP-B expressing HeLa cells treated with latrunculin B (LtB; 500 nM) or cells that were grown in normal culture medium (control) or in medium without glucose and FBS (-Glu/FBS; 4 h). Bar, 10 μ m. (B) Inverse FRAP decay curves of the Golgi fluorescence from GFP-B shown in panel A. Golgi fluorescence values were obtained every 5 s and for a total period of 15 min. (C) Mobile fraction (MF) and $T_{1/2}$ (min) for GFP-B fluorescence at the Golgi. Statistical analysis vs control cells using the one-tail Student's *t* test; * $p \leq 0.05$.

Figure 6. Actin interacts with subunit C but not with subunit B of the V-ATPase V_1 domain. (A) F/G-actin fractionation of HeLa cells untreated (control) or treated with latrunculin B (LtB; 1 μ M; 90 min). Samples were submitted to Western blotting analysis for actin, subunit B and subunit C. Quantitative analysis of results shown in A. Statistical analysis using Student's *t* test of results vs respective control from three independent experiments; *** $p \leq 0.001$. (B and C) Co-immunoprecipitation experiments with anti-actin (IP: actin) or anti-subunit B (IP: subunit B) antibodies from HeLa cells lysates and subsequent Western blotting analysis for the presence of subunits B and C, and actin.

Figure 7. Disassociation V_1 - V_0 domains by actin depolymerisation also occurs by the disruption of DRM. (A) Detergent resistant membranes (DRM) were obtained from HeLa cells untreated or treated with latrunculin B (LtB; 1 μ M; 90 min) submitted to solubilisation in 1% Triton X-100 at 4°C. The Triton X-100 fractions were subsequently loaded at the bottom of a sucrose gradient as indicated in Material and Methods. After centrifugation, fractions were collected from the top and analysed by SDS-PAGE followed by Western blotting to detect caveolin 1 (cav-1), and subunits B and a. For GM1, dot-blot was carried out from each fraction collected and before the SDS-PAGE using cholera toxin-HRP. (B) Quantitative analysis examining the subunits B/a ratio present in DRM fractions (indicated with a red box in upper

figure). Statistical analysis using Student's *t* test of results vs control from three independent experiments; * $p \leq 0.01$.

Table1. Depletion of subunit B raises Golgi and TGN pH. Ratiometric measurements of the pH measured in the Golgi stack and in the TGN in HeLa cells expressing (72 h) non-targeting siRNA (NT siRNA) or siRNA to subunit B (siRNA-B). Thereafter, cells were transfected with Golgi-pHluorin or TGN-pHluorin constructs for 18 h. Data represents means \pm SD of at least three independent experiments. Significant differences with respect to NT siRNA (** $p \leq 0.001$), and to intra-Golgi pH ($p \leq 0.001$) using Student's *t* test. N, number of measured cells.

Figure 1

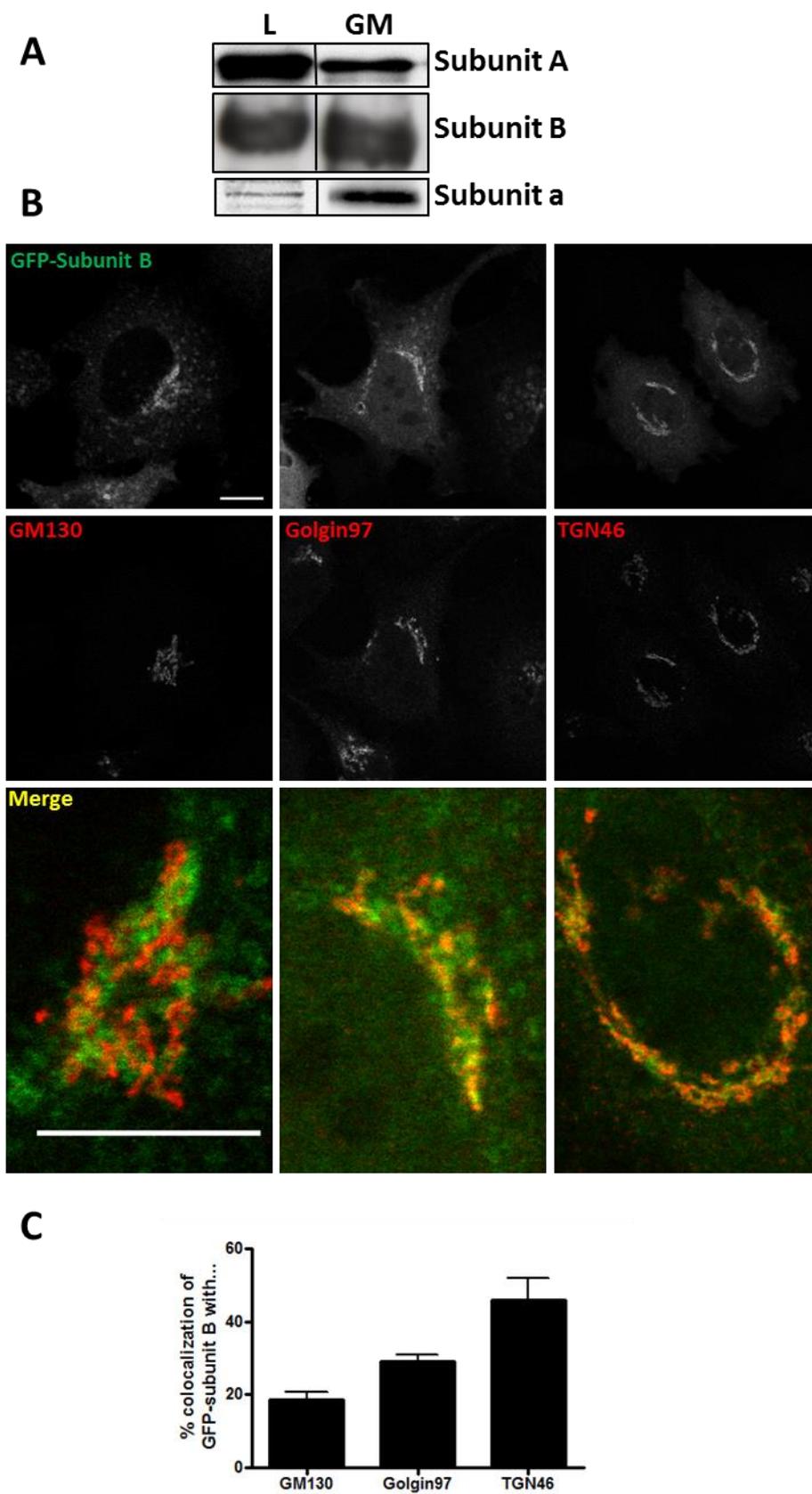


Figure 2

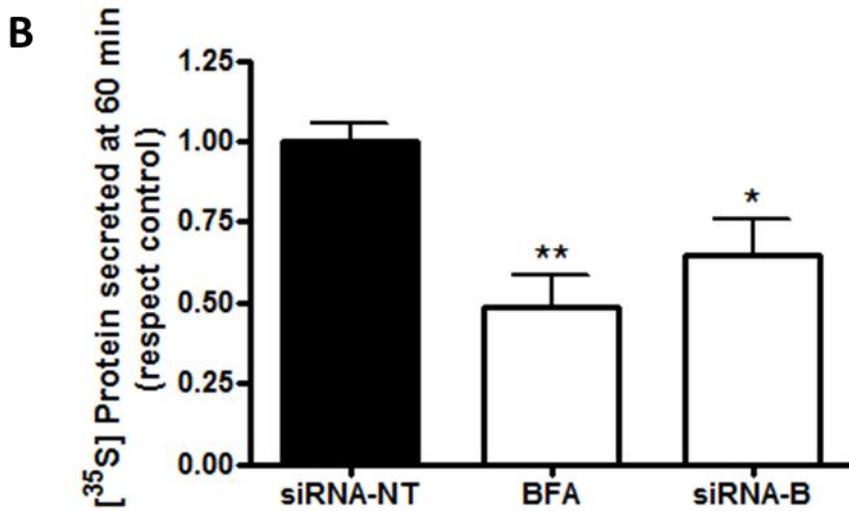
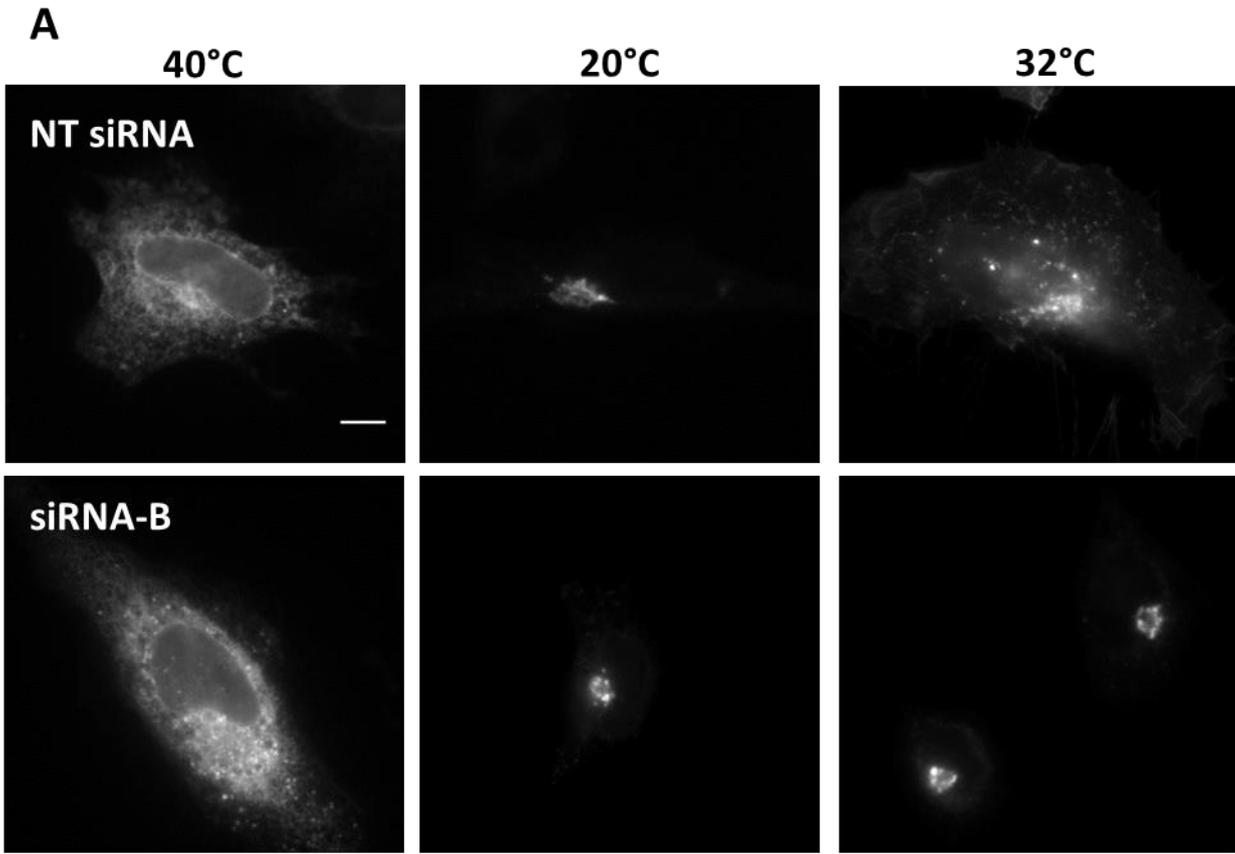


Figure 3

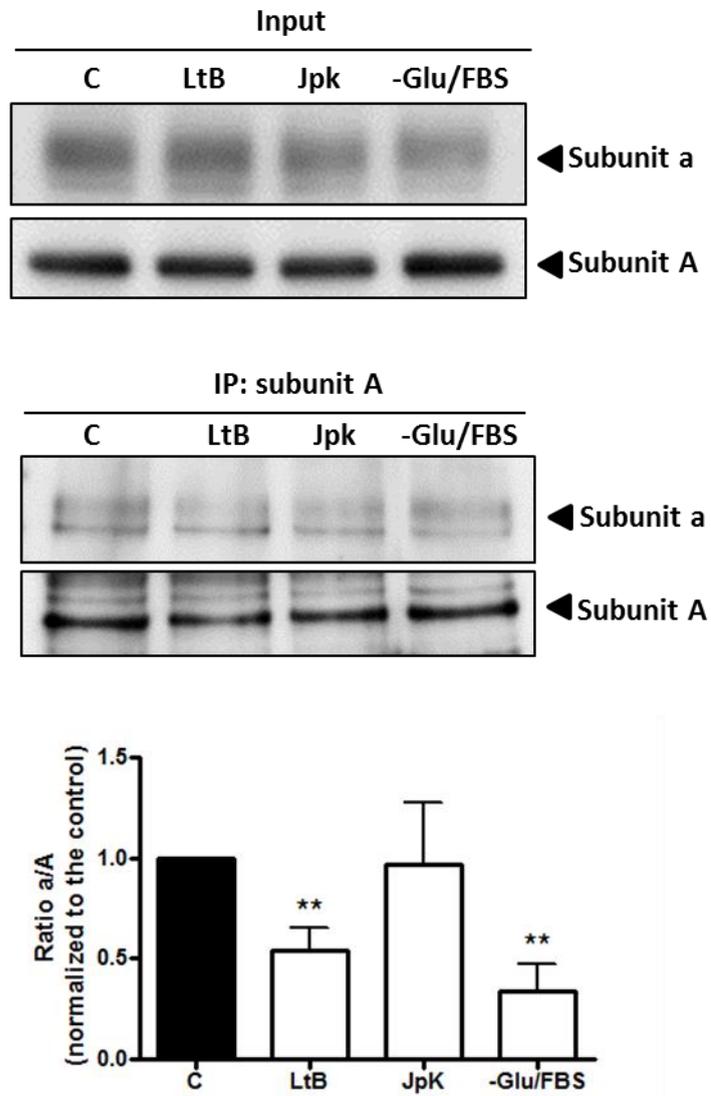


Figure 4

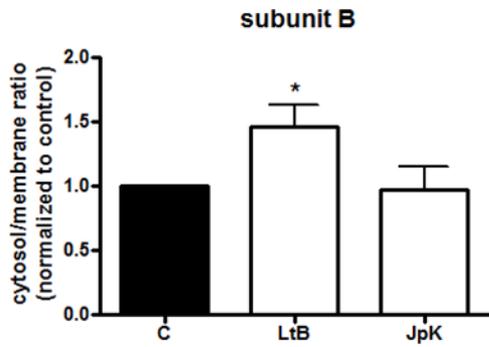
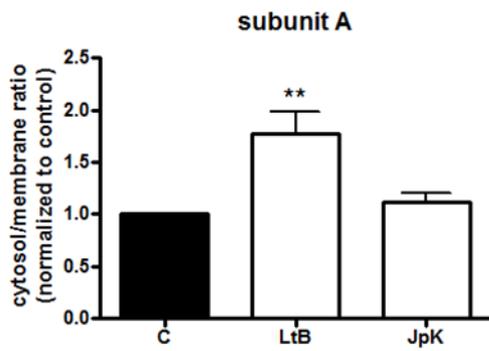
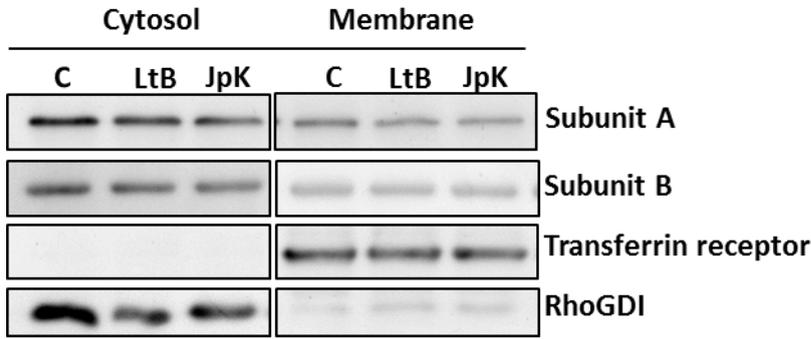
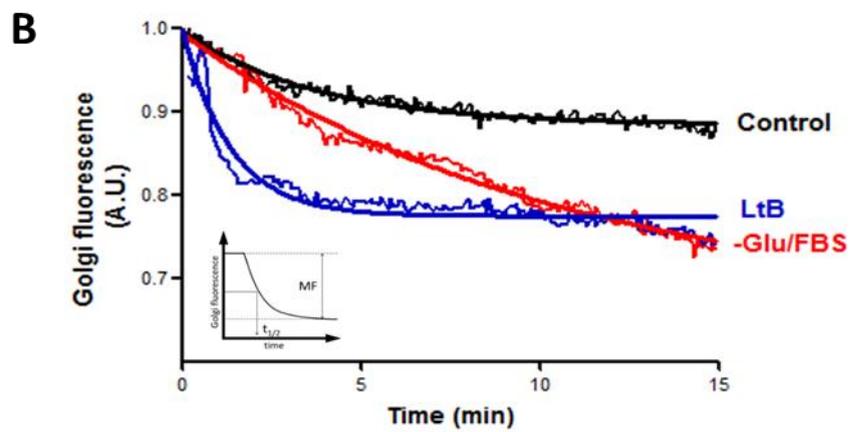
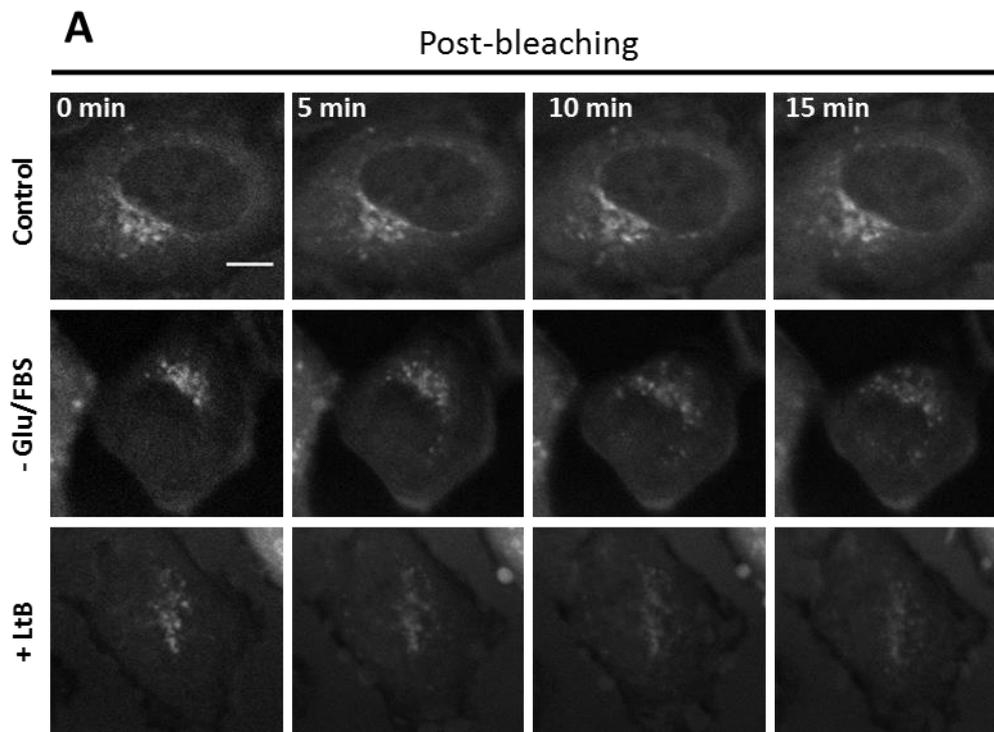


Figure 5



C

	MF	$T_{1/2}$ (min)
Control	0.037 ± 0.078 ($n=13$)	2,56
+ LtB	0.258 ± 0.077 ($n=8$)*	0,93
- Glu/FBS	0.264 ± 0.052 ($n=10$)*	7,19

Figure 6

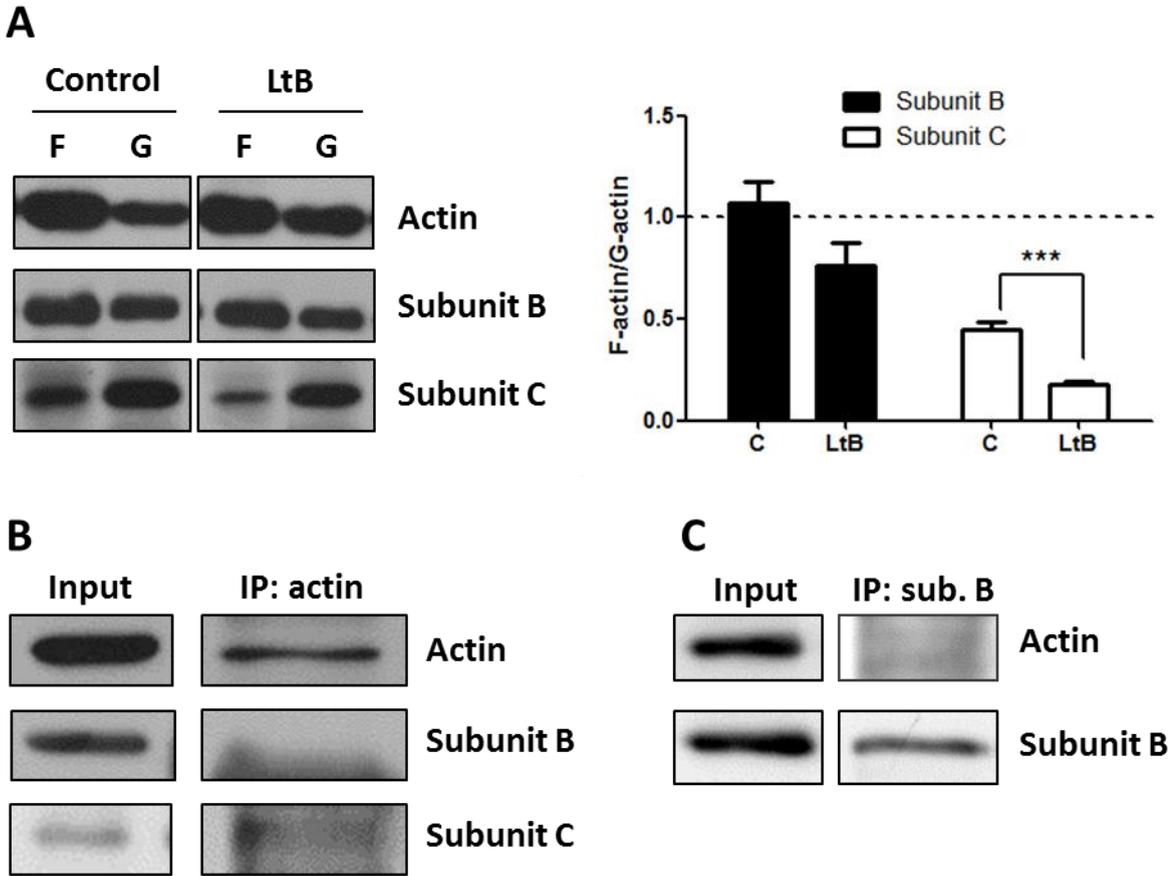


Figure 7

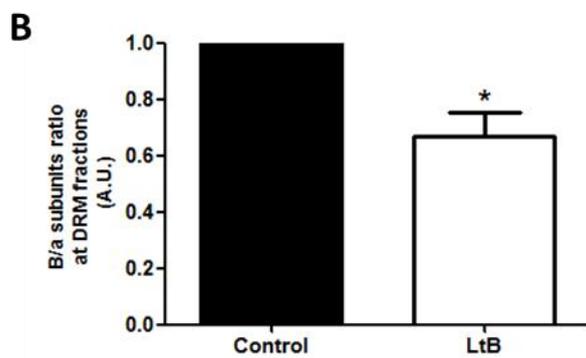
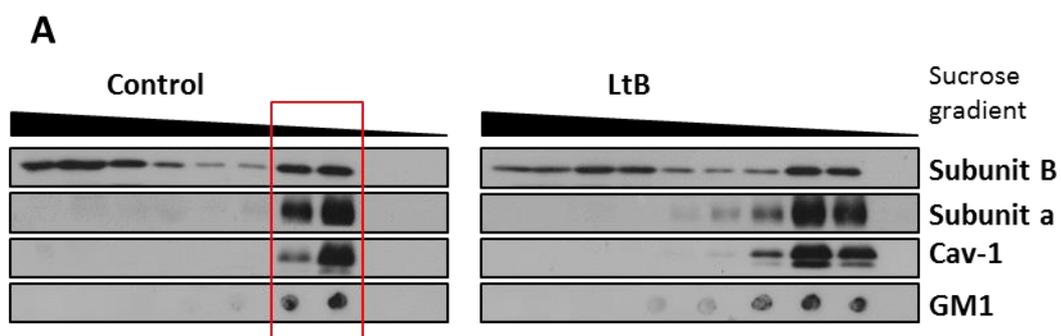


TABLE 1

	Intra-Golgi pH	Intra-TGN pH
NT siRNA	6.88 ± 0.07 (n=85)	6.16 ± 0.06 (n=32)[¶]
siRNA-B	7.50 ± 0.07 (n=94)^{***}	6.70 ± 0.07 (n=37)^{***,¶}

SUPPLEMENTARY MATERIAL

**ACTIN FILAMENTS REGULATE VACUOLAR H⁺-ATPase ACTIVITY AT THE
GOLGI COMPLEX**

Carla Serra-Peinado¹, Adrià Sicart^{1,4}, Juan Llopis³, Gustavo Egea^{1,2}

SUPPLEMENTARY FIGURES AND MOVIES

Supplementary Figure S1. GFP-tagged subunit B interacts with subunit A of the V-ATPase V₁ domain. Cells expressing for 24 h the subunit B tagged to GFP in the carboxyl (GFP-B) (A) or to the amino (B-GFP) (B) termini were lysed, immunoprecipitated with antibodies to GFP, and subsequently subjected to Western blotting for the presence of the V₁ domain subunit A with anti-subunit A antibodies.

Supplementary Figure S2. Silencing of subunit B of V-ATPase V₁ domain. Total cell lysates from HeLa cells previously transfected (72 h) with non-targeting siRNA pool (NT siRNA) or specific siRNA pool to subunit B were subjected to immunoblot analysis using antibodies to subunit B. Quantitative analysis of immunoblots is also shown. Values are the mean \pm SD from three independent experiments. Statistical analysis *vs* control (NT siRNA) using Student's *t* test, *** $p \leq 0.001$.

Supplementary Figure S3. Subunit B depletion does not alter anterograde transport of VSV-G from the ER to the Golgi. (A) Representative images of HeLa cells transfected with Cherry-ts045VSV-G and non-targeting (NTsiRNA) or subunit B (siRNA-B) siRNAs. After overnight incubation of cells at 40°C, temperature was shifted to 32°C and VSV-G protein was transported to the Golgi. Bar, 10 μ m. (B) Biochemical transport assay for VSV-G-GFP using Endo H assay. HeLa cells constitutively expressing VSV-G-GFP were transfected for 72 h with NT siRNA or siRNA-B and incubated at 40 °C for the last 24 h. Then, cells were shifted at 32 °C to induce the transport of VSV-G from the ER, lysed at indicated times, and subjected to Endo H treatment. *R* and *S* indicate Endo H-resistant and Endo H-sensitive forms, respectively. The ratio of the amount of Endo H-resistant form to that of total (*R* + *S*) amount is plotted. Values are represented as the mean \pm SD of three independent experiments and no significant differences were found.

Supplementary Figure S4. Actin depolymerisation induces disassociation of V₀ and V₁ domains. HeLa cells treated with latrunculin (LtB; 1 μ M for 90 min), jasplakinolide (Jpk; 1 μ M for 90 min) or cells starved of glucose and FBS (-Glu/FBS; for 4 h) were lysed and subjected to immunoprecipitation with anti-subunit B antibodies and subsequent Western blotting to subunits a (V₀ domain) or B (V₁ domain) as indicated in Fig. 3. Here we show the ratio between V₀ and

V₁ subunits a and B, respectively, from four independent experiments. Results are represented as means ± SD. Statistical analysis using Student's *t* test vs control; ***p* ≤ 0.01 and ****p* ≤ 0.001.

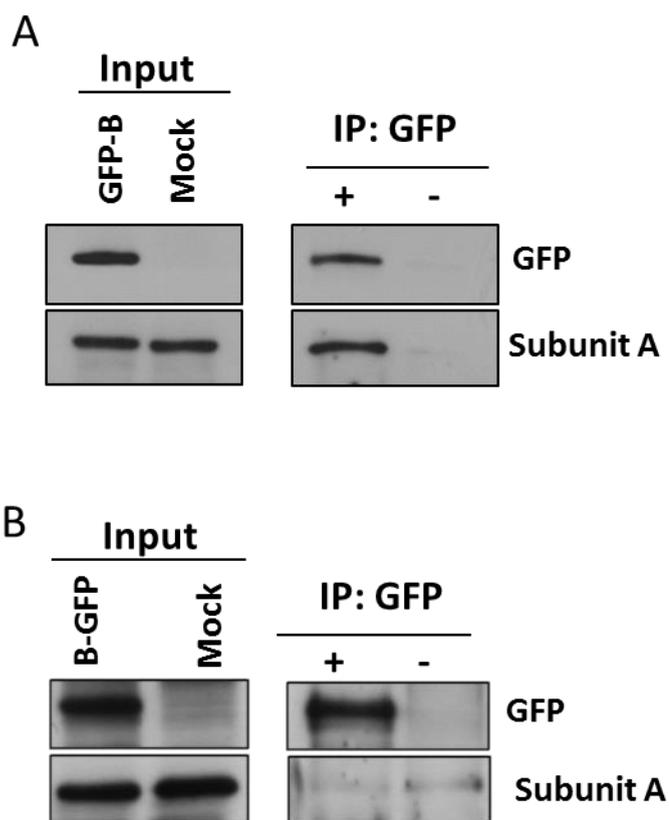
Supplementary Figure S5. GFP-B subunit lacking the actin-binding domain does not localize to the Golgi. HeLa cells were transfected with GFP-B or GFP-B lacking its actin-binding domain (GFP-B ΔABD) for 24 h fixed and stained with antibodies against TGN (TGN46) protein and visualized under the confocal microscope. *Bar*, 10 μm. B. Cells expressing for 24 GFP-B ΔABD were lysed, immunoprecipitated with antibodies to subunit A, and subsequently subjected to Western blotting analysis for the presence of the GFP-B ΔABD with anti-GFP antibodies.

Movie 1. Time-lapse microscope of HeLa cells expressing GFP-B.

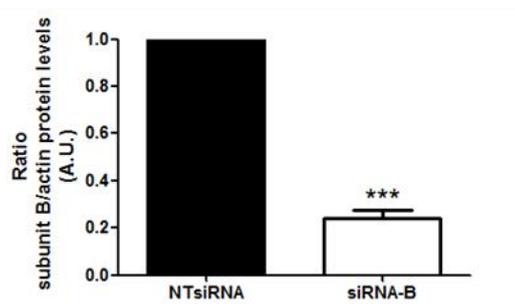
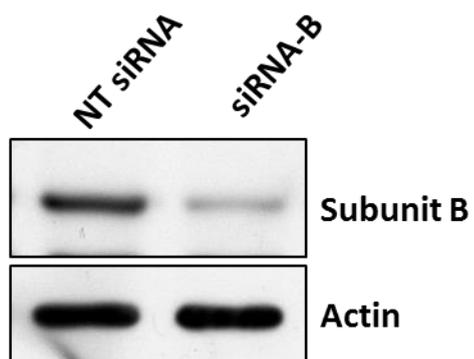
Movie 2. Time-lapse microscope of HeLa cells expressing GFP-B and cultured in the absence of glucose and FBS (-Gluc/FBS).

Movie 3. Time-lapse microscope of HeLa cells expressing GFP-B and treated with latrunculin B (LtB).

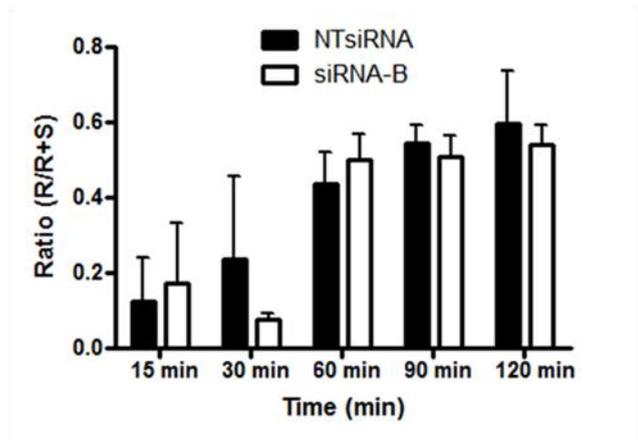
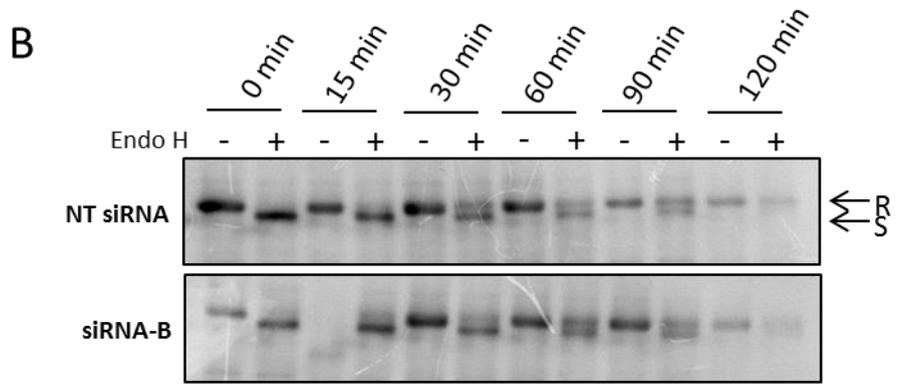
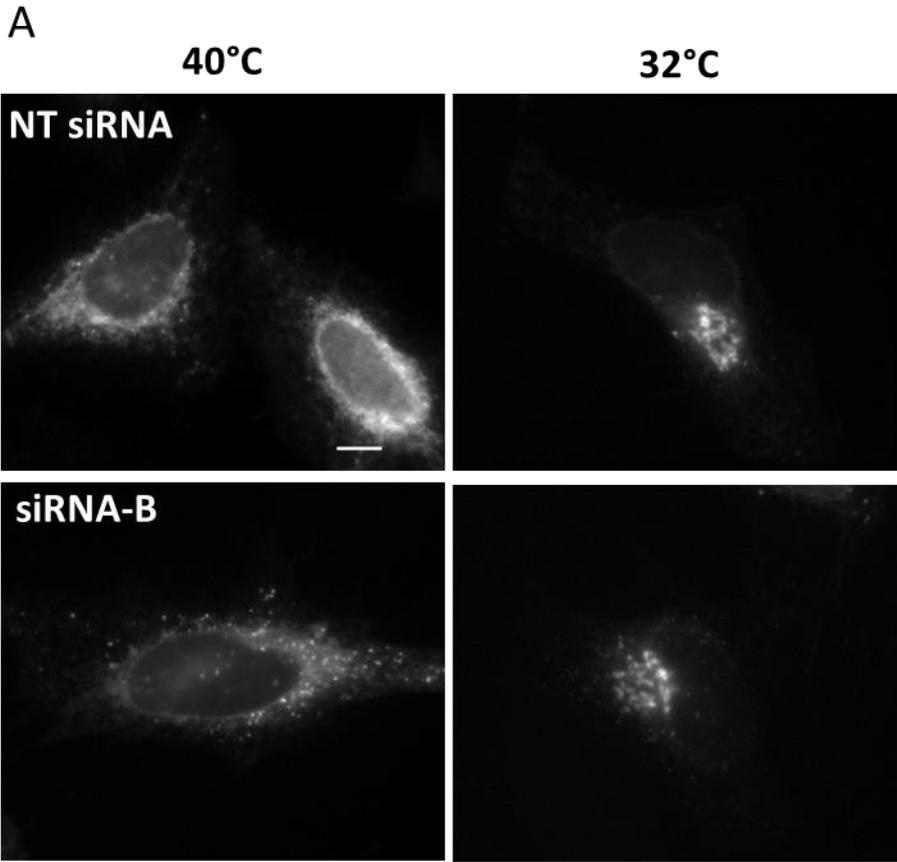
Supplementary S1



Supplementary S2

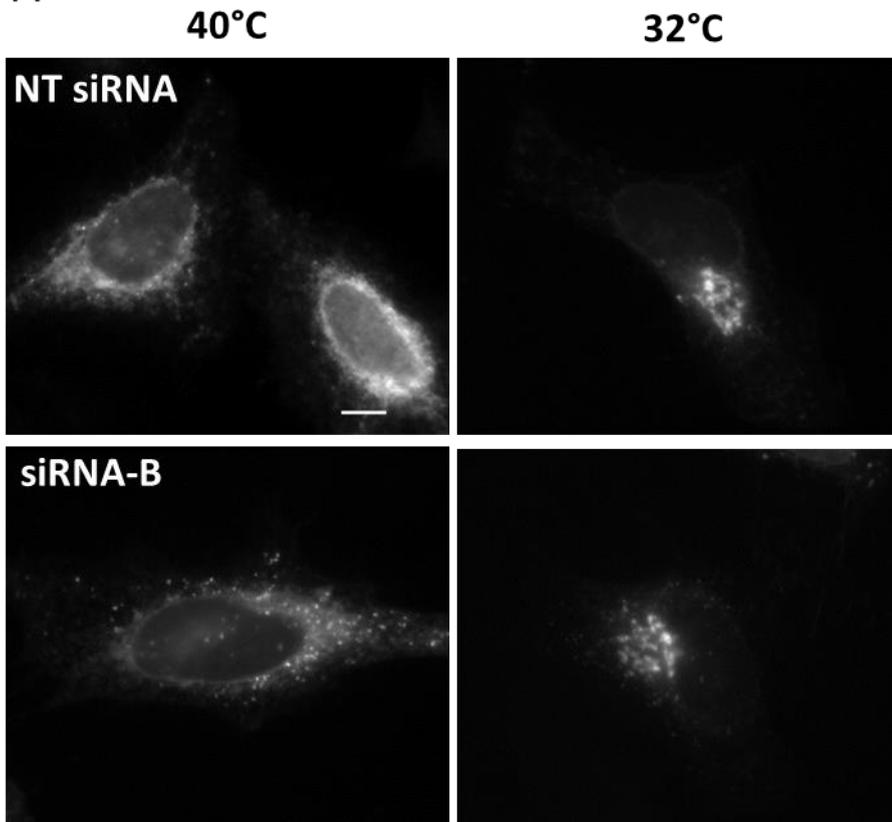


Supplementary S3

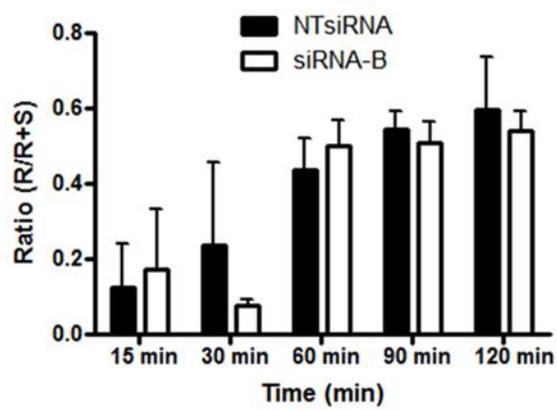
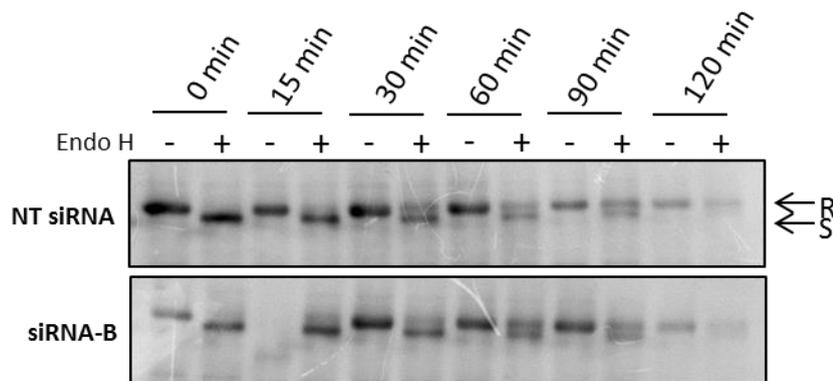


Supplementary S3

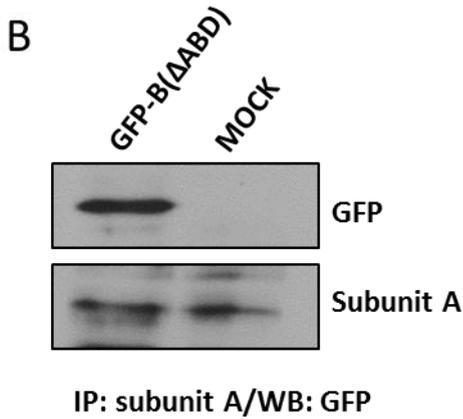
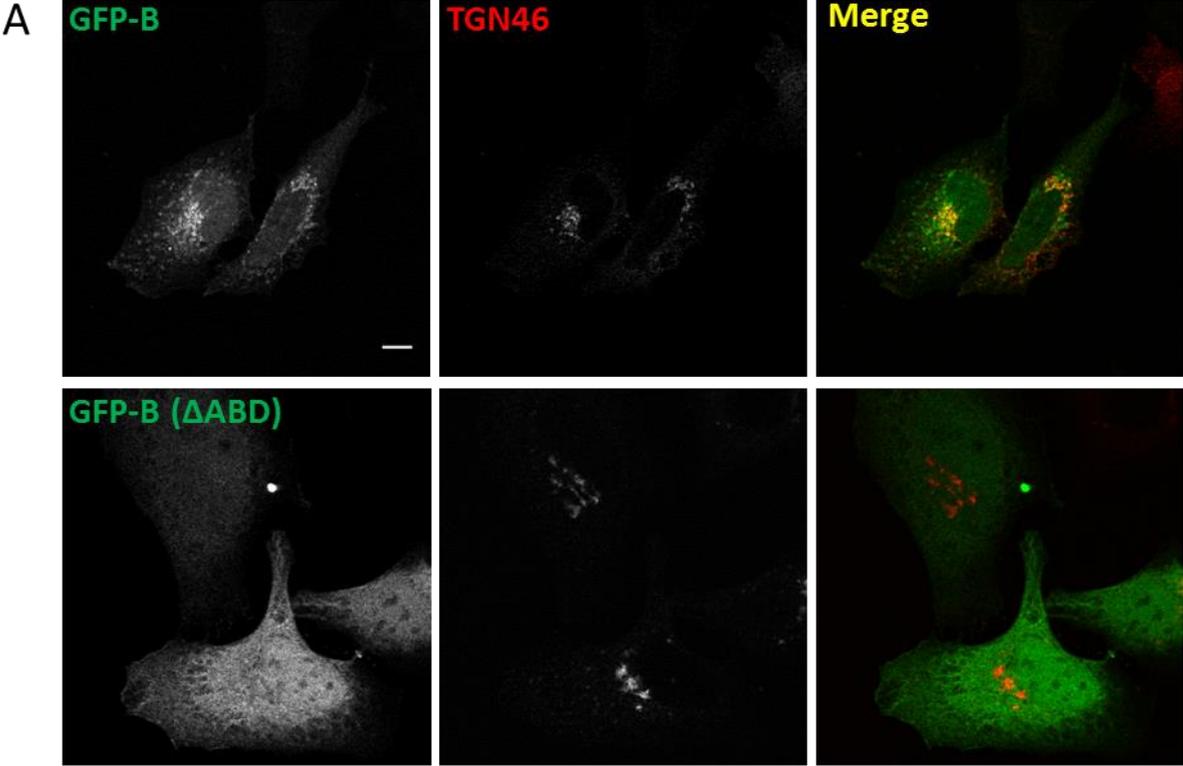
A



B



Supplementary S4



Artículos que se han publicado a lo largo de esta tesis:

Histochem Cell Biol (2013) 140:347–360
DOI 10.1007/s00418-013-1115-8

REVIEW

Actin acting at the Golgi

Gustavo Egea · Carla Serra-Peinado ·
Laia Salcedo-Sicilia · Enric Gutiérrez-Martínez

Accepted: 3 June 2013 / Published online: 27 June 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The organization, assembly and remodeling of the actin cytoskeleton provide force and tracks for a variety of (endo)membrane-associated events such as membrane trafficking. This review illustrates in different cellular models how actin and many of its numerous binding and regulatory proteins (actin and co-workers) participate in the structural organization of the Golgi apparatus and in trafficking-associated processes such as sorting, biogenesis and motion of Golgi-derived transport carriers.

Keywords Golgi apparatus · Cytoskeleton · Actin · Spectrin · Myosin · Rho GTPases

Introduction

The function of the Golgi apparatus is the result of a complex interaction between the molecules that establish its architecture, those that determine protein transport and those that integrate signals from either outside or inside the cell. Cytoskeletal elements (microtubules, actin filaments or microfilaments and intermediate filaments) integrate these processes. Association and coordination between them as well as their respective binding and regulatory

proteins are present in the majority of endomembrane systems, including the Golgi apparatus. While its basic function is highly conserved, the Golgi varies greatly in shape and number from one organism to another. Briefly, it ranges from dispersed cisternae or isolated tubular networks as occurs in algae, protozoa and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, to a pile of flattened cisternae aligned in parallel and known as the Golgi stack. This, depending on the organism examined, could be present in a single (fungi and the yeast *Pichia pastoris*) or multiple copies, the latter being scattered throughout the cytoplasm (plants and *Drosophila*) or organized as a ribbon around centrioles (vertebrates) (daSilva et al. 2004; Hawes and Satiat-Jeunemaitre 2005; He et al. 2004; He 2007; Henderson et al. 2007; Kondylis and Rabouille 2003; Ladinsky et al. 1999; Lowe 2011; Mogelsvang et al. 2003; Pelletier et al. 2002; Preuss et al. 1992; Rambourg and Clermont 1986; Rambourg et al. 2001; Ramírez and Lowe 2009; Rios and Bornens 2003; Rossanese et al. 1999). The cytoskeleton determines the location of the Golgi, and depending on the cellular model, either microtubules or actin filaments have the greater influence (Egea and Rios 2008), the impact of intermediate filaments being very limited (Gao and Sztul 2001; Gao et al. 2002; Styers et al. 2006; Toivola et al. 2005). Historically, microtubules were the first cytoskeleton element to be linked to the Golgi structure and function (Thyberg and Moskalewski 1999), and only later was it firmly established that actin and associated proteins (actin et al.) also played a significant role (for recent reviews see Brownhill et al. 2009; Egea et al. 2006; Harris and Tepass 2010; Hehnly and Stamnes 2007; Lanzetti 2007; Loubéry and Coudrier 2008; Myers and Casanova 2008; Ridley 2006; Smythe and Ayscough 2006; Soldati and Schliwa 2006). Here, we provide an up-to-date overview of the structural and transport consequences of the coupling

G. Egea (✉) · C. Serra-Peinado · L. Salcedo-Sicilia ·
E. Gutiérrez-Martínez
Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i
Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona,
C/Casanova, 143, 08036 Barcelona, Spain
e-mail: gegea@ub.edu

G. Egea
Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS)
i de Nanociència i Nanotecnologia (IN²UB), Universitat de
Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

Dispatch
R741

project to both streams. Independence between dorsal and ventral streams will generally only become apparent in normal observers (with intact brains) when responses are so speeded that there is not time for interaction through these pathways to occur. Neither the presence of these connections nor evidence such as that found by Gallivan and his colleagues invalidates Milner and Goodale's two visual systems hypothesis. Gallivan's findings, do, however, highlight the need to avoid overly simplistic interpretations of it.

References

- Milner, A.D., and Goodale, M. (1995). *The Visual Brain in Action* (Oxford: Oxford University Press).
- Gallivan, J.P., Cant, J.S., Goodale, M.A., and Flanagan, J.R. (2014). Representation of object weight in human ventral visual cortex. *Curr. Biol.* 24, 1866–1873.
- Haxby, J.V., Gobbini, M.I., Furey, M.L., Ishai, A., Schouten, J.L., and Pietrini, P. (2001). Distributed and overlapping representations of faces and objects in ventral temporal cortex. *Science* 293, 2425–2430.
- Eacott, M.J., and Heywood, C.A. (1995). Perception and memory: Action and interaction. *Crit. Rev. Neurobiol.* 9, 311–320.
- Hodges, J.R., Bozeat, S., Lambon Ralph, M.A., Patterson, K., and Spatt, J. (2000). The role of conceptual knowledge in object use: Evidence from semantic dementia. *Brain* 123, 1913–1925.
- Cavina-Pratesi, C., Kenridge, R.W., Heywood, C.A., and Milner, A.D. (2010). Separate processing of texture and form in the ventral stream: evidence from FMRI and visual agnosia. *Cereb. Cort.* 20, 433–446.
- Cavina-Pratesi, C., Kenridge, R.W., Heywood, C.A., and Milner, A.D. (2010). Separate channels for processing form, texture, and color: evidence from FMRI adaptation and visual object agnosia. *Cereb. Cort.* 20, 2319–2332.
- Kenridge, R.W., Thomson, R., and Heywood, C.A. (2012). Glossiness perception can be mediated independently of cortical processing of colour or texture. *Cortex* 48, 1244–1246.
- Nishio, A., Goda, N., and Komatsu, H. (2012). Neural selectivity and representation of gloss in the monkey inferior temporal cortex. *J. Neurosci.* 32, 10780–10793.
- Cant, J.S., and Goodale, M.A. (2007). Attention to form or surface properties modulates different regions of human occipitotemporal cortex. *Cereb. Cort.* 17, 713–731.
- Cant, J.S., Amott, S.R., and Goodale, M.A. (2009). fMRI-adaptation reveals separate processing regions for the perception of form and texture in the human ventral stream. *Exp. Brain Res.* 192, 391–405.
- Goda, N., Tachibana, A., Okazawa, G., and Komatsu, H. (2014). Representation of the material properties of objects in the visual cortex of nonhuman primates. *J. Neurosci.* 34, 2660–2673.
- Cloutman, L.L. (2013). Interaction between dorsal and ventral processing streams: Where, when and how? *Brain Language* 127, 251–263.

Department of Psychology, Durham University, Durham DH1 3LE, UK.
E-mail: Robert.Kenridge@durham.ac.uk

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.070>

Golgi Apparatus: Finally Mechanics Comes to Play in the Secretory Pathway

New findings report a mechanical role for actin in Golgi organization and vesicular trafficking. An elegant study uses optical tweezers and live-cell imaging to demonstrate the effects of a mechanical constraint on the dynamics of secretory membrane trafficking, combining physical experimental approaches with *in cellulo* studies of endomembranes.

Gustavo Egea*
and Carla Serra-Peinado

In the last 30 years, a huge amount of progress has been made in the identification and mechanistic understanding of molecular components that participate in the trafficking of lipids and proteins along the secretory pathway. The importance of membrane trafficking in health and disease was recognized last year with the Nobel Prize in Medicine and Physiology to well-known and recognized pioneers of the field (Randy Schekman, James Rothman and Thomas Südhof). One might therefore be tempted to think that the field of membrane trafficking no longer holds any great new 'surprises' or insights and might even fall into a state of lethargy (if not of decadence). But what an incorrect assumption! There is at least one aspect that still remains largely elusive in membrane trafficking: the contribution and

functional relevance of physical forces on the shape, organization, and function of endomembranes. Published studies [1–3] have undoubtedly provided (and continue to provide) great progress in addressing the contribution of membrane tension and curvature to coat-induced budding and molecular sorting and to membrane fission of transport carriers ([4] and references therein). In a recent issue of *Current Biology*, an elegant study by Guet *et al.* [5] combining physical approaches with confocal microscopy in living cells reveals that Golgi membranes are flexible and mechanically coupled, that actin confers rigidity to the Golgi apparatus, and that a mechanical constraint produces a switch from vesicular to tubular trafficking, linking forces with membrane fission.

On one hand, when we think of 'forces' in the cell, the main subcellular contributor is the

cytoskeleton, composed largely of two highly dynamic (and regulated) polymers —microtubules and actin filaments. On the other hand, when we think of membrane trafficking in the secretory pathway, the Golgi apparatus immediately comes to our mind. In most organisms, the Golgi is composed of one or more stacks of closely apposed flattened membranes called cisternae. In animal cells, these stacks are arranged end to end to form the 'Golgi ribbon'. It is well known that the cytoskeleton has a significant role in structuring the Golgi apparatus: microtubules participate in the lateral connection of the Golgi ribbon and in its polarity, and actin filaments are involved in the maintenance of the flattened shape of cisternae [6,7]. Accompanying both cytoskeletal elements is the Golgi matrix, the structural scaffold that provides proteinaceous cross-bridges linking adjacent Golgi cisternae. Members of the Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) and golgin families of proteins are components of the matrix [8]. These peripheral membrane proteins, together with microtubules and actin filaments (and their respective motors), stack the Golgi cisternae together.

Gaining insight into cellular membranes and their organization requires a combination of physical and cell biological approaches. Optical tweezers [9] allow for tight



CrossMark

