



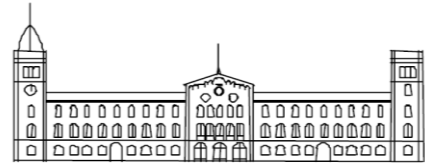
# El citoesqueleto de espectrina y el complejo de Golgi. Implicaciones en su arquitectura y funcionalidad en el transporte secretor

Laia Salcedo Sicilia

**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](http://www.tdx.cat)) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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](http://www.tdx.cat)) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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](http://www.tdx.cat)) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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

**EL CITOESQUELETO DE ESPECTRINA Y EL  
COMPLEJO DE GOLGI.  
IMPLICACIONES EN SU ARQUITECTURA Y  
FUNCIONALIDAD EN EL TRANSPORTE  
SECRETOR**

**Tesis presentada por Laia Salcedo Sicilia  
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

Laia Salcedo Sicilia

**Programa de Doctorado de Biomedicina**



*Als meus pares*

*Al meu germà*

*Al Carles*





*¡Cómo pasan los años...qué raudos y voraces!*

*¡Cómo pasa la vida!*

*A veces pienso que quizás el encanto de la vida  
está precisamente en este pasar rápido,  
en este desaparecer diario de todo lo que existe y vive, reflejado  
en las imágenes con que ahora nos deleitamos.*

*Onèsim Sicilia*



## **AGRADECIMIENTOS**

---



Aquesta tesi no hagués sigut possible sense l'ajut i el suport de moltes persones a les que vull expressar la meua gratitud. D'alguna manera, tots ells formen part d'aquestes pàgines i del record d'aquests anys d'aprenentatge, treball i amistat.

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies al Gustavo per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi al seu laboratori. Gràcies per haver confiat en mi des del primer dia, per la teua inquietud i pels teus coneixements, per la teua paciència i sobretot per haver-me facilitat totes les eines necessàries per a poder tirar endavant aquest projecte. Gràcies també per oferir-me l'oportunitat de fer les estades a l'estranger, han estat una de les millors experiències tant personals com professionals que he viscut durant aquesta tesi.

Gràcies a tots els compis del meu grup. Als que ja no hi sou i als que encara esteu al peu del canó. A la Susana Martínez, que em vas rebre amb els braços oberts i amb qui vaig compartir la primera etapa de la meua tesi. Al Sergi, companys de carrera i de laboratori, l'altre "peli" del grup! Moltes gràcies pel teu bon humor i pel teu somriure. Per seguir amb la tradició, espero poder donar-te una altra gran notícia la propera vegada que ens veiem! Al Frank, el personatge més carismàtic del grup. Gràcies per les lliçons de microscòpia i per aquella tarda en que van saltar les xispes! A l'Inés, companya i amiga, la més valenta del grup. Una curranta nata. Moltes gràcies per tot el que m'has ensenyat, per la teua força i energia, ets un exemple a seguir. Gràcies per escoltar-me i aconsellar-me i per veure sempre el got mig ple. Estic convençuda que ens retrobarem aviat en alguna gran ciutat, ja sigui a París, a Heidelberg o a Bangkok! També voldria agrair al Juan Ma l'haver-me donat un cop de mà amb la biologia molecular. Una font infinita de coneixements, gràcies pel teu suport i les teves idees. Una persona important que ha fet tirar endavant aquest projecte i a qui estic molt agraïda és la Susana Granell. De la teua mà va començar la segona etapa de la meua tesi. Moltes gràcies per ensenyar-me tot el que sabies, per guiar-me quan em vaig sentir perduda, per animar-me en els moments més durs, encara ara, que estàs a milers de quilòmetres d'aquí. També t'he de donar les gràcies per acollir-me a casa teua durant la meua estada americana! Little Rock, Arkansas, no hauria sigut el mateix sense tu! I al Boo, per no deixar-me morir de gana i preparar-me aquells tappers d'estofat de cérvol! La meua mare també t'ho agraeix, je je! Gràcies a la Bet, la veterana del grup, per estar sempre disposada a ajudar i per ser tan crítica i rigorosa. La teua passió per la ciència és admirable. No puc deixar d'esmenar a l'Enric, el nocturn del laboratori. Vam començar a la vegada aquesta aventura que és la tesi, et desitjo sort en els teus projectes. També vull donar les gràcies a la Carla, la benjamina del grup. Gràcies per ajudar-me durant uns mesos amb el projecte de l'espectrina. Sense tu no hagués pogut fer tantes immunos, quantes plaques de 24 vam arribar a fer? Has evolucionat molt en aquest temps, segueix així que ho aconseguiràs. Tira endavant amb força i que tinguis

moltíssima sort, ànims! Una altra persona important durant aquests cinc anys ha sigut el Javi. Vaig ser la teva ombra els primers mesos, em vas ensenyar a fer immunos i westerns. Recordes el dia que es van “fondre” els llums i vam fer les immunos amb la lampadeta d’escriptori? Je je, tranqui que no em xivaré! Gràcies per la teva ajuda i pel teu suport incondicional, ets un bon company i amic. Et desitjo el millor a tu i a les teves precioses nenes. També està la Jèssica, l’últim fixatge de la temporada. Moltes gràcies per la teva complicitat, pels ànims que m’has donat des del primer dia i pels consells a l’hora d’escriure. I no puc deixar-me la Roser, la menorquina del grup! Moltes gràcies per les sobrassades, els formatges, les ensaïmades i totes les coses bones que ens portes! Gràcies a tu anem tots amb el calçat oficial del lab, les menorquines! Aquestes aniran a Bangkok eh! Gràcies per ser tan maca i pel teu bon caràcter! FuGim? Je je je, que tinguis molta sort! Definitivament aquesta tesi no hagués sigut la mateixa sense el meu germà petit adoptiu, l’Adrià. Gràcies pels innombrables favors que m’has fet, per la teva amistat incondicional, per ajudar-me en tot, pel teu sentit de l’humor i pels marujeos, per totes les bones estones que hem passat junts i per ser el millor amic. Ens hem rigut molt! Només et puc dir una cosa: ¡¡GRACIAS!! No poden faltar unes paraules per la Maite, una de les persones més valuoses del grup. Gràcies a tu la vida al laboratori és molt més fàcil! Quan no hi ets, el lab es converteix en un camp de batalla! Moltíssimes gràcies per tot.

També estic agraïda al Jordi i a tots els membres del seu grup; al Pep, a l’Esther i a la Sílvia per tots els moments compartits.

A l’Histo lab no només hi som els Gustavos, sinó que coexistim amb el grup de Huntington. A ells també els hi dec el fet d’haver arribat fins aquí. Gràcies als que ja no hi sou però que esteu presents cada dia, com l’Emparitu, la valenciana més divertida amb aquest sentit de l’humor tan teu. Com podia ser que t’assabentessis sempre de tot? També hi ha el tàndem Paola-Íngrid amb les que he compartit molts sopars, festes i birretes. Gràcies per estar pendents de la meva tesi, per preguntar com va tot, per mantenir el contacte. Sou estupendes, je je! A l’Olga, sempre tan calmada i de bon humor i a la Bego, la bioquímica convertida en nutricionista. I també al Dani, quin personatge! El mateix t’explicava un acudit com et parlava de l’últim paper que s’havia llegit. Als que encara esteu al peu del canó, gràcies per fer que l’ambient del laboratori sigui tan bo! Gràcies als habitants del mini-lab: l’Albert, el rei dels papers, el meu “veí” del Putxet! Ara ja podràs anar a passejar el gos tranquil, je je! L’Ana, la mami del laboratori. Moltes gràcies per la teva companyia, per estar disposada a donar-me un cop de mà i per donar-me ànims. Ets una investigadora brillant, t’admiro molt! El Shiraz, the most international student in the lab! Good luck with the PhD. El Rafa i el Jordi, els nens de la Laura, sempre tan emocionats per aprendre coses noves. Gràcies per la vostra efusivitat, tanta que fins i tot ja teniu cicatrius de “guerra”, oi Rafa? I la Laura, la meva germaneta de doctorat, com

diu ella! Sóc afortunada d'haver compartit la tesi amb tu. Gràcies per tots els bons moments que hem compartit, per ajudar-me amb l'estadística i per ser tan bona companya. Ah, i el més important, moltes gràcies per haver-te ficat whatsapp, així no haurem d'explicar-te els cotis mil vegades, que aleshores et poses molt pesada! Et prenc la paraula i et guardo lloc sota la palmera eh! No em puc deixar d'anomenar la parella Mar-Marta. Lluitadores, divertides, genials i autèntiques. La Mar, l'empatia personificada, sempre estàs allà per pujar els ànims de tots. Moltes gràcies pel bon rotllo que aportes, per ser la millor companya i per donar-me tants ànims en els pitjors moments. I la Marta, la més sincera, gràcies per dir les coses tal com són (ara ja sé com he de dur les samarretes blanques, je je!), per estar disposada a escoltar i ajudar als altres. Moltes gràcies per totes les tardes a l'Ascot, per les braves i les birres, per les xerrades que s'allarguen fins tard intentant canviar el món. També vull donar les gràcies a la Cheru (pero no a tu hermana gemela eh!) pel teu sentit de l'humor tan esbojarrat i per ensenyar-nos italià. Que tinguis molta sort! I a la Vero, per les xerradetes sobre la nostra vida i per ensenyar-me a utilitzar el reference manager!

Tot i que no he compartit laboratori amb vosaltres, m'agradaria donar les gràcies al laboratori de la tercera. A les veteranes Raquel i Cristina, gràcies per les estones compartides. A la Míriam, moltíssimes gràcies per ajudar-me amb els meus mutants, sense tu no ho hagués aconseguit! Molta sort amb els nous projectes! A la Mònica i l'Ana, tan currantes, gràcies! I a la nova fornada Gerardo, Andy, Marco i Laetitia, que tingueu sort.

També estic agraïda a la Núria i la Carme, les millors secretes, sempre ajudant amb tota la paperassa de beques, tesis i comandes.

Durant aquests anys de tesi, els amics de sempre i la família també m'han acompanyat i m'han donat suport cada dia. Moltes gràcies a les nenes, la Miri i la Laura. Gràcies pels dinars dels divendres al costat del Clínic, per creure en mi i per ser sempre al meu costat. Gràcies al Jordi, que estàs lluitant per aconseguir allò que realment et fa feliç. Ets molt valent, ànims! I el Toni, amic incondicional, gràcies per animar-me en tot moment. També voldria donar les gràcies a la Mireia, l'alegria en persona, sempre tan positiva. Molta força que ja arribes al final! I no em puc oblidar de la colla de tianerus, gràcies pels bons moments i per fer un gran esforç per entendre què és tot això de la recerca i les tesis doctorals.

Finalment, no puc deixar d'anomenar els meus pares. Només ells saben el que ha significat aquesta tesi per a mi. A vosaltres us dec el ser com sóc. Gràcies per ensenyar-me el valor de l'esforç i la tenacitat, el valor de lluitar sempre per aconseguir allò que es vol i no rendir-se mai. Gràcies per estimar-me i per fer-me més forta. Al meu germà Ferran, gràcies per animar-me sempre, per la teva inquietud i per valorar-me.



Per últim, voldria donar les gràcies al Carles, el meu company de vida. A la teva complicitat dec l'impuls que em fa tirar endavant en els moments més difícils. Gràcies per donar-me suport en tot moment, per creure en mi, per ser sempre tan positiu i per fer-me veure que tots els problemes tenen solució. Gràcies per la teva força, per les teves ganes de lluitar, per voler ser millor. I sobretot, gràcies per estimar-me.

Moltes gràcies a tots!

## ÍNDICE

---



---

<b>ABREVIATURAS</b>	19
<b>INTRODUCCIÓN</b>	23
<b>I. TRÁFICO INTRACELULAR DE MEMBRANAS</b>	25
1. VÍAS DE TRÁFICO INTRACELULAR	25
1.1. La vía endocítica y de reciclaje	25
1.2. La vía secretora o biosintética	27
2. EL COMPLEJO DE GOLGI	28
2.1. Estructura	28
2.2. Funciones	29
3. TRÁFICO DE MEMBRANAS ASOCIADO AL COMPLEJO DE GOLGI	30
3.1. Transporte entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi	31
3.1.1. Transporte anterógrado	31
3.1.2. Transporte retrógrado	33
3.2. Transporte intra-Golgi	34
3.3. Transporte post-Golgi	35
<b>II. EL CITOESQUELETO DE ESPECTRINA</b>	36
1. EL CITOESQUELETO DE ESPECTRINA ERITROCITARIO	36
1.1. Descubrimiento, estructura y función	36
2. EL CITOESQUELETO DE ESPECTRINA NO ERITROCITARIO	38
2.1. Componentes	39
2.1.1. Espectrinas	39
2.1.2. Anquirinas	44
2.1.3. Proteínas 4.1	46
2.1.4. Aducinas	48
2.2. Funciones fisiológicas	49
3. EL CITOESQUELETO DE ESPECTRINA ASOCIADO AL COMPLEJO DE GOLGI Y AL TRÁFICO INTRACELULAR	58
<b>III. EL CITOESQUELETO DE ACTINA</b>	64
1. GENERALIDADES	64
2. EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN EL TRÁFICO INTRACELULAR	65
2.1. El citoesqueleto de actina y el complejo de Golgi	65
2.2. Biogénesis de los intermediarios de transporte	68

---

2.3. Los motores de actina en la biogénesis y locomoción de los intermediarios de transporte derivados del complejo de Golgi	70
2.4. Control de los mecanismos de transporte asociados a la actina	71
<b>3. MOTORES MOLECULARES</b>	<b>72</b>
3.1. Dineínas	73
3.2. Cinesinas	74
<b>IV. LOS FOSFOINOSÍTIDOS</b>	<b>75</b>
1. TIPOS DE FOSFOINOSÍTIDOS	75
2. METABOLISMO Y FUNCIÓN	75
2.1. Los fosfoinosítidos en el transporte intracelular	78
3. LOCALIZACIÓN EN SISTEMAS DE ENDOMEMBRANAS Y PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO	79
3.1. Localización subcelular de las distintas especies de fosfoinosítidos	79
3.1.1. Los fosfoinosítidos en el complejo de Golgi	80
3.2. Proteínas de reconocimiento	82
3.2.1. El dominio PH	83
<b>ANTECEDENTES, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b>	<b>85</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>89</b>
<b>I. MATERIALES</b>	<b>91</b>
1. REACTIVOS	91
2. ANTICUERPOS	92
3. PLÁSMIDOS	93
<b>II. MÉTODOS</b>	<b>93</b>
1. LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES	93
2. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LA $\beta$ III ESPECTRINA Y LA ANQUIRINA G119	93
3. TÉCNICAS MORFOLÓGICAS	94
3.1. Inmunocitoquímica y microscopía de epifluorescencia	94
3.2. Análisis cuantitativo de las imágenes	95
3.2.1. Cuantificación de la colocalización de la $\beta$ III espectrina con los marcadores de Golgi	95
3.2.2. Cuantificación de la morfología del complejo de Golgi	95
3.3. Microinyección de anticuerpos	95

---

4. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR	96
4.1. Extractos celulares y <i>western blotting</i>	96
4.2. Inmunoprecipitación	96
4.3. Fraccionamiento subcelular	97
4.4. Transfección con ADN plasmídico	97
4.5. Transfección con ARN de interferencia	97
4.6. Producción e infección lentiviral	98
4.7. PCR semicuantitativa	99
4.8. Generación de constructos de la $\beta$ III espectrina	101
4.9. Generación de la proteína recombinante PH- $\beta$ III espectrina	101
5. ENSAYOS DE TRANSPORTE INTRACELULAR	103
5.1. Uso de la brefeldina A y del nocodazole como herramientas para estudiar los flujos de membrana anterógrado y retrógrado del complejo de Golgi	103
5.2. Ensayo de transporte con el virus de la estomatitis vesicular	103
5.3. Ensayo de transporte con la toxina de <i>Shigella</i>	104
5.4. Ensayo de transporte de proteínas marcadas con azufre radioactivo	105
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	105
<b>RESULTADOS</b>	107
<b>I. GENERACIÓN DE NUEVAS HERRAMIENTAS MOLECULARES FRENTE A LA <math>\beta</math>III ESPECTRINA Y LA ANQUIRINA G119 Y SU LOCALIZACIÓN EN ENDOMEMBRANAS</b>	109
1. GENERACIÓN DE NUEVOS ANTICUERPOS CONTRA LA $\beta$ III ESPECTRINA Y LA ANQUIRINA G119 HUMANAS	109
2. PARTICIPACIÓN DE LA $\beta$ III ESPECTRINA EN EL MANTENIMIENTO DE LA ARQUITECTURA DEL COMPLEJO DE GOLGI	112
<b>II. IMPLICACIONES DE LA <math>\beta</math>III ESPECTRINA EN EL TRÁFICO DE MEMBRANAS DE LA VÍA SECRETORIA</b>	118
1. PAPEL DE LA $\beta$ III ESPECTRINA EN EL TRÁFICO INTRACELULAR EN LA ZONA DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y EL COMPLEJO DE GOLGI	118
2. PAPEL DE LA $\beta$ III ESPECTRINA EN EL TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS HASTA LA MEMBRANA PLASMÁTICA	120
3. GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR ESTABLE QUE NO EXPRESE LA $\beta$ III ESPECTRINA HUMANA	125

<b>III. DETERMINANTES DE MEMBRANA EN LA LOCALIZACIÓN DE LA <math>\beta</math>III ESPECTRINA EN EL COMPLEJO DE GOLGI</b>	127
1. PAPEL DEL FOSFATIDILINOSITOL 4-FOSFATO EN LA LOCALIZACIÓN DE LA $\beta$ III ESPECTRINA	128
2. PAPEL DE LA DINÁMICA DE ACTINA EN LA LOCALIZACIÓN DE LA $\beta$ III ESPECTRINA	133
3. FOSFORILACIÓN DE LA $\beta$ III ESPECTRINA	134
<b>IV. FIGURAS SUPLEMENTARIAS</b>	139
<b>DISCUSIÓN</b>	145
<b>I. LA <math>\beta</math>III ESPECTRINA Y SU IMPLICACIÓN EN EL MANTENIMIENTO DE LA ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO DE GOLGI</b>	147
<b>II. LA <math>\beta</math>III ESPECTRINA Y SU IMPLICACIÓN EN LA FUNCIONALIDAD SECRETORA DEL COMPLEJO DE GOLGI</b>	150
<b>III. LA ASOCIACIÓN DE LA <math>\beta</math>III ESPECTRINA CON LAS MEMBRANAS DEL COMPLEJO DE GOLGI</b>	151
<b>CONCLUSIONES</b>	159
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	163
<b>ANEXO</b>	209

## **ABREVIATURAS**

---





<b>aa</b>	Aminoácido	<b>FERM</b>	del inglés <i>Protein 4.1-, ezrin, radixin and moesin</i>
<b>ABD</b>	Dominio de unión a actina	<b>G-actina</b>	Actina globular
<b>Abp</b>	del inglés <i>Actin binding protein</i>	<b>Gb3</b>	Globotriaosilceramida 3
<b>ADNc</b>	ADN complementario	<b>GFP</b>	del inglés <i>Green fluorescent protein</i>
<b>AF</b>	Anemia de Fanconi	<b>Golgi</b>	Complejo de Golgi
<b>ARF</b>	del inglés <i>ADP ribosilation factor</i>	<b>GRASP</b>	del inglés <i>Golgi reassembly protein</i>
<b>ARNm</b>	ARN mensajero	<b>GST</b>	Glutati6n-S-transferasa
<b>Arp</b>	del inglés <i>Actin related protein</i>	<b>HBE</b>	del inglés <i>Human bronchial epithelial</i>
<b>AP</b>	del inglés <i>Activator protein</i>	<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>BFA</b>	Brefeldina A	<b>IPTG</b>	Isopropil tiogalact6sido
<b>BSA</b>	del inglés <i>Bovine serum albumin</i>	<b>IT</b>	Intermediario de transporte
<b>CERT</b>	del inglés <i>Ceramide transfer protein</i>	<b>Jpk</b>	Jasplakinolide
<b>CGN</b>	Red <i>cis</i> -Golgi	<b>KDEL<sub>r</sub></b>	Receptor de KDEL
<b>CHX</b>	Cicloheximida	<b>KLH</b>	del inglés <i>Key limpet hemocyanine</i>
<b>CTD</b>	Dominio C-terminal	<b>LtB</b>	Latrunculina B
<b>COP</b>	Coatómero	<b>MAD</b>	del inglés <i>Membrane association domain</i>
<b>Cys</b>	Cisteína	<b>MARKS</b>	del inglés <i>Myristolated alanine rich C kinase substrate</i>
<b>DAG</b>	Diacilglicerol	<b>MDCK</b>	del inglés <i>Madin Darby canine kidney</i>
<b>EAAT4</b>	del inglés <i>Excitatory Amino acid transporter 4</i>	<b>Met</b>	Metionina
<b>ELF</b>	del inglés <i>Embryonic liver factor</i>	<b>MET</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>Ena/ VASP</b>	del inglés <i>Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>	<b>MP</b>	Membrana plasmática
<b>Endo H</b>	Endo-β-N-acetilglucosaminidasa H	<b>M6P</b>	Manosa 6-fosfato
<b>ERES</b>	del inglés <i>ER exiting sites</i>	<b>M6PR</b>	Receptor de la manosa 6-fosfato
<b>ERGIC</b>	del inglés <i>ER/Golgi intermediate compartment</i>	<b>MFs</b>	Microfilamentos de actina
<b>F-actina</b>	Actina filamentosa	<b>MTs</b>	Microtúbulos
<b>FA</b>	del inglés <i>FERM adjacent</i>	<b>NZ</b>	Nocodazole
<b>FAPP2</b>	del inglés <i>Phosphoinositol 4-phosphate adaptor protein 2</i>		
<b>FBS</b>	del inglés <i>Fetal bovine serum</i>		

<b>OHC</b>	del inglés <i>Outer hair cells</i>	<b>TCA</b>	del inglés <i>Trichloroacetic acid</i>
<b>OSBP</b>	del inglés <i>Oxysterol binding protein</i>	<b>TGFβ</b>	del inglés <i>Transforming growth factor β</i>
<b>OSH1</b>	del inglés <i>Oxysterol binding protein homologue</i>	<b>TGN</b>	Red <i>trans</i> -Golgi
<b>PA</b>	del inglés <i>Phosphatidic acid</i>	<b>TrfR</b>	Receptor de transferrina
<b>Pasa</b>	Fosfatasa	<b>TRPC4</b>	del inglés <i>Transient receptor potential channel 4</i>
<b>Pb</b>	Par de bases nucleotídicas	<b>3D</b>	Tridimensional
<b>PCR</b>	del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>	<b>VSV-G</b>	Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular
<b>PDBu</b>	Forbol 12,13-dibutirato	<b>VTC</b>	del inglés <i>Vesicular tubular cluster</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehído	<b>WASP</b>	del inglés <i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
<b>PH</b>	del inglés <i>Pleckstrin homology</i>	<b>WB</b>	del inglés <i>Western blotting</i>
<b>PI</b>	Fosfoinosítido		
<b>PIK</b>	Fosfoinosítido-quinasa		
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A		
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C		
<b>PKD</b>	Proteína quinasa D		
<b>PtdIns</b>	Fosfatidilinositol		
<b>RCT</b>	Receptor de células T		
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático		
<b>RPE1</b>	del inglés <i>Retinal pigment epithelial 1</i>		
<b>SAATS</b>	del inglés <i>Spectrin-ankyrin-adaptor protein tethering system</i>		
<b>SAB</b>	del inglés <i>Spectrin/actin binding</i>		
<b>SCA5</b>	del inglés <i>Spinocerebellar ataxia type 5</i>		
<b>SEM</b>	del inglés <i>Standard error of the mean</i>		
<b>shRNA</b>	ARN <i>short hairpin</i>		
<b>SH3</b>	del inglés <i>Src homology 3</i>		
<b>siRNA</b>	ARN de interferencia		
<b>STx</b>	Toxina de <i>Shigella</i>		

# INTRODUCCIÓN

---



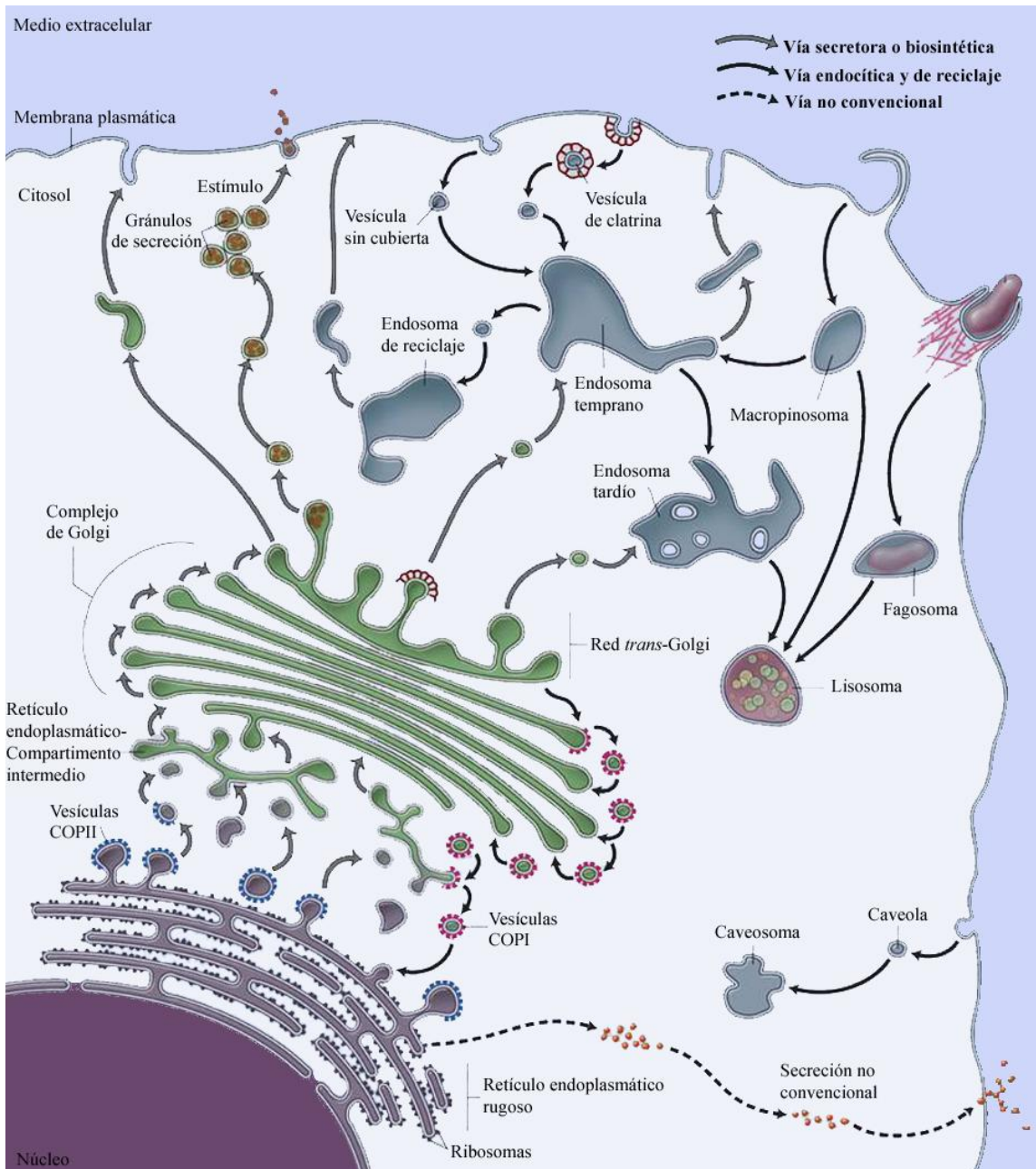
# I. TRÁFICO INTRACELULAR DE MEMBRANAS

## 1. VÍAS DE TRÁFICO INTRACELULAR

A lo largo de la evolución, la célula eucariota ha desarrollado compartimentos intracelulares que le permiten organizar y optimizar su metabolismo. Esta compartimentación conlleva la generación de rutas o vías de transporte que comuniquen dichos compartimentos, facilitando así la entrada y salida de las moléculas necesarias para mantener la integridad y la funcionalidad de la célula. Las rutas de transporte son las encargadas de llevar el *cargo*, que es el conjunto de moléculas a transportar y que pueden ser (glico) proteínas, (glico) lípidos y sustancias inorgánicas, de un compartimento a otro. El transporte se realiza a través de intermediarios de transporte (ITs) que tienen forma vesicular o túbulo-vesicular. Los ITs se mueven mediante proteínas motoras utilizando los elementos del citoesqueleto como soporte estructural para su desplazamiento. Las distintas vías de transporte intracelular se pueden clasificar siguiendo un criterio funcional (Figura 1).

### 1.1. La vía endocítica y de reciclaje

La célula utiliza la **vía endocítica** para incorporar sustancias como proteínas y lípidos o elementos exógenos que se encuentran en la membrana plasmática (MP) o en el medio extracelular. El *cargo* se internaliza a los endosomas tempranos, donde son destinados hacia los endosomas tardíos, los lisosomas, la red *trans*-Golgi o bien hacia los endosomas de reciclaje (Jones, 2007) Dependiendo del tamaño y de la naturaleza de la sustancia que se va a endocitar, hablamos de fagocitosis o de pinocitosis (Conner y Schmid, 2003). La **fagocitosis** se utiliza para internalizar moléculas de gran tamaño como virus, bacterias, parásitos intracelulares y complejos inertes. Es característico de las células del sistema inmune como los macrófagos y las células dendríticas. La **pinocitosis**, en cambio, es la vía por la que se internalizan macromoléculas y fluidos, además de ser el mecanismo empleado para el recambio constante de la MP. Se distinguen tres mecanismos de pinocitosis: la macropinocitosis, la endocitosis clatrina- o caveolina-dependiente y la endocitosis clatrina- o caveolina-independiente. En la **macropinocitosis** se forman deformaciones de membrana para internalizar el elemento exógeno. La **endocitosis clatrina-dependiente** ocurre de manera constitutiva en las células de mamífero y es crucial para la comunicación intracelular durante el desarrollo de tejidos y órganos (Seto y col., 2002) así como para la homeostasis celular. Los ITs que participan en este proceso están recubiertos por trisqueliones de clatrina que se ensamblan para formar una estructura poligonal que ayudará a deformar la membrana durante la incorporación del



**Figura 1: Esquema general de las principales vías del tráfico intracelular de membranas.** En la vía secretora, las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático se transportan al complejo de Golgi mediante ITs vesiculares. Una vez alcanzada la red trans-Golgi, el cargo se transporta a la MP, al sistema endo/lisosomal o a los gránulos de secreción en células especializadas y las proteínas de transporte son devueltas al retículo endoplasmático mediante ITs vesiculares. En la vía endocítica, el cargo se internaliza en la MP hacia los compartimentos endosomales y continúa su transporte hacia el complejo de Golgi o los lisosomas. La vía de reciclaje devuelve parte del cargo endocitado desde los endosomas de reciclaje hacia la superficie celular, y la vía de secreción no convencional transporta proteínas citosólicas o de membrana hacia la MP sin pasar por el complejo de Golgi (modificado de De Matteis y Luini, 2011).

complejo ligando-receptor (Robinson y Bonifacino, 2001). La endocitosis **caveolina-dependiente** es la ruta de internalización que emplean unas vesículas llamadas caveolas que

contienen mayoritariamente una proteína denominada caveolina. A través de estas vesículas se captan las moléculas de pequeño tamaño y de naturaleza hidrofóbica como glicosfingolípidos, colesterol y ciertas proteínas con afinidad para formar microdominios de membrana (van Deurs y col., 2003). A parte de las caveolas, existen otros microdominios en la MP como las balsas lipídicas o *lipid rafts* que contienen colesterol y esfingolípidos con una organización y dinámica diferente al resto de la membrana enriquecida en glicerofosfolípidos (Helms y Zurzolo, 2004). Su composición lipídica es la idónea para la internalización de proteínas y/o glicolípidos (Anderson y Jacobson, 2002). Así pues, a nivel de las balsas lipídicas tiene lugar la internalización de moléculas de forma **clatrina- o caveolina-independiente**.

La **vía de reciclaje** es la vía que siguen ciertas moléculas que, después de ser endocitadas y de haber liberado el *cargo*, son seleccionadas y devueltas a la MP para volver a ejercer su función. Es la ruta que emplean la mayoría de los receptores de membrana. Por ejemplo, el receptor de transferrina se separa de su *cargo* una vez se ha internalizado y vuelve a la MP pasando por los endosomas de reciclaje para reutilizarse (Maxfield y McGraw, 2004). En realidad es una combinación de la ruta endocítica (internalización) y de la secretora (vuelta a la superficie celular).

## 1.2. La vía secretora o biosintética

La vía secretora es la ruta por la que los componentes recién sintetizados son transportados desde el compartimento de síntesis o retículo endoplasmático (RE) hasta otros orgánulos como el complejo de Golgi (Golgi) o los lisosomas, la MP y al medio extracelular. Existen dos tipos de secreción dentro de la vía biosintética: la secreción constitutiva y la secreción regulada. Todos los tipos celulares poseen la ruta de **secreción constitutiva**, puesto que es utilizada para transportar y secretar de manera continua las proteínas y los lípidos recién sintetizados hasta el destino final (Ponnambalam y Baldwin, 2003). La **secreción regulada**, en cambio, sólo se produce en respuesta a algún tipo de estímulo intra-o extracelular (iones de calcio, hormonas o factores de crecimiento) (Blazquez y Shennan, 2000). En este tipo de secreción, el *cargo* que se sintetiza no es secretado inmediatamente, sino que se almacena en vesículas especializadas o gránulos de secreción (en función del tamaño que tengan), como en el caso de la insulina, que se acumula en los gránulos de secreción de las células pancreáticas. Recientemente se ha descrito otra vía de **secreción** llamada **no convencional** que se caracteriza por ser una ruta de transporte independiente del RE, de los ITs y del Golgi. Esta vía la siguen proteínas nucleares y citoplasmáticas que carecen de la señal peptídica que las llevaría al RE. Es el caso del factor de crecimiento de fibroblastos 2 o de la interleuquina 1 $\beta$ ,



que una vez sintetizados no se translocan al interior del lumen del RE sino que van directamente del citoplasma a la MP para salir al medio extracelular (Nickel, 2005).

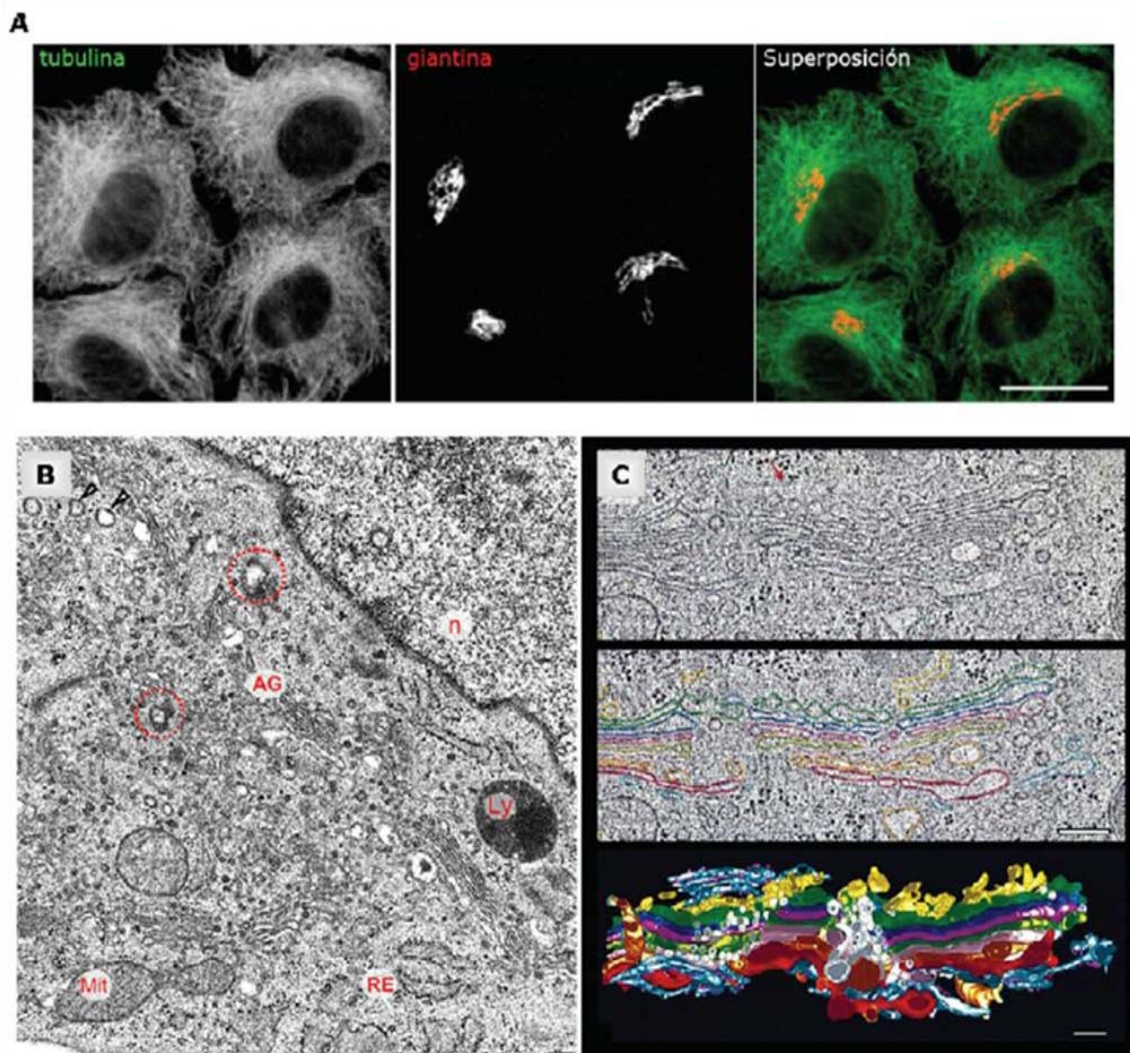
## 2. EL COMPLEJO DE GOLGI

El Golgi es un orgánulo muy dinámico que está presente en todas las células eucariotas, excepto en los eritrocitos, y que conforma un sistema de endomembranas interconectadas entre sí por estructuras tubulares y vesiculares que permiten el transporte intracelular de moléculas de un compartimento a otro. Se localiza en la zona perinuclear asociado al centrosoma (Rios y Bornens, 2003). El Golgi está compuesto por un número variable de sáculos o cisternas apiladas y aplanadas (*stack*) con dilataciones laterales (*rims*), que se agrupan formando una estructura llamada dictiosoma. La función principal del Golgi es la de modificar proteínas y lípidos sintetizados en el RE (modificaciones post-traduccionales) (Farquhar y Palade, 1998) para su posterior distribución intra- o extracelular. El conocimiento de su estructura y función es crucial para entender cómo funciona la vía secretora.

### 2.1. Estructura

Empleando técnicas de inmunofluorescencia, el Golgi aparece como una estructura única cuya morfología es variable en función del tipo celular, pero siempre se localiza cerca del núcleo y alrededor del centrosoma puesto que interacciona con los microtúbulos (MTs) y proteínas asociadas a éstos (Rios y Bornens, 2003). A nivel ultraestructural, utilizando técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) y tomografía electrónica, el Golgi aparece formado por un número variable de *stacks* interconectados de forma dinámica entre sí mediante un sistema túbulo-vesicular de membranas, con una región central más plana y una región lateral dilatada (Kepes y col., 2005) (Figura 2). Cada *stack* está polarizado morfológica, molecular y funcionalmente, de manera que se puede diferenciar una zona o cara de entrada (*cis*), que es donde se recibe el *cargo* procedente del RE, y una zona de salida (*trans*), que es donde se libera el *cargo* ya procesado. El conjunto de cisternas entre la cara *cis* y la cara *trans* constituyen la parte medial del Golgi. Cada una de las caras está unida a su respectiva red de estructuras túbulo-vesiculares altamente dinámicas que actúan como interfase entre el Golgi y otros compartimentos de la vía secretora. Así, se describe una zona de entrada o red tubular *cis* del Golgi (*cis-Golgi network* o CGN) entre el RE y la cara *cis* del Golgi y otra de salida o red tubular *trans* del Golgi (*trans-Golgi network* o TGN) localizada entre la cara *trans* del Golgi y la MP o compartimentos endosomales (Rambourg y Clermont, 1990). En el TGN es donde se

producen las últimas modificaciones post-traduccionales y donde se distribuye el *cargo* para ser transportado hacia su destino final: la MP, el sistema endosomal o el espacio extracelular.



**Figura 2. Localización y organización del complejo de Golgi en células NRK.** (A) Imágenes de microscopía óptica en las que se observan los MTs (anti- $\beta$ -tubulina) y el Golgi (anti-giantina). (B) Micrografía electrónica en la que se muestra la distribución perinuclear de distintos dictiosomas en la zona centrosomal donde se encuentra la pareja de los centriolos (círculos discontinuos). En las inmediaciones de las cisternas del Golgi se detectan perfiles vesiculares con cubierta de tipo COPI o clatrina. N, núcleo; Mit, mitocondria; AG, Golgi; Ly, lisosomas. (C) Tomografía electrónica y reconstrucción tridimensional (3D) en la que se representan las siete cisternas del Golgi. Escala Bar, 200 nm (modificado de Egea y Rios, 2002; Lázaro-Diéguéz, 2008).

## 2.2. Funciones

El Golgi actúa como una “estación central” en la vía secretora y su función principal es la de organizar gran parte del tráfico intracelular (Egea, 2001). El Golgi recibe los *cargos* sintetizados en el RE y proporciona una compartimentación para las modificaciones post-traduccionales. La

más común es el proceso de glicosilación sobre los 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. La mayoría de proteínas son glicosiladas en el RE mediante la adición de oligosacáridos ramificados (proceso de N-glicosilación) sobre los residuos de ácido aspártico. Cuando las proteínas N-glicosiladas pasan a través de las cisternas del Golgi, otras enzimas como las glicosidasas y las glicosiltransferasas completan la N-glicosidación. Por otro lado, otras proteínas se glicosilan solamente en el Golgi en los residuos de serina o treonina (proceso de O-glicosilación). La correcta ejecución de estas modificaciones es esencial para seleccionar su destino final y para su correcta funcionalidad. Por ejemplo, en algunos casos la proteína requiere un tipo concreto de residuo glucídico para ser destinada a un compartimento determinado. En este sentido, las enzimas lisosomales contienen manosa 6-fosfato (M6P) terminal en sus cadenas que es reconocida por la maquinaria molecular de selección y transporte para destinar la enzima a los lisosomas (Hille-Rehfeld, 1995). Otro ejemplo es la proteína glicosilfosfatidilinositol que tiene que estar glicosilada para ser transportada desde el TGN hasta la zona apical de la MP (Benting y col., 1999). En otras ocasiones las glicosilaciones son necesarias para estabilizar la conformación de la proteína. Sin embargo, las modificaciones no son exclusivas del *cargo* proteico, sino que también tienen lugar en los lípidos. Así, los glicoesfingolípidos se sintetizan en el Golgi tras añadir azúcares a la ceramida sintetizada en el RE. Estos lípidos son fundamentales para el correcto funcionamiento y estabilidad de las membranas celulares. En el Golgi también se sintetizan muchos carbohidratos como por ejemplo los glicosaminoglicanos, unos polisacáridos muy largos que están anclados a las proteínas sintetizadas en el RE para dar lugar a los proteoglicanos que formarán la matriz extracelular.

En el Golgi también se producen otras modificaciones post-traduccionales como los procesos de fosforilación que son esenciales para el envío correcto de ciertas proteínas solubles al interior de los lisosomas, procesos de sulfatación de proteoglicanos y ciertos aminoácidos (aa) y para reacciones de proteólisis esenciales para la activación de ciertas moléculas. Por último, hay que destacar que el Golgi participa en el reciclaje de la MP mediante la fusión de elementos vesiculares y/o tubulares generados en el orgánulo.

### **3. TRÁFICO DE MEMBRANAS ASOCIADO AL COMPLEJO DE GOLGI**

El Golgi es un orgánulo altamente dinámico cuyos componentes moleculares se renuevan constantemente. Al actuar como una “planta empaquetadora”, el Golgi recibe *cargo* continuamente procedente del RE mediante la fusión de los ITs del RE (vía secretora) y de los

endosomas (vía endocítica). Esta ganancia de membrana se equilibra con la pérdida de ésta gracias a la fisión de los ITs generados en el Golgi, que serán transportados a la MP y a otros orgánulos intracelulares. Así, para mantener la estructura y funcionalidad del Golgi, es necesario regular este flujo de membrana del Golgi para que el balance neto sea nulo. Por eso, cuando existen alteraciones en este tráfico de membranas, la estructura del Golgi se ve alterada impidiendo su correcto funcionamiento. Hay que tener en cuenta que este equilibrio se adapta a las demandas requeridas en cada momento por la célula delante de un estímulo concreto como la proliferación, la diferenciación, la señalización y la invasión de patógenos, entre otros.

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

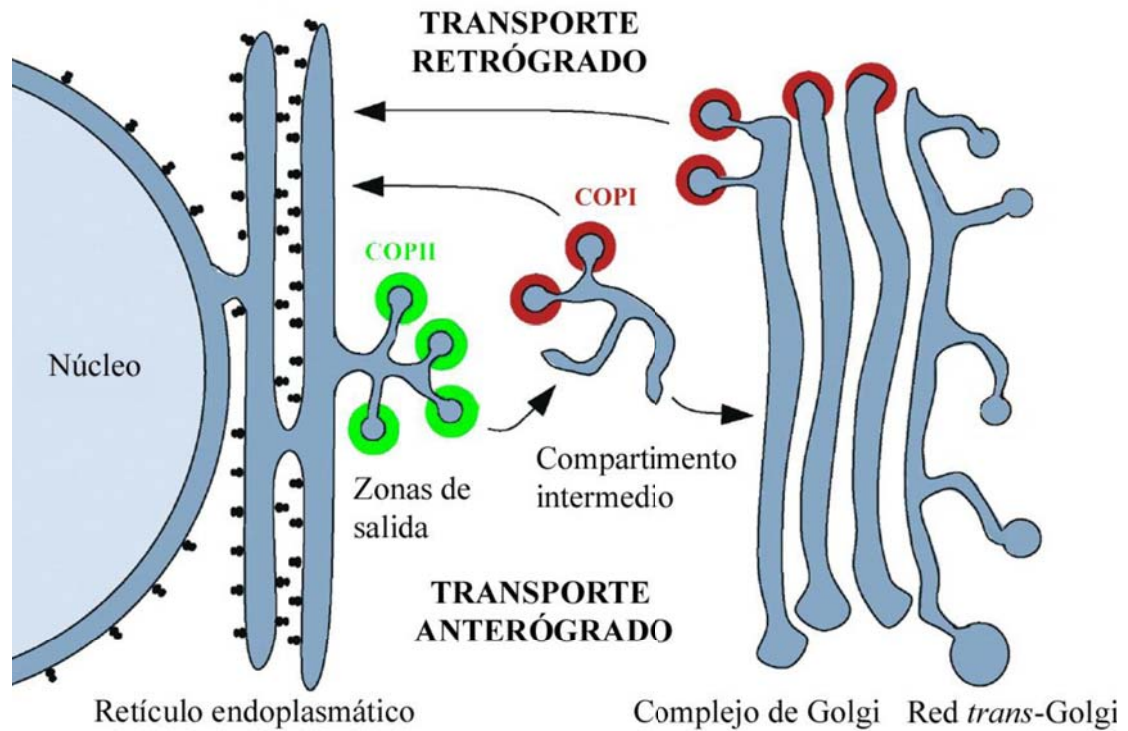
El transporte entre el RE y el Golgi se caracteriza por ser un transporte bidireccional. Se denomina **transporte anterógrado** al flujo de membrana que va desde el RE hacia el Golgi, y **transporte retrógrado** al flujo que va en sentido contrario (del Golgi al RE).

Los ITs que median el transporte entre estos dos compartimentos son las vesículas con cubiertas de tipo COP. Estas cubiertas o *coats* están formadas por complejos multiproteicos que al autoensamblarse deforman la membrana donadora para formar las vesículas de transporte. Existen dos tipos de cubiertas COP, las de tipo COPI y las de tipo COPII, que difieren tanto en la composición molecular como en la ubicación y la direccionalidad durante el transporte. Así, las vesículas de tipo COPII están implicadas en el transporte anterógrado (Schekman y Orci, 1996; Barlowe, 1998) mientras que las de tipo COPI participan en el transporte retrógrado (Orci y col., 1997), aunque también se postula que podrían participar en el transporte anterógrado (Orci y col., 1997) (Figura 3).

#### 3.1.1. Transporte anterógrado

A través de la vía anterógrada, las proteínas y lípidos sintetizados en el RE entran en la vía secretora y se dirigen al Golgi para ser modificados. Las membranas del RE encaradas hacia el *cis*-Golgi presentan unas regiones muy especializadas que están desprovistas de ribosomas llamadas sitios de salida o *ER exiting sites* (ERES) (Sesso y col., 1994). Los ERES son el lugar de exportación del *cargo* sintetizado que sale del RE (Palade, 1975), por lo que de estas zonas emergen continuamente vesículas con cubierta COPII. Las vesículas COPII reciben este nombre porque para su formación requieren el ensamblaje de un complejo multiproteico llamado COPII o *coatamer protein II*, que está formado por las proteínas Sec23/24, Sec13/31 y la GTPasa Sar1 (Kirchhausen, 2007; Barlowe 1994). La interacción entre el *cargo* y los

componentes de la cubierta COPII provoca la acumulación de éste en el lugar de producción de los ITs (Aridor, 1998). Después de la formación de la gema o *bud* en la membrana del RE con la cubierta COPII, ésta se fisiona de la membrana y da lugar a una vesícula libre que se desprende de la cubierta COPII.



**Figura 3: Esquema del transporte intracelular entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi.** El transporte entre el RE y el Golgi ocurre en varios pasos. Las gemas nacientes formadas en las zonas de salida del RE forman las vesículas COPII y se dirigen al compartimento intermedio entre el RE y el Golgi. Después, las proteínas se mueven del compartimento intermedio hacia el Golgi a través de las vesículas COPI o directamente por conexiones tubulares. Las proteínas residentes del RE que han escapado regresan desde el compartimento intermedio o el Golgi a través de vesículas de tipo COPI (modificado de Bonifacino y Glick, 2004).

Las vesículas COPII generadas en el RE no viajan directamente al Golgi, sino que se fusionan entre sí originando unas estructuras membranosas túbulo-vesiculares (VTCs, del inglés *vesicular tubular clusters*) entre el RE y el Golgi formando el compartimento intermedio o ERGIC (del inglés *ER/Golgi intermediate compartment*) (Bannykh y col., 1998; Hauri y Schweizer, 1992). Existen dos hipótesis para explicar el transporte desde el ERGIC hasta el *cis*-Golgi (Rabouille y Klumperman, 2005). La primera sugiere que el *cargo* llega a la primera cisterna del Golgi desde el ERGIC a través de las vesículas COPI. La segunda propone una fusión de los elementos membranosos del ERGIC para generar la primera cisterna del Golgi. La fusión continuada de membrana de los ITs derivados del RE compensa la pérdida de membrana

utilizada para el transporte post-Golgi (desde el Golgi a la MP) y para el transporte retrógrado (desde el Golgi al RE) manteniendo así la integridad estructural y funcional del Golgi.

### 3.1.2. Transporte retrógrado

La vía retrógrada es la que se usa para devolver las proteínas residentes en el RE, tanto lumenales como de membrana (Munro y Pelham, 1987; Semenza y col., 1990), que se han escapado del orgánulo por la vía anterógrada (Pelham, 1991). También se reciclan proteínas de membrana como el receptor de KDEL (KDEL<sub>r</sub>) (Appenzeller, 1999) o proteínas residentes en el Golgi como las glicosiltransferasas (Lee y col., 2004; Lippincott-Schwartz y col., 1990; Storrie y col., 1998; Storrie, 2005). Por último, también sirve para equilibrar la membrana consumida en el transporte anterógrado.

Los ITs que median este tipo de transporte son de tipo COPI y requieren para su formación el complejo proteico COPI o *coatamer protein I* compuesto por siete subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\sigma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) (Kreis y Pepperkok, 1994). El modelo más aceptado propone que estas vesículas tienen como función acumular y seleccionar el *cargo* y transportarlo de manera retrógrada (Bethune y col., 2006; Lippincott-Schwartz y Liu, 2006). También se ha descrito que podrían estar involucradas en el transporte bidireccional a través de los *stacks* del Golgi (Orci y col., 2000). Esta es la vía que utiliza el KDEL<sub>r</sub> para devolver las proteínas lumenales residentes del RE que se han “escapado” del orgánulo siguiendo el flujo anterógrado. Las proteínas del RE suelen ser retenidas en el RE pero a veces este sistema no es del todo eficiente y algunas proteínas abandonan el RE para llegar al Golgi. La mayoría de proteínas solubles del RE tienen una secuencia de cuatro aa en el extremo carboxilo (secuencia KDEL). Esta secuencia es reconocida por el KDEL<sub>r</sub>, una proteína transmembrana que reside en el Golgi y en el ERGIC y que cicla constantemente entre el RE y el Golgi (Lewis y Pelham, 1990). Cuando el KDEL<sub>r</sub> reconoce a una proteína con secuencia KDEL, se une a ésta y la lleva de nuevo al RE mediante el transporte retrógrado a través de las vesículas COPI. Una vez que el complejo proteico llega al RE, éste se disocia y el KDEL<sub>r</sub> se localiza de nuevo en el *cis*-Golgi. Alteraciones en el transporte entre el RE y el Golgi se van a reflejar en la redistribución del KDEL<sub>r</sub>, de manera que va a quedar retenido en el RE si hay una alteración en la vía anterógrada, o en el Golgi si el transporte retrógrado tiene alguna anomalía. Existen otros mecanismos para recuperar las proteínas que se escapan del RE. Es el caso de las proteínas transmembrana del RE que contienen la secuencia de aa KKXX (donde K es lisina y X cualquier aa) en el extremo carboxilo que se encara hacia el citoplasma. Esta secuencia interacciona con componentes de la cubierta COPI y actúa

como señal de recuperación que estimula el transporte retrógrado de estas proteínas que han escapado del RE y han alcanzado el ERGIC o el Golgi (Nilsson y col., 1989).

Aunque el sistema COPI ha evolucionado como un mecanismo eficiente para recuperar proteínas que abandonan el RE, no es el único que genera un flujo retrógrado. Las primeras evidencias de la existencia de un sistema de transporte independiente de las vesículas COPI surgieron tras identificar una GTPasa del Golgi denominada Rab6 (Martinez y col., 1997). La sobreexpresión de la proteína Rab6 activada (Rab6-GTP) provocaba un flujo retrógrado con un efecto similar al producido por la brefeldina A (BFA) (ver en apartado 5.1. de los métodos el mecanismo de acción de la BFA). La existencia de varias rutas de transporte retrógrado se confirmó gracias al estudio del transporte de distintas toxinas bacterianas, como la toxina de *Shigella* (STx). En células tratadas con inhibidores de la vía de transporte COPI, el transporte de la STx desde el Golgi al RE permanece inalterado. Además se han podido visualizar los ITs que contienen la STx colocalizando con la proteína Rab6. También se ha descrito que mutantes dominantes negativos de Rab6 (Rab6-GDP) retrasan significativamente el transporte de la STx y de las enzimas de glicosilación al RE (Girod y col., 1999). Aunque el mecanismo por el cual Rab6 promueve el transporte retrógrado no se conoce bien, se han identificado varias proteínas que interaccionan con Rab6-GTP que podrían actuar como efectores para el funcionamiento de la vía. Por un lado, se ha visto que Rab6 interacciona con una proteína de la familia de las cinesinas llamada rabquinesina (Echard y col., 1998). El extremo C-terminal de esta proteína reconoce específicamente Rab6-GTP y la sobreexpresión de mutantes inactivos de la rabquinesina enlentece el efecto sobre el tráfico de membrana inducido por Rab6-GTP. Esto indica que Rab6 utiliza este motor de MTs para mover los ITs en el mismo sentido de movimiento que la mayoría de las cinesinas [del extremo (-) al extremo (+) de los MTs] (Miki y col., 2005). Por otro lado, mediante estudios con sistemas de doble híbrido se consiguió aislar una proteína denominada bicaudal-D que interacciona con Rab6 (Matanis y col., 2002). Tras su translocación a las membranas del Golgi, bicaudal-D recluta el complejo motor dineína-dinactina que se desplaza hacia el extremo (-) de los MTs.

### **3.2. Transporte intra-Golgi**

Existen dos modelos para explicar cómo el *cargo* procedente del ERGIC llega a la cara *cis* del Golgi y atraviesa las distintas cisternas en dirección *trans*-Golgi para ser modificado y enviado a su destino final (Rabouille y Klumperman, 2005).

El modelo de **transporte vesicular** (Rothman, 1994) considera que las cisternas del Golgi son estructuras estables donde el flujo de membrana se da mediante vesículas COPI que contienen

el *cargo* anterógrado. Éstas se transportan lateralmente por los extremos de las cisternas o *lateral rims*, atravesando de forma secuencial todas ellas desde la *cis-* hasta la *trans-*, pasando por la medial-Golgi, hasta llegar al TGN. Por el contrario, el modelo de **maduración de las cisternas** (Mironov y col., 1997; Glick y Malhotra, 1998) considera que las cisternas *cis*-Golgi son estructuras dinámicas. La primera cisterna se formaría por fusión de los ITs que generan los VTCs e irían madurando de *cis a trans*. Una vez la cisterna madura que contiene el *cargo* ya procesado llega a la parte *trans*-Golgi, se produciría la segregación de los distintos *cargos*. Seguidamente, esta cisterna sufriría cambios bioquímicos y morfológicos para adquirir características del TGN. En este modelo, las vesículas COPI sólo transportan el *cargo* en sentido retrógrado dirigiéndolo hacia la cisterna apropiada y así poder preservar la identidad y la polaridad del Golgi. Sin embargo, estudios recientes sugieren que este modelo es demasiado lento para el transporte anterógrado de la mayoría de las proteínas (Orci y col., 2000; Volchuk y col., 2000). Así, se propone un **sistema híbrido basado en el modelo de maduración de las cisternas** en el que las vesículas COPI mediarían el transporte de *cargo* anterógrado y retrógrado (Orci y col., 1997; Orci y col., 2000; Pelham y Rothman, 2000). Por último, tras la observación de estructuras tubulares entre las cisternas por MET se postula un nuevo **modelo de conexiones entre cisternas** en el cual no participarían los ITs de tipo COPI, sino que el *cargo* y las enzimas residentes en el Golgi se moverían de forma anterógrada y retrógrada, respectivamente, mediante túbulos que interconectarían las cisternas (Mironov y col., 1997; Trucco y col., 2004; Vivero-Salmeron y col., 2008).

### 3.3. Transporte post-Golgi

Una vez el *cargo* ha alcanzado el *trans*-Golgi, entra en contacto con el compartimento adyacente a éste conocido como TGN. En esta red de membranas túbulo-vesiculares se producen las últimas modificaciones post-traduccionales y se introduce el *cargo* en los ITs que lo transportarán a su destino final (endosomas, lisosomas y MP). En las células polarizadas (epiteliales y neuronales) se distingue entre el transporte secretor hacia la membrana basolateral o hacia la membrana apical, los cuales son regulados por maquinarias moleculares distintas (De Matteis y Luini, 2008). En el caso de las proteínas con **destino basolateral**, la señal se localiza en el dominio citoplasmático del *cargo* y consiste en secuencias de aa de tipo YXXO (donde Y es tirosina, X es cualquier aa y O es un aa hidrofóbico) o en secuencias de aa con motivos dileucina DXXLL (donde D es ácido aspártico y L es leucina). Estas señales son reconocidas por las proteínas de la cubierta o las proteínas adaptadoras asociadas periféricamente a la cara citosólica de la membrana (Bonifacino y Traub, 2003). En el caso de



las proteínas con **destino apical**, la salida se facilita por interacciones de tipo lípido-lípido o lípido-proteína dentro de los dominios transmembrana o luminales, en las que participan los N- y los O-glicanos (Potter y col., 2004), o bien por interacciones con el dominio de anclaje GPI que está asociado a las balsas lipídicas (Schuck y Simons, 2004). Por tanto, muchas de las proteínas destinadas al dominio apical tienen mayor afinidad por las zonas ricas en esfingolípidos y colesterol para ser transportadas separadamente del *cargo* con destino basolateral (Keller y col., 2001). Una vez seleccionado el *cargo*, éste se retiene en unos dominios específicos de membrana del TGN que forman una estructura túbulo-vesicular, excluyendo proteínas residentes del Golgi y *cargos* con otro destino. A continuación, estos dominios son separados progresivamente del resto de la membrana del TGN a través de los MTs, generando estructuras tubulares y vesiculares. Por último, se produce la fisión de los ITs derivados de la membrana del TGN y, posteriormente, se transporta a la MP (De Matteis y Luini, 2008).

## **II. EL CITOESQUELETO DE ESPECTRINA**

La aparición de los metazoos a partir de sus antecesores unicelulares requirió una serie de adaptaciones impuestas por la aparición de nuevas funciones a raíz de la diferenciación celular, la integración de éstas en distintos tejidos y del incremento de tamaño de los propios organismos. Estos requisitos incluían la habilidad de las células de desarrollar la organización espacial de su superficie en dominios altamente especializados y de los subcompartimentos intracelulares para permitir así la interacción celular y la señalización intracelular. También aparecieron nuevas adaptaciones al movimiento y al estrés mecánico que éste conllevaba. La aparición evolutiva del citoesqueleto de espectrina permitió cumplir con estos requisitos.

### **1. EL CITOESQUELETO DE ESPECTRINA ERITROCITARIO**

#### **1.1. Descubrimiento, estructura y función**

El citoesqueleto de espectrina se descubrió en los eritrocitos (Marchesi y Steers, 1968; Clarke, 1971). Los eritrocitos de los mamíferos carecen de núcleo y orgánulos y, por tanto, no tienen ningún sistema biosintético de reparación. Aún así, sobreviven en el torrente sanguíneo durante 120 días. Esto implica que tienen que tener algún tipo de adaptación en la membrana que les permita permanecer en circulación tanto tiempo, puesto que la bicapa lipídica sin soporte alguno no podría aguantar la presión de la circulación.

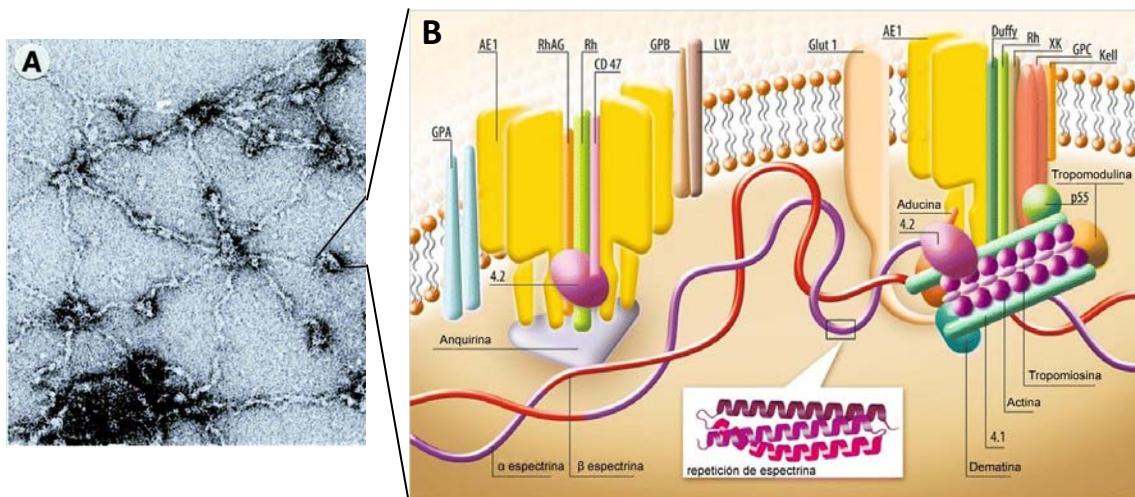
El citoesqueleto de espectrina es una red bidimensional que se encuentra por debajo de la membrana del eritrocito. Está formado por la propia **espectrina**, que es el componente mayoritario del citoesqueleto, la **anquirina**, la **proteína 4.1**, la **aducina** y la **actina**.

La membrana esquelética de los eritrocitos de mamífero se visualizó por primera vez en micrografías electrónicas de extractos de eritrocitos usando detergentes (Yu y col., 1973). El citoesqueleto de la membrana eritrocitaria está organizado como una red hexagonal formada por cinco, seis o siete moléculas de espectrina bien extendidas y unidas a filamentos de actina de unos 40 nm de longitud, formados por 12-16 monómeros (Byers y Branton, 1985; Liu y col., 1987; Shen y col., 1986) (Figura 4 A). El citoesqueleto de espectrina y actina de los eritrocitos está unido a la bicapa lipídica básicamente por la asociación de la espectrina con la anquirina, la cual está unida al dominio citoplasmático del intercambiador aniónico banda 3 (Bennett, 1978; Bennett y col., 1982; Bennett y Stenbuck, 1979; Luna y col., 1979; Tyler y col., 1980; Yu y Goodman, 1979). El intercambiador aniónico banda 3 se asocia formando dímeros (Nigg y Cherry, 1979), que a su vez se asocian con la anquirina para formar pseudo-tetrámeros (Che y col., 1997; Michaely y Bennett, 1995; Pinder y col., 1995; Ye y col., 1999). Los dímeros del intercambiador aniónico también se pueden asociar con la banda 4.2 por la parte citoplasmática (Yu y Steck, 1975). También existen otras conexiones de membrana adicionales en la zona de unión de la espectrina con la actina o *spectrin-actin junction points* que se dan gracias a un complejo proteico entre la proteína 4.1, la p55 (un miembro de la familia MAGUK) y la glicoporina C (Hemming y col., 1995; Marfatia y col., 1995; Marfatia y col., 1994) (Figura 4 B).

Muchas de las proteínas que bloquean los extremos libres de los filamentos de actina así como las que ayudan a definir la longitud de los filamentos de actina y a estabilizar los complejos espectrina-actina, como la tropomiosina, se han visualizado por microscopía electrónica en este mismo complejo (Derick y col., 1992; Ursitti y Fowler, 1994). La proteína 4.1 estabiliza la asociación de la espectrina con la actina (Tyler y col., 1980; Ungewickell y col., 1979) y la aducina se asocia con los extremos (+), que tienen una velocidad de polimerización más rápida de los filamentos de actina, en un complejo que bloquearía el extremo del filamento, promoviendo así el ensamblaje de la espectrina (Gardner y Bennett, 1987; Kuhlman y Fowler, 1997; Kuhlman y col., 1996; Li y col., 1998) (Figura 4 B).

La función principal del citoesqueleto de espectrina en los eritrocitos es la de soportar la bicapa lipídica, dándole la forma de disco bicóncavo al eritrocito y la elasticidad que requiere para fluir a través de los capilares sanguíneos. También controla la acumulación de algunas proteínas transmembrana en la membrana eritrocitaria durante la eritropoyesis (Mohandas y Gallagher, 2008; Salomao y col., 2010). La naturaleza esencial del citoesqueleto de espectrina

se demostró inicialmente en ratones que contenían mutaciones en la espectrina y la anquirina (Bodine y col., 1984; Greenquist y col., 1978). Posteriormente, estas mutaciones se han encontrado en humanos y conllevan a la aparición de anemias hereditarias por malformaciones de los eritrocitos, como la esferocitosis, la eliptocitosis o la piropoiquilocitosis, indicando que el citoesqueleto de espectrina es necesario para la existencia de los eritrocitos de los mamíferos (Eber y Lux, 2004; Gallagher, 2004).



**Figura 4. Organización del citoesqueleto de la membrana del eritrocito.** (A) Microscopía electrónica de la membrana eritrocitaria. Los tetrámeros de espectrina están entrecruzados en los puntos de unión mediante filamentos cortos de actina y proteína 4.1-aducina. Aproximadamente seis espectrinas interaccionan con cada punto de unión. En la zona central de los tetrámeros de espectrina se encuentra unido el complejo anquirina-intercambiador aniónico (modificado de Bennett y Baines, 2001). (B) La interacción entre la espectrina y la actina está modulada por proteínas asociadas como la proteína 4.1 junto con la dematina, la aducina, la tropomiosina y la tropomodulina. Sus funciones son estabilizar el complejo espectrina-actina, mantener la longitud del filamento de actina (la aducina actúa como proteína de coronado/bloqueo) y unir la red de espectrina con las proteínas transmembrana (la glicoporina C y el intercambiador aniónico 1 o AE1) a través de proteínas adaptadoras (la proteína p55 y la proteína 4.2). Existe otro sitio de unión a membrana vía anquirina, la cual une la  $\beta$  espectrina con el AE1. El complejo Rh/RhAG-anquirina también puede actuar de unión entre la membrana eritrocitaria y el citoesqueleto de espectrina. Las espectrinas también interaccionan directamente con fosfolípidos como fosfatidiserina y fosfatidiletanolamina, componentes de membrana confinados a la capa interna de la bicapa lipídica. En la  $\beta$  espectrina, los sitios de unión a fosfolípidos se localizan cerca de los sitios de unión a anquirina y proteína 4.1, que son las proteínas encargadas de conectar la espectrina con la membrana. GPA, glicoporina A; GPB, glicoporina B; GPC, glicoporina C; GLUT, transportador de glucosa 1; Rh, factor Rh; RhAG, factor Rh asociado a glicoproteínas (modificado de Machnicka y col., 2012).

## 2. EL CITOESQUELETO DE ESPECTRINA NO ERITROCITARIO

Durante mucho tiempo se pensó que las proteínas que formaban el citoesqueleto de espectrina sólo se encontraban en los eritrocitos. Las aproximaciones iniciales que se

realizaron con anticuerpos para demostrar lo contrario fallaron para revelar la existencia de éstas en otras líneas celulares no eritrocitarias de mamíferos. Sin embargo, los glóbulos rojos nucleados de algunos invertebrados sí que tenían proteínas relacionadas con el citoesqueleto de espectrina (Hiller y Weber, 1977; Pinder y col., 1978). La aparición de nuevas técnicas más sensibles basadas en inmunodetección y en biología molecular ayudó al descubrimiento de un citoesqueleto de espectrina no eritrocitario.

El descubrimiento de que otros tejidos, a parte del eritrocitario, expresaban isoformas de anquirina (Bennett, 1979) y espectrina (Bennett y col., 1982; Burridge y col., 1982; Glenney y col., 1982a; Goodman y col., 1981; Levine y Willard, 1981) sugirió que el citoesqueleto de espectrina eritrocitario era relevante en otros tipos celulares. Sin embargo, aunque los principios estructurales básicos establecidos para los eritrocitos se podrían aplicar a otros tejidos, la organización, las interacciones proteicas y las funciones de las proteínas del citoesqueleto de espectrina son más diversas que en los glóbulos rojos.

Hay dos diferencias importantes entre el citoesqueleto de espectrina eritrocitario y el no eritrocitario. La primera es que, mientras el citoesqueleto de espectrina eritrocitario está distribuido uniformemente por debajo de la MP, la espectrina y la anquirina se encuentran compartimentadas en subdominios específicos de la MP en células polarizadas, como las neuronas (Lazarides y Nelson, 1983), células de riñón (Drenckhahn y col., 1985; Nelson y Veshnock, 1986) y músculo (Craig y Pardo, 1983). La segunda es que la espectrina se une a una serie de proteínas transmembrana, como la banda 3, a través de la anquirina en los eritrocitos. En cambio, las anquirinas y espectrinas no eritrocitarias interaccionan con gran cantidad de proteínas de membrana, sobretodo transportadores (Bennett y Baines, 2001). Estas observaciones fueron la base de la hipótesis de que la espectrina y la anquirina tienen un papel en la determinación de la composición y función de regiones especializadas de la MP (Drubin y Nelson, 1996; Bennett y Chen, 2001).

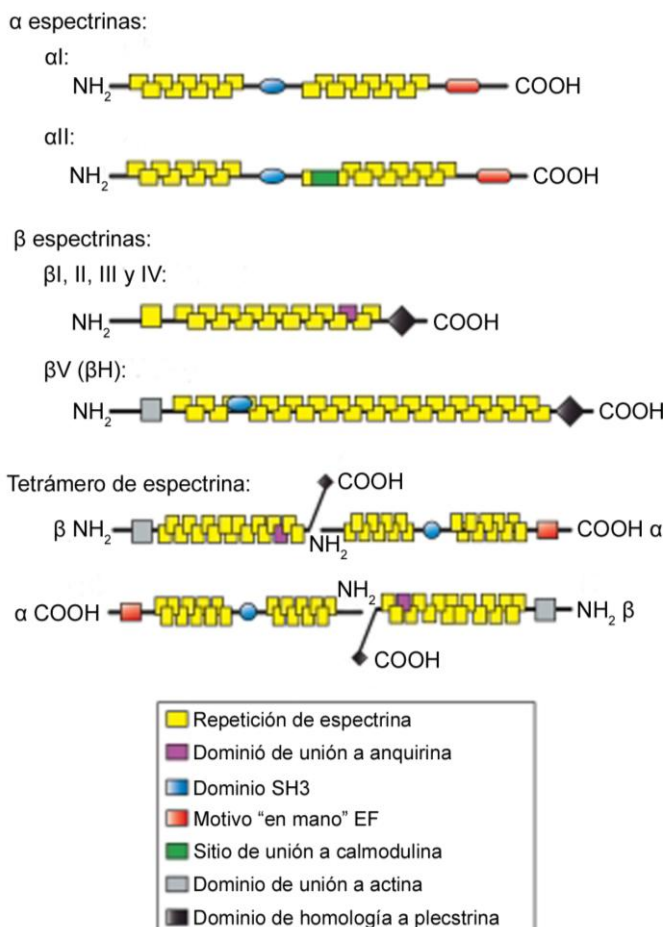
## **2.1. Componentes**

### **2.1.1. Espectrinas**

Las membranas de los eritrocitos se aislaron tratándolos con una solución hipotónica (Dodge y col., 1963), de manera que los eritrocitos aumentaron de tamaño y adoptaron una forma esférica. El estiramiento de la membrana del eritrocito lo hizo permeable, por lo que la hemoglobina se filtró hacia el exterior y quedaron unas estructuras casi incoloras llamadas fantasmas o *ghosts*. Entre las proteínas que se extrajeron del eritrocito bajo estas condiciones había un par de polipéptidos de elevado peso molecular que se denominaron espectrinas

(Marchesi y Steers, 1968; Tillack y col., 1970) (del inglés *spectre*, cuyo significado es fantasma). Actualmente estos dos polipéptidos se conocen como  $\alpha$  y  $\beta$  espectrina (de 280 y 246 kDa según su secuencia de aa, respectivamente) aunque en la literatura también se describen como banda 1 y banda 2 debido a que aparecen como dos bandas en geles de SDS-PAGE (Fairbanks y col., 1971). En tejidos no eritrocitarios, la espectrina se denominó inicialmente como espectrina del cerebro o espectrina no eritrocitaria (Goodman y col., 1981; Bennett y col., 1982; Burrige, 1982; Lazarides y Nelson, 1982), fodrina (Levine y Willard, 1981; Glenney y col., 1982b) o calspectina (Kakiuchi y col., 1982). El término fodrina aún se usa de forma ocasional y generalmente se refiere a la  $\alpha$ II y a la  $\beta$ II espectrina. La espectrina identificada en el hígado embrionario se llamó ELF (Mishra y col., 1999) (del inglés *embryonic liver factor*).

Las espectrinas son moléculas largas y flexibles (200-260 nm de largo por 3-6 nm de ancho) que existen principalmente como heterotetrámeros formados por dos **subunidades de tipo  $\alpha$**  y dos **subunidades de tipo  $\beta$** . Estas subunidades se ensamblan por los extremos en una conformación antiparalela para formar dímeros  $\alpha\beta$  que se asocian entre ellos para formar tetrámeros. La formación de estos tetrámeros implica que el extremo amino de cada subunidad  $\alpha$  se asocie con el extremo carboxilo de cada subunidad  $\beta$  (Figura 5). No obstante,



**Figura 5. Estructura de los dominios de las espectrinas.** Esquema de las dos subunidades  $\alpha$  y las cuatro subunidades  $\beta$  de la espectrina. La espectrina está formada por una serie de unidades modulares llamadas repeticiones de espectrina (amarillo). Los otros dominios, como el dominio de homología a Src (SH3, azul), motivo "en mano" EF (relacionado con la unión a calcio; rojo), y el dominio de unión a calmodulina (verde) promueven interacciones con moléculas de unión que son importantes para la función de la espectrina. El dominio de homología a plectrina (negro) promueve la asociación de la espectrina con la MP vía fosfoinosítidos y el dominio de unión a actina (gris) enlaza la red de espectrina con filamentos cortos de actina, que serán estabilizados mediante proteínas accesorias. Todas las subunidades de espectrina están sujetas a splicing alternativo que hará que aumente su diversidad funcional (modificado de Bennett y Healy, 2007).

las cadenas de  $\beta$  espectrina pueden formar complejos homopoliméricos en el músculo esquelético (Block y Morrow, 1989) y en el Golgi (Beck y col., 1994; Devarajan y col., 1996). Cada extremidad del tetrámero de espectrina se une a filamentos de actina mediante la  $\beta$  espectrina, permitiendo así la formación de una red compleja formada por espectrina y actina. Las espectrinas se expresan en todos los metazoos a raíz de varios genes. Por esa razón, en los mamíferos existen distintas isoformas de espectrina que se han originado a partir de las eliminaciones de varios fragmentos (*splicing*) del ARN mensajero (ARNm) proveniente de siete genes. Los genes *SPTA1* y *SPTAN1* codifican para las proteínas  $\alpha I$  y  $\alpha II$  espectrina, respectivamente. Al contrario de lo que pasa con *SPTA1*, el gen *SPTAN1* codifica para varias isoformas de  $\alpha II$  espectrina que se encuentran en todas las células no eritrocitarias y que resultan de tres procesos de *splicing* (Cianci y col., 1999; Moon y McMahon, 1990; Berghs y col., 2000). Hay cinco genes que codifican para las  $\beta$  espectrinas: cuatro genes  $\beta$  convencionales, *SPTB*, *SPTBN1*, *SPTBN2* y *SPTBN4*, que codifican para las proteínas  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\beta III$  y  $\beta IV$  espectrina, respectivamente, y el gen *SPTBN5* que codifica para la  $\beta V$  espectrina también llamada  $\beta H$  (del inglés  *$\beta$  Heavy*) (Sahr y col, 1990; Winkelmann y Forget, 1993). La expresión de las distintas isoformas de espectrina está regulada de manera específica por el tejido donde se expresa y su estadio de desarrollo (Tabla 1).

**Tabla 1. Los genes de espectrina y su expresión en tejidos de mamífero** (modificado de Machnicka y col., 2012).

Proteína	Gen	Expresión	Referencia
$\alpha I$	<i>SPTA1</i>	Isoforma $\alpha I \Sigma 1$ en eritrocitos e isoforma $\alpha I \Sigma^*$ en el cerebro	Sahr y col., 1990; Winkelmann y Forget, 1993
$\alpha II$	<i>SPTAN1</i>	Varias isoformas presentes en todas las células no eritrocitarias	Cianci y col., 1999; Moon y McMahon, 1990; Zhang y col., 2010
$\beta I$	<i>SPTB</i>	$\beta I \Sigma 1$ en eritrocitos, $\beta I \Sigma 2$ en el cerebro y músculo, $\beta I$ espectrina también detectada en linfocitos	Winkelmann y Forget, 1993; Winkelmann y col., 1990; Bennett y Baines, 2001; Pradhan y Morrow, 2002
$\beta II$	<i>SPTBN1</i>	Todas las células nucleadas	Winkelmann y Forget, 1993; Bennett y Baines, 2001; Pradhan y Morrow, 2002
$\beta III$	<i>SPTBN2</i>	Golgi y vesículas, MP de neuronas y células epiteliales	Stankewich y col., 1998; Holleran y col., 2001
$\beta IV$	<i>SPTBN4</i>	Neuronas (axón, segmento inicial, nódulo de Ranvier), islotes pancreáticos y en el núcleo	Berghs y col., 2000; Tse y col, 2001
$\beta V$	<i>SPTBN5</i>	Niveles bajos en muchos tejidos	Stabach y Morrow, 2000; Legendre y col., 2008

Los invertebrados también tienen genes para la espectrina. En los genomas de *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* encontramos un solo gen que codifica para una  $\alpha$  espectrina que es muy similar a la  $\alpha II$  espectrina de mamíferos [*spc-1* y *l(3)dre3*,

respectivamente] (Byers y col., 1987; Dubreuil y col., 1989) y dos genes codificantes para la  $\beta$  espectrina: uno (*unc-70/bgs-1* en *C. elegans* y  *$\beta$ -Spc* en *D. melanogaster*) codifica para la proteína  $\beta_G$  (proteína similar a la  $\beta_{II}$  espectrina de mamíferos) conocida como  $\beta$  espectrina convencional (Byers y col., 1992) y el otro (*sma 1* en *C. elegans* y *karst* en *D. melanogaster*) codifica para la  $\beta_H$  espectrina, que es una espectrina pesada similar a la  $\beta_V$  espectrina que encontramos en mamíferos (McKeown y col., 1998; Dubreuil y Grushko, 1998). Las secuencias genómicas de las espectrinas de *D. melanogaster* y las espectrinas no eritrocitarias de mamíferos están más conservadas entre ellas que entre las espectrinas no eritrocitarias y las eritrocitarias en mamíferos.

### **Dominios funcionales**

A pesar de la diversidad de genes, cada subunidad de espectrina está formada por una sucesión de motivos formados por triples hélices llamados **repeticiones de espectrina**. Son dominios de 106 aa de largo flanqueados por secuencias N- y C-terminal no homólogas (Sahr y col., 1990; Speicher y Ursitti, 1994; Winkelmann y col., 1990). Las  $\alpha$  espectrinas están formadas por 20 repeticiones de espectrina (de  $\alpha_1$  a  $\alpha_{20}$ ), las  $\beta$  espectrinas contienen 17 (de  $\beta_1$  a  $\beta_{17}$ ) y las  $\beta_V$  espectrinas tienen 30. La estructura de unidad de repetición y sus interconexiones están asociadas a la flexibilidad de la proteína (Grum y col., 1999). Cuando los tetrámeros de espectrina se estiran, los filamentos de espectrina pueden alcanzar los 200 nm de longitud. Además de ser importantes para la flexibilidad y la estructura de las espectrinas, estas repeticiones se consideran como una plataforma de interacción. Algunas de ellas están involucradas en la formación de dímeros y tetrámeros de espectrina, como las  $\alpha_{17}$ - $\alpha_{20}$  que interaccionan con las  $\beta_1$ - $\beta_4$ , y la primera hélice de la  $\alpha$  espectrina con la última repetición  $\beta_{17}$  de la  $\beta$  espectrina (Li y col., 2008; Speicher y col., 1992; Ursitti y col., 1996). Además, también son esenciales para la unión del citoesqueleto de espectrina con la bicapa lipídica. En los eritrocitos, las repeticiones  $\beta_{14}$  y  $\beta_{15}$  se unen al intercambiador aniónico AE1 a través de la anquirina (Ipsaro y Mondragon, 2010). Otro complejo de unión a la membrana lipídica es el formado por la proteína 4.1, la actina, la dematina, la aducina, la tropomiosina y la tropomodulina. Este complejo une el citoesqueleto de espectrina con la glicoporina C y el intercambiador aniónico AE1 a través de las proteínas adaptadoras p55 y 4.2 (Korsgren y col., 2010; Ipsaro y col., 2009; Low, 2009; Van Kim y col., 2006). El complejo 4.1 también estabiliza la interacción espectrina-actina y mantiene la longitud de los filamentos de actina. Las espectrinas también interaccionan directamente con fosfolípidos como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, que son componentes muy activos de la membrana eritrocitaria y que se encuentran en la parte interna de ésta (Diakowski y col., 2006; Sikorski y col., 2000;

Thompson y col., 2008; Grzybek y col., 2006; Chorzalska y col., 2010; Wolny y col., 2011; An y col., 2005). Todas estas interacciones son cruciales para el mantenimiento de las propiedades mecánicas de la membrana. Estudios recientes han demostrado que las repeticiones de espectrina ( $\alpha$ 4) de la subunidad  $\alpha$  interactúan directamente con proteínas de membrana como las moléculas de adhesión Lu/BCAM (Collec y col., 2011; Gauthier y col., 2010).

Además de las repeticiones de espectrina, las espectrinas contienen secuencias adicionales que les facilitan las interacciones con otras proteínas o lípidos. Las  $\alpha$  espectrinas tienen un **dominio SH3** (dominio de homología a la proteína tirosina quinasa Src) entre las repeticiones  $\alpha$ 9 y  $\alpha$ 10 que participa en la señalización celular mediante la interacción con sitios ricos en prolina (Musacchio y col., 1992). En el extremo carboxilo se encuentran cuatro **motivos EF “en mano”** relacionados con la calmodulina, de los cuales dos están involucrados en la unión a calcio (Lundberg y col., 1997; Trave y col., 1995; Trave y col., 1995). La  $\alpha$ II espectrina difiere de la  $\alpha$ I por un inserto de 35 aa en la repetición  $\alpha$ 10 responsable de la **unión a calmodulina** de forma dependiente de calcio (Okabe y Sobue, 1987) y por dos sitios de corte por caspasas (Rotter y col., 2004) y calpaínas (Nicolas y col., 2002). Todas las  $\beta$  espectrinas tienen un **dominio de unión a actina** en el extremo N-terminal formado por un tándem de dos dominios de homología a calponina (dominios CH) presente en muchas proteínas relacionadas con espectrina y no relacionadas con citoesqueleto (Bañuelos y col., 1998; Karinch y col., 1990). Las repeticiones  $\beta$ 14 y  $\beta$ 15 de las  $\beta$  espectrinas convencionales se unen a anquirina (Kennedy y col., 1991; Davis y col., 2008; Ipsaro y col., 2009; Stabach y col., 2009). Puesto que hay dos  $\beta$  espectrinas en cada tetrámero, cada uno de ellos puede unirse potencialmente a dos anquirinas: hay evidencias de cooperación entre anquirinas para poder unirse a espectrina (Cianci y col., 1988). En la región C-terminal de las  $\beta$  espectrinas se encuentra el **dominio de homología a plectrina** (dominio PH) responsable de la unión a fosfoinosítidos (Musacchio y col., 1993; Saraste y Hyvonen, 1995; Stankewich y col., 1998).

Mientras que los eritrocitos de mamífero contienen solamente un tipo de tetrámero de espectrina formado por una subunidad  $\alpha$ I y una subunidad  $\beta$ I que se localiza en la parte interna de la MP, las células nucleadas pueden tener varias especies de espectrina. Muchas de las isoformas de  $\alpha$  y  $\beta$  espectrina que derivan de distintos genes se localizan en varios compartimentos celulares, como la MP, el Golgi, el RE, las vesículas y el núcleo. Algunas de las isoformas son específicas de un tipo celular o de un orgánulo concreto con funciones muy determinadas. La inactivación de los genes que codifican para las espectrinas canónicas en *D. melanogaster* y *C. elegans* indican que estas proteínas son esenciales para la supervivencia y el desarrollo normal de estos organismos.



### 2.1.2. Anquirinas

Las anquirinas son una familia de proteínas adaptadoras que están implicadas en la unión de diversas proteínas a dominios altamente especializados de la MP y del RE (Bennett y Baines, 2001).

Los vertebrados tienen tres genes de anquirina (*ANK1-3*) que codifican para la **anquirina R** (del inglés *restricted*), la **anquirina B** (del inglés *broadly*) y la **anquirina G** (del inglés *giant*), respectivamente. La anquirina R es la anquirina eritrocitaria de los mamíferos (Lux y col., Otto y col., Peters y col., 1995; Kordeli y col., 1995) aunque también se expresa en algunas neuronas y en el músculo estriado. La anquirina B se identificó inicialmente en el cerebro pero ahora se sabe que se encuentra en la mayoría de tejidos. La anquirina G es la de mayor tamaño y tiene una expresión generalizada. Se caracterizó en el sistema nervioso pero también se encuentra en la mayoría de tejidos. En cambio, los invertebrados sólo tienen un gen que codifica para la anquirina, aunque en la línea descendiente de los artrópodos se duplicó el gen y por eso tienen dos anquirinas (Hortsch y col., 2002; Hopitzan y col., 2006).

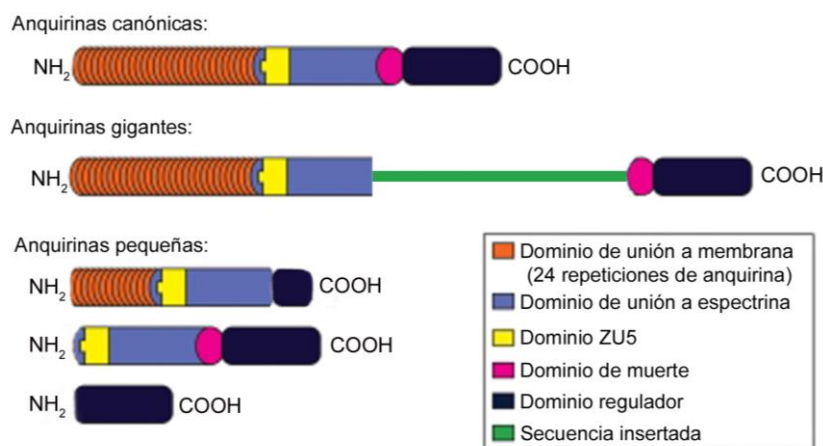
La expresión de los genes de anquirina depende del tejido y del estado de desarrollo del organismo, generando así múltiples isoformas de anquirina. Podemos clasificar las anquirinas en tres grandes grupos, según su peso molecular: las **anquirinas canónicas**, codificadas por los tres genes, que pesan entre 190 y 250 kDa, las **anquirinas gigantes** que pesan entre 270 y 480 kDa y las **anquirinas pequeñas**, de 26 a 120 kDa. Éstas últimas están codificadas por los genes *ANK1* y *ANK3* y se asocian a orgánulos intracelulares (Tabla 2).

**Tabla 2.** Los genes de anquirina y su expresión en tejidos de mamífero (modificado de Rubtsov y Lopina, 2000).

Proteína	Gen	Variante (kDa)	Expresión	Referencia
ANK R	<i>ANK1</i>	206	La más abundante en eritrocitos	Palek y Lambert, 1990
		186	Eritrocitos pero minoritaria	Palek y Lambert, 1990
		20-26	Región M y Z de las miofibrillas del músculo estriado	Zhou y col., 1997
ANK B	<i>ANK2</i>	440	Axones sin mielina y dendritas del cerebro embrionario	Kunimoto y col., 1991
		220	Cuerpos celulares, dendritas de las neuronas y en la glía	Otto y col., 1991
ANK G	<i>ANK3</i>	480	Nódulos de Ranvier y segmentos iniciales de los axones mielinizados	Kordeli y col., 1995; Peters y col., 1995
		270	Nódulos de Ranvier y segmentos iniciales de los axones mielinizados	Kordeli y col., 1995; Peters y col., 1995
		190	Axones sin mielina y en riñón	Thevananther y col., 1998
		119 100-120	Epitelios, tejido muscular y en Golgi Asociada a lisosomas de macrófagos y al retículo sarcoplásmico del músculo esquelético. Riñón, colon y testículos	Devarajan y col., 1996 Hoock y col., 1997; Kordeli y col., 1998; Hoock y col., 1998

## Dominios funcionales

Aunque las anquirinas están reguladas por *splicing* de los ARNm, las formas canónicas tienen una estructura parecida con tres dominios básicos altamente conservados (Figura 6). El extremo amino contiene **24 repeticiones de anquirina**, que son estructuras de hélice-bucle-hélice que forman sitios de unión de mucha afinidad para sus ligandos (Michaely y col., 2002). Cada repetición de anquirina está formada por 33 aa y se han encontrado en más de 300 proteínas humanas no relacionadas con las anquirinas. Debido al elevado número de repeticiones de anquirina, las anquirinas canónicas pueden unirse a más de una proteína de membrana: por ejemplo, la anquirina B, que se encuentra en el corazón, puede formar un complejo con el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  NCX1, con el receptor  $\text{IP}_3$  y con la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Mohler y col., 2003). El dominio central **ZU5** es el que se une a espectrina (Ipsaro y col., 2009 y 2010). Está formado por 150 aa y su conformación es de dos láminas  $\beta$  en el corazón de la estructura 3D. Mientras que en otras proteínas el **dominio de muerte** interviene en la activación de ciertas caspasas y en la muerte celular, en las anquirinas no se sabe muy bien qué papel juega aunque se postula que podría estar implicado en interacciones con otras proteínas (Mohler y col., 2002; Del Rio y col., 2004). Este dominio se encuentra en la región C-terminal y está formado por seis hélices  $\alpha$ . El **dominio regulador** contiene muchos aa ácidos y es muy sensible a proteólisis (Lux y col., 1990; Lambert y col., 1990). Se encarga de modular afinidades del dominio de unión a espectrina y del dominio de unión a membrana hacia sus ligandos proteicos (Hall y Bennett, 1987).



**Figura 6. Estructura de los dominios de las anquirinas.**

Esquema de los tres tipos de anquirinas. El dominio de unión a membrana de las isoformas de anquirina (naranja) está formado por 24 repeticiones de anquirina, que forman una superficie de unión muy versátil para muchos

ligandos de las anquirinas. El dominio de unión a espectrina (azul) permite a las anquirinas coordinar proteínas integrales de membrana con la red de espectrina. El dominio de muerte (rosa) es el dominio más conservado mientras que el dominio regulador (negro) es la región más variable de las anquirinas. Este dominio interacciona intramolecularmente con el dominio de unión a membrana para modular la afinidad de la anquirina por otros ligandos (modificado de Bennett y Healy, 2009).

Más allá de estos elementos comunes, en la estructura de las anquirinas canónicas hay mucha variación en la secuencia de las demás anquirinas (Tabla 2). Por ejemplo, a algunas formas les falta alguna o todas las repeticiones de anquirina (Peters y col., 1995; Gagelin y col., 2002; Hopitzan y col., 2005). La anquirina B de 440 kDa y la anquirina G de 480 son el resultado de una inserción de una cola de 220 kDa entre el dominio de unión a espectrina y el dominio de muerte. Estas isoformas gigantes tienen funciones especializadas en los axones sin mielina (anquirina B) y en el anclaje de los canales de voltaje dependientes de sodio a los axones iniciales y a los nódulos de Ranvier. En las anquirinas gigantes, los *splicing* alternativos pueden generar isoformas de más de 400 kDa: en el caso de la anquirina G gigante que se encuentra en los nódulos de Ranvier, el inserto es tan grande que le permite estar en contacto con la MP y con el interior del axón (Kordeli y col., 1995). Finalmente, las anquirinas de menor tamaño carecen de algún fragmento largo de las anquirinas canónicas y se localizan en membranas especializadas, como la anquirina G de 119 kDa que se encuentra en el Golgi, la anquirina G de 100-120 kDa que está en los lisosomas y la anquirina R de 26 kDa que se localiza en el retículo sarcoplásmico. En el caso de la isoforma que se encuentra en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético (Ank1.5 de 17,5 kDa), el dominio de unión a membrana se encuentra en el extremo amino y le faltan todos los dominios canónicos (Bagnato y col., 2003; Kontrogianni-Konstantopoulos y col., 2003; Porter y col., 2005). Sin embargo, algunas de las anquirinas musculares tienen un dominio de 76 aa de largo que se une a obscurina y posiblemente también a titina (OTBD) (Hopitzan y col., 2006; Borzok y col., 2007).

### 2.1.3. Proteínas 4.1

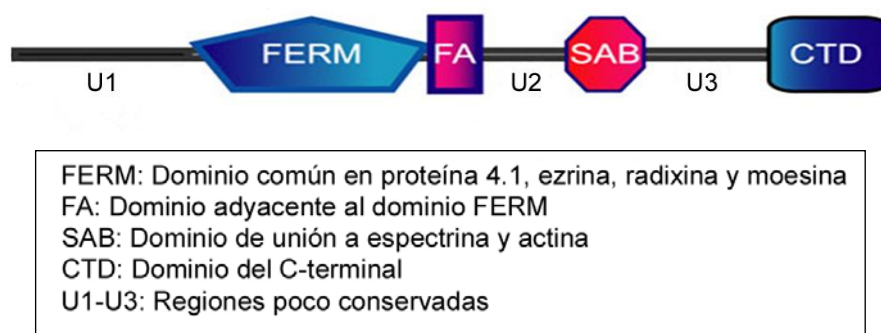
Igual que sucede con las espectrinas y las anquirinas, las proteínas 4.1 aparecieron temprano en la evolución animal y los vertebrados poseen más de una copia de los genes 4.1. El gen *EPB41* codifica para la **proteína 4.1R** (del inglés *red blood cells*), el gen *EPB41L1* codifica para la **proteína 4.1N** (del inglés *neuron*), el *EPB41L2* para la **proteína 4.1G** (del inglés *general expression*) y el *EPB41L3* lo hace para la **proteína 4.1B** (del inglés *brain*) (Conboy y col., 1986; Parra y col., 1998, 2000; Tran y col., 1999; Walensky y col., 1999). La proteína 4.1R se encuentra en tejidos hematopoyéticos como los eritrocitos, la médula ósea y el hígado fetal aunque también se expresa muy poco en otros tipos celulares (Peters y col., 1998), mientras que las otras tres proteínas 4.1 se encuentran en una gran variedad de tipos celulares pero no en eritrocitos (Taylor-Harris y col., 2005a). La proteína 4.1G tiene una expresión general (Parra y col., 1998; Peters y col., 1998), la proteína 4.1B se encuentra básicamente en el cerebro

(Parra y col., 2000) junto con la proteína 4.1N, sobretodo en subpoblaciones de neuronas (Walensky y col., 1999). En *D. melanogaster* y *C. elegans* hay solo una copia del gen 4.1.

Uno de los aspectos comunes de las proteínas 4.1 es que están sujetas a *splicing* dependiendo del tejido y del estadio de desarrollo. Este efecto está bien caracterizado para la proteína 4.1R, en la que más de la mitad de los exones del gen que la codifica pueden sufrir *splicing* (Conboy, 1999). Esto regula la interacción con el citoesqueleto y la señalización intracelular (Conboy, 1999; Gascard y col., 1999; Luque y col., 1999; Luque y Correas, 2000). En el riñón (Ramez y col., 2003; Gascard y col., 2004) y en el corazón (Taylor-Harris y col., 2005b), todas las proteínas 4.1 están sujetas a *splicing*, y esto parece ser que es lo que ocurre en todos o casi todos los tejidos (Parra y col., 2004).

### Dominios estructurales

Los productos de los cuatro genes de mamífero son proteínas modulares con tres dominios funcionales unidos por regiones poco conservadas entre ellas (Conboy, 1999; Parra y col., 2000) (Figura 7). Éstos son el **dominio FERM** (del inglés *protein 4.1, ezrin, radixin and moesin*) (Chishti y col., 1998) y el **dominio CTD** del C-terminal (Scott y col., 2001), que pueden unirse a proteínas transmembrana, y el **dominio SAB** que se une a espectrina y actina (Correas y col., 1986a, b; Discher y col., 1993, 1995) y se encarga de ligar la proteína 4.1 con el citoesqueleto. La proteína 4.1N es una excepción puesto que su dominio SAB no se une ni a espectrina ni a actina (Gimm y col., 2002). Adyacente al dominio FERM hay el **dominio FA** (del inglés *FERM-adjacent*) (Baines, 2006).



**Figura 7. Estructura de los dominios de las proteínas 4.1.** Los dominios característicos de las proteínas 4.1 son el dominio FERM que se une a ciertas proteínas de membrana, a calmodulina y a  $PI(4,5)P_2$ , seguido de su dominio adyacente FA que, en el caso de las proteínas 4.1R, es sustrato de fosforilación de las proteínas quinasa A y C. El dominio SAB se une a espectrina y a actina y el dominio CTD, que se sitúa en el extremo carboxilo, se une a varias proteínas transmembrana. Entre los dominios estructurales encontramos unas regiones relativamente conservadas entre las proteínas 4.1 llamadas U1-U3. La región U1 (conocida también por pieza de cabeza) se une a calcio y a calmodulina (modificado de Baines, 2010).

El dominio FERM se llama así porque es un módulo común en las proteínas 4.1, ezrina, moesina y radixina (Chishti y col., 1998). Consta de tres unidades globulares de unos 100 aa cada una y representa un lugar donde convergen muchos procesos de regulación y señalización. Tiene un sitio de unión a calmodulina (Nunomura y Takakuwa, 2006), a fosfatidilserina (An y col., 2001) y a PI(4,5)P<sub>2</sub> (An y col., 2006), y las fosforilaciones afectan a su actividad (Manno y col., 2005) igual que en la región U1 (Nunomura y col., 2001). El dominio FERM tiene varios sitios de unión para muchas proteínas de membrana que están regulados por estos factores. Este dominio representa un inusual nexo de regulación en respuesta a señales de regulación de expresión génica, señalización a través de proteínas quinasa y calcio y a través de la disponibilidad de lípidos fosforilados.

Hay regiones en las distintas proteínas 4.1 que no se han conservado durante la evolución. Se llaman **regiones U1, U2 y U3**, y no se sabe muy bien cuál es su función. En la proteína 4.1R, la región U1 se une a calmodulina (Leclerc y Vetter, 1998) y a la proteína centrosomal asociada P4.1 (Hung y col., 2000). Esta región también se ha descrito que modula el transporte nuclear de la proteína 4.1R (Gascard y col., 1998, 1999; Luque y Correas, 2000), sugiriendo que las funciones y las propiedades de las proteínas 4.1 se determinan mediante las interacciones entre los diversos dominios funcionales. La fosforilación mediada por la proteína quinasa C (PKC) de un residuo de serina del dominio FA modula la interacción del dominio FERM y del dominio SAB con una serie de ligandos específicos (Manno y col., 2005). Para la región U2, se ha descrito recientemente que es la responsable de las propiedades anti-proliferativas de la proteína 4.1B (Robb y col., 2005). Para la región U3, en cambio, no se ha descrito aún ninguna función.

#### **2.1.4. Aducinas**

Los vertebrados tienen tres genes de aducina (*ADD1-3* que codifican para las **aducinas α, β y γ**, respectivamente) mientras que los invertebrados sólo tienen uno. Las aducinas de los vertebrados son heterotetrámeros formados por los polipéptidos αβ o αγ (Matsuoka y col., 2000). La α aducina se expresa en la mayoría de tejidos mientras que la β aducina tiene un patrón de expresión más restrictivo limitado al cerebro y células hematopoiéticas (Joshi y col., 1991). La γ aducina forma oligómeros con la α aducina en aquellas células en las que no hay β aducina (Dong y col., 1995). La aducina es una proteína de coronado o bloqueo del extremo (+) de la actina filamentosa (Kuhlman y col., 1996) que promueve la unión de la espectrina y otras proteínas con la actina (Gardner y Bennett, 1987; Li y col., 1998). La regulación de la actividad de bloqueo del extremo (+) de la aducina podría ser relevante en las células motoras y en

tejidos en desarrollo, puesto que las señales de calcio podrían exponer los extremos (+) de la actina filamentosa. La aducina se asocia con los lados y los extremos (+) de la actina filamentosa con más afinidad en presencia de la espectrina que cuando solamente hay actina (Li y col., 1998). Así, la forma más común de asociación de la aducina con la espectrina es formando un complejo ternario en los extremos (+) de los filamentos de actina (Gardner y Bennett, 1987; Bennett y col., 1988).

### Dominios estructurales

Cada polipéptido contiene tres regiones (Figura 8): una región globular en el N-terminal resistente a proteólisis que se conforma como la proteína aldolasa (**dominio de homología a la familia aldolasa II**), una región corta intermedia llamada **cuello** y una cola sensible a proteasas que contiene un **dominio de homología a la familia MARCKS** (del inglés *myristolated alanine rich C kinase substrate*). Este dominio de la cola es un sitio de múltiples interacciones con otras proteínas, incluidas las espectrinas y la actina (Blackshear, 1993; Musacchio y col., 1992). Sin embargo, parece ser que requiere la formación de dímeros o oligómeros para ser funcional. Esto se da gracias a la región del cuello (Matsuoka y col., 2000). También une a calmodulina y a calcio (Gardner y Bennett, 1987; Matsuoka y col., 1996) y contiene un sitio de fosforilación para PKC. La calmodulina y la PKC son reguladores negativos de las interacciones entre la aducina y la espectrina y la aducina y la actina (Matsuoka y col., 1996, 1998).



**Figura 8. Estructura de los dominios de las aducinas.** Las aducinas contienen un dominio de homología a la familia Aldolasa II. En el C-terminal hay una región corta que contiene los sitios de fosforilación de PKA y PKC y los sitios de unión a calcio, calmodulina, actina y espectrina. Las regiones con una secuencia similar para los distintos polipéptidos de aducina se muestran en gris. La zona central (región del cuello) forma oligómeros. También contiene sitios de fosforilación de la quinasa ROCK, que regulará la interacción con la espectrina (modificado de Baines, 2010).

## 2.2. Funciones fisiológicas

Se han postulado varias hipótesis sobre el papel de la espectrina y la anquirina basadas en el estudio de su localización celular y sus interacciones con otras proteínas. La manipulación de la expresión génica en modelos animales ha proporcionado varias pruebas que demuestran o

refutan dichas hipótesis y ha revelado nuevas funciones del citoesqueleto de espectrina. En los primeros esfuerzos para elucidar la función de la espectrina se microinyectaron anticuerpos contra la espectrina en fibroblastos en cultivo. Se observó la formación de agregados y el colapso de los filamentos intermedios de las células que aparentemente eran normales (Mangeat y Burridge, 1984). Estos resultados sugirieron que la espectrina no era necesaria para la supervivencia de los fibroblastos en cultivo y aparentemente no era esencial para los procesos metabólicos básicos. Más tarde, se descubrió que la espectrina y la anquirina se localizaban en los dominios basolaterales de varios tejidos epiteliales (Drenckhahn y Bennett, 1987; Drenckhahn y col., 1985; Nelson y Veshnock, 1986). Estas observaciones morfológicas fueron acompañadas por el descubrimiento de Nelson y Veshnock en 1987 de que la anquirina se asociaba con la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de los dominios basolaterales de diversos tejidos epiteliales. Posteriormente, Nelson y col. (McNeill y col., 1990) descubrieron que la expresión de E-cadherina en fibroblastos promovía el contacto célula-célula y que se reclutaba espectrina en estos sitios de contacto intercelular. Además, caracterizaron un complejo de espectrina, cadherina y anquirina que se forma durante el ensamblaje de las células MDCK (del inglés *Madin-Darby canine kidney*) para formar hojas epiteliales (Nelson y col., 1990). También se observó que la sobreexpresión de los dominios de unión a anquirina y a actina de la  $\beta$  espectrina resultaba en la formación de células anormales que carecían de la distribución polarizada de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Devarajan y col., 1997; Hu y col., 1995). Con estas observaciones se confirma que la espectrina y la anquirina tienen un papel fundamental en los estadios iniciales de la formación de la polaridad de las células epiteliales así como en la adhesión celular basada en cadherina y en el mantenimiento de dicha polaridad (Yeaman y col., 1999).

La espectrina y la anquirina también están implicadas en procesos intracelulares en donde participa el Golgi (Beck y Nelson, 1998; De Matteis y Morrow, 1998). El concepto de un citoesqueleto de espectrina asociado al Golgi proviene de las observaciones hechas a partir de las formas inmunoreactivas de la  $\beta$  espectrina (Beck y col., 1994; Stankewich y col., 1998) y la anquirina (Beck y col., 1997; Devarajan y col., 1996; Peters y col., 1995) asociadas a las membranas del Golgi. El descubrimiento de que las membranas lisosomales contenían una forma truncada de anquirina G de 120 kDa sugirió que otros orgánulos también podían contener las proteínas anquirina y/o espectrina (Hooek y col., 1997). Además, la espectrina se asocia con la dinactina, un motor de MTs, en células que sobreexpresan Arp 2 (del inglés *actin related protein 2*) (Holzinger y col., 1999). Existen evidencias sobre el papel de la espectrina en el transporte de membranas post-Golgi que se basan en la interrupción del transporte

polarizado de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en células MDCK que sobreexpresan un fragmento del N-terminal de la  $\beta$  espectrina (Devarajan y col., 1997).

Por otro lado, basándose en las observaciones hechas por Willard y col. (Levine y Willard, 1981), se ha propuesto que la  $\beta$  espectrina (fodrina por este grupo) participa en el transporte axonal puesto que está presente en varios tipos de proteínas y orgánulos que se transportan a lo largo del axón. También se ha sugerido que la espectrina participa en el mantenimiento de las vesículas sinápticas en los nervios terminales (Sikorski y col., 2000). Esta hipótesis se centra en la asociación de la espectrina con la sinapsina, una proteína de las vesículas sinápticas (Sikorski y col., 1991) y con MUNC 13 (Sakaguchi y col., 1998).

En el caso de los invertebrados (*D. melanogaster* y *C. elegans*) el patrón de expresión de las espectrinas es muy similar al de los vertebrados. La  $\beta_G$  espectrina de *C. elegans* se localiza en las zonas de contacto célula-célula desde el estadio embrionario hasta los tejidos epiteliales adultos (Moorthy y col., 2000). Igual que sucede en los vertebrados, la  $\beta_G$  espectrina de *C. elegans* se expresa sobretodo en el sistema nervioso, en axones y en cuerpos celulares. También se encuentra en las zonas de contacto con la matriz extracelular de las células musculares (Moorthy y col., 2000). La  $\beta_H$  espectrina de *D. melanogaster* está en los dominios apicales de las células epiteliales, igual que la  $\beta_{TW}$  de los pollos (De Cuevas y col., 1996; Dubreuil y col., 1997; Glenney y col., 1983; Thomas y col., 1998).

### **Regulación de la morfología celular y de las propiedades mecánicas**

Como ya se ha comentado anteriormente, el citoesqueleto de espectrina eritrocitario actúa como soporte para dar forma al eritrocito y mantiene la integridad de la membrana celular y sus propiedades mecánicas (Delaunay, 2007; Perrotta y col., 2008). En las células nucleadas, el citoesqueleto de espectrina no eritrocitario está involucrado en el mantenimiento de la arquitectura celular, la morfología y la estabilidad de la membrana (Bennett y Healy, 2008; Goodman y col., 1981; Wu y col., 2001). En las células epiteliales, la depleción de  $\beta_{II}$  espectrina o de anquirina G resulta en la pérdida de la membrana lateral, la expansión del área de la membrana apical y basal y la conversión de la célula con morfología de columna a una escamosa (Kizhatil y col., 2007a, b). Las dos proteínas son necesarias para la compactación y la acumulación de E-cadherina en la zona de contacto célula-célula de las células epiteliales y para el correcto transporte de proteínas y fosfolípidos hasta la membrana lateral (Kizhatil y col., 2007a). (Figura 9 A).

Las espectrinas también aportan flexibilidad a las células no eritrocitarias. Esta propiedad la confiere la  $\beta_V$  espectrina de los mamíferos y sus homólogos ( $\beta_H$  espectrina en *D. melanogaster* y Sma-1 en *C. elegans*). Estos homólogos de la  $\beta_V$  espectrina tienen 30 repeticiones de



espectrina en vez de 17 que ayudan a entrelazar los filamentos de actina y les da más flexibilidad a las células (Grum y col., 1999; Stabach y Morrow, 2000). En las células OHC (del inglés *outer hair cells*), la  $\alpha$ II, la  $\beta$ II y la  $\beta$ V espectrina, junto con la actina filamentosa, forman una red cortical involucrada en la amplificación del sonido o la aceleración de estímulos mecánicos (Fettiplace y col., 2006). Los mamíferos han desarrollado un mecanismo de amplificación adicional, llamado electromotilidad, que es exclusivo de las células OHC localizadas en el caracol óseo del oído. La función principal de esta red de espectrina y actina es suministrar propiedades flexibles que se requieren para los ciclos de contracción y elongación de los pelos. Mientras que la  $\beta$ II espectrina está restringida al plato cuticular, una red apical muy densa en filamentos de actina, la  $\beta$ V espectrina se concentra en el entramado cortical y está directamente relacionada en la electromotilidad de estas células (Legendre y col., 2008).

Tanto las  $\alpha$  como las  $\beta$  espectrinas son necesarias durante el desarrollo del sistema nervioso. Las  $\beta$  espectrinas interactúan directamente con la molécula de adhesión celular NCAM, una molécula de adhesión sináptica implicada en la estabilización mecánica de los contactos neuronales (Leshchyn's'ka y col., 2011, 2003). Variaciones genéticas en la NCAM se consideran un factor de riesgo en el trastorno bipolar y en la esquizofrenia (Atz y col., 2007). Por otra parte, la fosforilación de la  $\alpha$ II espectrina en la repetición de espectrina  $\alpha$ 12 es dependiente de la interacción con la proteína 14-3-3 (proteína implicada en migración neuronal y plasticidad sináptica) y actúa como un interruptor entre la regulación positiva y negativa de la neurita como consecuencia de su estimulación por NCAM (Ramser y col., 2010).

### **Estabilización y activación de microdominios de membrana**

El citoesqueleto de espectrina participa en la organización de membranas especializadas. Cuando la espectrina o la anquirina se encuentran mutadas, las proteínas que interactúan con ellas no se acumulan en la zona correcta de la membrana. La expresión y activación del canal TRPC4 (del inglés *transient receptor potential channel 4*) están parcialmente reguladas por la interacción directa con la espectrina. En células que tienen la expresión de la  $\alpha$ II espectrina deplecionada, el canal TRPC4 no se inserta en la membrana (Odell y col., 2008).

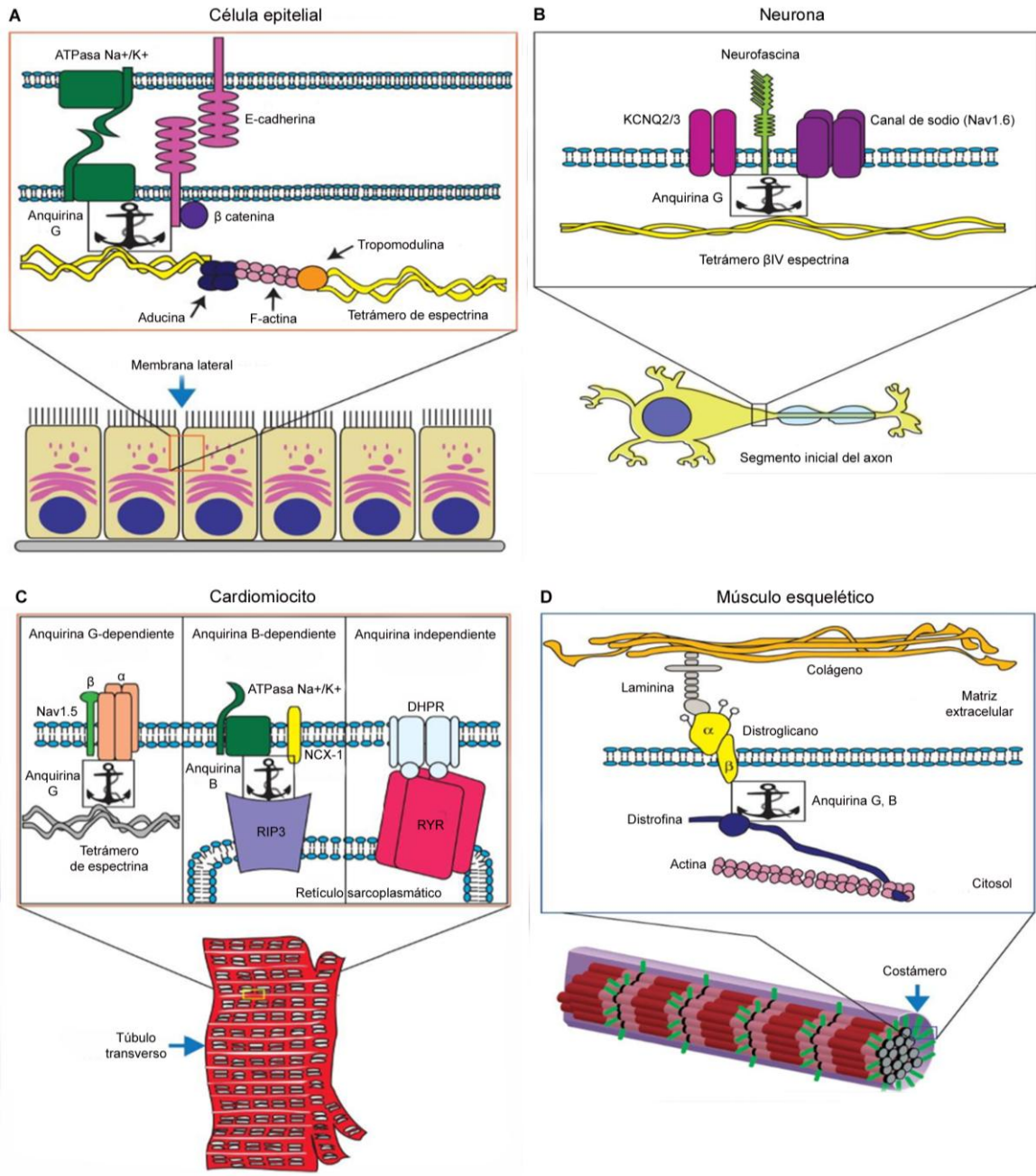
También se ha descrito una mutación de la  $\beta$ III espectrina causante de la ataxia espinocerebelar de tipo 5 (SCA5, del inglés *spinocerebellar ataxia type 5*) y otras enfermedades neurodegenerativas (Stankewich y col., 1998; Ikeda y col., 2006; Lorenzo y col., 2010; Stankewich y col., 2010). Defectos en la  $\beta$ III espectrina están asociados a la deslocalización del transportador de glutamato EAAT4 en la superficie de la MP de las células de Purkinje (Jackson y col., 2001; Perkins y col., 2010). Los ratones deficientes en  $\beta$ IV espectrina presentan

temblores y contracciones de los cuartos traseros. La falta de  $\beta$ IV espectrina en estos ratones temblorosos está asociada a la deslocalización de los canales de voltaje de los segmentos iniciales de los axones y de los nódulos de Ranvier. Alteraciones en la localización de los canales de sodio y potasio de los nervios mielinizados disminuyen la propagación y desincroniza los potenciales de acción (Parkinson y col., 2001; Komada y Soriano, 2002). Por tanto, la  $\beta$ IV espectrina actúa como una plataforma multifuncional de regulación para los canales de sodio y tiene un papel importante en la estructura y estabilidad de las membranas excitables en corazón y cerebro, dirigiendo a proteínas reguladoras y estructurales (Figura 9 B y C). En *D. melanogaster*, la pérdida de  $\beta$  espectrina conlleva la pérdida de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  del dominio basolateral de las células epiteliales (Dubreuil y col., 2000). En un caso extremo, la pérdida de una variante de la  $\beta$ II espectrina en ratones conlleva la muerte uterina (Tang y col., 2003). Por otra parte, defectos en la anquirina B se han asociado con arritmias cardíacas en humanos y con sucesos de muerte súbita (Mohler y col., 2003). La falta de anquirina B conlleva una pérdida de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , intercambiadores de sodio y calcio y receptores de inositol trifosfato (Mohler y col., 2004a, 2005) (Figura 9 C). Un efecto cardíaco similar ocurre a raíz de una mutación en el dominio de unión a anquirina G del canal de sodio dependiente de voltaje (Mohler y col., 2004b).

Tal y como se ha descrito anteriormente, el citoesqueleto de espectrina controla la disposición de determinados canales de membrana, receptores, transportadores y moléculas de adhesión. Defectos en las espectrinas resultan en la desestabilización de la estructura de la membrana que conllevan a importantes enfermedades neurodegenerativas y están involucradas en procesos patológicos.

### **Señalización intracelular, ciclo celular y reparación del ADN**

Otros estudios sugieren la participación de la espectrina en la regulación del ciclo celular. La espectrina podría estar involucrada en la señalización del TGF $\beta$  (del inglés *transforming growth factor  $\beta$* ), un potente regulador del crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. Estudios de proteómica revelan la presencia de  $\beta$  espectrina en un complejo que incluye el receptor 1 de TGF $\beta$  (Conrotto y col., 2007). La pérdida de  $\beta$  espectrina resulta en defectos de la señalización del TGF $\beta$  porque las proteínas que modulan la actividad del TGF $\beta$ , Smad3 y Smad4, se deslocalizan (Tang y col., 2003). Las espectrinas también forman parte del complejo receptor unido a proteína G (Nebl y col., 2002) y del complejo sináptico multiproteico (Sikorski y col., 2000; Becamel y col., 2004; Husi y col., 2000). Estas observaciones indican que las espectrinas están involucradas en el ciclo celular puesto que regulan la expresión de



**Figura 9. Las anquirinas y las espectrinas organizan complejos macromoleculares en diversos tipos de membranas especializadas.** (A) La anquirina G en el ensamblaje de la membrana lateral epitelial. La anquirina G se une a E-cadherina, βII espectrina y a la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Las espectrinas están conectadas vía puentes de F-actina unidos a α y aducina y a tropomiosina. (B) La anquirina G forma un complejo con la βIV espectrina, la neurofascina (una proteína de adhesión) y canales iónicos (KCNQ2/3 y el canal de sodio) en los segmentos iniciales de los axones en las células de Purkinje. (C) En el túbulo transverso de los cardiomiocitos, las anquirinas B y G coordinan la separación de microdominios. La anquirina B se une a la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, al intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX-1) y al receptor de inositol-3 fosfato (RIP3). La anquirina G forma un complejo con Nav1.5 y espectrina. (D) En los costámeros del músculo esquelético, las anquirinas B y G cooperan para estabilizar componentes clave del complejo de las distroglicoproteínas. En la membrana, la anquirina G se une a distrofina y a β-distroglicano (modificado de Bennett y Healy, 2009).

receptores de membrana. En el modelo animal, la regulación a la baja de la expresión de ELF, una isoforma de la  $\beta$ II espectrina, confiere susceptibilidad a la tumorigénesis: ratones mutantes heterocigotos para el déficit de  $\beta$ II espectrina ( $\beta$ II espectrina +/-) desarrollan tumores asociados con la desregulación del control del ciclo celular en la transición G1/S y con la señalización defectuosa del TGF $\beta$  (Baek y col., 2006; Kim y col., 2006; Kitisin y col., 2007). Además, estos ratones nacen con características fenotípicas similares a las del síndrome de *Beckwith-Wiedemann*, una enfermedad genética que cursa con sobrecrecimiento físico asociado con un elevado riesgo de formación de tumores embrionarios.

En células de melanoma que carecen de  $\alpha$ II espectrina, la expresión de p21 (un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina) está aumentada y el ciclo celular está retenido en la fase G1. La falta de espectrina podría modificar indirectamente el ciclo celular mediante la alteración de la adhesión celular (Metral y col., 2009). Aunque el rol de las espectrinas en el ciclo celular está poco claro, las espectrinas tendrían que ser consideradas como elementos importantes de la transducción de vías de señalización extracelular que controlan el ciclo celular.

La  $\alpha$ II espectrina está presente en los núcleos de células humanas y podría participar en la reparación del ADN. Los pacientes con anemia de Fanconi (AF) no tienen  $\alpha$ II espectrina (McMahon y col., 2001). Ésta colocaliza con las proteínas reparadoras del ADN XPF y FANCA, que son proteínas AF, en el núcleo (Sridharan y col., 2003; Sridharan y col., 2006). Otra proteína AF, la FANCG, contiene un motivo que interacciona directamente con el dominio SH3 de la  $\alpha$ II espectrina. Interviene en el mantenimiento de la estabilidad de la  $\alpha$ II espectrina dentro de la célula (Lefferts y col., 2009). La  $\alpha$ II espectrina podría ser importante en alguno de los pasos iniciales del proceso de reparación vía XPF/ERCC1 (Wang y Lambert, 2010). Después del daño celular, la  $\alpha$ II espectrina se une a los sitios dañados del ADN y actúa como andamio, contribuyendo así al reclutamiento de las proteínas reparadoras. Además, la  $\alpha$ II espectrina está involucrada en el mantenimiento de la estabilidad de los cromosomas. La depleción de la  $\alpha$ II espectrina en células humanas resulta en la inestabilidad cromosomal puesto que se ha observado un incremento del número de las aberraciones de cromatina. Esto conlleva a la disminución del crecimiento celular y supervivencia (McMahon y col., 2009).

### **Adhesión y expansión celular**

La  $\alpha$  espectrina participa en la adhesión y expansión celular a través del dominio SH3. La  $\alpha$ II espectrina está presente en una serie de complejos de señalización a través de la integrina  $\beta$ 3 inducidos por calpaína. El dominio SH3 transmite señales que son requeridas para la activación de Rac y la extensión de lamelipodios (Bialkowska y col., 2005). Se ha observado que células que sobreexpresan el dominio SH3 adherido a un sustrato y que tienen los complejos de

señalización de integrinas dependientes de calpaína ya formados, tienen inhibida la activación de Rac, la extensión de lamelipodios y la expansión celular. Ésta fue restablecida sobreexpresando el mutante de Rac constitutivamente activo. Otros estudios apoyan la hipótesis de la participación de la  $\alpha$ II espectrina en la reorganización de la actina (Metral y col., 2009). La depleción de espectrina mediante ARNs de interferencia afecta a la adhesión y expansión celular. Estas células que carecen de espectrina presentan modificaciones del citoesqueleto de actina, como la pérdida de fibras de estrés, alteraciones en los contactos focales y expresión anormal de ciertas integrinas. A través del dominio SH3, la espectrina interacciona con dos miembros de la familia Ena/VASP (del inglés *enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein*): VASP (Benz y col., 2008) y EVL (Rotter y col., 2005; Bournier y col., 2006). Las proteínas Ena/VASP se encuentran en los contactos focales, en los contactos célula-célula y en regiones de membrana altamente dinámicas como los lamelipodios. Estas proteínas aparentemente regulan la adhesión y controlan la dinámica de actina. Las proteínas de la familia Ena/VASP son esenciales para la remodelación de actina cuando acontece la activación de células T, la formación y la extensión de los lamelipodios. Las proteínas Ena/VASP se unen a la proteína adaptadora ADAP, que se expresa en células T y en células mieloides, y que participa en el agrupamiento de la integrina LFA-1. La espectrina también interacciona con otras proteínas implicadas en la dinámica de actina como la Abi1 (Ziemnicka-Kotula y col., 1998; Dubielecka y col., 2011) y proteínas de la familia WASP (del inglés *Wiskott-Aldrich syndrome protein*). Las células T de pacientes con el síndrome de *Wiskott-Aldrich* presentan defectos en el citoesqueleto muy característicos (Derry y col., 1994) así como alteraciones funcionales (Nonoyama y Ochs, 1998).

### **Control de la activación de proteínas transmembrana**

El otro ejemplo de la participación de la espectrina en la señalización celular es su contribución a la formación del receptor de células T (RCT) en linfocitos. Se ha demostrado que el citoesqueleto de espectrina se une directamente a CD45 en los linfocitos a través de la espectrina y la anquirina (Iida y col., 1994; Pradhan y Morrow, 2002). CD45 juega un papel importante en la proliferación de linfocitos T estimulada por el contacto con el antígeno y en el desarrollo del timo. La actividad catalítica de CD45 es necesaria para la señalización y regulación del RCT. Mutaciones en el gen humano que codifica para CD45 son la causa de varias inmunodeficiencias severas (Kung y col., 2000; Tchilian y Beverley, 2006; Tchilian y col., 2001). Los ratones deficientes en CD45 son inmunodeficientes, con pocos linfocitos T periféricos, defectos en el desarrollo del timo y no se da la activación del sistema inmune mediada por el receptor (Wallace y col., 1997). La unión directa de la espectrina a CD45

estimula la actividad fosfotirosina fosfatasa de CD45, facilitando el movimiento de CD45 y CD3 hacia la superficie del linfocito (Pradhan y Morrow, 2002).

En líneas celulares derivadas de linfocitos, la espectrina se distribuye por el citoplasma pero a menudo aparece formando agregados (Repasky y col., 1986). Estos agregados ricos en espectrina contienen varias proteínas como la hsp70, el receptor para la quinasa -1 C y PKC $\theta$  (una subfamilia de PKC independiente de calcio) (Ghaffari-Tabrizi y col., 1999; Trushin y col., 1999). La activación de linfocitos mediante PMA, el aglutinamiento del RCT y la hipertermia leve resultaron en la formación de agregados citoplasmáticos de espectrina (Masso-Welch y col., 1999). El reclutamiento de proteínas intracelulares hacia la MP es un evento bien caracterizado necesario para la iniciación de la transducción de señales; la participación de espectrina en este acontecimiento podría indicar su función en la señalización de los linfocitos. Estos factores implican que la agregación de espectrina y PKC $\theta$  en linfocitos estimulados química y físicamente y la formación de un gran complejo de señalización en la zona donde se acumula el RCT en la sinapsis inmunológica podrían ser dos fenómenos relacionados (Kwiatkowska y Sobota, 1999).

La agregación de espectrina también podría estar asociada a eventos apoptóticos de fase temprana que preceden a una pérdida de la asimetría de aminofosfolípidos de la membrana (Dubielecka y col., 2010). La redistribución de espectrina y PKC $\theta$  en un agregado polar también se ha observado en las líneas celulares Jurkat T y HL60 durante los primeros estadios de la apoptosis inducida por citostáticos. Estos cambios parecen estar restringidos a la espectrina y no conciernen otras proteínas citoesqueléticas como la actina o la vimentina. Aunque las espectrinas son sustratos potenciales de las caspasas-3, -7 y -8, estas proteasas exhiben menor implicación en la agrupación de la espectrina/PKC $\theta$  durante las fases tempranas de la apoptosis. Además, se ha visto que la agregación de espectrina es parcialmente dependiente de la actividad de PKC $\theta$ .

### **Las funciones de la espectrina se pueden regular mediante modificaciones post-translacionales**

Muchas vías de regulación post-translacional de la espectrina han sido correlacionadas con apoptosis/necrosis (Czogalla y Sikorski, 2005), con secreción/endocitosis, con el desarrollo del cristalino de los vertebrados (Lee y col., 2001) y con patologías del sistema nervioso central (Wang y col., 1998; Glantz y col., 2007).

Las vías de regulación que afectan a la espectrina incluyen la activación de los iones de calcio, la calmodulina y la proteólisis activada por calcio. La proteólisis de espectrina conlleva a la desestabilización de la remodelación de la membrana. Este proceso está controlado por varias

proteasas, como las  $\mu$ -calpaínas y las caspasas-2, -3 y -7, y está altamente regulado por calcio/calmodulina y fosforilación de tirosinas. El clivaje de la  $\alpha$ II espectrina está muy influenciado por la homeostasis del calcio y la calmodulina, la cual representa una potencial vía de regulación para la estabilidad y plasticidad del citoesqueleto de espectrina (Rotter y col., 2004; Nicolas y col., 2002). Recientemente se ha descubierto que, durante las fases iniciales de la apoptosis, la caspasa-8 corta un fragmento del N-terminal que contiene el dominio ABD y el fragmento del C-terminal de la  $\beta$ II espectrina.

La otra vía reguladora importante durante la remodelación de la membrana esquelética es la fosforilación de la espectrina. Se ha observado que la fosforilación de la  $\beta$  espectrina es esencial para la desestabilización de la membrana esquelética del eritrocito (Manno y col., 1995; Perrotta y col., 2001; Pinder y col., 1977), el desensamblaje del citoesqueleto durante la mitosis (Fowler y Adam, 1992) y el control de la estabilidad del Golgi (Siddhanta y col., 2003). De la misma manera, la  $\alpha$ II espectrina es importante en la fosforilación de tirosinas. La fosforilación/defosforilación de tirosinas en el sitio de clivaje por parte de calpaínas en la  $\alpha$ II espectrina, mediante quinasas y fosfatasa, es un mecanismo que regula esta subunidad de espectrina sensible al clivaje (Nicolas y col., 2002; Nedrelow y col., 2003). La espectrina es un punto clave en la convergencia entre las cascadas de señales de quinasas/fosfatasa y las mediadas por calcio. Este tipo de control puede ser importante en el tráfico vesicular, la endocitosis, el crecimiento de neuritas y la activación del receptor NMDA (Kamal y col., 1998). Sin embargo, un estudio hecho en ratones homocigóticos que expresan una forma mutada de la  $\alpha$ II espectrina resistente a la proteólisis por parte de calpaínas y caspasas, cuestiona la importancia funcional de este proceso *in vivo* (Meary y col., 2007). Además, la  $\beta$ IV espectrina podría estar involucrada en el mecanismo regulador de los canales de sodio Nav1.5 a través de la fosforilación de la  $\beta$ IV espectrina por una quinasa-II dependiente de calcio/calmodulina (Hund y col., 2010).

### **3. EL CITOESQUELETO DE ESPECTRINA ASOCIADO AL COMPLEJO DE GOLGI Y AL TRÁFICO INTRACELULAR**

Como ya hemos comentado anteriormente, el citoesqueleto de espectrina es un citoesqueleto asociado a membrana que participa en el mantenimiento de la integridad estructural de la membrana y en la generación de distintos dominios proteicos de membrana funcionales.

Estos requerimientos de conservar la integridad de la membrana y los microdominios membranosos no están limitados a la MP. El Golgi, un orgánulo membranosos compuesto por varios dominios de membrana organizados en una estructura compleja, necesita mantener

estas dos funciones atribuidas al citoesqueleto de espectrina. Además, el citoesqueleto de espectrina conecta varias estructuras u orgánulos con los motores involucrados en el transporte dirigido por los MTs y también facilita el transporte de proteínas de membrana a través de la vía secretora y endocítica (Devarajan y col., 1997).

Actualmente se han descrito varias isoformas de proteínas del citoesqueleto de espectrina eritrocitario en el Golgi. Éstas son la  **$\beta$ III espectrina** (Beck y col., 1994; Stankewich y col., 1998), la **anquirina G119** (Devarajan y col., 1996), la **anquirina de 195 kDa** (Beck y col., 1997), el intercambiador aniónico **AE2** (Holappa y col., 2001) y una variante de la **proteína 4.1B** (Kang y col., 2009).

La  $\beta$ III espectrina, inicialmente denominada  $\beta$ I $\Sigma^*$  espectrina, fue descrita por primera vez por Beck, Malhotra y Nelson (Beck y col., 1994) a partir de estudios en los que se examinó la distribución intracelular de las isoformas de espectrina eritrocitarias en células no eritrocitarias. De hecho, estos estudios se basaron en la reactividad cruzada de anticuerpos específicos contra la  $\beta$ I espectrina eritrocitaria que reconocían un solo polipéptido en fracciones enriquecidas de membranas de Golgi de hígado de rata, con un peso molecular similar al de la  $\beta$  espectrina eritrocitaria (alrededor de 200 kDa). También se estudió la habilidad de ciertos péptidos de espectrina para perturbar la funcionalidad del Golgi (De Matteis y Morrow, 1998; Holleran y col., 1998). Más tarde, Stankewich y col. (Stankewich y col., 1998) descubrieron y clonaron otro miembro de la familia de genes  $\beta$  espectrina a la que llamaron  $\beta$ III espectrina con un peso molecular de 271 kDa y expresada en varios tipos de tejidos. Estudios de inmunofluorescencia indirecta revelaron una localización de la  $\beta$ III espectrina en las membranas del Golgi y en vesículas citoplasmáticas, y estudios *in vitro* corroboraron la asociación de la  $\beta$ III espectrina con dicho orgánulo. Con este estudio se aceptó que la proteína anteriormente descrita como  $\beta$ I $\Sigma^*$  espectrina era la  $\beta$ III espectrina. En cuanto a su función, se ha descubierto que la  $\beta$ III espectrina se une a la subunidad Arp1 (del inglés *actin related protein 1*) de la dinactina, sugiriendo un posible papel en el transporte (Holleran y col., 2001). En pacientes con SCA5 se ha encontrado una mutación en el dominio CH que afecta a la interacción de la  $\beta$ III espectrina con Arp1 y, consecuentemente, afecta a la estabilización de las proteínas de membrana así como al transporte del EAAT4, puesto que la unión de la espectrina con Arp1 y con el complejo motor de dineína está alterada. Estudios con cultivos celulares revelan que el mutante L253P de la  $\beta$ III espectrina, en vez de encontrarse en la membrana celular, aparece atrapado en el citoplasma asociado con el Golgi. Además, esta forma mutada de  $\beta$ III espectrina evita la correcta localización de la  $\beta$ III espectrina silvestre y el transporte de EAAT4 a la MP. Estos datos evidencian un efecto dominante negativo de la mutación que causa SCA5 y muestra que el transporte de la  $\beta$ III espectrina y del EAAT4 desde el Golgi está alterado



gracias a la imposibilidad de que la forma mutada de  $\beta$ III espectrina L253P interactuara con Arp1 (Clarkson y col., 2010).

La anquirina G119 se clonó y caracterizó por primera vez por Devarajan y col. (Devarajan y col., 1996) a partir de una anquirina G de riñón humano. Estudios de secuenciación revelaron que esta isoforma era un transcrito alternativo de la anquirina G de 270 kDa localizada en el cerebro y anticuerpos generados contra la anquirina G119 reconocían un péptido de 116 kDa en tejido cortical de riñón de rata y en lisados totales de células MDCK. La inmunoreactividad de este anticuerpo en células MDCK subconfluentes se distribuyó en el Golgi con un patrón que coincidía con la inmunoreactividad de la  $\beta$ -COP y la  $\beta$ I $\Sigma$ \* espectrina. Estudios *in vitro* ratificaron la interacción entre la anquirina G119 y la  $\beta$ I $\Sigma$ \* espectrina en lisados celulares de MDCK.

Al mismo tiempo que se descubrió la anquirina G119, Beck y col. identificaron y localizaron otra isoforma de anquirina en el Golgi que llamaron anquirina 195 (Beck y col., 1997). A partir de un suero generado contra la anquirina eritrocitaria se obtuvieron anticuerpos purificados por afinidad que reconocían una isoforma de 195 kDa (por *western blotting*, WB) y marcaban el Golgi (por inmunofluorescencia, IF) en células MDCK, pero que no reconocían la isoforma anquirina G119. Estudios ultraestructurales revelaron que el complejo anquirina 195- $\beta$  espectrina localizaban en el TGN.

Por otra parte, también se ha descubierto que el intercambiador aniónico AE2 está asociado a las membranas del Golgi en fibroblastos (Holappa y col., 2001). Mediante técnicas de biología molecular observaron que, aquellas células que presentaban un marcaje del Golgi con los anticuerpos contra la AE2, tenían el ARNm que codificaba para dicha proteína. Además, este ARNm desaparecía cuando la expresión de la proteína era inhibida por siRNAs específicos y la expresión de la proteína salvaje fusionada a un vector GFP localizaba en el Golgi.

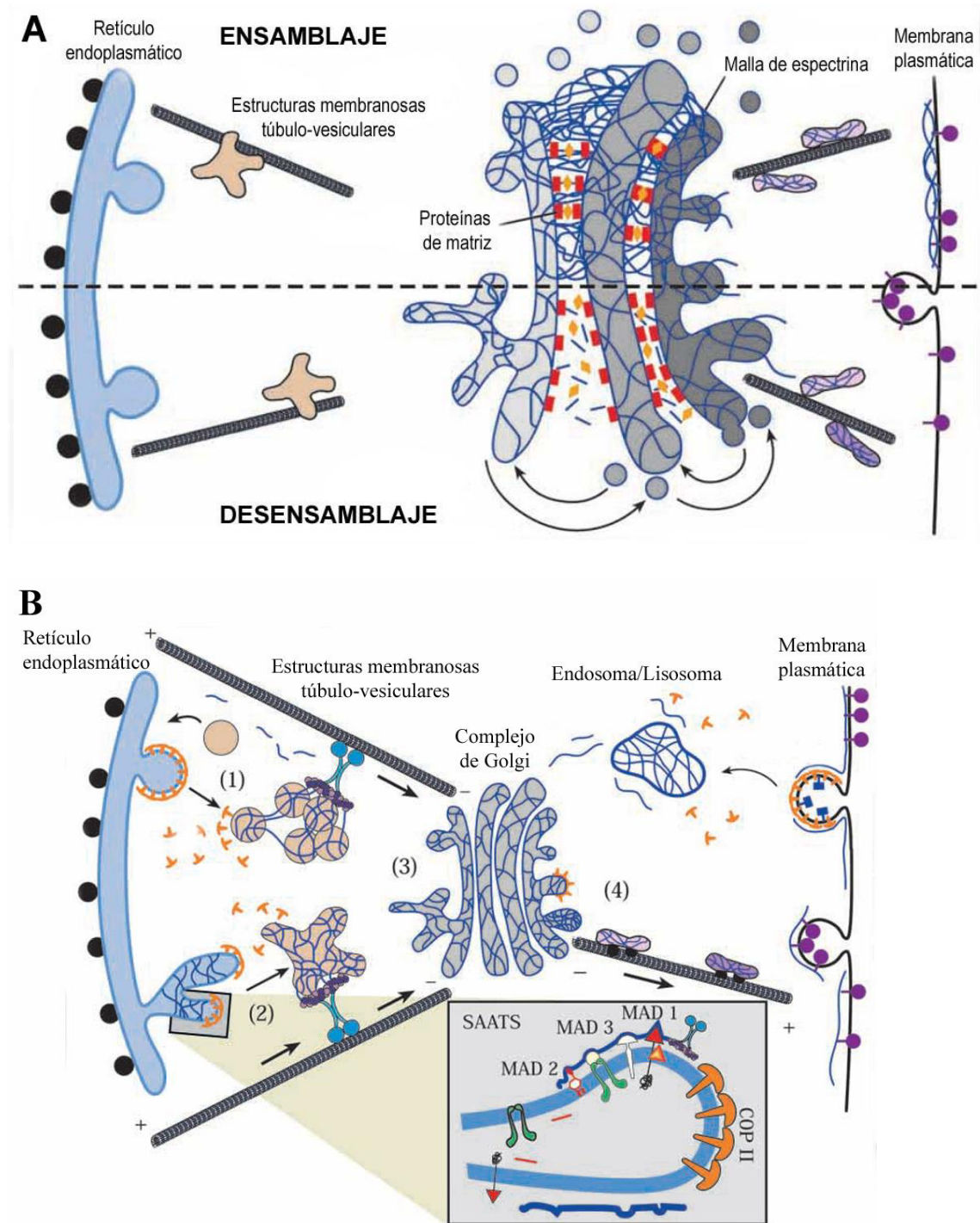
En 2008, Kang y col. descubrieron una variante de 200 kDa de la proteína 4.1B asociada con el Golgi en células MDCK y HBE (del inglés *human bronchial epithelial*) (Kang y col., 2008). Generaron varios anticuerpos contra las regiones no conservadas (regiones U1-U3) y comprobaron su especificidad mediante IF y WB. También observaron que estos anticuerpos inmunoprecipitaban la  $\beta$  espectrina del Golgi y que no reconocían la proteína 4.1B en el Golgi cuando ésta era deplecionada con siRNAs.

A pesar de todos los trabajos realizados para averiguar el papel del citoesqueleto de espectrina en el Golgi, no se ha podido clasificar la espectrina en ningún grupo de proteínas implicadas en el control del transporte de la vía secretora. Su presencia en orgánulos que intervienen en el tráfico de membranas así como la interrupción del transporte intracelular cuando la espectrina está alterada sugiere que ésta participa de forma activa en el transporte proteico y en la

posible selección del *cargo*. Para elucidar esta cuestión, se han propuesto dos modelos (Figura 10): el primer modelo remarca el papel de la espectrina como una fuerza organizadora y estabilizadora del Golgi (De Matteis y Morrow, 1998; Lorra y Huttner, 1999; Figura 10 A), mientras que el segundo explica cómo la espectrina participa en el movimiento de los ITs y en la selección del *cargo* a lo largo de la vía secretora (De Matteis y Morrow, 1998; Devarajan y col., 1997; Figura 10 B).

El **modelo de malla** o *Golgi mesh* hace analogía con el citoesqueleto de la MP, postulando que el citoesqueleto de espectrina actuaría como una plantilla para darle forma a las membranas del Golgi. Este modelo se sugirió a partir de la obtención de una fracción insoluble rica en membranas de Golgi que contenía espectrina, anquirina, actina y otras proteínas como las golginas que se definió como la matriz del Golgi (Beck y col., 1994; Fath y col., 1997; Nakamura y col., 1995). Se ha observado que algunos de los componentes de esta matriz, junto con la proteína de interacción p155, regulan el proceso de apilamiento de las cisternas (Barr y col., 1998; Shorter y Warren, 1999; Shorter y col., 1999). Estas proteínas actúan guiando el alineamiento y la captura de las cisternas adyacentes, de forma análoga a la que anclan las vesículas de transporte a las cisternas donadoras y aceptadoras. Sin embargo, aún queda por determinar si hay una relación directa entre los componentes de la matriz del Golgi y la espectrina. Se postula que esta interacción podría tener lugar a través de los sitios de unión a ARF y a PI(4,5)P<sub>2</sub> de la espectrina, hecho que explicaría el rápido y reversible desensamblaje de las cisternas del Golgi cuando ARF se inactiva mediante BFA.

El modelo de malla también encaja bien con las últimas versiones propuestas sobre el modelo de la progresión y maduración de las cisternas (Bonfanti y col., 1998; Bannykh y Balch, 1997; Mironov y col., 1997). Un componente esencial de este modelo es la existencia de un complejo proteico de anclaje al Golgi muy dinámico que sea capaz de remodelarse de forma rápida. La regulación de la asociación de la espectrina con las membranas del Golgi a través de ARF y la capacidad intrínseca de expansión del *Golgi mesh* son propiedades importantes para la captura y la remodelación de los ITs provenientes de la zona pre-Golgi. La maduración bioquímica de estos elementos en *stacks* maduros depende del transporte retrógrado de las enzimas del Golgi, mientras que la maduración morfológica de los VTCs en cisternas ordenadas sería preservada por el citoesqueleto de espectrina. En las etapas finales de la maduración y progresión de las cisternas, el control dinámico del *Golgi mesh* facilitaría la liberación de las membranas del Golgi y su posterior conversión a compartimentos post-Golgi. En este marco, agentes que bloquean la asociación de la espectrina con el Golgi afectan a la organización y a la integración de las membranas que provienen del RE con el Golgi, inhibiendo así el transporte en la zona RE/Golgi (Devarajan y col., 1997; Godi y col., 1998).



**Figura 10. Modelos del citoesqueleto de espectrina asociado al complejo de Golgi.** (A) El modelo de malla o Golgi mesh. La hipótesis de la malla atribuye a la espectrina un papel en la organización y la estabilización de las membranas del Golgi. En este modelo, la espectrina es un componente crucial de la malla proteica del Golgi, que es una matriz de proteínas responsables de conferirle la forma tan característica al Golgi y de mantener la integridad estructural de las cisternas del orgánulo. Hipotéticamente, la espectrina interacciona con al menos una proteína de matriz del Golgi. Esta malla de espectrina es dinámica puesto que experimenta ciclos de ensamblaje (imagen de arriba) y desensamblaje (imagen de abajo). Estos ciclos están controlados por la GTPasa ARF y por fosfoinosítidos, y se generan para permitir la formación o fisión de las vesículas de transporte. También permiten la captación y remodelación de los ITs que llegan a la cara cis-Golgi y la estabilización de estas cisternas a medida que van

*madurando hacia el medial- y trans-Golgi. La dinámica y el control localizado de la espectrina también facilitan la liberación de membrana de Golgi en forma de compartimentos post-Golgi. (B) El modelo SAATS. Para explicar el papel de la espectrina tanto en los compartimentos pre- como post-Golgi y la selección del cargo al perturbar la espectrina, el modelo SAATS atribuye a la espectrina un papel en la selección de cargo así como en el anclaje de los ITs con los motores. Las vesículas COPII salen del RE y se dirigen hacia el ERGIC (1). Aunque es posible que el ensamblaje del sistema SAATS empiece en el RE, a lo mejor, en conjunción con la formación de las vesículas COPII (2), podría ser que este ensamblaje empiece en el ERGIC y coincida con la liberación de la cubierta COPII de las vesículas recién formadas (1). Una característica del sistema SAATS es que se puede unir selectivamente a unas pocas vesículas recién formadas y agruparlas en complejos de transporte que serán transportados por el complejo dineína/dinactina a lo largo de los MTs hacia el cis-Golgi (3). Las vesículas que se encuentran en el ERGIC que no han sido reclutadas por el sistema SAATS son devueltas al RE. En el Golgi (3), la espectrina organiza los mosaicos de proteínas y lípidos, facilitando su retención y estabilización en las cisternas del Golgi tal y como se ha hipotetizado en el modelo de malla. Las proteínas que no han sido estabilizadas por este sistema son devueltas a través de las vesículas COPI. En el TGN y más allá (4), los mosaicos unidos a espectrina se clasifican para ser transportados a lo largo del sistema motor (modificado de De Matteis y Morrow, 2000).*

El **modelo SAATS** (del inglés *spectrin-ankyrin-adapter protein tethering system*) postula que la espectrina del Golgi y sus proteínas adaptadoras asociadas facilitan la captura de proteínas integrales de membrana por parte de los ITs y el transporte de éstas desde el RE hasta su destino final. El modelo SAATS probablemente implica otras proteínas adaptadoras a parte de la anquirina, como la proteína 4.1, la aducina, la  $\alpha$ - y  $\beta$ -catenina y otras proteínas relacionadas con la actina. Igual que sucede con los ITs con cubierta, el ensamblaje del sistema SAATS a las vesículas nacientes está mediado por ARF (Godi y col., 1998). Se hipotetiza que el sistema SAATS reconoce secuencias señal de los dominios citoplasmáticos de las proteínas integrales, como aquellos que unen a la anquirina. Es decir, el sistema SAATS podría ejercer como una chaperona sensible a la fidelidad del plegamiento de los dominios citoplasmáticos de ciertos *cargos* de la vía secretora. Una característica clave de este modelo es el papel que juegan ciertas interacciones entre las proteínas de membrana destinadas para el transporte anterógrado y el sistema SAATS. Cuando estas interacciones ocurren, el transporte del RE al Golgi es eficiente; cuando están bloqueadas, el transporte es defectuoso o está bloqueado. Al contrario de lo que sucede en el modelo de malla, en el modelo SAATS se prevé que la espectrina actúe primero en el compartimento aceptor, agrupando y seleccionando las moléculas específicas o las vesículas nacientes del RE y que serán destinadas para el transporte anterógrado. Este compartimento podría ser el propio RE, aunque es más probable que el sistema SAATS actúe primero en los VTCs del ERGIC. Este es un punto clave de clasificación entre las moléculas que se transportaran de forma anterógrada y las que serán devueltas al RE a través del transporte retrógrado gracias a la presencia de motivos dilisina y residuos de fenilalanina en sus dominios citoplasmáticos. Esto también tiene lugar donde las vesículas se

recubren con la cubierta COPII y se agrupan para ser transportadas vía anterógrada a lo largo de los MTs (Bannykh y col., 1996; Campbell y Schekman, 1997; Lippincott-Schwartz, 1998; Presley y col., 1997; Rowe y col., 1996). Es en este punto donde el sistema SAATS ejerce su función, agrupando aquellas vesículas que contienen la concentración suficiente de proteínas o lípidos que se unen al sistema SAATS, en ITs que posteriormente se moverán a lo largo de los MTs hacia el *cis*-Golgi gracias al complejo motor espectrina-dineína/dinactina. Una vez en el ERGIC, las vesículas que no han sido capturadas por el sistema SAATS o que no tienen el sitio de interacción con SAATS, podrían ensamblarse con las cubiertas de tipo COPI y ser devueltas al RE o bien ser transportadas vía anterógrada pero de forma más lenta que si participara el sistema SAATS.

Una vez ensambladas, el sistema SAATS podría permanecer con el mosaico asociado de membrana para ser incorporado y transportado a través del Golgi. Este proceso probablemente vendría acompañado por el intercambio de algunos de los componentes del sistema SAATS (por ejemplo, un intercambio de anquirina G119 por la anquirina de 195 kDa). En el caso de las vesículas nacientes en el TGN, este sistema podría participar en direccionar a un conjunto de vesículas a lo largo de los MTs hasta la MP (donde se produciría un intercambio final de los componentes del sistema SAATS con componentes del citoesqueleto de espectrina cortical, como la anquirina de 195 kDa por la anquirina G190 y la  $\beta$ III espectrina por la  $\beta$ II espectrina). Su posible implicación en la vía endocítica y de reciclaje, incluida aquella que es dependiente de clatrina, seguiría principios similares.

Aunque los dos modelos propuestos resaltan distintos aspectos de la localización de la espectrina y su posible función en la vía secretora, no se excluyen sino que tienen puntos en común y a día de hoy no hay pruebas experimentales definitivas para ninguno de ellos.

### III. EL CITOESQUELETO DE ACTINA

#### 1. GENERALIDADES

A lo largo de la evolución, la célula eucariota ha desarrollado una compleja estructura celular o citoesqueleto que resulta imprescindible para el mantenimiento de la morfología celular así como para realizar diversas funciones como la migración o la división celular. El citoesqueleto está formado por tres tipos de biopolímeros: los filamentos de actina o **microfilamentos** (MFs), los **filamentos intermedios** y los **microtúbulos**. Junto con estos biopolímeros hay un conjunto de proteínas que controlan y regulan la dinámica de polimerización y despolimerización de éstos.

El componente principal del citoesqueleto de actina es la propia actina. Es la proteína más abundante en la célula eucariota y está altamente conservada a lo largo de la evolución. Se trata de una proteína de 43 kDa que se presenta en forma monomérica o globular (G-actina) y/o en forma filamentosa o polimerizada (F-actina). En la F-actina, los monómeros se ensamblan dando lugar a la formación de filamentos con propiedades bioquímicas y biofísicas particulares. Ambas formas de actina presentan cierta polaridad, en donde se distingue un extremo (-) o *pointed end* y un extremo (+) o *barbed end*.

El citoesqueleto de actina está regulado por proteínas relacionadas con la actina o por proteínas de unión a actina. La red de MFs puede organizarse formando distintas estructuras como el córtex o fibras de estrés que determinan y mantienen la morfología celular. Los MFs también participan en el movimiento celular proporcionando una fuerza de locomoción que se genera gracias a la polimerización de actina y contribuyen al transporte intracelular sirviendo como “carriles” por los que viajan moléculas y estructuras membranosas que son conducidas a través de motores moleculares (miosinas). Los MFs también participan en la formación de estructuras de locomoción como los filopodios, lamelipodios y ondulaciones de membrana o *ruffling* (Small y col., 2002). Las “cometas” de actina impulsan microorganismos y ciertos orgánulos a través del citoplasma aprovechando la fuerza generada por la polimerización de la actina (Pollard y Borisy, 2003). Los MFs también resultan indispensables para el ciclo celular puesto que intervienen en la formación del anillo contráctil de actomiosina subcortical (Field y col., 1999) y en el empaquetamiento o congregación de los cromosomas durante la mitosis en oocitos (Lenart y col., 2005).

## **2. EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN EL TRÁFICO INTRACELULAR**

Como hemos comentado anteriormente, el citoesqueleto de actina contribuye a la motilidad vesicular de varias formas (Soldati y Schliwa, 2006; Egea y col., 2006): primero, la actina sirve de carril para las proteínas motoras miosinas. Segundo, la polimerización por sí misma puede impulsar las vesículas para que alcancen su destino final.

Los avances que se han realizado para elucidar los mecanismos que regulan el citoesqueleto de actina en la vía secretora provienen mayoritariamente de estudios hechos sobre el Golgi y sobre el proceso de endocitosis.

### **2.1. El citoesqueleto de actina y el complejo de Golgi**

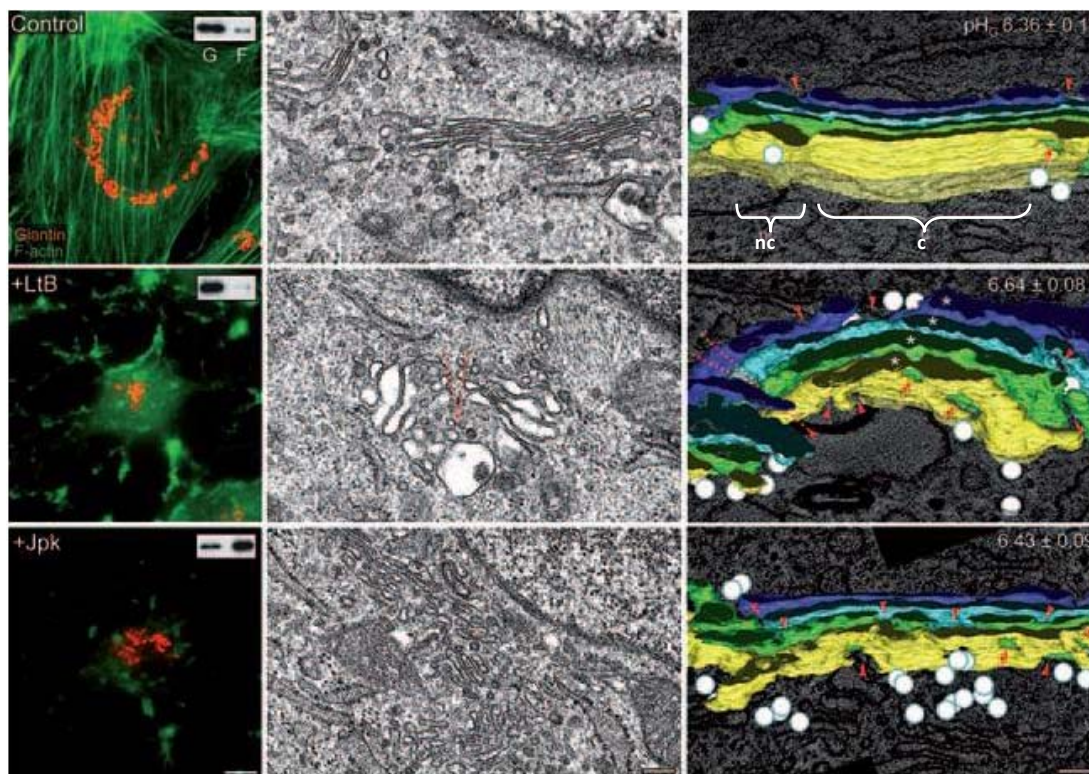
El transporte proteico en el Golgi utiliza tanto las proteínas motoras asociadas a los MTs como a los MFs (Caviston y Holzbaaur, 2006; Egea y col., 2006; Allan y col., 2002; Palmer y col., 2005).

El citoesqueleto también es necesario para la morfología del Golgi y para su posición intracelular. La disrupción de los MTs o el bloqueo de las funciones de dineína causan una dramática redistribución de los *stacks* del Golgi de una estructura yuxtannuclear compacta localizada en el centrosoma a un conjunto de estructuras puntiformes dispersadas junto a los ERES (Caviston y Holzbaur, 2006; Allan y col., 2002). Puesto que el Golgi se encuentra asociado al centrosoma, el transporte hacia el Golgi está mediado por los motores de MTs que se dirigen hacia el extremo (-) (dineína) mientras que el transporte desde el Golgi se hace a través de los motores direccionados hacia el extremo (+) (cinesinas). Así, el motor dineína está implicado en la motilidad hacia el interior de la célula, mientras que el motor cinesina se encarga del movimiento hacia la superficie celular.

La primera evidencia de que los MFs y el Golgi están unidos fue la observación de que el Golgi de una gran variedad de líneas celulares se compactaba cuando éstas se trataban con agentes anti-actina que despolimerizaban (citocalasinas y latrunculinas) o estabilizaban y nucleaban (jasplakinolide) los MFs (di Campli y col., 1999; Lázaro-Diéguez y col., 2006; Valderrama y col., 1998, 2000, 2001) (Figura 11). Sin embargo, a nivel ultraestructural, los *stacks* del Golgi de las células tratadas con estas toxinas eran diferentes: las toxinas que despolimerizaban la actina causaban una dilatación de las cisternas, mientras que las que estabilizaban la actina, las perforaban y/o fragmentaban pero permanecían totalmente aplanadas. Estos cambios ultraestructurales se mantenían al tratar las células con nocodazole (NZ, un agente que despolimeriza los MTs) junto con agentes anti-actina, indicando que los MTs no intervienen en el mantenimiento de la estructura plana y continua de las cisternas. Por consiguiente, la contribución del citoesqueleto a la organización estructural del Golgi sería la siguiente: primero, los MTs (y las proteínas asociadas a los MTs) determinan la localización del Golgi alrededor del centrosoma, y segundo, el citoesqueleto de actina mantiene la continuidad y la forma aplanada de las cisternas con ayuda de otras proteínas, como la espectrina, y también participa en el mantenimiento de la homeostasis del pH del Golgi junto con la H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar (Moriyama y Nelson, 1989) e intercambiadores de cationes (Nakamura y col., 2005). A pesar de la gran cantidad de *cargo* que atraviesa continuamente el Golgi, las cisternas siempre permanecen planas y la continuidad de las membranas del orgánulo no se rompe cuando el *cargo* que se transporta es mucho mayor de lo normal (Trucco y col., 2004). Así pues, la razón de hallar actina en el Golgi sería para prevenir la dilatación de las cisternas causada como consecuencia del elevado contenido proteico hiperosmótico que está en tránsito a través de los *stacks* del Golgi.

Como hemos comentado anteriormente, si hacemos analogía con los glóbulos rojos, esta morfología aplanada de las cisternas del Golgi vendría determinada por el citoesqueleto de





**Figura 11: La interacción de la actina con el complejo de Golgi.** Las células NRK tratadas con latrunculina B (+LtB) o jasplakinolide (+Jpk) muestran una compactación del Golgi similar cuando se observaron por microscopía de fluorescencia. También se muestran los respectivos acúmulos de G- y F-actina. A nivel ultraestructural, el tratamiento con LtB produce básicamente una dilatación de las cisternas mientras que el tratamiento con Jpk sólo induce una fragmentación de éstas. También se muestra la reconstrucción 3D hecha a partir de tomogramas electrónicos del Golgi de las células control y las tratadas. En las células control se visualiza la región central compactada (c) i la región lateral no compactada (nc). En las células tratadas con LtB, se observa una dilatación de las cisternas (asterisco) pero también se puede ver una perforación y/o fragmentación (punta de flecha). Con el tratamiento con Jpk las cisternas se mantienen planas pero muestran muchas perforaciones (flechas) y fragmentación (punta de flecha). La perforación/fragmentación del stack del Golgi se indica con las líneas rojas discontinuas. En los paneles 3D también se indican los valores del pH intra-Golgi (el asterisco indica la significancia estadística de  $p \leq 0,01$ ) (modificado de Egea y Rios, 2008).

espectrina. La actina (Heimann y col., 1999; Valderrama y col., 2000), la espectrina y la anquirina (De Matteis y Morrow, 2000), intercambiadores aniónicos (Holappa y col., 2001) y la proteína 4.1 (Kang y col., 2009) se encuentran en las membranas del Golgi. Moléculas iónicas reguladoras como las  $H^+$ -ATPasas vacuolares y los intercambiadores de aniones y cationes que se encuentran en el Golgi y que están en tránsito hasta la MP, también contribuyen a la presunción de que el citoesqueleto de actina aporta estabilidad mecánica a las cisternas, manteniendo la homeostasis del pH dentro del Golgi (Demaurex, 2002). Esta homeostasis es necesaria para las modificaciones post-translacionales de proteínas y lípidos (Axelsson y col.,

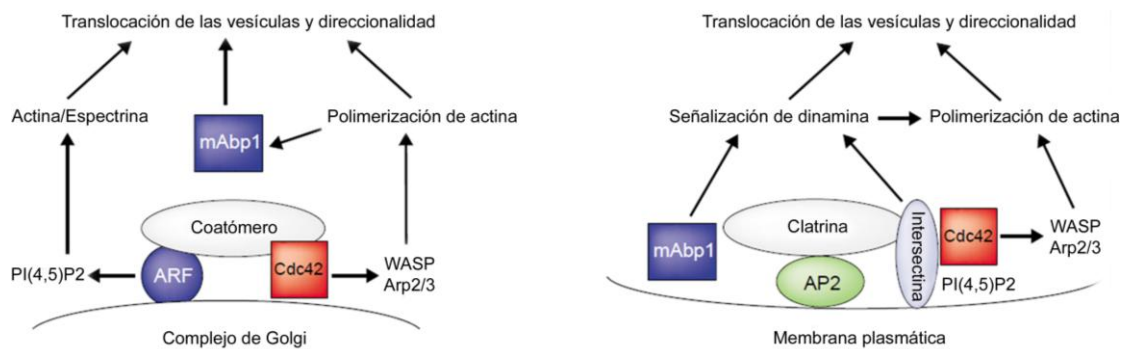


2001) y para mantener las cisternas aplanadas (Palokangas y col., 1998). Además, el tratamiento con latrunculina B (LtB) induce un incremento significativo en el pH intra-Golgi, mientras que el jasplakinolide (Jpk) no produce ni dilatación de las cisternas ni induce ningún cambio del pH del interior del orgánulo (Lázaro-Diéguéz y col., 2006) (Figura 11). También se ha observado que la disrupción de los MFs y la consecuente expansión de las cisternas disminuyen las diferencias de tensión de membrana entre el RE y el Golgi (Upadhyaya y Sheetz, 2004), induciendo así un retraso en el flujo de membrana de Golgi a RE (Valderrama y col., 2001). Otros estudios basados en tratamientos con agentes que perturban los MFs mostraron un bloqueo del transporte anterógrado de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) a través del Golgi (Hirschberg y col., 1998).

## **2.2. Biogénesis de intermediarios de transporte**

Igual que ocurre en la MP durante la endocitosis, existe una asociación de las membranas del Golgi con componentes que directa o indirectamente desencadenan el reclutamiento y/o la polimerización de actina (Arp2/3, Cdc42, cortactina, N-WASP y sindapina) y componentes que determinan la formación y fisión de los ITs (COPI y clatrina, y dinamina II, respectivamente). Otra evidencia que relaciona el citoesqueleto de actina con la funcionalidad de las etapas tempranas de la vía secretora es la identificación de proteínas de unión a actina y sus proteínas reguladoras que se localizan en las membranas del Golgi o en las vesículas derivadas de éste. Entre ellas, se encuentran la propia actina (Godi y col., 1998; Heimann y col., 1999; Fucini y col., 2000; Valderrama y col., 2000), la espectrina (Godi y col., 1998; Fucini y col., 2000; Beck y col., 1994; Devarajan y col., 1996; Holleran y col., 1996; Fath y col., 1997; Stankewich y col., 1998; Holleran y col., 2001), la anquirina (Devarajan y col., 1996; Beck y col., 1997; Devarajan y col., 1997), la contractina (Heimann y col., 1999; Holleran y col., 1996), la tropomiosina (Heimann y col., 1999), la drebrina (Fucini y col., 2000) y la proteína de unión a actina 1 de mamíferos (mAbp1) (Fucini y col., 2002) (Figura 12).

Una hipótesis sobre el papel del citoesqueleto de actina en la formación de ITs es que la actina proporciona un soporte estructural que facilita la formación de ITs (vesiculares o tubulares) en las porciones laterales del Golgi. Esto se consigue gracias a la generación de fuerza mediante la polimerización de actina *de novo* acoplada a la actividad mecánica de los motores de actina (miosinas). Respecto a esta idea, los nucleadores de actina Arp2/3 y Spir1 son reclutados al Golgi, donde estimulan la nucleación y polimerización de actina (Carreno y col., 2004; Chen y col., 2004; Kerkhoff y col., 2001; Matas y col., 2004). Los efectores que median esta polimerización de actina asociada al Golgi son varios: para el complejo Arp2/3, los mediadores



**Figura 12. Mecanismos de activación del ensamblaje de actina durante la formación de vesículas en el complejo de Golgi y en la membrana plasmática.** En el Golgi, ARF activado puede estimular la producción de PI(4,5)P<sub>2</sub> mediante la activación de PI4K (Godi y col., 1998; Godi y col., 1999). Los altos niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> reclutan espectrina y actina al Golgi, junto con Cdc42 que se recluta mediante la interacción con el coatómero (Fucini y col., 2002; Wu y col., 2000). El complejo Cdc42/coatómero guía el ensamblaje de actina que contiene mAbp1. La espectrina, Cdc42, WASP y mAbp1 están implicadas en el transporte proteico en las vías tempranas de secreción. Durante la endocitosis de la MP, mAbp1 junto con otras proteínas que tienen el dominio SH3 (sindapina, cortactina e intersectina) pueden unirse a dinamina (Schafer, 2002; Qualmann y col., 2000) (modificado de Stamnes, 2002).

localizados en el Golgi son Cdc42/N-WASP (Chen y col., 2004; Matas y col., 2004; Luna y col., 2002) y dinamina II/cortactina (Cao y col., 2005). La nucleación de actina en el Golgi inducida por el complejo Arp2/3 está ligada a la fisión de ITs mediada por dinamina que tiene lugar en el TGN. Así, la interferencia con las proteínas de interacción dinamina II/cortactina (Cao y col., 2005) o sindapina II/dinamina II (Kessels y col., 2006) bloquea el transporte post-Golgi. Igual que el complejo Arp2/3, Spir1 también está involucrada en el transporte post-Golgi (Kerkhoff y col., 2001). Estudios recientes *in vivo* han demostrado que la miosina II no muscular actúa como efector de Rab6 en la producción de ITs en el Golgi (Miserey-Lenkei y col., 2010).

A diferencia de lo que ocurre en el TGN (Corda y col., 2002; Praefcke y McMahon, 2004; Ghanekar y Lowe, 2005), la potencial asociación entre el proceso de fisión de membrana y los mecanismos basados en actina en la zona RE/Golgi y en los compartimentos pre-Golgi aún no está clara pero hay indicios que apuntan a una conexión entre la polimerización de actina dirigida por Cdc42, la formación de ITs de tipo COPI y el sistema motor de los MTs (Chen y col., 2005).

Mientras que la polimerización de actina y la biogénesis de ITs parece que sucede en todos los compartimentos del Golgi, algunos de los mediadores moleculares que regulan ambos procesos se localizan en las cisternas del orgánulo. A diferencia de lo que ocurre con Cdc42 y el complejo Arp2/3, N-WASP no se encuentra en el TGN sino que está restringido al *cis*- y medial-Golgi (Matas y col., 2004). En cambio, la cortactina, que está directamente relacionada con el transporte post-Golgi, se visualiza en ambas caras del Golgi (sobre todo en los extremos y en

las gemas de las cisternas) (Cao y col., 2005). A pesar de que no existen pruebas ultraestructurales de la localización exacta de la cortactina, se postula que ésta podría estar sustituyendo a N-WASP en el reclutamiento del complejo Arp2/3 en el TGN. Por tanto, la segregación de *cis*- a *trans*- de algunos de los componentes de la maquinaria de actina en el Golgi podría facilitar la eficiencia y la fidelidad de la formación y fisión de los ITs en subdominios individuales del Golgi. De este modo, en el TGN, el transporte post-Golgi estaría mediado por las interacciones de dinamina II/cortactina/Arp2/3 y sindapina II/dinamina II (Cao y col., 2005; Kessels y col., 2006), mientras que Cdc42/N-WASP/Arp2/3 mediarían el transporte proteico en la zona RE/Golgi (Chen y col., 2004; Matas y col., 2004; Luna y col., 2002; Chen y col., 2005).

### **2.3. Los motores de actina en la biogénesis y locomoción de los intermediarios de transporte derivados del complejo de Golgi**

Los motores de actina o miosinas son una superfamilia de proteínas motoras caracterizadas por su capacidad para desplazarse por los MFs desde el extremo (-) al extremo (+). Las miosinas también generan fuerza que promueve la formación de ITs y/o su desplazamiento desde el Golgi.

En levaduras, la miosina de tipo I participa en las fases iniciales de la endocitosis (Geli y Riezman, 1996). En mamíferos, la miosina  $\alpha$  interviene en la regulación del transporte de proteínas endocitadas a los endosomas y lisosomas (Raposo y col., 1999). En las células polarizadas, esta miosina se localiza en vesículas que derivan del Golgi y su actividad motora es necesaria para el transporte hasta la MP. Sin embargo, existen otras proteínas como la miosina II no muscular (“miosina II” de aquí en adelante) que están implicadas en el transporte proteico basado en la actina del Golgi al RE (Duran y col., 2003; Egea y col., 2006; Stow y Heimann, 1998). Estudios hechos *in vitro* han demostrado su interacción con las membranas del Golgi (Fath, 2005), sugiriendo un modelo en el cual la miosina II estaría anclada a las cisternas por su C-terminal y a la F-actina por su extremo amino. Su translocación a lo largo del filamento de actina podría generar la fuerza necesaria para mover los ITs derivados del Golgi fuera de la cisterna y podría facilitar la asociación y función de la maquinaria molecular implicada en la escisión de membrana para poder liberar completamente el IT. La unión de la isoforma de tropomiosina Tm5NM-2 a los filamentos cortos de actina del Golgi (Percival y col., 2004) podría facilitar el reclutamiento de la miosina II para que se una a actina. Otras proteínas del citoesqueleto asociado al Golgi como la espectrina y la anquirina también podrían participar en el proceso. Por otra parte, la miosina II interacciona con la GTPasa Rab6, hecho

que contribuye a su localización en el Golgi y, junto con la F-actina, participa en la fisión de las vesículas que contienen Rab6 del Golgi (Miserey-Lenkei y col., 2010).

La miosina Ib regula el tráfico post-Golgi de una forma dependiente de actina y genera fuerza que controla el ensamblaje de F-actina. Junto con el citoesqueleto de actina, la miosina Ib promueve la formación de transportadores tubulares en el TGN que darán salida a proteínas transmembrana (Almeida y col., 2011).

La miosina VI es otro motor de actina que se encuentra en el *trans*-Golgi (Buss y col., 2002) y en el TGN que, a diferencia del resto de miosinas conocidas, mueve los ITs hacia el extremo (-) de los filamentos de actina. Así, la miosina VI genera fuerza y direccionalidad para el movimiento de los ITs desde el Golgi, de acuerdo con la polarización de la polimerización de la actina asociada al Golgi.

La miosina V también está implicada en el transporte de Golgi (Allan y Schroer, 1999).

#### **2.4. Control de los mecanismos de transporte asociados a la actina**

La estrecha asociación del tiempo e intensidad de la polimerización de actina en el Golgi con los procesos de formación y fisión de ITs asociados al orgánulo es esencial, tal y como sucede en los estadios iniciales de la endocitosis mediada por clatrina (Merrifield y col., 2002; Merrifield y col., 2004). En el Golgi, una posibilidad es que este control se podría llevar a cabo regulando los niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> que, en estado basal, son muy bajos (De Matteis y col., 2005). El PI(4,5)P<sub>2</sub> actuaría sinérgicamente con Cdc42/N-WASP (Rohatgi y col., 2000) y cortactina (Schafer y col., 2002) durante la nucleación y/o polimerización de actina inducida por el complejo Arp2/3. Es razonable pensar que el PI(4,5)P<sub>2</sub> es generado en las porciones laterales de las cisternas de forma simultánea al reclutamiento de COPI, Cdc42 y cortactina inducido por el factor de ribosilación de ADP 1 (ARF-1). La activación de ARF-1, la proteína de unión a GTP que regula el ensamblaje de las vesículas COPI, causa un incremento de los niveles de actina y espectrina en las membranas del Golgi (Godi y col., 1998; Fucini y col., 2000; Fucini y col., 2002). Se ha descrito que ARF regula los niveles de espectrina en el Golgi a través de un mecanismo que involucra al metabolismo del fosfatidilinositol (Godi y col., 1998; Godi y col., 1999). La espectrina es importante para la funcionalidad del Golgi, puesto que la disrupción de su unión con las membranas del orgánulo mediante un anticuerpo anti-espectrina o con formas truncadas de la espectrina recombinante inhibe el transporte del VSV-G al Golgi (Godi y col., 1998). Por otro lado, se ha observado una fragmentación del Golgi como consecuencia de una disminución de la síntesis de PI(4,5)P<sub>2</sub> que se correlaciona con la fosforilación de la  $\beta$ III espectrina asociada al Golgi y su subsecuente translocación al citoplasma (Siddhanta y col.,

2003). Otras posibilidades implican la presencia de Cdc42 GAP (del inglés *GTPase-activating protein*) y GES (del inglés *guanine nucleotide exchange factor*) en el Golgi y la proteína coronina 7 que se reclutaría al orgánulo una vez fosforilada (Rybakin y col., 2004).

A parte del papel que tiene la actina en el proceso de escisión, los filamentos de actina y/o el citoesqueleto basado en actina podrían organizar espacialmente la maquinaria molecular secretora mediante la formación de una barrera física en las regiones laterales y/o centrales de las cisternas. Así, en la zona central de las cisternas, la conjunción del citoesqueleto basado en actina-espectrina con una composición membranosa determinada de lípidos y proteínas (glicosiltransferasas) podría generar una especie de barrera física que impediría la formación de ITs de forma permanente en esa área.

### 3. MOTORES MOLECULARES

Los motores moleculares son los responsables de la mayoría de formas de movimiento celular. A parte de las **miosinas**, que se mueven sobre los MFs, existen otros tipos de motores citoplasmáticos. Son las **dineínas** y las **cinesinas**, que usan los MTs como raíles. Los MTs están polarizados con un extremo (-) localizado en posición yuxtannuclear, junto al centrosoma, y un extremo (+) que se encuentra en la periferia celular.

El mecanismo que usan para convertir energía química en fuerza mecánica se basa en la hidrólisis de ATP, que causa un pequeño cambio conformacional en el dominio globular del motor que es amplificado y traducido en movimiento, con ayuda de motivos accesorios. Dominios adicionales fuera de la unidad motora son los responsables de la dimerización, regulación e interacciones con otras moléculas.

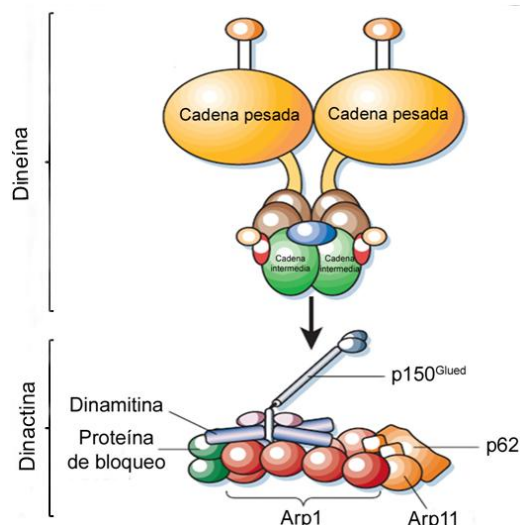
En el transporte vesicular mediado por los motores moleculares, los procesos de regulación tienen que asegurarse de que los motores se unen o son activos sólo en aquellas vesículas ensambladas y no en el orgánulo donador. Esto implica que el sitio de unión al motor se crea o se activa durante el proceso de ensamblaje de la vesícula. Además, la coordinación temporal del ensamblaje vesicular y la motilidad mediada por motores tiene que ocurrir para que la translocación de éstas, desde el orgánulo donador, sólo se dé después del empaquetamiento del *cargo* y de la escisión de la vesícula. La función prematura del motor podría inducir la translocación de vesículas vacías o la formación de ITs tubulares en vez de vesiculares. Finalmente, un tipo concreto de vesículas puede mediar múltiples pasos del transporte en la célula. Por ejemplo, las vesículas COPI están implicadas en el transporte bidireccional en el Golgi (Orci y col., 1997) y en el transporte a través de los compartimentos endosomales (Gu y col., 1997). Todos estos pasos requieren distintas interacciones con el citoesqueleto o con los

motores. Por eso, la regulación direccional es necesaria para seleccionar la proteína motora correcta para cada ocasión.

### 3.1. Dineínas

Las dineínas son las proteínas motoras de los MTs responsables del transporte axónico retrógrado, del tránsito de las vesículas de Golgi al centrosoma y de algunos otros movimientos dirigidos al extremo (-) del MT. Las dineínas son proteínas multiméricas excepcionalmente grandes que están compuestas por dos o tres cadenas pesadas y que forman un complejo con un número indeterminado de cadenas intermedias y ligeras. Estas proteínas se dividen en dos clases funcionales: las dineínas citosólicas y las del axonema.

La dineína citosólica es una molécula con dos cabezas, con dos cadenas pesadas idénticas o casi idénticas que conforman los dominios de la cabeza. La dineína no puede transportar *cargo* por sí sola, sino que requiere la presencia de dinactina, un gran complejo proteico que une las vesículas a las cadenas ligeras de la dineína (Figura 13).



**Figura 13. Esquema general del complejo dineína-dinactina.**

La molécula de dineína, formada por varias cadenas pesadas (amarillo), intermedias (verde) y ligeras, interacciona con la subunidad p150<sup>Glued</sup> del complejo dinactina a través de sus cadenas intermedias (flecha). El componente más prominente del complejo dinactina es un filamento corto de la proteína Arp1, que interacciona con la espectrina (modificado de Schliwa y Woehlke, 2003).

La dinactina presenta por lo menos ocho subunidades, entre las que se incluyen una proteína llamada p150<sup>Glued</sup> que se une a los MTs, la Arp1, una proteína relacionada con la actina que se une a la espectrina y la p50 dinamitina, que interactúa con las cadenas ligeras de la dineína. La p150<sup>Glued</sup> es un dímero que forma una estructura de lazada y se une a dineína, al filamento de Arp1 y a los MTs. La Arp1 se une directamente a la  $\beta$ III espectrina, reclutando así la dineína y la dinactina a las membranas intracelulares y generando una interacción entre el complejo motor de MTs con el *cargo* (Holleran y col., 2001). La dinamitina es necesaria para mantener la integridad del complejo (Schroer, 2004). La expresión de una forma dominante negativa de

p150<sup>Glued</sup> o la sobreexpresión de la dinamitina inducen la fragmentación del Golgi en múltiples elementos dispersos (Burkhardt y col., 1997; Quinyne y col., 1999) y la consecuente perturbación del transporte de los ITs desde el RE al Golgi a través de los MTs. Este bloqueo se da en las etapas iniciales del transporte proteico, en el RE, puesto que el componente del coatómero COPII, Sec23p, interacciona directamente con la dinactina. Esta interacción facilitaría la formación de los ITs y su movimiento hacia el Golgi (Watson y col., 2005). De hecho, está ampliamente aceptado que el motor dineína/dinactina es principalmente responsable del transporte RE/Golgi y de la localización del Golgi en el centro de la célula. Sin embargo, existe un modelo que postula que la dinactina interviene en la coordinación de la actividad de los motores moleculares de los MTs y en la regulación de su procesividad (Berezuk y Schroer, 2007; Deacon y col., 2003; Haghnia y col., 2007; Ross y col., 2006).

### 3.2. Cinesinas

La superfamilia de las cinesinas son las otras proteínas motoras de los MTs y comprenden 16 clases que funcionan para transportar diferentes tipos de *cargo* (vesículas de secreción, lisosomas y cromosomas, entre otros) en distintas porciones de la célula y en diferentes tipos de células. En el caso de la cinesina convencional, que es la más común, presenta dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que, con las cadenas pesadas, forman dos cabezas globulares grandes y una cola espiral superenrollada. Funciona para transportar vesículas y orgánulos en dirección de (-) a (+) a lo largo de los MTs. Las cadenas ligeras, que se unen al extremo de la cola de espiral superenrollada, se forman mediante la dimerización de las dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras, que se unen al extremo de la cola de espiral superenrollada, se unen a las proteínas en la membrana de una vesícula o un orgánulo, que se coloca sobre la carga de la cinesina.

Existen tres subgrupos de cinesinas (cinesina-1 a -3) que dirigen el tráfico desde el Golgi y que pueden tener actividad hacia el extremo (-) en el mismo *stack* del Golgi. La cadena pesada de la cinesina-1 se localiza en el Golgi (Gyoeva y col., 2000; Wozniak y Allan, 2006). Las cinesinas también pueden contribuir al fenotipo de dispersión del Golgi que se observa cuando los MTs son despolimerizados con el NZ, puesto que al inyectar anticuerpos contra la cinesina se previno la dispersión de los mini-*stacks* del Golgi después de tratar las células con NZ (Minin, 1997). Esto podría ser debido al bloqueo del movimiento de los fragmentos del Golgi hacia la periferia a lo largo de los MTs. Sin embargo, el papel más importante de las cinesinas en el Golgi es conducir el tráfico de ITs desde el Golgi hacia el RE o la MP.

## IV. LOS FOSFOINOSÍTIDOS

Los fosfoinosítidos (PIs) son fosfolípidos de membrana derivados del fosfatidilinositol (PtdIns) considerados componentes esenciales de las membranas celulares de los eucariotas. A pesar de que constituyen menos del 1% de la cohorte lipídica celular, juegan un papel clave en la regulación de muchos procesos biológicos fundamentales (Di Paolo y De Camilli, 2006; Saarikangas y col., 2010). Son moléculas anfipáticas formadas por una cabeza hidrofílica (polar), que es un grupo inositol, y una cola hidrofóbica (apolar), que son dos cadenas de ácidos grasos unidos por un esqueleto de glicerol (Figura 14 A).

La rápida respuesta metabólica de los PIs después de la estimulación de algunos receptores de la superficie celular fue el primer indicio de que estos lípidos podían actuar como moléculas reguladoras. Controlan la biología de los orgánulos regulando el transporte vesicular y modulan la distribución de los lípidos y su metabolismo gracias a la ayuda de las proteínas transportadoras de lípidos. Los PIs también regulan canales de iones, bombas y transportadores, así como procesos de exocitosis y endocitosis.

### 1. TIPOS DE FOSFOINOSÍTIDOS

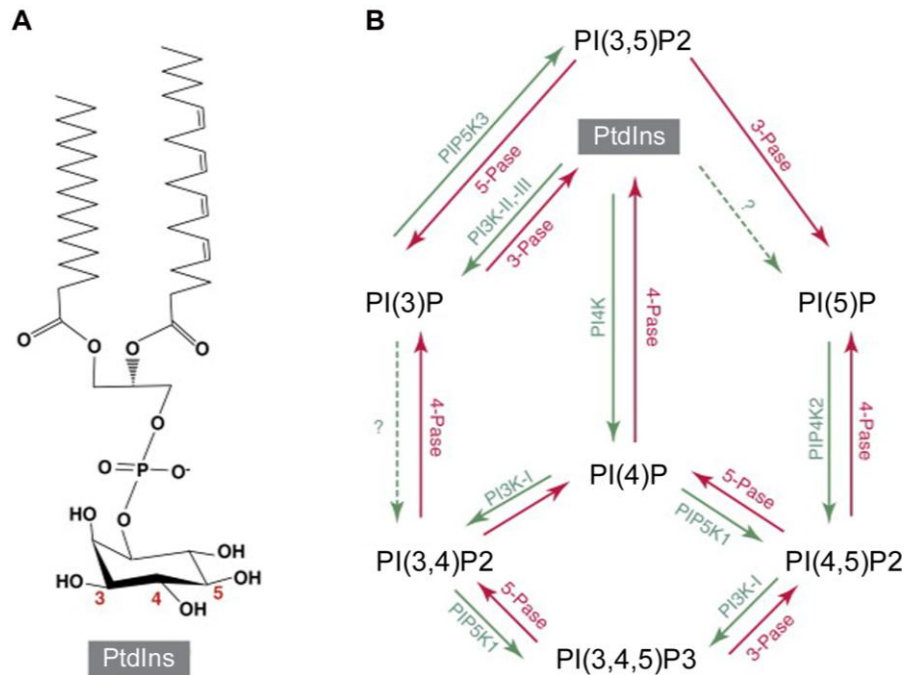
Los PIs se pueden fosforilar reversiblemente en las posiciones 3-, 4- y 5- de los grupos hidroxilo del inositol para generar las siete especies distintas de PIs identificadas en las células eucariotas [**PI(3)P**, **PI(4)P**, **PI(5)P**, **PI(3,4)P<sub>2</sub>**, **PI(4,5)P<sub>2</sub>** y **PI(3,4,5)P<sub>3</sub>**] (Figura 14 B), que sirven como plataforma de anclaje a la membrana para un elevado número de proteínas. El PtdIns representa menos del 15% de todos los fosfolípidos de las células eucariotas y los PIs generalmente son una orden de magnitud menos abundantes, siendo el PI(4)P y el PI(4,5)P<sub>2</sub> los derivados fosforilados más abundantes (0,5%). El PI(3)P es otro PI abundante en las células (0,2%), mientras que otros como el PI(3,5)P<sub>2</sub> y el PI(3,4,5)P<sub>3</sub> aparecen en menor proporción (0,005% y casi indetectable, respectivamente) (Lemmon y Ferguson, 2000; Saarikangas y col., 2010).

### 2. METABOLISMO Y FUNCIÓN

A pesar de no ser muy abundantes, los PIs presentan diferentes actividades biológicas gracias a la unión de sus grupos polares con proteínas citosólicas o con los dominios citosólicos de proteínas de membrana, puesto que los PIs se concentran en la cara citosólica de las membranas celulares (Czech, 2003; Lemmon, 2008). El PtdIns se sintetiza principalmente en el



RE y luego es transportado a otras membranas mediante el transporte vesicular o con ayuda de proteínas citosólicas transportadoras de PtdIns (PTPs).



**Figura 14. El fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados.** (A) El PI está formado por un grupo polar de inositol con los grupos hidroxilos en posición 3-, 4- y 5- que pueden ser fosforilados. (B) Esquema de las reacciones metabólicas que generan las siete especies derivadas del PI, con las quinasas en verde y las fosfatasa en rojo. Las flechas discontinuas indican las vías de las cuales no hay evidencias sólidas de su existencia (modificado de Nezis y col., 2010).

La regulación espacio-temporal de la producción y el recambio de los PIs es crucial para su función. Ésta viene determinada por la acción concertada de quinasas y fosfatasa que pondrán o quitaran grupos fosfato, respectivamente, junto con fosfolipasas que se encargaran de cortar los lípidos (Figura 14 B). Las quinasas de los PIs se expresan de forma ubicua y son muy abundantes en todas las membranas celulares, aunque muestran una gran especificidad por sus sustratos. Existen tres quinasas de PIs: las **fosfoinosítido 3-quinasas** (PI3Ks), las **fosfoinosítido 4-quinasas** (PI4Ks) y las **fosfoinosítido fosfato-quinasas** (PIP5K). Se han identificado tres clases de PI3Ks en función de su estructura primaria, su regulación y su especificidad de sustrato. Las de clase I, que se subclasifican en clase IA y IB, las de clase II y las de clase III. *In vitro*, las quinasas de clase I pueden fosforilar PtdIns, PI(4)P y PI(4,5)P<sub>2</sub>, este último para formar PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. La PI3K actúa como enzima transductora de señales intracelulares y controla funciones celulares esenciales como la dinámica del citoesqueleto y el tráfico de membranas (Lindmo y Stenmark, 2006). El PI(3,4,5)P<sub>3</sub> es un segundo mensajero que

se unirá a varios dominios de unión a lípidos que se encuentran en proteínas efectoras para reclutarlos a la MP. En condiciones normales, las células muestran niveles bajos de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> y éstos incrementan gracias a la estimulación de factores de crecimiento. Sin embargo, *in vivo* prefieren el PI(4,5)P<sub>2</sub> como sustrato. *In vitro*, las de clase II usan PtdIns y PI(4)P como sustrato y las de clase III sólo fosforilan PtdIns. De PI4Ks encontramos las de tipo II y tipo III en función de lo sensibles que son a determinados inhibidores (adenosina, a concentraciones  $\mu$ M, para las de tipo II y wortmanina para las de tipo III). Ambos tipos de PI4K solamente usan PtdIns como sustrato para generar PI(4)P y tienen actividad específica en las membranas del Golgi. De las cuatro isoformas que se han clonado de PI4K (PI4KII $\alpha$ , PI4KII $\beta$ , PI4KIII $\alpha$  y PI4KIII $\beta$ ), sólo la PI4KII $\alpha$  y la PI4KIII $\beta$  se encuentran en este orgánulo (Weixel y col., 2005). Un potencial regulador de la síntesis de PI(4)P en el Golgi es la proteína quinasa D (PKD). Esta quinasa se localiza en dominios específicos del TGN y juega un papel importante en la formación de transportadores post-Golgi, seguramente controlando la maquinaria de fisión (Liljedahl y col., 2001). La PKD se asocia con la PI4K (Nishikawa y col., 1998) (se hipotetiza que podrían ser las isoformas PI4KII $\alpha$  o  $\beta$ ) y con la PIP5K. La presencia de actividad PI4K (y de PIP5K) en inmunoprecipitados de PKD depende de la actividad PKD (Nishikawa y col., 1998). Esto indica que, o bien la interacción es modulada por la autofosforilación de PKD, o bien que la PKD estimula la actividad de PI4K, y esto podría ser capaz de regular los niveles de PI(4)P [y de PI(4,5)P<sub>2</sub>] en el Golgi. Hay dos clases de PIPKs que pueden generar PI(4,5)P<sub>2</sub> y se han identificado en función de la sensibilidad que tienen al ácido fosfatídico (PA). Solamente las de tipo I son estimuladas por PA y fosforilan distintas posiciones del anillo de inositol; fosforilan PI(4)P en la posición D5 para generar PI(4,5)P<sub>2</sub> y por ello se llaman PIP5K, mientras que las de tipo II fosforilan PI(5)P para generar PI(4,5)P<sub>2</sub> y por eso son PIP4K. Ambos tipos tienen isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

Las fosfatasa que pueden desfosforilar los PIs se dividen en tres grandes grupos en función de su habilidad para hidrolizar los PIs fosforilados: son las **3-fosfatasa**s (3-Pasas), las **4-fosfatasa**s (4-Pasas) y las **5-fosfatasa**s (5-Pasas). Entre las 3-Pasas encontramos el supresor de tumores PTEN que, *in vivo*, desfosforila PI(3,4,5)P<sub>3</sub> aunque *in vitro* puede usar todos los PIs fosforilados en posición D3. Hay dos 4-Pasas clonadas: las de tipo I y de tipo II, que usan PI(3,4)P<sub>2</sub> como sustrato. Además, la actividad fosfatasa está asociada con el dominio Sac. Este dominio está presente en las proteínas Sac1-3 y tiene actividad *in vitro* para con PI(3)P, PI(4)P y PI(3,5)P<sub>2</sub>. Sin embargo, los mutantes de Sac1 de levaduras tienen niveles altos de PI(4)P que indican que, *in vivo*, Sac1p tiene preferencia por PI(4)P. Las 5-Pasas se clasifican en cuatro tipos del I al IV de acuerdo con su sustrato. Las de tipo II son un grupo heterogéneo en el que encontramos OCRL y la 5-Pasa II. Las de tipo III tienen un dominio con homología a Src (SH2) y pueden hidrolizar el

fosfato de la posición D5 y las de tipo IV solo hidrolizan un sustrato lipídico como PI(3,4,5)P<sub>3</sub> y PI(4,5)P<sub>2</sub>. La hidrólisis de PI(4,5)P<sub>2</sub> la ejecutan las fosfolipasas PLC o PLA<sub>2</sub>, dando lugar a metabolitos que propagan y amplifican la señalización y las 5-Pasas que inhiben su señal.

Los PIs también pueden ser desfosforilados por fosfatasas lipídicas que poseen un amplio rango de sustratos y diferentes especificidades posicionales así como localizaciones celulares (Sasaki y col., 2009).

Los PIs son unos de los pocos lípidos que tienen una función estructural pero que a su vez son precursores de muchas moléculas señalizadoras.

## 2.1. Los fosfoinosítidos en el transporte intracelular

Como hemos comentado anteriormente, los PIs están involucrados en múltiples funciones celulares. Sin embargo, en este apartado sólo comentaremos su implicación en el transporte intracelular.

En la vía dependiente de clatrina, el proceso de reconocimiento del *cargo* va seguido del reclutamiento de clatrina. Éste está mediado por el adaptador AP180, que se une a PI(4,5)P<sub>2</sub> a través de su dominio ANTH. La formación de invaginaciones de membrana se lleva a cabo mediante proteínas deformadoras de membrana como la epsina, que además de unirse a PI(4,5)P<sub>2</sub>, introducen una hélice anfipática en la membrana (Ford y col., 2002). Posteriormente, los factores endocíticos se disocian rápidamente de las vesículas gracias a la defosforilación del PI(4,5)P<sub>2</sub> por 5-Pasas que interactúan con la dinamina en las últimas etapas de la endocitosis (Cremona y col., 1999; McPherson y col., 1996).

En la fagocitosis, el PI(4,5)P<sub>2</sub> se acumula en los fagosomas tempranos por activación local de PIP5K y juega un papel importante en la remodelación de actina a través del reclutamiento de proteínas de unión a actina en las membranas de los fagosomas (Coppolino y col., 2002). Después del inicio de la formación del fagosoma, la hidrólisis del PI(4,5)P<sub>2</sub> y el desensamblaje de actina muestran cinéticas espaciales y temporales similares, y lo que es más importante, la desunión de actina del fagosoma se inhibe por la alteración de la hidrólisis de PI(4,5)P<sub>2</sub>. Los receptores fagocíticos son capaces de activar PI3K, que transforma PI(4,5)P<sub>2</sub> a PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. La acumulación de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> activa las miosinas que se localizan en los fagosomas, ya que se unen a PI(3,4,5)P<sub>3</sub> a través de su dominio PH (Cox y col., 2002).

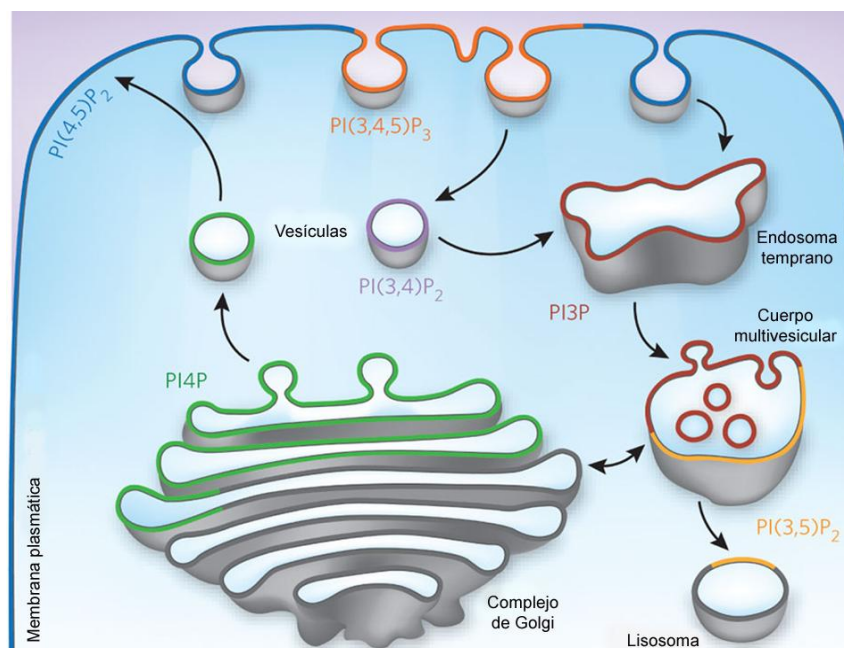
El PI(4,5)P<sub>2</sub> también está implicado en la fase de pre-fusión de la exocitosis. Se ha observado que la distribución de PI(4,5)P<sub>2</sub> coincide con la de las vesículas listas para ser liberadas y que llevarán a cabo el proceso de exocitosis (Milosevic y col., 2005; di Paolo y col., 2004).

En estos procesos, el  $PI(4,5)P_2$  tiene un papel fundamental como co-receptor de reclutamiento y regulación de proteínas endocíticas.

### 3. LOCALIZACIÓN EN SISTEMAS DE ENDOMEMBRANAS Y PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO

#### 3.1. Localización subcelular de las distintas especies de fosfoinosítidos

El balance entre la actividad de las quinasas y fosfatasa de PIs puede ser diferente en los distintos compartimentos intracelulares, lo que genera distribuciones heterogéneas de las distintas especies de PIs entre los orgánulos celulares (De Matteis y Godi, 2004). Esta distribución no homogénea se dedujo a partir de la visualización de las distribuciones subcelulares de los dominios proteicos que reconocen los distintos PIs. Esta aproximación ha permitido la visualización de acumulaciones de distintos PIs en la célula (Figura 15). Así, las



**Figura 15. Distribución subcelular de los fosfoinosítidos.** Las distintas especies de PIPs están concentradas en diferentes compartimentos subcelulares y regiones. Sólo se muestran las formas de PIP predominantes: en la MP encontramos  $PI(4,5)P_2$ , el  $PI(4)P$  se localiza en el Golgi y en el TGN, y en los endosomas tempranos y en los cuerpos multivesiculares hay  $PI(3)P$ . El  $PI(3,5)P_2$  lo encontramos también en los cuerpos multivesiculares y en los lisosomas. Finalmente en las vesículas hay  $PI(3,4)P_2$  (modificado de Kutateladze, 2010).

formas  $PI(4,5)P_2$  y  $PI(3,4,5)P_3$  se encuentran principalmente en la MP, donde controlan la generación de mensajeros secundarios, la exocitosis, la endocitosis y la reorganización del citoesqueleto de actina (Odorizzi y col., 2000; Di Paolo y De Camilli, 2006). Sin embargo, hay

estudios que revelan la existencia de un pequeño acúmulo de PI(4,5)P<sub>2</sub> en membranas intracelulares como el Golgi, endosomas y RE (Watt y col., 2002). El PI(3)P se localiza en endosomas tempranos y cuerpos multivesiculares, mientras que el PI(4)P es la forma más abundante en el Golgi y el PI(3,5)P<sub>2</sub> está en endosomas y lisosomas (D'Angelo y col., 2008). Además, la presencia de PIs en el núcleo sugiere que éstos también regulan la dinámica de la actina nuclear (Irvine, 2003).

### 3.1.1. Los fosfoinosítidos en el complejo de Golgi

El PI(4)P es el PI más importante en el Golgi y las membranas del orgánulo son el mayor sitio de generación de PI(4)P (Cockcroft y col., 1985). Estudios de localización usando proteínas fluorescentes de unión a lípidos o anticuerpos específicos indicaron que una proporción sustancial del PI(4)P intracelular se encuentra en las membranas del Golgi (Stefan y col., 2002; Blagoveshchenskaya y col., 2008; Varnai y Balla, 2008). Tanto en mamíferos como en levaduras, se ha observado que el PI(4)P regula el tráfico intracelular desde el Golgi hasta la periferia celular (Walch-Solimena y Novick, 1999; Hama y col., 1999; Audhya y col., 2000; Schorr y col., 2001; Godi y col., 2004). En levaduras, la generación de PI(4)P en el Golgi es esencial para el transporte anterógrado de una gran variedad de *cargo* como la invertasa, la Hsp150 y la chitina sintasas (Walch-Solimena y Novick, 1999; Audhya y col., 2000; Schorr y col., 2001). Además, se ha implicado al PI(4)P en el transporte anterógrado desde el RE, aunque el mecanismo exacto de esta regulación aún está por determinar (Blumental-Perry y col., 2006). Mutaciones en las PI4K causan defectos en el citoesqueleto de actina y en la morfología de los ITs sugiriendo otras posibles funciones para el PI(4)P del Golgi (Walch-Solimena y Novick, 1999; Foti y col., 2001).

El PI(4)P es esencial para la funcionalidad del Golgi. Existen dos tipos funcionales de efectores de PI(4)P en este orgánulo: los adaptadores de clatrina y las proteínas transportadoras de lípidos. El primer grupo consiste en el complejo del adaptador de clatrina 1 (AP-1) y en las proteínas GGAs (del inglés *γ-ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding*). El transporte del Golgi mediado por clatrina es importante para la salida de proteínas hacia el compartimento endosomal y lisosomal. AP-1 se une al TGN mediante una interacción simultánea con PI(4)P y Arf1 (Wang y col., 2003). Estudios realizados en levaduras y en mamíferos han demostrado que el PI(4)P está involucrado en el reclutamiento de proteínas GGA en el Golgi. Las GGAs se unen a PI(4)P mediante su dominio GAT, el cual también se une a ubiquitina pero no a Arf1 (Wang y col., 2007). El PI(4)P incrementa la afinidad de la ubiquitina por el dominio GAT, indicando un papel adicional del PI en el reconocimiento del *cargo* en el TGN (Wang y col., 2007). Tanto la

AP-1 como las GGAs funcionan en la salida de *cargo* dependiente de clatrina entre el TGN y los endosomas (Duncan y Payne, 2003). Sin embargo, estudios recientes en levaduras sugieren estas proteínas controlan vías de tráfico distintas del TGN que involucran a los endosomas tempranos y tardíos (Abazeed y Fuller, 2008). En ambos casos, el reclutamiento de los adaptadores de clatrina en el Golgi requiere una detección coincidente del Arf1 activado y del PI(4)P, el cual controla la formación de las vesículas recubiertas de clatrina en el TGN.

La segunda clase de efectores de PI(4)P en el Golgi consiste en unas proteínas transportadoras de lípidos solubles caracterizadas por específicos sitios de unión a lípidos. La proteína transportadora de ceramida (CERT), la de unión a oxisterol (OSBP) y la adaptadora 4-fosfato (FAPP2) tienen un dominio PH que es necesario para unirse al Golgi. Estudios *in vitro* indican que estas proteínas son capaces de facilitar el transporte no vesicular y el intercambio de lípidos entre dos membranas distintas (D'Angelo y col., 2008).

El PI(4)P es el PI que predomina en el Golgi; una deficiencia de este lípido afecta a la estructura y funcionalidad del orgánulo. En levaduras, mutaciones en las PI4K que se encuentran en el Golgi resultan en una acumulación de intermediarios de membrana anormales, llamados cuerpos de Berkeley, y en alteraciones del transporte intracelular hacia la MP (Odorizzi y col., 2000). Estos defectos son similares a los producidos por mutaciones en la GTPasa Arf1 (Gaynor y col., 1998) y podrían reflejar la propiedad del PI(4)P de actuar como un co-receptor con Arf1, reclutando proteínas citosólicas en las membranas del TGN como el adaptador de clatrina AP-1, las proteínas GGA y las FAPP1/2 (Behnia y Munro, 2005; De Matteis y col., 2005). La isoforma PI4KIII $\beta$  de mamíferos interacciona con Arf1 y a su vez es estimulado por la GTPasa, indicando que ésta puede cooperar con el PI(4)P en múltiples y sinérgicos mecanismos (De Matteis y col., 2005). Además, la depleción de la isoforma PI4KII $\alpha$  también provoca la disrupción de la integridad del Golgi (Wang y col., 2003).

La restricción espacial del PI(4)P en el Golgi se asegura con la acción de fosfatasas como la Sac1 (Guo y col., 1999). Es una proteína integral de membrana la localización de la cual varía en función de las condiciones de crecimiento: se encuentra mayoritariamente en el RE en condiciones de crecimiento y se transloca al Golgi en ausencia de nutrientes (Faulhammer y col., 2007). Puede desfosforilar PI(4)P cuando se da transporte retrógrado del Golgi al RE (Guo y col., 1999). Las células de levadura que tienen la Sac1 mutada tienen niveles elevados de PI(4)P, incluso en la MP (Roy y Levine, 2004), indicando un acúmulo excesivo de PI(4)P en los compartimentos de la vía secretora temprana.

A pesar de que no se ha visualizado ninguna isoforma de PIP5K en el Golgi, existen evidencias de que el PI(4,5)P<sub>2</sub> podría generarse en el Golgi. Primero, la actividad de la PIP5K y la de su forma recombinante PIP5K $\alpha$  están asociadas con las membranas del Golgi e incrementan los

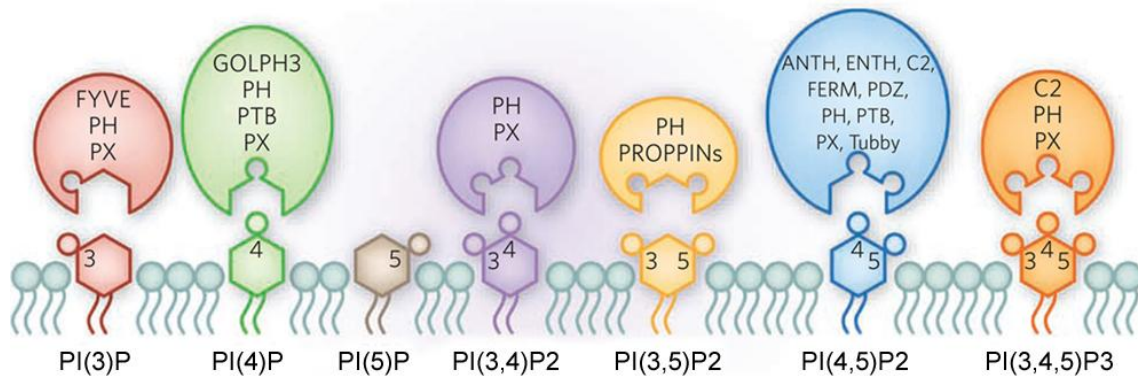
niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> *in vitro* (Godi y col., 1999; Jones y col., 2000; Siddhanta y col., 2000) de forma Arf-dependiente. Segundo, el Golgi posee tres 5-Pasas: la farbina, la hSac2 y la 5-Pasa de tipo II Ocr1. Defectos en esta última causan el síndrome oculocerebrorenal o síndrome de Lowe (Attree y col., 1992). Se han detectado niveles altos de PI(4,5)P<sub>2</sub> en células del túbulo proximal del riñón de pacientes con síndrome de Lowe. La proteína Ocr1-1 interacciona con la golgina 84, una proteína de las membranas del Golgi (Bascom y col., 1999), y se localiza en el TGN en fibroblastos y células epiteliales (Dressman y col., 2000), aunque también se ha observado la presencia de Ocr1-1 en lisosomas de células de riñón humanas (Zhang y col., 1998).

Se ha propuesto que PI(4,5)P<sub>2</sub> interviene en el transporte en la zona RE/Golgi (Godi y col., 1998), en la formación/liberación de los ITs en la zona post-Golgi y en el mantenimiento de la integridad estructural y funcionalidad del Golgi (Siddhanta y col., 2000; Sweeney y col., 2002). El PI(4,5)P<sub>2</sub> podría ejercer estos efectos controlando las maquinarias de espectrina y actina que intervienen en la organización y funcionalidad del Golgi (De Matteis y Morrow, 1998; Lorra y Huttner, 1999). Agentes que secuestran PI(4,5)P<sub>2</sub>, como la neomicina y varios dominios PH (ver apartado 3.2), inhiben el ensamblaje de espectrina y actina estimulado por Arf, a las membranas del Golgi *in vitro* (Godi y col., 1998). Sin embargo, al sobreexpresar la isoforma PIP5K $\alpha$  se incrementan los niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub>, promoviendo así la polimerización de actina de las vesículas nacientes para formar cometas de actina, algunos de los cuales son ITs derivados de las membranas del Golgi (Rozelle y col., 2000). El PI(4,5)P<sub>2</sub> podría actuar en los procesos de fisión de membranas a través del reclutamiento/activación de la dinamina, una proteína de unión a PI(4,5)P<sub>2</sub> implicada en la fisión de membrana en la MP y en el TGN, y/o estimulando la actividad PLD para incrementar así los niveles de PA, un lípido promotor de los procesos de fisión (Kozlov, 2001).

### 3.2. Proteínas de reconocimiento

Como ya hemos comentado anteriormente, los Pls sirven de marcadores de los compartimentos intracelulares y forman sitios de anclaje únicos para efectores proteicos. De esta forma, las siete especies de Pls junto con los efectores proteicos que se unen a ellos y las enzimas que generan o modifican los Pls, forman una compleja red proteico-lipídica de señalización. Existen proteínas citosólicas que contienen uno o varios módulos efectores capaces de reconocer una especie de PI y así son reclutadas a distintos compartimentos intracelulares (Figura 16). El dominio **PH** fue el primer efector que se une a Pls que se descubrió (Harlan y col., 1994). Actualmente se conocen once módulos: **ANTH** (del inglés *AP180 N-terminal homology*), **C2** (del inglés *conserved región-2 of protein kinase C*), **ENTH** (del

inglés epsin N-terminal homology), **FERM**, **FYVE** (del inglés *Fab1*, *YOTB*, *Vac1 and EEA1*), **GOLPH3** (del inglés *Golgi phosphoprotein 3*), **PDZ** (del inglés *postsynaptic density 95, disk large, zonula occludens*), **PROPPINs** (del inglés  *$\beta$ -propellers that bind PIs*), **PTB** (del inglés *phosphotyrosine binding*), **PX** (del inglés *Phox homology*) y **Tubby**.



**Figura 16. Módulos efectores que reconocen fosfoinosítidos.** Los dominios de unión a PIs y sus dianas están coloreadas igual que en la figura 15, de acuerdo con su distribución predominante en las membranas intracelulares (modificado de Kutateladze, 2010).

El reconocimiento de una disposición única de los grupos fosfatos alrededor del anillo de inositol, que se describe como el “código PI”, por parte de estos dominios resulta en el reclutamiento de las proteínas que los contienen hacia compartimentos intracelulares concretos. Generalmente, la interacción entre los PIs y las proteínas citosólicas es de baja afinidad. Para que ésta sea mayor y más estable, los PIs cooperan con uno o más sitios de unión adicionales en la membrana. Debido a la localización subcelular tan heterogénea de los PIs, este mecanismo de reconocimiento dual (o múltiple) genera un código de detección coincidente para la regulación de las interacciones membrana-citosol y, por consiguiente, para la definición de la identidad del orgánulo (Wenk y De Camilli, 2004; Behnia y Munro, 2005).

Muchas de estas proteínas de reconocimiento contienen otros dominios de unión a proteínas y/o lípidos, o poseen actividades catalíticas. Éstas desencadenan fosforilaciones y desfosforilaciones de otros complejos asociados a membrana y de adaptadores, promoviendo así la interconversión de los PIs y la activación o finalización de cascadas de señalización.

### 3.2.1. El dominio PH

Los dominios PH forman una de las familias de módulos de señalización más grandes y han sido los más caracterizados. El dominio PH fue identificado en los años 90 y su nombre proviene de dos regiones homólogas a plecstrina, el mayor sustrato de la PKC en las plaquetas



(Haslam y col., 1993; Mayer y col., 1993). Desde entonces, este módulo se ha encontrado en 275 proteínas humanas involucradas en señalización intracelular (factores GTP-GDP y sus proteínas activadoras), tráfico de membranas (FAPP2), citoesqueleto (dinamina y  $\beta$  espectrina) y metabolismo lipídico (PLC $\delta$ 1, PLD1 y 2).

El dominio PH contiene alrededor de 120 residuos plegados en una estructura 3D muy conservada a pesar de que hay poca similitud de secuencia entre los miembros de la familia. Debido a esta variabilidad en la secuencia, los dominios PH tienen diversas funciones e interaccionan con varios ligandos incluidas proteínas, fosfolípidos, PtdIns y Pls. Muchos de los dominios PH reconocen Pls de forma poco precisa y muy promiscua, aunque hay un pequeño grupo (10-20% del total de dominios PH) que se une fuertemente y de manera específica a Pls, sobre todo a PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, a PI(4,5)P<sub>2</sub> y a PI(3,4)P<sub>2</sub>. La afinidad de unión de los dominios PH a los Pls varía significativamente entre un rango nanomolar y micromolar (DiNitto y Lambright, 2006).

Entre los efectores mejor caracterizados que se unen a PI(3,4,5)P<sub>3</sub> se encuentran los dominios PH de las proteínas ARNO, Btk, Gap1, Grp1 y cithesina-1 (Fukuda y col., 1996; Klarlund y col., 1997; Cronin y col., 2004). El dominio PH de la fosfolipasa PLC $\delta$ 1 es específico de PI(4,5)P<sub>2</sub> mientras que el de la TAPP1, la centaurina  $\beta$ 2 y PEPP1 prefieren a PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(3)P, respectivamente. Las proteínas FAPP1 y OSBP se unen solamente a PI(4)P, y DAPP1, PDK1 y PKB (Akt) lo hacen a PI(3,4)P<sub>2</sub> y a PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Lemmon y Ferguson, 2000; DiNitto y Lambright, 2006; Lemmon, 2004).

La zona de unión a Pls del dominio PH está formada por tres bucles que flanquean una estructura de barril  $\beta$ . Igual que los sitios de unión de las otras proteínas de reconocimiento de Pls, esta estructura en forma de bolsillo contiene una secuencia motivo (Isakoff y col., 1998) KK<sub>n</sub>(K/R)XR en la que las cadenas básicas de la lisina (K) y la arginina (R) hacen contacto directo con los grupos fosfato del lípido. Como resultado, el dominio PH está polarizado electrostáticamente y tiene un fuerte potencial electrostático positivo alrededor del sitio de unión que contribuye a las interacciones electrostáticas específicas con los Pls y no específicas con otros lípidos aniónicos de membrana (Lemmon y Ferguson, 2000; DiNitto y Lambright, 2006; Singh y Murray, 2003; Manna y col., 2007; He y col., 2008).

**ANTECEDENTES, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y  
OBJETIVOS**

---



Resultados previos en nuestro laboratorio han demostrado que los filamentos de actina están directamente implicados en la localización subcelular del Golgi (Valderrama y col., 1998; di Campli y col., 1999) y en el transporte retrógrado del Golgi al RE (Valderrama y col., 2001), ya que hemos visualizado la actina en los ITs tipo COPI y en las porciones distales no compactas de las cisternas del Golgi (Valderrama y col., 2000). También se ha descrito que los MFs son los responsables directos de mantener la forma plana de las cisternas, puesto que proveen estabilidad mecánica a las cisternas y regulan indirectamente la actividad de las bombas e intercambiadores iónicos para mantener la homeostasis iónica del Golgi (Valderrama y col., 1998; Lázaro-Diéguez y col., 2006). Hay evidencias de que el motor de actina miosina II está implicado en la generación de ITs en el Golgi (Duran y col., 2003; Egea y col., 2006; Stow y Heimann, 1998, Misérey-Lenkei y col., 2010) y que interacciona con el orgánulo (Fath, 2005), de manera que proporciona fuerza suficiente para fisurar los ITs de las cisternas y/o para su movimiento posterior a lo largo de los MFs (DePina y Langford, 1999; DePina y col., 2007; Misérey-Lenkei y col., 2010). Este proceso podría tener lugar en conjunción con otras proteínas del citoesqueleto asociado al Golgi como la espectrina, la anquirina o la isoforma de tropomiosina Tm5NM-2 (Heimann y col., 1999; Duran y col., 2003; Percival y col., 2004). Por otro lado, se sabe que el citoesqueleto de espectrina, cuyos componentes básicos son la propia espectrina, la actina, la tropomiosina y la anquirina, interviene en el mantenimiento de la integridad de la estructura de la MP y en la formación de dominios discretos de membrana, determinando la forma discoidea de los eritrocitos y su capacidad de deformación a su paso por los capilares (Bennett y Baines, 2001).

Con estos antecedentes en la literatura y sabiendo que existe un citoesqueleto de espectrina asociado al Golgi, definiéndose una isoforma de espectrina ( $\beta$ III espectrina) y dos isoformas de anquirina (anquirina G119 y anquirina de 195 kDa) (Holleran y col., 2001), y que estas isoformas podrían estar implicadas en el transporte secretor (Devarajan y col., 1997; Gough y Beck, 2004) y en el mantenimiento estructural del Golgi (Siddhanta y col., 2003), establecemos un modelo comparativo a nivel del Golgi con la organización macromolecular del citoesqueleto de espectrina en la MP de los eritrocitos, en el cual las cisternas del Golgi equivaldrían a un pequeño eritrocito pero vuelto del revés. Así, el citoesqueleto de espectrina participaría de forma sustancial en determinar o mantener la estructura aplanada de las cisternas y regularía la actividad secretora y la arquitectura del Golgi.

Por todo ello nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: **la  $\beta$ III espectrina y la anquirina G119 son necesarias para el mantenimiento de la organización estructural del Golgi y para el transporte secretor asociado.** Para demostrarla nos planteamos los siguientes objetivos:

**Objetivo 1:**

Determinar la localización de la  $\beta$ III espectrina y la anquirina G119 dentro del Golgi (polaridad *cis-/trans-* y zona central/periférica) y averiguar si son necesarias para el mantenimiento de la organización estructural del Golgi.

**Objetivo 2:**

Determinar cómo la  $\beta$ III espectrina y la anquirina G119 participan en la funcionalidad del Golgi en cuanto al tráfico de membranas a lo largo de la vía secretora.

**Objetivo 3:**

Identificar qué dominios estructurales son los responsables de la localización de la  $\beta$ III espectrina y la anquirina G119 en las membranas del Golgi.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## I. MATERIALES

### 1. REACTIVOS

A continuación se detallan los distintos reactivos utilizados así como una pequeña descripción, la concentración de uso y su procedencia.

Reactivo	Descripción	Concentración	Procedencia
Brefeldina A	Metabolito fúngico que desorganiza la estructura y bloquea la función del Golgi	1-5 µg/ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)
Cicloheximida	Antibiótico que inhibe la síntesis proteica	100 µg/ml	Sigma-Aldrich
Geneticina	Antibiótico que selecciona las células eucarióticas que son positivas para la neomicina	100-1000 µg/ml	Sigma-Aldrich
Jasplakinolide	Toxina marina que estabiliza la polimerización de los filamentos de actina	500 nM	Invitrogen (Paisley, Reino Unido)
Latrunculina B	Toxina marina que inhibe la polimerización de los filamentos de actina	500 nM	Calbiochem (Darmstadt, Alemania)
Nocodazole	Promotor de la despolimerización de los MTs	10 µM	Calbiochem
PDBu (del inglés <i>Phorbol 12,13-dibutirate</i> )	Éster de forbol análogo al diacilglicerol. Permeable a la MP	1 µM	Sigma-Aldrich
Polibreno (Bromuro de hexadimetrina)	Polímero de carga positiva que neutraliza la repulsión de carga entre el lentivirus y el ácido siálico de la superficie celular	8 µg/ml	Sigma-Aldrich
Puromicina	Antibiótico que selecciona las células eucarióticas que son positivas para la puromicina acetiltransferasa	1-10 µg/ml	Sigma-Aldrich
Rapamicina	Antifúngico e inmunosupresor. Inhibe selectivamente mTOR y bloquea la activación de determinadas quinasas	100 nM	Calbiochem
Subunidad B de la toxina de <i>Shigella</i>	Toxina bacteriana que se internaliza a través de un receptor de MP hasta el RE. Se utiliza como marcador de la vía retrógrada	0.5 µg/ml	Dr. Ludger Johannes (Instituto Curie, Paris, Francia)
TRlzol	Solución de fenol e isocianato de guanidina que se usa para aislar ARN de células y tejidos	3 ml/100 cm <sup>2</sup>	Invitrogen



## 2. ANTICUERPOS

Las siguientes tablas muestran los anticuerpos primarios y secundarios empleados para inmunofluorescencia o *western blotting* indicando la especie contra la que se han generado, la dilución de trabajo y su procedencia.

Anticuerpo primario	Especie	Dilución de trabajo		Procedencia
		IF	WB	
βIII espectrina (nº 33)	Conejo	1:150	-	Universidad Pompeu Fabra (Barcelona, España)
βIII espectrina (nº 82)	Conejo	-	1:1000	Eurogentec (Liege, Bélgica)
CTR433	Ratón	1:5	-	Dr. M. Bornens (Instituto Curie)
GFP	Conejo	-	1:25000	Invitrogen
GM130	Ratón	1:1000	1:10000	Transduction Laboratories (Lexington, KY, EEUU)
Golgina97	Ratón	1:300	1:3000	Molecular Probes (Invitrogen)
GST	Ratón	1:500	1:5000	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Receptor manosa-6P	Ratón	1:200	-	Abcam
Receptor transferrina	Ratón	-	1:25000	Molecular Probes
Myc	Ratón	1:500	1:5000	Sigma-Aldrich
p190 RhoGAP	Ratón	-	1:3000	BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU)
Rho GDI	Conejo	-	1:1000	Santa Cruz (Delaware, CA, EEUU)
pSerina	Conejo	-	1:1000	Invitrogen
PKD <i>motif</i>	Conejo	-	1:1000	Cell Signaling (Danvers, MA, EEUU)
TGN46	Oveja	1:500	-	Serotech (Oxford, Reino Unido)

Anticuerpo secundario	Especie	Dilución de trabajo		Procedencia
		IF	WB	
Alexa 488	Conejo	1:500	-	Invitrogen
Alexa 488	Oveja	1:500	-	Invitrogen
Alexa 488	Ratón	1:500	-	Invitrogen
Alexa 546	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
ABD-βIII espectrina βIII espectrina	pEGFP pcDNA3.1	Forma truncada de la construcción βIII espectrina Dr. L. Ranum (Universidad de Florida, Gainesville, EEUU)
PH-βIII espectrina PH-FAPP1	pEGFP pGEX	Forma truncada de la construcción βIII espectrina Dr. M. A. De Matteis (Universidad de Nápoles, Italia)
PH-OSBP	pEGFP	Dr. T. Levine (Universidad College London, Londres, Reino Unido)
psPAX pMD2.G	psPAX pMD2.G	Dr. A. J. Morris (Universidad de Kentucky, Lexington, KY, EEUU)
shRNAs βIII espectrina TGN38-FRB-CFP	pLKO.1 pEGFP	Open Biosystems (Waltham, MA, EEUU) Dr. Tamas Balla (NIH, Bethesda, MD, EEUU)

## II. MÉTODOS

### 1. LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES

Las células RPE1 (del inglés *retinal pigment epithelial*) crecieron en medio DMEM/F-12 1:1 (del inglés *dulbecco modified medium nutrient mixture F-12*) mientras que las células COS-7, NRK, HEK293, HeLa y HeLa que expresan constitutivamente la proteína GFP-VSV-Gts045 lo hicieron en medio DMEM, ambos suplementados con suero bovino fetal (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) al 10% (v/v) inactivado, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 mg/ml), piruvato sódico (100 mM) y L-glutamina (10 mM). Tanto el DMEM/F-12 como el DMEM y el FBS son de Invitrogen. Las células crecieron a 37 °C en atmósfera saturada de agua y al 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LA βIII ESPECTRINA Y LA ANQUIRINA G119

La primera tanda de anticuerpos contra las isoformas βIII espectrina y anquirina G119 se realizó en la Universidad Pompeu Fabra (ver tabla adjunta). Se diseñaron varios péptidos para cada proteína localizados en distintos dominios y se sintetizaron químicamente conjugados a KLH (del inglés *keyhole limpet hemocyanin*), una proteína transportadora que incrementa la inmunoreactividad del péptido. Cada péptido se inyectó a dos o tres conejos y éstos se sangraron después de cada inyección. En total se realizaron tres inyecciones por conejo al mes durante tres meses. También se sangraron los conejos antes de introducirles los péptidos para

obtener el suero pre-inmune, que es el control de la inmunoreactividad aparecida como consecuencia de la inyección de los péptidos. Se analizó el grado de inmunoreactividad de todos los sangrados (en total tres más el sangrado pre-inmune) mediante la técnica ELISA. Posteriormente, los sangrados más inmunoreactivos de todos se purificaron por cromatografía de afinidad con los respectivos péptidos. Una segunda tanda de anticuerpos se realizó por Eurogentec (ver tabla adjunta) siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Todos los anticuerpos obtenidos se testaron por IF y WB en varios tipos celulares.

En la siguiente tabla se especifica la secuencia de aa de los distintos péptidos y su localización en las proteínas así como su nomenclatura y la de los anticuerpos obtenidos (en azul la primera tanda y en verde la segunda tanda de anticuerpos).

	Nº del péptido	Secuencia de aa y posición	Nº del anticuerpo
<b>βIII espectrina</b>	1	YSDINNRWDLPSDWDN (20-35 aa)	82 y 83
	2	LRANNQKVYTPREGR (376-390 aa)	86 y 87
	3	TALEEREKERKRKREE (2076-2091 aa)	36, 37 y 38
	4	EGPGPGSGDEANGPRGER (2165-2182 aa) (Stankewich y col., 1998)	84 y 85
	5	CRKQEMEAFGKKAANRS (2226-2242 aa)	33, 34 y 35
<b>Anquirina G119</b>	6	PPSGEGVSNGYKGDTP (818-834 aa)	58, 59 y 60
	6	PPSGEGVSNGYKGDTP (818-834 aa)	129 y 130
	7	FPDTSTNPGQCF (1065-1076 aa)	127 y 128
	8	CFRRRDIFSMRSL (1075-1088 aa)	37, 39 y 46
	8	CFRRRDIFSMRSL (1075-1088 aa)	309 y 310

### 3. TÉCNICAS MORFOLÓGICAS

#### 3.1. Inmunocitoquímica y microscopía de epifluorescencia

Las inmunofluorescencias indirectas 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 durante 15 min. Después de lavar con PBS, los grupos aldehídos del PFA se bloquearon con una solución 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl en PBS durante 20 min. A continuación, las células se permeabilizaron durante 10 min con solución de bloqueo [0.1% de 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 y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4 °C. Seguidamente, se lavaron con PBS y se montaron en mowiol. Las preparaciones se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 y las imágenes se captaron con una cámara Orca-ER CCD

(Hamamatsu Photonics, Japón). Para los estudios de colocalización y de transporte intracelular se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Alemania). El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con los programas Adobe Photoshop CS (Adobe Systems, San José, CA, EEUU) e Image J 1.43 (NIH, Bethesda, MD, EEUU).

### **3.2. Análisis cuantitativo de las imágenes**

#### **3.2.1. Cuantificación de la colocalización de la $\beta$ III espectrina con los marcadores del complejo de Golgi**

Para cuantificar el grado de colocalización entre el marcador de la  $\beta$ III espectrina (marcaje en rojo) y los distintos marcadores de Golgi (marcaje en verde) usamos el programa de análisis de imagen Image J 1.43. Previamente se fijaron una serie de parámetros para poder comparar las imágenes entre sí: se tomaron en una escala de grises a 8 bits y se eligieron aquellas células que no tenían la fluorescencia del marcaje saturada. Para analizar el nivel de colocalización de las proteína según las intensidades de sus marcajes, seguimos dos criterios: el primero basado en el porcentaje de píxeles rojos ( $\beta$ III espectrina) que colocalizaban con los píxeles verdes (marcador de Golgi), y viceversa; el segundo se basó en el umbral mínimo de la señal de ambos marcadores. Finalmente, cuantificamos el número de píxeles en rojo que se solapaban con píxeles verdes respecto en número total de píxeles en rojo.

#### **3.2.2. Cuantificación de la morfología del complejo de Golgi**

Para cuantificar el fenotipo de la fragmentación del Golgi en las células silenciadas para la  $\beta$ III espectrina también usamos el programa de análisis de imagen Image J 1.43. Para ello, definimos la región de interés de cada célula, que es el Golgi, y se midió tanto el perímetro como la superficie del orgánulo con un área mínima de 3 píxeles. La circularidad del Golgi se calculó a partir de la fórmula  $4\pi [\Sigma(\text{áreas})/\Sigma(\text{perímetros})]^2$  (Bard y col., 2003).

### **3.3. Microinyección de anticuerpos**

Para la microinyección de anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina, se sembraron células NRK en cubreobjetos de 25 mm de diámetro previamente tratados con poli-D-lisina para facilitar la adhesión de las células al vidrio. Al día siguiente, se microinyectó en el citoplasma de las células las fracciones IgG purificadas del anticuerpo anti- $\beta$ III espectrina nº 33 o las fracciones IgG del suero pre-inmune junto con rojo dextrano (lo usamos para identificar posteriormente las células microinyectadas). Después de la microinyección, trasladamos los cubreobjetos a

placas con DMEM fresco y se incubaron durante 5 h a 37 °C. Posteriormente se fijaron con PFA al 4% y se procesaron para inmunocitoquímica tal y como se ha descrito anteriormente.

## 4. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 4.1. Extractos celulares y *western blotting*

Los extractos celulares se obtuvieron a partir de flascos de 75 cm<sup>2</sup> en los que añadimos 300 µl de tampón de lisis frío (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, pH 7,4) con inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina y pepstatina A) y fosfatasa (ortovanadato de sodio y PMSF). Las muestras se pasaron 30 veces por una jeringa de insulina y se incubaron durante 10 min en hielo. Después se centrifugaron a 1000 g durante 10 min y el sobrenadante obtenido se cuantificó con el *kit DC protein assay* de Bio-Rad. Luego se añadió tampón de carga 5x con 10% de β-mercaptoetanol y se hirvió durante 5 min. Para la electroforesis se cargaron 30 µg de proteína en un gel del 6, 8 o 10% (volumen/volumen) de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman, Maidstone, Kent, Reino Unido) y se bloquearon o bien con 5% de BSA disuelta en tampón TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% de tween-20), o con 5% de leche en polvo en tampón TBST durante 1 h. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en PBS con 1% de BSA-0.002% de azida sódica durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas se lavaron con tampón TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h en 5% de leche/tampón TBST. Después de varios lavados, las membranas se incubaron durante 1 min a temperatura ambiente con el reactivo *Western blotting luminol reagent* (Santa Cruz). Las bandas se visualizaron por la exposición de la membrana a *Hyperfilm* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y sus intensidades se midieron por densitometría de la película usando el software Image J.

### 4.2. Inmunoprecipitación

Los extractos celulares se prepararon añadiendo 300 µl de tampón RIPA modificado (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 135 mM NaCl, 10% de glicerol, 0.05% de SDS, 0.5% de tritón X-100, 0.1% de deoxicolato de sodio y 2 mM EDTA) más inhibidores de proteasas (véase apartado anterior) y procesadas como se ha indicado anteriormente. Se incubaron 500 µg de muestra con el anticuerpo correspondiente y con 50 µl de perlas de sefarosa con proteína A (Santa Cruz) toda la noche. Al día siguiente, las perlas se lavaron tres veces con el tampón RIPA modificado o con el tampón TA (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM azida sódica, 1 mM PMSF y 1 mM EGTA) y las

proteínas se eluyeron de las perlas mediante la adición del 20  $\mu$ l de tampón de carga 5x con 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente estas muestras se procesaron por *western blotting* tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

### 4.3. Fraccionamiento subcelular

Las fracciones citosólicas y de membrana procedentes de células RPE1 control o tratadas con latrunculina B (500 nM, 1 h) o jasplakinolide (500 nM, 1 h) se obtuvieron a partir de placas de 100  $\text{cm}^2$  en las que añadimos cinco veces más el volumen celular de tampón XB (20 mM Hepes, 150 mM KCl, pH 7.7) suplementado con inhibidores de proteasas (véase apartado anterior). Los extractos celulares se lisaron mecánicamente pasándolos por una jeringa de insulina y se centrifugaron a 1000 *g* durante 10 min. El sobrenadante obtenido (fracción total) se sometió a una ultracentrifugación de 1 h a 60000 *rpm* usando un rotor MLA-130 (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, EEUU). El sobrenadante obtenido corresponde a la fracción citosólica mientras que el *pellet* es la fracción de membrana. Ésta se resuspendió con el mismo volumen de fracción citosólica que obtuvimos con tampón RIPA y se incubó a 4 °C durante 1 h. Posteriormente se volvió a ultracentrifugar a 60000 *rpm* durante 1 h para eliminar el material insoluble restante. Todas las fracciones subcelulares se procesaron por *western blotting* tal y como se ha explicado anteriormente.

### 4.4. Transfección con ADN plasmídico

Los plásmidos fueron transfectados de forma reversa, es decir, cuando las células estaban en suspensión, y luego se sembraron entre el 60 y el 80% de confluencia sobre cubreobjetos o en placas de cultivo. Como método de transfección se empleó FuGene HD (Promega) usando el protocolo recomendado por el fabricante. Los experimentos se realizaron entre las 12 y 16 h después de la transfección.

### 4.5. Transfección con ARN de interferencia

Para la transfección de los ARNs de interferencia (siRNA, del inglés *small interference RNA*), se usó el reactivo Hiperfect (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo adjunto. Los cuatro siRNAs que se usaron para inhibir la expresión de  $\beta$ III espectrina humana se adquirieron en Dharmacon (ON-TARGET $plus$  siRNAs) y se usaron por separado o con una mezcla de todos. Como control se utilizó una mezcla de cuatro siRNAs con secuencias que no codificaban para ninguna proteína (siRNA *non-targeting*). El protocolo se realizó de la siguiente manera: el

primer día se sembraron  $3 \times 10^5$  células en placas de 6 pocillos y se dejaron en el incubador. Mientras tanto, se prepararon los complejos (20 nM de siRNA) y se añadieron a las células que están empezando a adherirse a la placa. El segundo día se levantaron las células, se volvieron a transfectar como el día anterior y se incubaron durante 3 días más. A las 96 h desde la primera transfección se realizaron los experimentos. Los siRNAs empleados se especifican en la siguiente tabla:

siRNA contra la $\beta$ III espectrina	Secuencia de 5' a 3'
9	GGAGAAGCUUACUGCGCUA
10	CGUACGAGCUGCAGCGCUU
11	CCAGAGAGCACUCGGAUUAU
12	GAGCAGGUCUACCGAGUCA

#### 4.6. Producción e infección lentiviral

Para inhibir específicamente la expresión de la  $\beta$ III espectrina en células RPE1 se empleó el sistema lentiviral, que consiste en introducir dentro de las células una secuencia de ARN complementaria al ARN codificante para la proteína de interés usando los lentivirus como vector de internalización y expresión.

Para llevar a cabo esta técnica, se necesitaron los plásmidos lentivirales que codifican el ARN de interferencia (shRNA, del inglés *short hairpin RNA*) contra la  $\beta$ III espectrina y la anquirina G119. Las secuencias de los shRNAs clonadas en los plásmidos lentivirales pKLO.1 se especifican en la siguiente tabla:

	shRNA	Secuencia de 5' a 3' (sentido-bucle-antisentido)
$\beta$ III espectrina	27	CCGGGCCCTTCTCTTGCTGTTTACTCGAGTAAACAGCAGAAGAGAAGGGCTTTTTG
	28	CCGGCGTCGCCTTTGATTACCGAAACTCGAGTTTCGGTAATCAAAGGCGACGTTTTTG
	29	CCGGGCAGGTTATCCCAACGTCAATCTCGAGATTGACGTTGGGATAACCTGCTTTTTG
	30	CCGGCGCGGATCTAGTCATCAAGAACTCGAGTTCTTGATGACTAGATCCGCGTTTTTG
	31	CCGGCCTGCATACTAAGTGGCAGAACTCGAGTTCTGCCACTTAGTATGCAGGTTTTTG

El protocolo constó de dos pasos: en primer lugar las células empaquetadoras 293T se transfectaron con 3 vectores lentivirales para obtener los lentivirus contra la  $\beta$ III espectrina y la anquirina G119, y a continuación las células RPE1 se infectaron para silenciar la expresión de las proteínas de interés.

### **Producción de los lentivirus contra la $\beta$ III espectrina y la anquirina G119**

La transfección de las células empaquetadoras 293T para generar los lentivirus se realizó siguiendo el manual de instrucciones de la Lipofectamina 2000 (Invitrogen). La mezcla final de la transfección se preparó en dos mezclas (solución A y solución B). La solución A consistió en la mezcla, por este orden, de los vectores lentivirales pMD2.G (4,5  $\mu$ g del vector con los genes de la cápside), psPAX (9  $\mu$ g del vector con los genes de la envuelta) y el vector con el shRNA de nuestra proteína (13,5 $\mu$ g). La solución B consistió en el reactivo de transfección disuelto en el medio de transfección (opti-MEM, Invitrogen). Tanto la solución A como la B se incubaron por separado y posteriormente se mezclaron y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Mientras tanto, las células 293T que se habían sembrado previamente en placas de 100 cm<sup>2</sup> con DMEM sin antibiótico a una confluencia del 80-90%, se lavaron con PBS y se les añadió 6 ml de medio de transfección. Finalmente se añadió la mezcla al medio. Al cabo de 6 h, se cambió el medio de transfección y se añadió DMEM completo sin antibióticos. Después de 48 h, se recogió el medio que contenía los lentivirus, se filtró cuidadosamente con un filtro de 45  $\mu$ m de diámetro, se alicuotó y se guardó a -80 °C.

### **Infección de las células RPE1 con los lentivirus producidos**

Una vez obtenidos los lentivirus, se procedió a infectar las células RPE1. Para ello, se sembraron 6 x 10<sup>5</sup> células en una placa de 100 cm<sup>2</sup> y se infectaron con 5 ml de DMEM/F-12 más los lentivirus (volumen final de 10 ml). Después de 24 h, se cambió el medio por DMEM/F-12 completo que contenía puromicina (el antibiótico de selección). Los experimentos se realizaron a partir de las 96 h después de la infección. Como control negativo de los efectos de la infección se utilizaron lentivirus que contenían un shRNA que no interfería con la expresión de nuestras proteínas (*non-silencing sequence*).

Por otra parte, adquirimos un lote comercial (*MISSION shRNA lentiviral transduction particles*, Sigma-Aldrich) de 5 clones lentivirales contra la  $\beta$ III espectrina. El protocolo que se siguió fue el siguiente: en un pocillo de una placa de 6 pocillos se sembraron células RPE1 al 25% de confluencia para que estuvieran al 50% el día de la infección. Al día siguiente se añadió polibreno, un polícatión que incrementa la eficiencia de infección porque facilita la adhesión de las partículas lentivirales a la membrana celular, y seguidamente se añadieron los lentivirus. Las células se incubaron toda la noche a 37 °C. A la mañana siguiente se cambió el medio y se añadió DMEM/F-12 completo que contenía el antibiótico de selección.



#### 4.7. PCR semicuantitativa

Para realizar las PCRs semicuantitativas se siguieron varios pasos:

##### Extracción de ARN total

Para comprobar la inhibición del ARNm que codifica para la proteína de interés se extrajo ARN de distintos tipos celulares. Para una placa de 100 cm<sup>2</sup> al 80% de confluencia se añadió 3 ml de TRIzol (Invitrogen) y se homogenizaron las células primero con la pipeta varias veces y después con una jeringa de insulina. Seguidamente se añadieron 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIzol, vorteamos para mezclar bien la muestra con el alcohol y se dejó en hielo. Después la muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min con el fin de separar la fase acuosa de la orgánica. El ARN, presente en el sobrenadante que correspondía a la fase acuosa, se transfirió a otro tubo con cuidado de no tocar la interfase con la punta de la pipeta y se le añadió isopropanol (el mismo volumen que de muestra) para precipitar el ARN y se incubó en hielo durante 10 min. Después se volvió a centrifugar a 12000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante por decantación. El *pellet* obtenido se lavó con 500 µl de etanol al 70% a -20 °C para eliminar restos de sales y se centrifugó de nuevo a 12000 rpm durante 10 min. El precipitado restante se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de agua dietilpircarbonato (DEPC). Después de incubó a 65 °C durante 10 min para disolver bien en ARN obtenido. La concentración del ARN se determinó por espectrofotometría y las muestras se conservaron a -80 °C hasta el momento de su utilización. Se comprobó el estado del mismo mediante el análisis electroforético del ARN en un gel desnaturalizante de agarosa/formaldehído.

##### Obtención y amplificación del ADN complementario

Para realizar la retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) a partir del ARN total extraído de las células se utilizó el *kit* comercial de GeneCraft (Colonia, Alemania) que contenía la transcriptasa inversa *GeneScript*, siguiendo el protocolo adjunto. Las secuencias de los cebadores así como el tamaño del fragmento amplificado se muestran en la siguiente tabla:

Gen y proteína	Secuencia de 5' a 3'	Tamaño (pb)
SPTBN2 (βIII espectrina humana)	GCTGTGCCGCAAGCAGGAGA TCAAAGGCGACGCTGCCCTG	192
ANK3 (Anquirina G119 humana)	GAATTCTGCGCAGCACCACA TGGAATTTCCGTCTTCTTGG	370

Se utilizó la proteína GAPDH como control interno de la reacción. El producto amplificado fue sometido a separación electroforética en gel de agarosa al 1%.

#### 4.8. Generación de constructos de $\beta$ III espectrina

Los distintos constructos de la  $\beta$ III espectrina se generaron mediante PCR usando el *kit* comercial de Finnzymes (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) que contenía la ADN polimerasa *phusion high fidelity*, siguiendo el manual de instrucciones. Como molde usamos el plásmido conteniendo la  $\beta$ III espectrina silvestre. Los cebadores para amplificar los dominios de interés se describen a continuación:

Dominio	Secuencia de 5' a 3'
Dominio de unión a actina (ABD)	AGCTGAATTCACCACCATGAGCAGCAGCTGTCACCC AGCTGGTACCCAGCTCCGAGGCCAGGGACTC
Dominio de homología a plecstrina (PH)	TTTGAATCTCCACCATCCACACAAGCACCC TTTGGATCCCTACTTGTCTTCTTAAAGAAGCT

Una vez obtenidos los productos de las PCRs se purificaron con el *kit* de Qiagen *QIAquick gel extraction* para eliminar el tampón utilizado en las PCRs. Seguidamente realizamos las dobles digestiones de los vectores pEGFP para poder clonar los dominios de la  $\beta$ III espectrina en la posición C-terminal (pEGFP-N3 para ABD- $\beta$ III espectrina-GFP) o en N-terminal (pEGFP-C1 para GFP-PH- $\beta$ III espectrina). Para ello usamos las enzimas de restricción EcoRI y KpnI para ABD- $\beta$ III espectrina-GFP, y EcoRI y BamHI para GFP-PH- $\beta$ III espectrina de Fermentas (Thermo Fisher Scientific) y seguimos el manual de instrucciones. Después, cargamos el producto de las digestiones en un gel de agarosa al 1%, recortamos las bandas correspondientes y las tratamos con el *kit* *QIAquick gel extraction* para extraer el ADN digerido. Para poder ligar los dominios ABD y PH de la  $\beta$ III espectrina a los vectores pEGFP correspondientes usamos el *kit* *Quick ligation* de New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU) y seguimos el protocolo adjunto. Con los productos obtenidos de la ligación se transformaron bacterias de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* según las instrucciones de uso del *kit* *Quick ligation*. Una vez obtenidas las colonias positivas para nuestros constructos, las amplificamos y aislamos el ADN con el *kit* *Wizard plus SV minipreps DNA purification system* de Promega. Las nuevas construcciones generadas se secuenciaron para comprobar que se habían hecho correctamente.

#### 4.9. Generación de la proteína recombinante PH- $\beta$ III espectrina

Para generar la proteína recombinante clonamos el dominio PH de la  $\beta$ III espectrina en el vector pGEX-4T3 siguiendo el protocolo descrito anteriormente, pero en este caso usando las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Este vector de expresión codifica para un fragmento de la enzima glutatión S transferasa (GST) que es capaz de unirse a su sustrato, el glutatión.

Con el ADN obtenido transformamos la cepa Rosetta de *E. coli*, una cepa derivada de la BL21 (DE3). Estas cepas contienen el lisógeno DE3 del fago  $\lambda$ , lo que permite la inducción de la T7 ARN polimerasa en respuesta al derivado sintético de la lactosa IPTG (isopropil tiogalactósido). Una vez inducida, la T7 ARN polimerasa transcribe el vector de interés y se traduce nuestra proteína. Detectamos los clones recombinantes positivos mediante PCR y los secuenciamos para corroborar que el ADN codificaba para nuestra proteína de interés.

El procedimiento a seguir fue el siguiente: crecimos un clon recombinante en 120 ml de medio LB con el antibiótico de resistencia toda la noche, en agitación a 37 °C. Al día siguiente, añadimos 700 ml de medio LB con el antibiótico de resistencia al cultivo anterior y lo dejamos en agitación a 37 °C durante 4 h. Después añadimos 0.5 mM de IPTG para inducir la expresión de la T7 ARN polimerasa, que transcribirá el gen de interés y por tanto se sintetizará nuestra proteína, y dejamos el cultivo en agitación a 37 °C durante 6 h más. Para recoger las bacterias centrifugamos el cultivo a 6000 *rpm* durante 10 min y congelamos el *pellet* obtenido a -80 °C. Posteriormente, resuspendimos el *pellet* de bacterias con 10 ml de PBS frío que contenía inhibidores de proteasas (véase apartados anteriores) y sonicamos la muestra durante 5 min para lisar las bacterias. Después añadimos el 1% de NP-40 y lo dejamos en rotación 5 min en frío. Seguidamente centrifugamos la muestra a 4500 *g* durante 30 min y recogimos el sobrenadante que contenía la proteína recombinante. Para purificarla, usamos una perlas de agarosa con glutatión: mezclamos 600  $\mu$ l de perlas previamente lavadas con el sobrenadante y lo dejamos en rotación durante 4 h en frío. Después recuperamos las perlas de agarosa-glutatión que tenían unida la proteína recombinante mediante una centrifugación a 4500 *g* durante 5 min. Lavamos el *pellet* obtenido con PBS (3 lavados) y el último lo hicimos con 1 ml de tampón de glutatión (50 mM Tris-HCl pH 8.8 y 10 mM de glutatión). Se centrifugó de nuevo y se recogió el sobrenadante. Las perlas se volvieron a lavar con tampón de glutatión (2 veces) y se volvió a recoger el sobrenadante. Aislamos la proteína recombinante por cromatografía de exclusión molecular, de manera que pasamos el sobrenadante por una columna de *sephadex* previamente equilibrada con PBS. La elución se hizo por centrifugación (1000 *g* durante 2 min). Posteriormente, la proteína recombinante se concentró usando los filtros de Millipore

(Massachusetts, CA, USA) *Amicon ultra centrifugal filter units*, se alicuotó y se guardó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

## 5. ENSAYOS DE TRANSPORTE INTRACELULAR

### 5.1. Uso de la brefeldina A y del nocodazole como herramientas para estudiar los flujos retrógrado y anterógrado de membrana del complejo de Golgi

La BFA es una herramienta útil y común para estudiar el flujo de membrana en la zona RE/Golgi. Es un compuesto que se aísla del hongo *Eupenicillium brefeldianum* y que inhibe la activación de la GTPasa Arf1 impidiendo que se generen las vesículas COPI. Este efecto provoca un flujo de membrana unidireccional del Golgi al RE mediante túbulos, lo que finalmente comporta la fusión de las membranas del Golgi con el RE y también la redistribución completa de las proteínas residentes en el Golgi. Un retraso o bloqueo en el desensamblaje del Golgi inducido por la BFA representa una alteración en el flujo retrógrado y sugiere también una perturbación en el transporte retrógrado de proteínas COPI dependiente. Por otro lado, aprovechando el efecto de la BFA sobre la redistribución del Golgi al RE se puede estudiar el flujo anterógrado. Al eliminar la BFA del medio, se restablece el transporte anterógrado así como la activación de Arf1 y el Golgi se reensambla.

El NZ es un agente anti-neoplásico que interviene en la polimerización de los MTs inhibiendo su ensamblaje. Afecta a la dinámica de los MTs al unirse a la  $\beta$ -tubulina y previene la formación del enlace disulfuro entre las dos cadenas, inhibiendo así la dinámica de los MTs. Como hemos comentado anteriormente, el Golgi está asociado con el centrosoma, de manera que el citoesqueleto impone la localización del orgánulo. Estudios pioneros sobre el papel de los MTs en la organización estructural del Golgi en células de mamífero se basan en el uso de drogas que perturban la dinámica de los MTs, como el NZ. En la ausencia de MTs, el Golgi se fragmenta dando lugar a unas pequeñas estructuras llamadas *mini-stacks*, que se encuentran dispersas por todo el citoplasma y son plenamente funcionales. Los *mini-stacks* inducidos por el NZ se asocian estrechamente con los ERES, de manera que cualquier alteración en el desensamblaje de los MTs indicará una perturbación del flujo de membrana retrógrado. Al igual que pasa con la BFA, el efecto del NZ es reversible, hecho que hace posible estudiar el flujo de membrana anterógrado cuando eliminamos la droga del medio de cultivo y los MTs se reensamblan de nuevo, permitiendo que la arquitectura normal del Golgi se reestablezca.

## 5.2. Ensayo de transporte con el virus de la estomatitis vesicular

Para los experimentos de transporte de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular o el VSV-G, usamos las células HeLa que expresan constitutivamente la forma termosensible GFP-VSV-Gts045. 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 cicloheximida (CHX, 100 µg/ml) en el medio para inhibir la síntesis de proteínas. Después, las células se incubaron a 32 °C, que es la temperatura permisiva que permite el correcto plegamiento de la proteína y permite su transporte desde el RE hasta la MP, pasando por el Golgi. Las células se fijaron a distintos tiempos de transporte con PFA al 4% y se procesaron para inmunofluorescencia.

Para los ensayos bioquímicos usamos la enzima endo-β-N-acetilglucosaminidasa H (endo-H, New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU), una glicosidasa recombinante que corta los residuos de elevado contenido en manosa que tienen las proteínas cuando salen del RE, pero que no puede actuar con los residuos de N-glicanos más complejos que presentan las proteínas maduras después de haber sido modificadas en el Golgi. Se usa para monitorizar la llegada al Golgi de las glicoproteínas de la siguiente manera: células HeLa que expresan constitutivamente la forma termosensible GFP-VSV-Gts045 se incubaron 24h a 40 °C y se transfirieron a 32 °C para permitir la salida de la proteína del RE al Golgi. A distintos tiempos se lisaron las células con 0.5% de SDS y se desnaturalizaron a 100 °C durante 10 min. 20 µg de proteína se trataron con otro tampón desnaturizante que contenía DTT y se volvió a hervir a 100 °C durante 10 min. Después se incubó la muestra con la enzima endo-H a 37 °C durante 1 h, se añadió tampón de carga 5x con 10% de β-mercaptoetanol y se procesaron para *western blotting* tal y como se ha descrito anteriormente.

## 5.3. Ensayo de transporte con la toxina de *Shigella*

En los experimentos de transporte de la STx se utilizó el fragmento B de la toxina que contiene la secuencia KDEL (STx-B-KDEL-Cy3), secuencia que permite su retención en el RE cuando llegue a este compartimento, permitiendo así su visualización durante el transporte. Las células RPE1 se lavaron con PBS y se incubaron con DMEM/F-12 sin FBS durante 30 min a 37 °C. A continuación se añadió la toxina al medio y se incubó durante 1 h a 4 °C, permitiendo su unión al receptor de membrana globotriaosilceramida 3 (Gb3). Tras este tiempo, las células se lavaron con DMEM/F-12 conteniendo FBS para eliminar el exceso de STx-B-KDEL-Cy3 que no se ha unido a la MP. Después, las células pasaron a 37 °C para inducir su transporte al Golgi para

alcanzar finalmente el RE. Las células se fijaron a distintos tiempos de transporte con PFA al 4% y se procesaron para inmunofluorescencia.

#### 5.4. Ensayo de secreción de proteínas solubles marcadas con [ $S^{35}$ ]

Para los experimentos de secreción se siguió el protocolo establecido en Cheong y col., 2003. Las células RPE1 silenciadas con un siRNA control, con un siRNA contra la  $\beta$ III espectrina o tratadas con BFA (como control positivo) se incubaron con DMEM/F-12 sin metionina (Met) ni cisteína (Cys) durante 30 min y posteriormente se marcaron radioactivamente con 20  $\mu$ Ci del mix [ $S^{35}$ ]-Met/Cys (PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU) por pocillo de una placa de 6 pocillos. Luego, las células se lavaron con DMEM/F-12 completo frío para eliminar el exceso de radioactividad y se incubaron a 18 °C durante 3 h para acumular las proteínas sintetizadas *de novo* que estarán marcadas con [ $S^{35}$ ]. Después, las células se lavaron con PBS-5% BSA y se pasaron a 37 °C. Para determinar la cinética de secreción, el sobrenadante de las células se recogió a diferentes tiempos de incubación y se precipitaron las proteínas marcadas con [ $S^{35}$ ] con ácido tricloroacético (TCA, del inglés *trichloroacetic acid*) al 20%. A continuación se lavaron con acetona fría y se cuantificaron con un contador de centelleo. Para determinar la incorporación total de [ $S^{35}$ ]-Met/Cys en las proteínas celulares, las células se lisaron con 0.1 N NaOH en 0.1% de SDS, se trataron con TCA y se procesaron como se ha descrito anteriormente. Como control adicional, un pocillo de células permaneció en hielo hasta la recogida de los sobrenadantes.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y se analizaron mediante *one-way* o *two-way* ANOVA seguida por las múltiples de Bonferroni, o con la prueba *t* de Student de dos colas usando el programa Graphpad Prism 3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, EEUU). Una  $p \leq 0.05$  fue considerada significativa.



## **RESULTADOS**

---





## **I. GENERACIÓN DE NUEVAS HERRAMIENTAS MOLECULARES FRENTE A LA $\beta$ III ESPECTRINA Y LA ANQUIRINA G119 Y SU LOCALIZACIÓN EN ENDOMEMBRANAS**

### **Antecedentes y Objetivo**

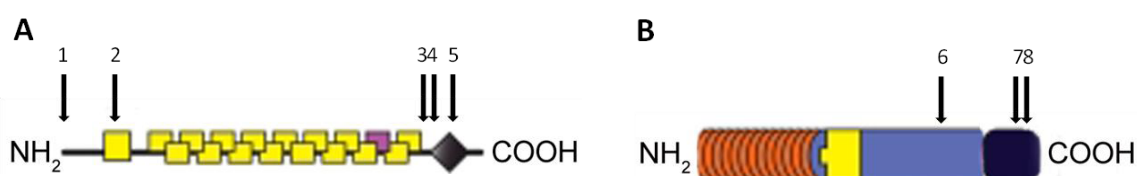
La prueba más evidente de la asociación estructural del Golgi con el citoesqueleto proviene de tratar las células con agentes anti-MTs (Dinter y Berger, 1998) que fragmentan la red del Golgi y ésta se dispersa por el citoplasma, formando los llamados *mini-stacks*. Estos elementos son competentes en cuanto al transporte pero menos eficientes, lo que indica que no existe una relación directa entre la organización estructural y la funcional del Golgi. Lo mismo revelan los resultados con agentes anti-actina que compactan el Golgi y dilatan/fragmentan las cisternas pero no bloquean la función transportadora (Di Campli y col., 1999; Hirschberg y col., 1998; Lázaro-Diéguez y col., 2007). Entonces, ¿por qué las cisternas del Golgi se mantienen planas en la zona central y se dilatan en los extremos? Se postula que un grupo de proteínas, llamadas golginas, interaccionan entre ellas para mantener a las cisternas unidas (Short y col., 2005) aunque el silenciamiento de algunas no causa alteraciones significativas. Hay que tener presente el citoesqueleto de espectrina. Se ha descrito en el Golgi una isoforma de la espectrina ( $\beta$ III espectrina) y dos de la anquirina (anquirina G119 y anquirina de 195 kDa) (Holleran y col., 2001). Se ha especulado sobre su localización (*cis-* y *trans-*, respectivamente) y se las ha implicado en el transporte desde el RE al Golgi (Devarajan y col., 1996; De Matteis y Morrow, 2000) pero estos resultados son controvertidos ya que algunos de ellos no se han podido reproducir en otros laboratorios y los anticuerpos o no funcionan o su especificidad es dudosa. Consecuentemente, desconocemos todavía su precisa localización y relevancia funcional en el Golgi. Así pues, nos centramos en determinar la localización de la  $\beta$ III espectrina y la anquirina G119 dentro del Golgi (polaridad *cis-/trans-* y zona central/periférica) y en averiguar cómo participan en el mantenimiento de la organización del Golgi. Para ello necesitamos nuevas y específicas herramientas moleculares de trabajo.

### **1. GENERACIÓN DE NUEVOS ANTICUERPOS CONTRA LA $\beta$ III ESPECTRINA Y LA ANQUIRINA G119 HUMANAS**

Para estudiar la localización exacta de la  $\beta$ III espectrina y de la anquirina G119 dentro del Golgi nos planteamos obtener anticuerpos específicos contra ambas proteínas, puesto que los

anticuerpos comerciales y no comerciales disponibles no dieron los resultados previamente descritos en la literatura.

Para generar nuevos anticuerpos policlonales, seleccionamos y sintetizamos varios péptidos localizados en distintas regiones de la  $\beta$ III espectrina y la anquirina G119 (Figura 17. Ver apartado 2 de materiales y métodos para las secuencias peptídicas y la correspondiente nomenclatura establecida). Tanto los sueros obtenidos como los anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad fueron testados para ver la capacidad que tenían para teñir el Golgi por IF y/o para reconocer una banda por WB alrededor del peso molecular esperado (270 kDa para la  $\beta$ III espectrina y 119 kDa para la anquirina G119).

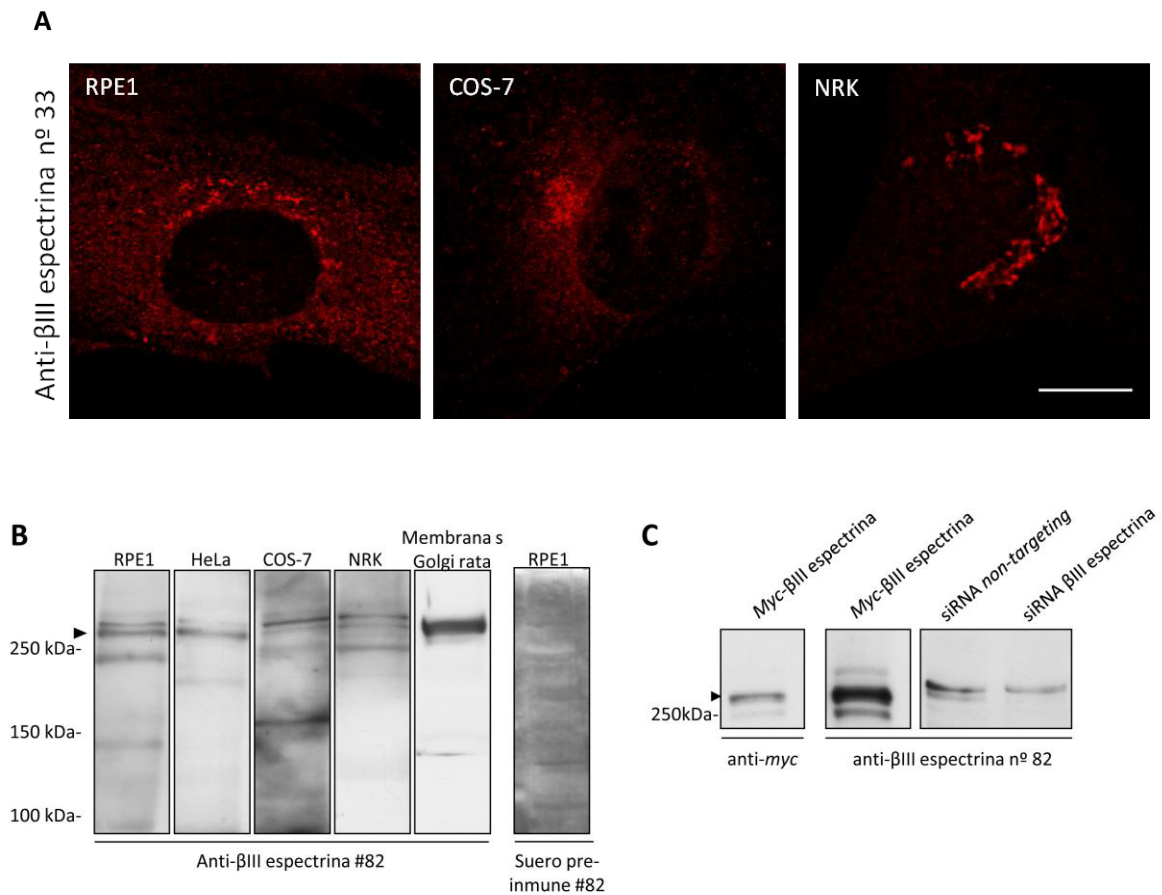


**Figura 17. Representación esquemática de la  $\beta$ III espectrina y la anquirina G119 humanas y las secuencias peptídicas exclusivas.** (A) La  $\beta$ III espectrina y las regiones elegidas para sintetizar los péptidos (flechas). El péptido 1 se encuentra en el dominio de unión a actina; el péptido 2 está en la primera repetición de espectrina; los péptidos 3 y 4 están en regiones inespecíficas y el péptido 5 se encuentra en el dominio PH. (B) La anquirina G119 y las regiones elegidas para sintetizar los péptidos (flechas). El péptido 6 está en el dominio de unión a espectrina, y los péptidos 7 y 8 se encuentran en el dominio regulador (modificado de Bennett y Healy, 2007 y 2009).

En el caso de la  $\beta$ III espectrina, sólo el anticuerpo nº 33, generado contra el péptido 5, marcaba un compartimento peri- o yuxtannuclear en una variedad de líneas celulares que correspondía al Golgi (Figura 18 A). Por WB, el anticuerpo nº 82 ,generado contra el péptido 1, reconocía un doblete por encima de los 250 kDa en lisados procedentes de distintos tipos celulares y de fracciones enriquecidas en membranas de Golgi de hígado de rata (Figura 18 B). Sin embargo, después de silenciar la expresión de la  $\beta$ III espectrina con siRNAs vimos que, tanto la intensidad del marcaje perinuclear observado por IF como una de las bandas del doblete disminuían (Figura 18 C). Además, este anticuerpo reconocía a la  $\beta$ III espectrina unida a una cola *myc* cuando se sobreexpresaba en células RPE1. Estos resultados nos confirmaron la especificidad de nuestros anticuerpos contra la  $\beta$ III espectrina. El resto de anticuerpos eran poco eficientes. Por todo ello, escogimos los anticuerpos nº 33 y nº 82 para realizar los experimentos de IF y WB, respectivamente.

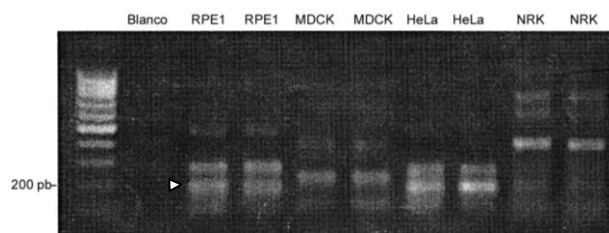
Por otra parte, para estar seguros de que las células con las que íbamos a trabajar expresaban  $\beta$ III espectrina, diseñamos cebadores específicos contra la proteína y realizamos PCRs cuantitativas a partir de lisados de células RPE1, HeLa, MDCK y NRK (ver apartado 4.7 de

materiales y métodos para las secuencias de los cebadores). Comprobamos que los tipos celulares humanos contienen  $\beta$ III espectrina (Figura 19). En las células NRK también aparece una banda pero mucho más tenue.



**Figura 18. Caracterización de los anticuerpos contra péptidos exclusivos de la  $\beta$ III espectrina humana.** (A) IF de células RPE1, COS-7 y NRK con el anticuerpo nº 33 contra la  $\beta$ III espectrina. Escala Bar, 10  $\mu$ m. (B) WB de lisados de varios tipos celulares y fracciones enriquecidas en membranas de Golgi de hígado de rata, con el suero pre-inmune y la fracción purificada por afinidad del anticuerpo nº 82 contra la  $\beta$ III espectrina. La punta de flecha indica la banda correspondiente a la  $\beta$ III espectrina. (C) WB de lisados de células RPE1 que expresaban la  $\beta$ III espectrina unida a una cola myc con anticuerpos contra myc y contra la  $\beta$ III espectrina (nº 82). También se muestra el patrón de bandas de un lisado de células RPE1 control o silenciadas contra la  $\beta$ III espectrina para corroborar que la banda reconocida por el anticuerpo anti-myc es la banda del doblete que desaparece después del silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina.

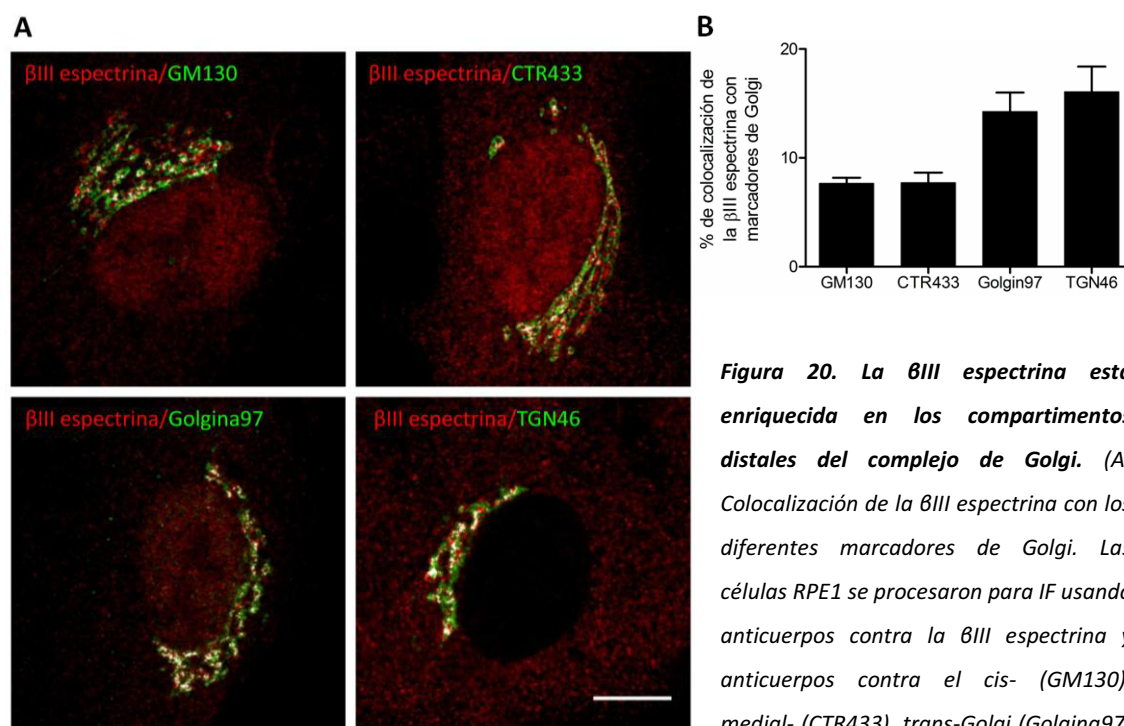
En el caso de la **anquirina G119**, ninguno de los anticuerpos purificados por afinidad reconocía a la proteína ni por IF ni por WB (Figura suplementaria 1). Además, tampoco pudimos elucidar si nuestras células expresaban la proteína puesto que las PCRs no amplificaron ningún fragmento con el tamaño esperado (Figura suplementaria 2). **Por estos motivos decidimos centrar todo el estudio en la  $\beta$ III espectrina.**



**Figura 19.** Las células RPE1 y HeLa expresan la  $\beta$ III espectrina humana. PCR para amplificar el ADNc que codifica para la  $\beta$ III espectrina humana. La punta de flecha indica el fragmento amplificado con un tamaño de 192 pb.

## 2. PARTICIPACIÓN DE LA $\beta$ III ESPECTRINA EN EL MANTENIMIENTO DE LA ARQUITECTURA DEL COMPLEJO DE GOLGI

Una vez caracterizados los anticuerpos y estar seguros de su especificidad, estudiamos la distribución subcelular de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi de células RPE1. Mediante microscopía confocal realizamos estudios de colocalización con marcadores de los compartimentos proximales (GM130 y CTR433) y distales (Golgina97 y TGN46) del Golgi (Figura 20). En todas las células el marcaje de  $\beta$ III espectrina se solapaba con todos los marcadores de Golgi (Figura 20 A) pero colocalizaba más con los marcadores de *trans*-Golgi y del TGN (Figura 20 B). A parte del marcaje de Golgi, también observamos un marcaje basal citoplasmático y nuclear de intensidad variable dependiendo de la célula que se examinaba.



**Figura 20.** La  $\beta$ III espectrina está enriquecida en los compartimentos distales del complejo de Golgi. (A) Colocalización de la  $\beta$ III espectrina con los diferentes marcadores de Golgi. Las células RPE1 se procesaron para IF usando anticuerpos contra la  $\beta$ III espectrina y anticuerpos contra el cis- (GM130), medial- (CTR433), *trans*-Golgi (Golgina97)

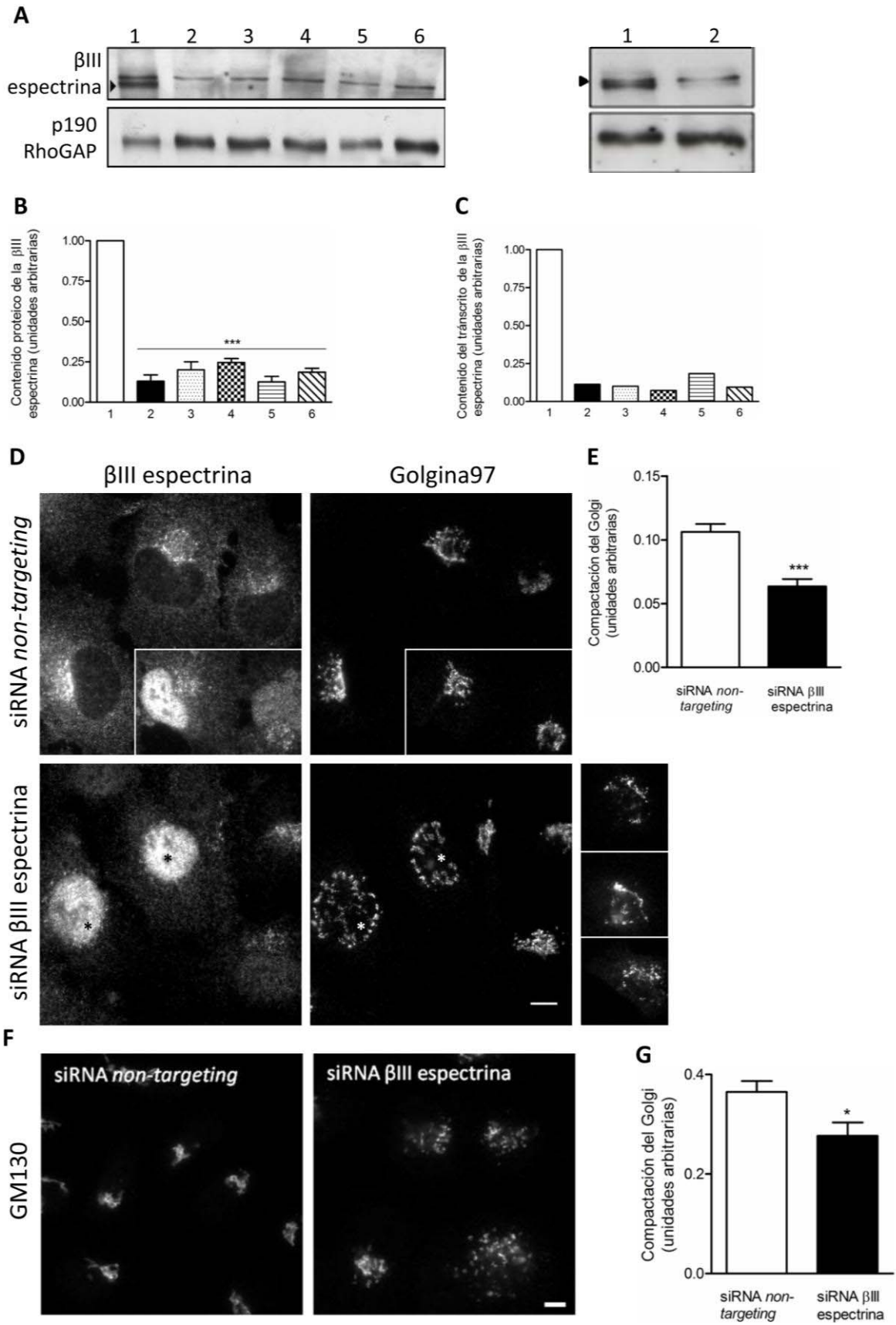
o contra el TGN (TGN46). Las imágenes solapadas muestran la colocalización de la  $\beta$ III espectrina con los respectivos marcadores Golgi (píxeles en blanco). Escala Bar, 10  $\mu$ m. (B) Análisis cuantitativo de las imágenes mostradas en el panel (A) en el que cada columna representa el número de píxeles rojos ( $\beta$ III espectrina) que se superponen con los píxeles verdes (marcador de Golgi) respecto al total de píxeles rojos.

Estos resultados indican que, si bien la  $\beta$ III espectrina se encuentra a lo largo de todo el *stack* del Golgi, está más enriquecida en los compartimentos distales.

Estudios previos han mostrado que la espectrina parece tener un papel estructural en el Golgi (Beck y col., 1994). Sin embargo, hay pocas evidencias de la que la  $\beta$ III espectrina interviene en el mantenimiento de la morfología en forma de cinta tan característica del Golgi (Siddhanta y col., 2003). Con la finalidad de caracterizar el papel de la  $\beta$ III espectrina en la estructura del Golgi, analizamos si el silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina afectaba a su morfología. Para disminuir la expresión de la  $\beta$ III espectrina utilizamos el sistema de silenciamiento mediado por siRNAs (ver apartado 4.5 de materiales y métodos para las secuencias de los siRNAs). Analizamos por WB la expresión de la  $\beta$ III espectrina en los lisados de células RPE1 transfectadas con los diferentes

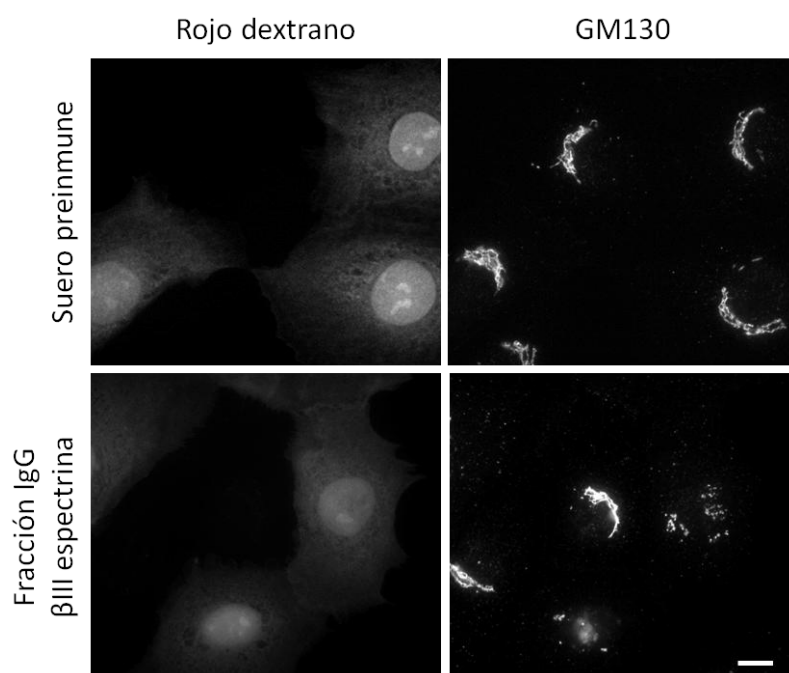
siRNAs solos (siRNA 9-12) o combinados. Observamos una reducción de los niveles de expresión de la  $\beta$ III espectrina después de 96 h de silenciamiento (Figura 21 A) siendo el efecto mayor cuando se combinaron los cuatro siRNA (alrededor del 85%; Figura 21 A y B). Por tanto, decidimos realizar los experimentos de silenciamiento utilizando la combinación de los cuatro siRNA. Como control, utilizamos una combinación de cuatro siRNA que no codificaban para ninguna proteína (siRNA *non-targeting*). Para comprobar que la disminución de los niveles proteicos de la  $\beta$ III espectrina era debida a una disminución del ARNm, realizamos PCRs cuantitativas en tiempo real y observamos una disminución del ARNm del 90% en las células silenciadas con los siRNAs de la  $\beta$ III espectrina (Figura 21 C). Como era de esperar, a nivel de IF observamos que las células silenciadas no presentaban marcaje para la  $\beta$ III espectrina, aunque tanto el marcaje citoplasmático como el nuclear persistían (Figura 21 D). En estas células, el Golgi estaba fragmentado en grado diverso pero manteniendo siempre su localización perinuclear (Figura 21 D). Cuantificamos este fenotipo usando el índice de compactación del Golgi que consiste en medir el área y el perímetro de cada Golgi (Bard y col., 2003). Observamos que las células silenciadas tenían un Golgi menos compactado (es decir, más fragmentado) que las células control (Figura 21 E). La fragmentación del Golgi en ausencia de la  $\beta$ III espectrina también se reprodujo en células HeLa (Figura 21 F, G).

Otro abordaje experimental que utilizamos para determinar qué papel tiene la  $\beta$ III espectrina en la estructura del Golgi fue microinyectar los anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina. Microinyectamos la fracción IgG del anticuerpo nº 33 en el citoplasma de células NRK conjuntamente con rojo dextrano para poder identificar aquellas células microinyectadas. También observamos una fragmentación del Golgi 5 h después de la microinyección. Como control, microinyectamos la fracción IgG del suero preinmune nº 33. En estas condiciones, el



**Figura 21. El silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina fragmenta el complejo de Golgi.** (A) Silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina en células RPE1 (izquierda) y células HeLa (derecha). Lisados totales de RPE1 y HeLa transfectadas durante 96 h con siRNAs control (carril 1) o con siRNAs contra la  $\beta$ III espectrina (mezcla de cuatro, carril 2; los cuatro por separado, carriles 3-6) se procesaron para WB utilizando anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina y anti-RhoGAP p190 como control de carga. La punta de flecha indica la banda correspondiente a la  $\beta$ III espectrina que es la que disminuye después del silenciamiento. (B) Cuantificación del resultado de las células RPE1 mostrado en el panel (A), en el cual las columnas representan la ratio obtenida de las respectivas densitometrías de la  $\beta$ III espectrina y la p190 RhoGAP de cada condición experimental. Los valores son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significación estadística,  $p \leq 0.001$  (\*\*\*). (C) Cuantificación del resultado de las células RPE1 mostrado en el panel (A), en el cual las columnas representan la ratio obtenida de los valores obtenidos de la  $\beta$ III espectrina y GAPDH (utilizado como control). (D) Las células RPE1 control y las silenciadas con los siRNAs contra la  $\beta$ III espectrina se fijaron a las 96 h después de la transfección. Posteriormente se procesaron para IF usando anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina y anti-Golgina97. El asterisco muestra las células que no presentan marcaje de  $\beta$ III espectrina. Los insertos muestran diferentes fenotipos de fragmentación del Golgi en ausencia de  $\beta$ III espectrina. Escala Bar, 10  $\mu$ m. (E) Análisis cuantitativo de la fragmentación del Golgi de células RPE1 silenciadas y células control mostradas en el panel (D) midiendo el índice de compactación del Golgi. Los valores son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significación estadística,  $p \leq 0.001$  (\*\*\*). (F) Células HeLa tratadas como en el panel (D). Posteriormente se fijaron y procesaron para IF usando el marcador de Golgi GM130. Escala Bar, 10  $\mu$ m. (G) Análisis cuantitativo de la fragmentación del Golgi de células HeLa silenciadas y células control mostradas en el panel (F) midiendo el índice de compactación del Golgi. Los valores son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significación estadística,  $p \leq 0.05$  (\*).

Golgi permanecía inalterado y no se distinguía del Golgi de las células vecinas no microinyectadas (Figura 22).

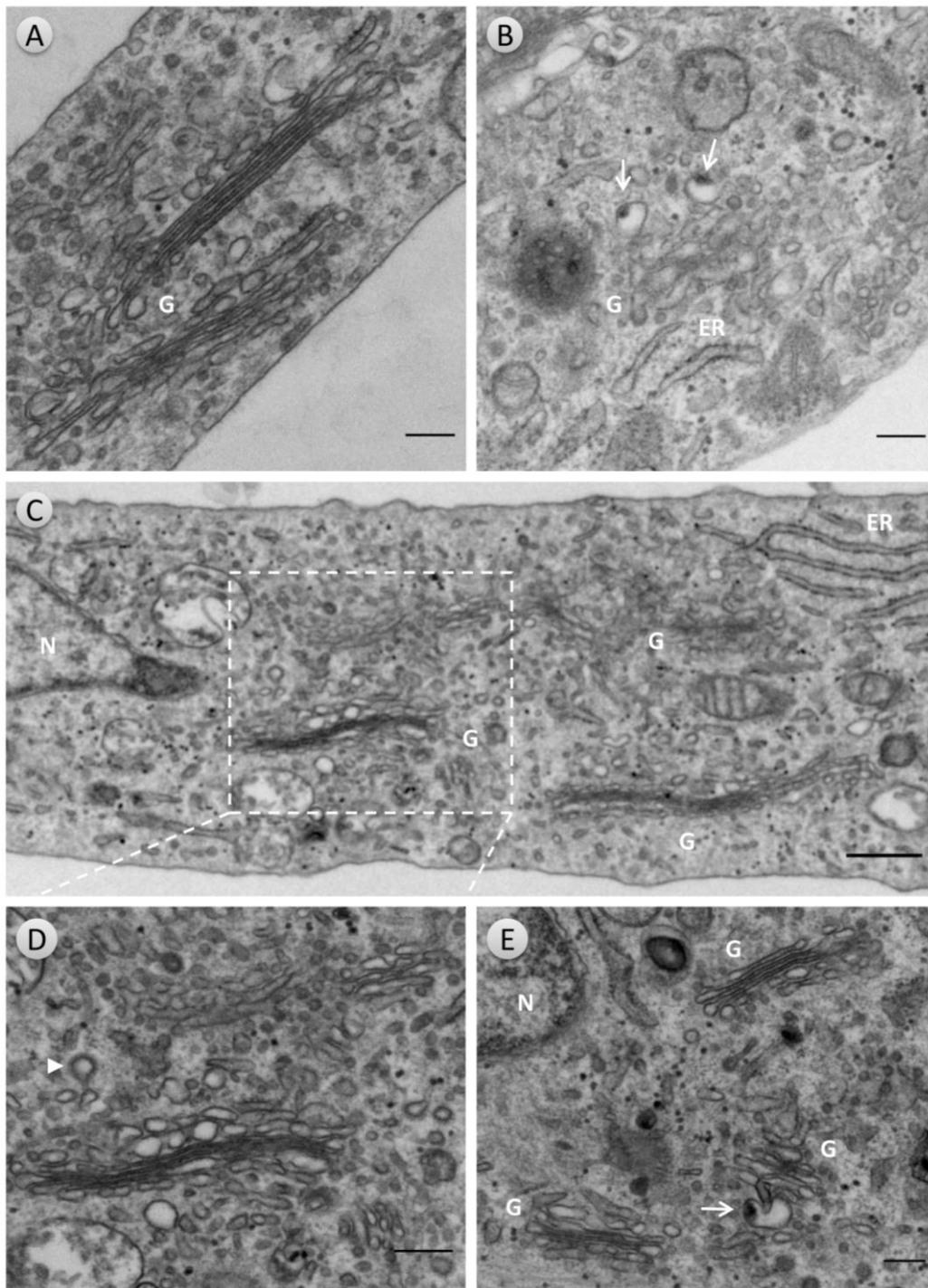


**Figura 22. La microinyección de anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina causa una fragmentación del complejo de Golgi.** Células NRK fueron co-microinyectadas con rojo dextrano (para detectar las células positivas) junto con la fracción IgG del suero pre-inmune o post-inmune n<sup>o</sup> 33. Después de 5 h, las células se fijaron y se procesaron para IF usando anticuerpos anti-GM130 para visualizar el Golgi. Escala Bar, 10  $\mu$ m.



Todos estos resultados demuestran que la  $\beta$ III espectrina es necesaria para mantener la organización estructural del Golgi en forma de cinta o *ribbon*.

Hemos observado que tanto el silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina como la microinyección de anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina alteran la morfología del Golgi a nivel de microscopía de epifluorescencia. El siguiente paso fue examinar su efecto a nivel ultraestructural. En las células control, el Golgi aparecía como una estructura altamente organizada, compuesta por cuatro, cinco o seis cisternas aplanadas y apiladas formando el característico *stack* o dictiosoma, con pocos perfiles túbulo-vesiculares cerca de las cisternas (Figura 23 A). Por el contrario, las células silenciadas mostraron una estructura del Golgi desorganizada, con las cisternas dilatadas en grado variable, especialmente en la parte distal y un incremento de perfiles vesiculares muy próximos a las cisternas más distales (Figura 23 B-D), aunque éstas parecían mantener el apilamiento aparentemente normal. También apreciamos una dispersión de los dictiosomas en concordancia con lo observado por microscopía de epifluorescencia. Tenemos que destacar que en la mayoría de las dilataciones de la zona distal del Golgi aparecieron estructuras de tipo vacuolar con una masa electrodensa en su interior (Figura 23 B y E) adyacentes a las cisternas del Golgi.



**Figura 23.** La depleción de la  $\beta$ III espectrina induce la desorganización estructural del complejo de Golgi, una fragmentación y dilatación variable de las cisternas y un incremento de perfiles vesiculares en los compartimentos trans-Golgi. Las células RPE1 control (A) y silenciadas para la  $\beta$ III espectrina (B-E) se fijaron y procesaron para MET. (C) Imagen panorámica de una célula RPE1 silenciada para la  $\beta$ III espectrina. (D) Inserto del panel (C). El silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina desorganiza la estructura del Golgi, fragmentándola y dilatando en grado variable las cisternas, especialmente las más distales. La punta de flecha indica vesículas de clatrina. Aumenta también el número de perfiles vesiculares alrededor de las cisternas. (E) En la zona distal del dictiosoma aparecen estructuras vacuolares con un cuerpo electrodenso en su interior (flechas). N, núcleo; G, complejo de Golgi; ER, retículo endoplasmático. Escala Bar, 200 nm.

## II. IMPLICACIONES DE LA $\beta$ III ESPECTRINA EN EL TRÁFICO DE MEMBRANAS DE LA VÍA SECRETORA

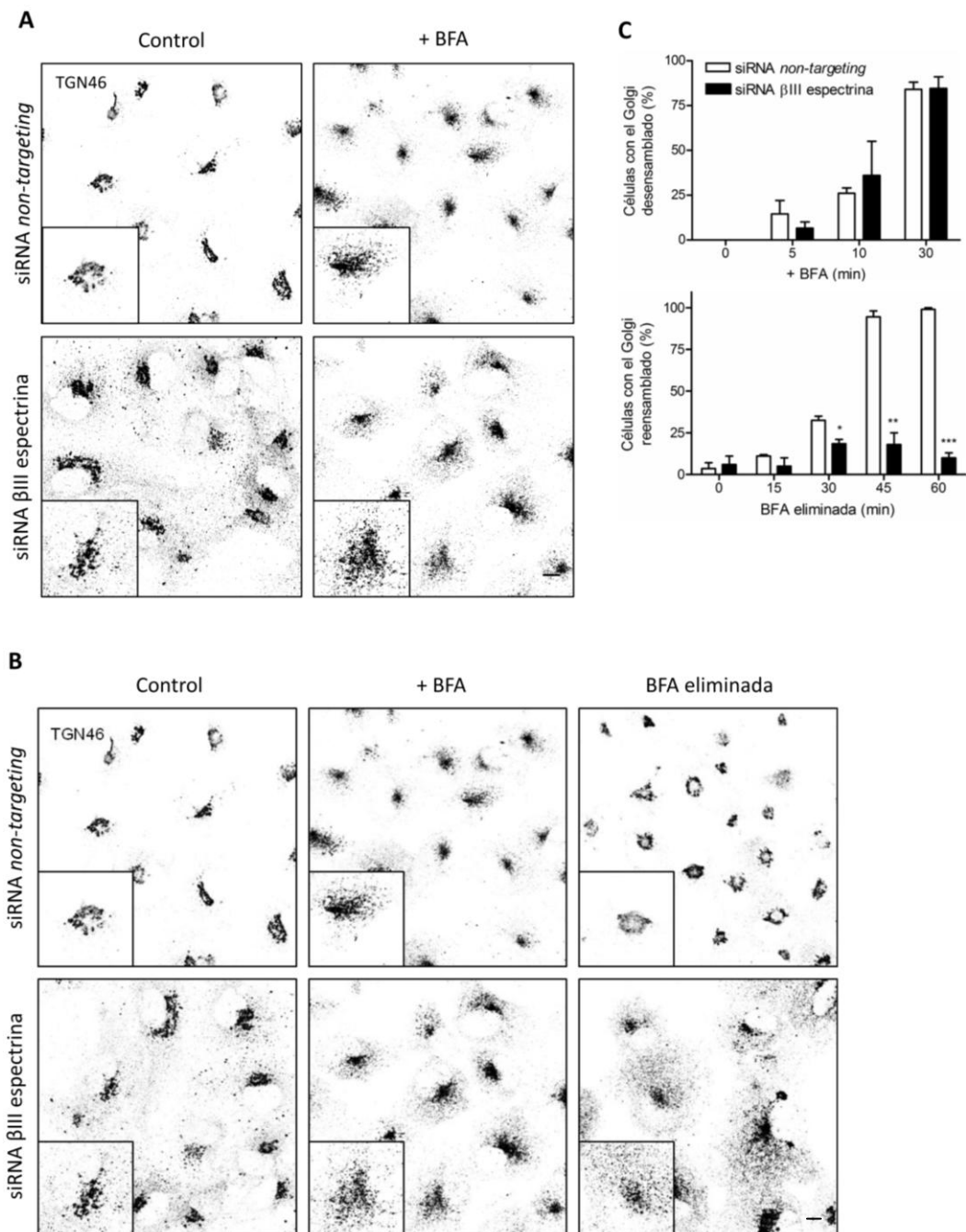
### Antecedentes y Objetivo

Varios estudios relacionan a la  $\beta$ III espectrina con el transporte de proteínas. Por un lado, se ha observado que la sobreexpresión del dominio de unión a membrana del extremo amino de la  $\beta$ I $\Sigma$ \* espectrina altera el transporte de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> hacia la MP (Devarajan y col., 1997). Por otra parte, se ha demostrado que determinadas mutaciones en la  $\beta$ III espectrina afectan al transporte post-Golgi del transportador de glutamato EAAT4 y otras proteínas sinápticas (Ikeda y col., 2006; Clarkson y col., 2010; Perkins y col., 2010; Stankewich y col., 2010; Lorenzo y col., 2010). A pesar de todas estas evidencias, la funcionalidad de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi no está bien establecida. Con ayuda de los nuevos anticuerpos generados contra la  $\beta$ III espectrina humana y de las técnicas de ARN de interferencia, pretendemos clarificar el papel que tiene la  $\beta$ III espectrina en las distintas vías de transporte secretor en la zona RE/Golgi y post-Golgi empleando ensayos de transporte específicos.

### 1. PAPEL DE LA $\beta$ III ESPECTRINA EN EL TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS EN LA ZONA DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y EL COMPLEJO DE GOLGI

Para estudiar el papel de la  $\beta$ III espectrina en el transporte de proteínas en la zona del RE/Golgi, examinamos el efecto del silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina y la consecuente disrupción de la estructura del Golgi sobre el flujo de membrana anterógrado (de RE a Golgi) y retrógrado (de Golgi a RE). Para ello, tratamos células RPE1 silenciadas con siRNAs control o siRNAs contra la  $\beta$ III espectrina con BFA (ver apartado 5.1 de materiales y métodos el mecanismo de acción de la BFA). En las células tratadas con BFA, las proteínas residentes del Golgi que se encuentran en la zona perinuclear se redistribuyeron al RE, adquiriendo el característico patrón reticular propio del RE al mismo tiempo que las células control (Figura 24 A). Tal y como se había descrito anteriormente, la  $\beta$ III espectrina también se redistribuyó rápidamente del Golgi al citoplasma. Sin embargo, cuando se eliminó la BFA del medio para estudiar el flujo de membrana anterógrado observamos un bloqueo de la reconstitución del Golgi de las células silenciadas empleando tanto marcadores del *stack* como del TGN (Figura 24 B). La cuantificación muestra que no hay cambios significativos en la cinética de desensamblaje del Golgi (flujo retrógrado) de las células silenciadas respecto a las control (Figura 24 C). Sin embargo, la cinética de reensamblaje del Golgi (flujo anterógrado) estaba

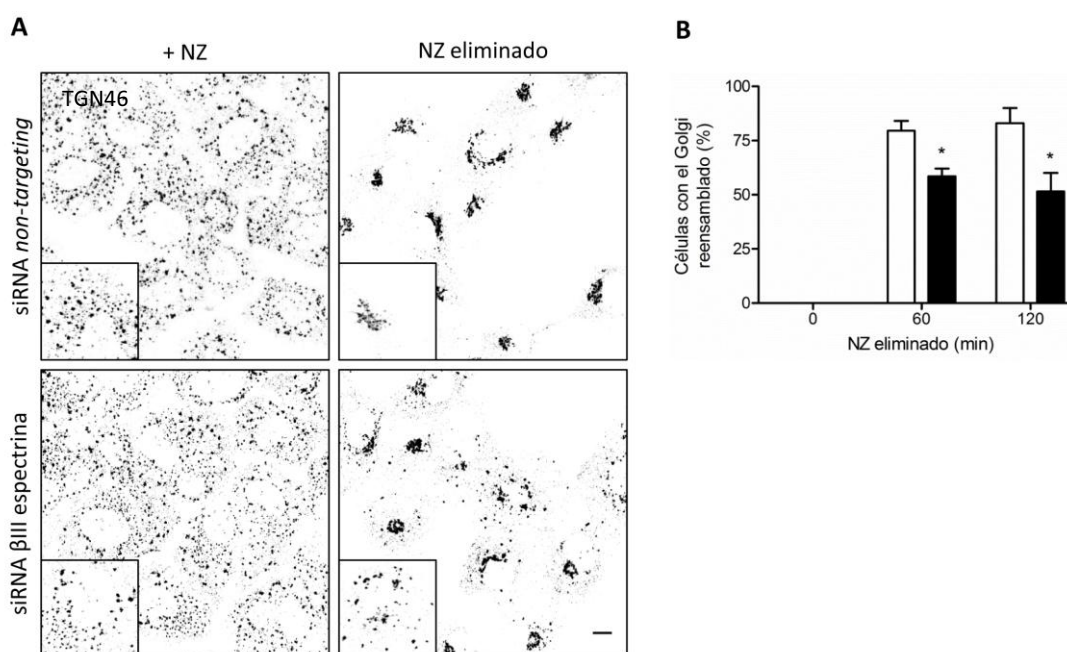
inhibida ya que 60 min después de eliminar la BFA, un 90% de las células silenciadas todavía permanecían con el Golgi desensamblado (Figura 24 C).



**Figura 24. El silenciamiento de  $\beta$ III espectrina bloquea el reensamblaje pero no el desensamblaje del complejo de Golgi al emplear la brefeldina A.** (A) Las células RPE1 silenciadas con siRNAs control o contra la  $\beta$ III espectrina se trataron con BFA (2.5  $\mu$ g/ml; 0, 5, 10 y 30 min), se fijaron y se procesaron para IF usando anticuerpos anti-TGN46 para visualizar el Golgi (ver insertos del panel). (B) Las células RPE1 silenciadas se trataron con BFA (2.5  $\mu$ g/ml; 90 min), se lavaron para eliminar la BFA del medio y se fijaron a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45 y 60 min) para ser procesadas como en (A). Escala Bar, 10  $\mu$ m. (C) Análisis cuantitativo de los resultados mostrados en (A) y (B). Los valores son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significación estadística,  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*) y  $p \leq 0.001$  (\*\*\*).

También estudiamos la dinámica del desensamblaje y reensamblaje del Golgi tratando las células con NZ, una droga que despolimeriza los MTs (ver apartado 5.1 de materiales y métodos el mecanismo de acción del NZ). No detectamos ninguna diferencia en la cinética del desensamblaje del Golgi entre las células silenciadas y las control puesto que al cabo de 1 h se formaban las estructuras de Golgi mini-stacks. Sin embargo, al eliminar el NZ del medio, el Golgi del 50% de las células silenciadas permanecía todavía altamente fragmentado mientras que el de las células control se reformó correctamente (Figura 25). Estos resultados se reprodujeron empleando otros marcadores de Golgi (GM130 y Golgina97).

Estos resultados muestran que la  $\beta$ III espectrina participa en el flujo de membrana anterógrado (de RE al Golgi) pero no en el retrógrado (de Golgi al RE) en la zona RE/Golgi.



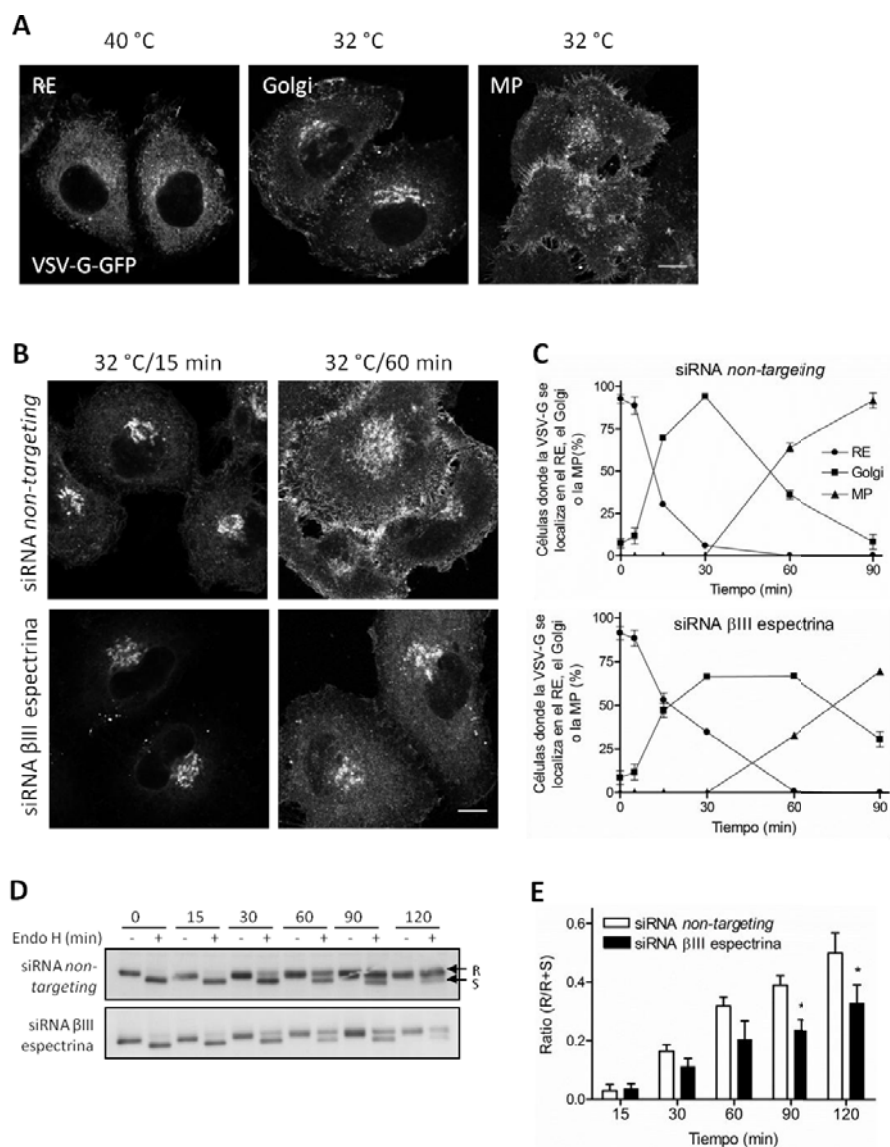
**Figura 25. El silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina bloquea el reensamblaje pero no el desensamblaje del complejo de Golgi al emplear nocodazole.** (A) Las células RPE1 silenciadas con siRNAs control o contra la  $\beta$ III espectrina se trataron con NZ (10  $\mu$ g/ml; 3 h). Posteriormente se lavaron para eliminar el NZ del medio y se fijaron a diferentes tiempos (0, 1 y 2 h) para ser procesadas para IF utilizando anticuerpos anti-TGN46. Escala Bar, 10  $\mu$ m. (B) Análisis cuantitativo del resultado mostrado en el panel (A). Los valores representados son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significación estadística,  $p \leq 0.05$  (\*).

## 2. PAPEL DE LA $\beta$ III ESPECTRINA EN EL TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS HASTA LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Para estudiar más en detalle estas alteraciones observadas con los ensayos de flujo de membrana del Golgi examinamos el transporte anterógrado de *cargo*. Para ello, usamos la

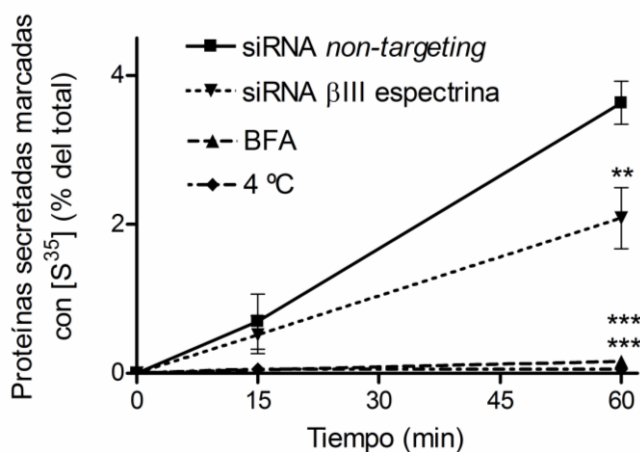
glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular o VSV-G. Existe una variante termosensible del virus (ts045-VSV) que permite sincronizar el transporte del VSV-G a lo largo de la vía secretora. Así pues, cuando las células se mantienen a la temperatura no permisiva (40 °C), el VSV-G se retiene en el RE puesto que no adquiere una correcta conformación. Una vez que el VSV-G se ha acumulado en el RE, las células se incuban a 32 °C (que es la temperatura permisiva) y tiene lugar el transporte sincronizado del VSV-G hacia la MP pasando previamente por el Golgi. Para este tipo de ensayos, usamos las células HeLa que expresaban de forma constitutiva el VSV-G unido a GFP. Así pues, silenciamos las células HeLa-VSV-G-GFP con siRNAs control o siRNAs contra la  $\beta$ III espectrina durante 96 h y las incubamos a 40 °C la noche anterior de hacer el experimento. Al día siguiente, hicimos el cambio de temperatura y examinamos la cinética del transporte de la glicoproteína desde el RE hasta la MP (Figura 26 A). En las células control, el transporte del VSV-G desde el RE al Golgi tenía lugar a los 15 min. Esta llegada se detectaba porque la proteína adquiría un patrón de distribución perinuclear en lugar de tener el típico patrón reticular del RE. Posteriormente, el VSV-G seguía su camino hasta la MP, alcanzándola a los 60 min del cambio de temperatura (Figura 26 B y C). En el caso de las células silenciadas, el transporte del VSV-G del RE al Golgi se producía más lentamente, de manera que a los 15 min del cambio de temperatura, sólo el 50% de las células presentaban el VSV-G en el Golgi frente al 75% de las células control. La cinética de transporte hasta llegar a la MP también se enlentecía respecto a la de las células control, de manera que a los 60 min a 32 °C, el 25% de estas células aún tenían la glicoproteína en el Golgi frente el 75% de ellas en las que el VSV-G se localizaba en la MP (Figura 26 B y C).

Para complementar estas observaciones morfológicas, también analizamos la cinética de adquisición de resistencia a la enzima endoglicosidasa H (endo H), que es indicativa del transporte desde el RE hasta el compartimento medial del Golgi. Esta enzima corta los residuos glucídicos ricos en manosa que tienen las proteínas cuando salen del RE pero no puede procesar los residuos de N-glicanos más complejos que presentan las moléculas maduras después de haber sido modificadas en el Golgi. En las células HeLa-VSV-G-GFP control vimos que la banda resistente a la endo H aparecía claramente a los 30 min y aumentaba hasta las 2 h. En las células que no expresaban  $\beta$ III espectrina, la banda resistente también aparecía a los 30 min del cambio de temperatura pero no aumentaba a partir de este tiempo (Figura 26 D y E), sugiriendo que la llegada del VSV-G al Golgi era más lenta en ausencia de la  $\beta$ III espectrina.



**Figura 26. El silenciamiento de la βIII espectrina bloquea el transporte anterógrado del VSV-G** (A) Imágenes representativas de células HeLa que expresan constitutivamente el VSV-G-GFP, en las cuales la glicoproteína se localiza en el RE, el Golgi o la MP. Escala Bar, 10 μm. (B) Imágenes de las células HeLa-VSV-G-GFP tratadas con siRNAs control o contra la βIII espectrina durante 96 h e incubadas a 40 °C durante las últimas 16 h. Posteriormente, las células se incubaron a 32 °C y se fijaron a distintos tiempos (0, 15, 30, 60 y 90 min). Escala Bar, 10 μm. (C) Cuantificación de la cinética del transporte del VSV-G-GFP de células HeLa silenciadas. Las gráficas muestran el % de células que presentan el VSV-G-GFP en el RE, el Golgi o la MP. Observamos que las células silenciadas tienen un retraso en la llegada del VSV-G-GFP al Golgi y a la MP. Los valores son la media ± SEM de tres experimentos independientes. (D) Ensayo bioquímico del transporte del VSV-G-GFP utilizando la endo H. Las células HeLa-VSV-G-GFP se silenciaron con los siRNAs control o contra la βIII espectrina durante 96 h y se incubaron a 40 °C las últimas 24 h. Después, las células se pasaron a 32 °C para inducir el transporte del VSV-G desde el RE, se lisaron a distintos tiempos (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min) y se trataron con la enzima endo H. Posteriormente las muestras se procesaron para WB con anticuerpos anti-GFP. Las flechas indican la proteína resistente (R) y la sensible (S) a la endo H. (E) Cuantificación del resultado mostrado en el panel (D), en el cual las columnas representan la ratio obtenida de la proteína resistente a la endo H respecto la proteína total (proteína resistente + proteína sensible). Los valores representan la media ± SEM de tres experimentos independientes. La significación estadística,  $p \leq 0.05$  (\*).

Por otro lado, nos preguntamos si las alteraciones observadas en el transporte de proteínas transmembrana cuando la  $\beta$ III espectrina estaba deplecionada también se producían en el transporte de proteínas solubles. Para ello, analizamos la cinética de secreción post-Golgi de las proteínas solubles marcadas con aa (Met/Cys) marcados con azufre radioactivo [ $S^{35}$ ]. Silenciamos las células RPE1 como hemos descrito anteriormente. Como controles positivos tratamos las células RPE1 con BFA o las incubamos a 4 °C. Una vez incubamos las células con [ $S^{35}$ ], las mantuvimos durante 3 h a 19 °C para acumular las proteínas de nueva síntesis en el Golgi, sincronizando de este modo el transporte de salida hasta el medio extracelular. En este caso observamos que las células silenciadas contra la  $\beta$ III espectrina tenían una disminución significativa en cuanto a la secreción global de proteínas solubles (Figura 27).



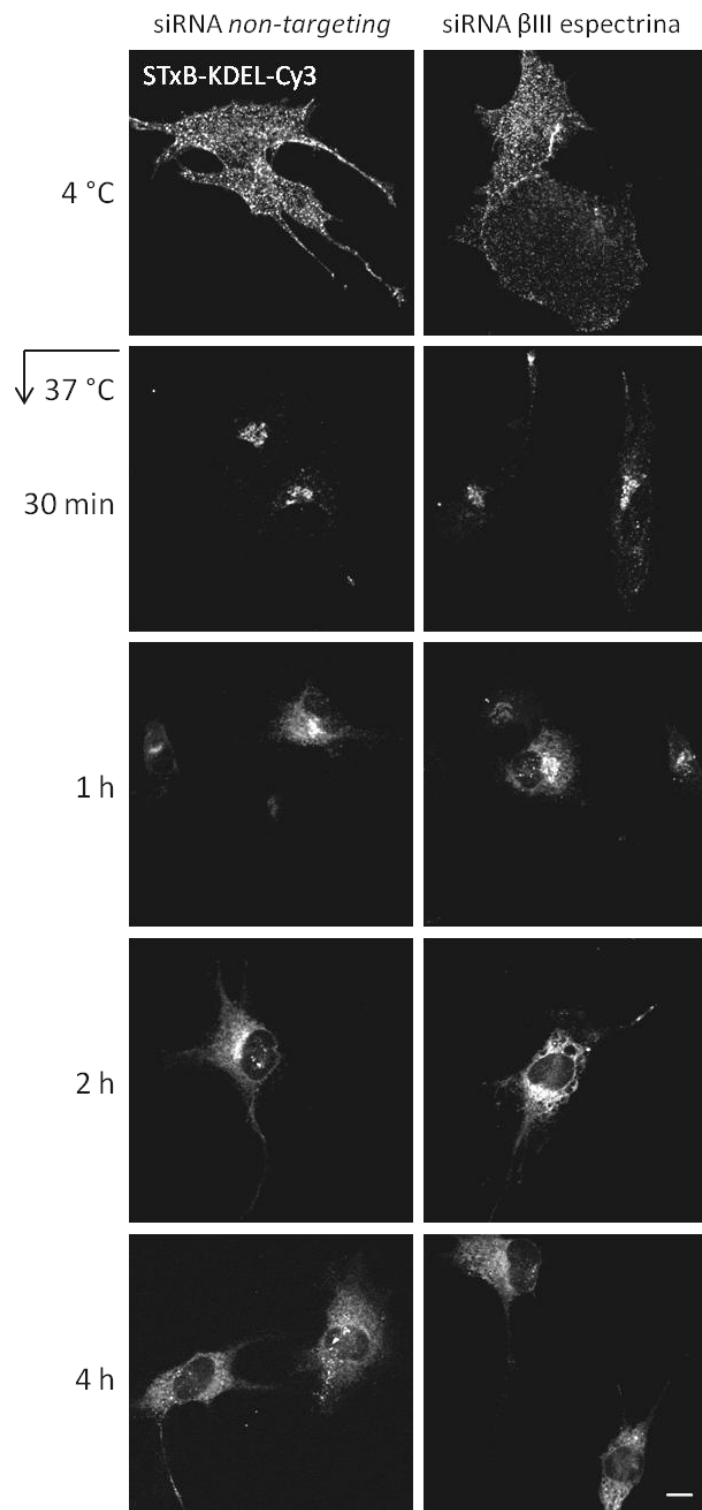
**Figura 27. La depleción de la  $\beta$ III espectrina inhibe la secreción post-Golgi al medio extracelular de proteínas solubles marcadas radioactivamente.** Las células RPE1 se transfectaron con siRNAs control o contra la  $\beta$ III espectrina. 96 h después se marcaron con [ $S^{35}$ ] Met/Cys, se incubaron a 19 °C durante 3 h para acumular al Golgi las proteínas sintetizadas de novo y se pasaron a 37 °C. A los tiempos indicados, las proteínas de los sobrenadantes y los lisados celulares se

precipitaron y cuantificaron mediante un contador de centelleo. Como controles positivos, el ensayo se realizó con células a 4 °C o tratadas con BFA. Los valores representados son la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. La significación estadística,  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)

Todos estos resultados nos permiten concluir que la  $\beta$ III espectrina es necesaria para el transporte anterógrado secretor tanto de proteínas solubles como de proteínas de membrana. Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos con la BFA y el NZ indican que el flujo de membrana retrógrado no se ve alterado en ausencia de  $\beta$ III espectrina, quisimos corroborarlos examinando el transporte retrógrado de un *cargo* desde la MP hasta el RE, pasando por el Golgi. En este caso usamos el fragmento B de la toxina de *Shigella* (STxB). Esta toxina se une al glicolípido Gb3 de la MP y se endocita siguiendo la vía de los endosomas tempranos. Seguidamente, se transporta al RE atravesando el Golgi. Las células control y las células silenciadas contra la  $\beta$ III espectrina se incubaron con la STxB, que está unida al fluorocromo Cy3 y lleva acoplado en el extremo C-terminal la secuencia KDEL (STxB-KDEL-Cy3) que la retiene en el RE una vez alcanza este compartimento. Se incubaron las células con la toxina a 4



°C durante 1 h para permitir su unión con el Gb3 y sincronizar posteriormente su internalización. Después, las células se lavaron para retirar la STxB-KDEL-Cy3 no unida y se incubaron a 37 °C para inducir su transporte hacia el RE (Johannes y col., 1997). Después de 30 min a 37 °C, la STxB-KDEL-Cy3 alcanzaba el Golgi (identificado por el marcaje yuxtannuclear) y a las 4 h ya se observó un patrón reticular como consecuencia de su llegada al RE (Figura 28). No observamos diferencia alguna en la cinética de transporte y llegada al RE de la STxB-KDEL.



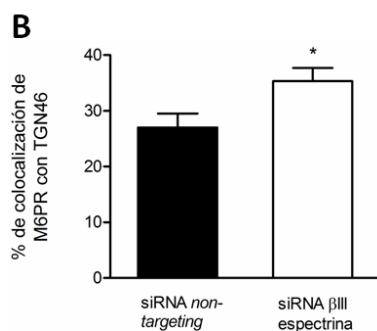
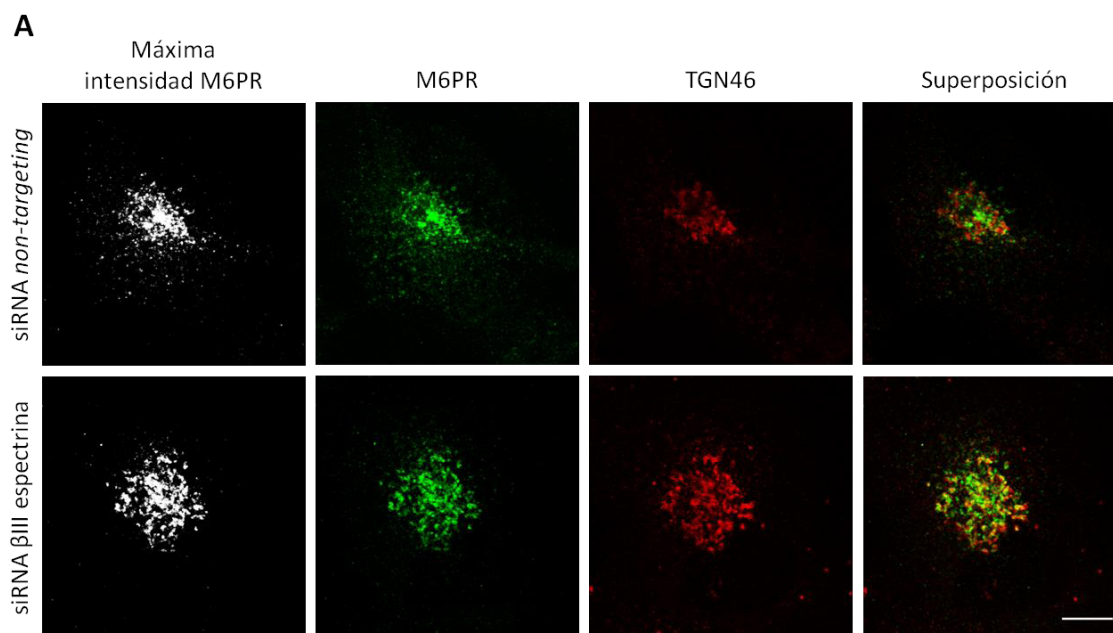
**Figura 28. El transporte retrógrado de la STxB-KDEL hacia el retículo endoplasmático no está alterado en ausencia de la βIII espectrina.** Cinética del transporte retrógrado en células control y en células silenciadas contra la βIII espectrina del fragmento B de la toxina de *Shigella* que contiene la secuencia de retención en el RE (KDEL). La incubación inicial de la STxB-KDEL-Cy3 se llevó a cabo a 4 °C para permitir la unión con el receptor Gb3. Después las células se incubaron a 37 °C para inducir el transporte de la toxina y se fijaron a distintos tiempos siguiendo su llegada al Golgi (identificado por el marcaje yuxtannuclear) y posteriormente al RE (identificado por el patrón reticular). Escala Bar, 10 μm.

En resumen, estos resultados indican que la  $\beta$ III espectrina es necesaria para el transporte anterógrado de proteínas solubles y asociadas a membrana. No lo es, en cambio, para el transporte retrógrado ni para la vía endocítica.

Con los experimentos de localización de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi observamos que, a pesar de que la proteína se encuentra distribuída por todo el orgánulo, es más abundante en el *trans*-Golgi y en el TGN. Gracias a los experimentos de secreción post-Golgi vimos que la ausencia de  $\beta$ III espectrina afecta al transporte de proteínas solubles desde el post-Golgi hacia el medio extracelular. Con todos estos resultados nos planteamos si la  $\beta$ III espectrina podría tener un papel importante en la salida de *cargo* a nivel post-Golgi en dirección a los compartimentos lisosomales. Para ello examinamos la distribución subcelular del receptor de la manosa 6-fosfato (M6PR). El M6PR es una proteína transmembrana que regula el transporte de las enzimas a los lisosomas. El dominio extracelular de este receptor tiene sitios de reconocimiento de residuos de manosa 6-fosfato (M6P) presentes en proteínas luminales destinadas a lisosomas (enzimas lisosomales). Estas enzimas se sintetizan en el RE y adquieren el residuo M6P en la región *cis*-Golgi e interactúan con los MPRs en la región *trans*-Golgi. Los complejos ligando-receptor son transportados por vesículas cubiertas de clatrina que emergen del TGN hacia los compartimentos endosomales tardíos en donde el complejo se disocia. Finalmente, el M6PR es reciclado hacia el TGN y las enzimas permanecen en los lisosomas. El M6PR se localiza tanto en el TGN como en numerosas estructuras puntiformes citoplasmáticas que ciclan entre el TGN y los endosomas tardíos. La modificación de esta distribución refleja una alteración en el transporte secretor en la zona post-Golgi. En las células silenciadas contra la  $\beta$ III espectrina, este marcaje citoplasmático puntiforme del M6PR se reducía y aumentaba el marcaje en la zona perinuclear. En cambio, el patrón de marcaje de las células control estaba más disperso por todo el citoplasma (Figura 29 A). Al cuantificar la localización del M6PR con un marcador residente en el TGN, determinamos que la distribución del M6PR en las células silenciadas se solapaba más con el marcador TGN46 que en las células control (Figura 29 B), sugiriendo que la salida del M6PR del TGN está dañada en ausencia de la  $\beta$ III espectrina.

### **3. GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR ESTABLE QUE NO EXPRESE $\beta$ III ESPECTRINA HUMANA**

Con el fin de abordar los estudios sobre el papel de la  $\beta$ III espectrina en la funcionalidad y la ultraestructura del Golgi, nos planteamos una alternativa a los experimentos de silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina con siRNAs debido al largo tiempo de incubación que requerían (cinco



**Figura 29. El silenciamiento de la βIII espectrina altera el patrón de distribución del receptor de la manosa 6-fosfato.** (A) Distribución subcelular del M6PR usando anticuerpos anti-M6PR y anti-TGN46 en células RPE1 control o silenciadas contra la βIII espectrina. Escala Bar, 10 μm. (B) Cuantificación de la colocalización de ambos marcadores, en la que las columnas indican el número de píxeles verdes (M6PR) que se solapan con los píxeles rojos (TGN46) respecto al total de píxeles verdes. La significación estadística,  $p \leq 0.05$  (\*).

días). Quisimos desarrollar una línea estable de células RPE1 que no espectrina humana. Para ello, generamos unos plásmidos lentivirales pLKO.1-puromicina que codificaban shRNAs contra la βIII espectrina (ver apartado 4.6 para las secuencias de los shRNAs) y los introdujimos en las células empaquetadoras HEK293 conjuntamente con los vectores lentivirales que codificaban los genes de la cápside y de la envuelta del lentivirus. Las células RPE1 se infectaron con los lentivirus y se seleccionaron las que eran positivas con puromicina. Se comprobó el silenciamiento de la βIII espectrina mediante IF a los cuatro y siete días después de la infección, pero lamentablemente en ningún caso detectamos disminución del marcaje de la βIII espectrina (Figura suplementaria 3). Después de varios experimentos advertimos que teníamos muchos problemas con la producción de los lentivirus, puesto que generamos varias tandas de ellos y cada una se comportaba de una forma distinta, en cuanto a términos de infección, haciendo difícil la reproducción de los experimentos. Por este motivo decidimos utilizar partículas lentivirales comerciales. Para ello usamos vectores lentivirales pLKO.1-neomicina que contenían los shRNAs en los que la secuencia nucleotídica era la misma que la

de los siRNAs que nos habían funcionado previamente (siRNA nº 9, 10 y 12 más un control *non-targeting*). Infectamos las células RPE1 previamente tratadas con polibreno, un polímero de carga positiva que incrementa la eficiencia de infección porque facilita la adhesión de la partícula lentiviral a la MP de las células, con distintas MOIs (del inglés *multiplicity of infection*). La MOI es el número de partículas lentivirales transductoras por célula; es decir, el número de lentivirus que se internalizarán en una célula. Al día siguiente reemplazamos el medio de las células por uno que contenía el antibiótico de selección G418 y comprobamos el silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina por IF y WB a las 96 h después de la infección (Figura suplementaria 4). En ningún caso observamos una disminución del marcaje de la proteína.

Por otra parte, al ver que nuestros shRNAs no funcionaban, adquirimos cinco clones lentivirales pLKO.1-puromicina comerciales ya testados. Seguimos la misma estrategia descrita anteriormente y observamos que aquellas células infectadas con los virus nº 29, 30 y 31 no presentaban marcaje de  $\beta$ III espectrina por IF (Figura suplementaria 5). Curiosamente, al aislar estas células para hacer clones estables observamos que las células no se dividían y acababan muriendo, haciendo imposible la creación de una línea celular estable carente de  $\beta$ III espectrina.

### **III. DETERMINANTES DE MEMBRANA EN LA LOCALIZACIÓN DE LA $\beta$ III ESPECTRINA EN EL COMPLEJO DE GOLGI**

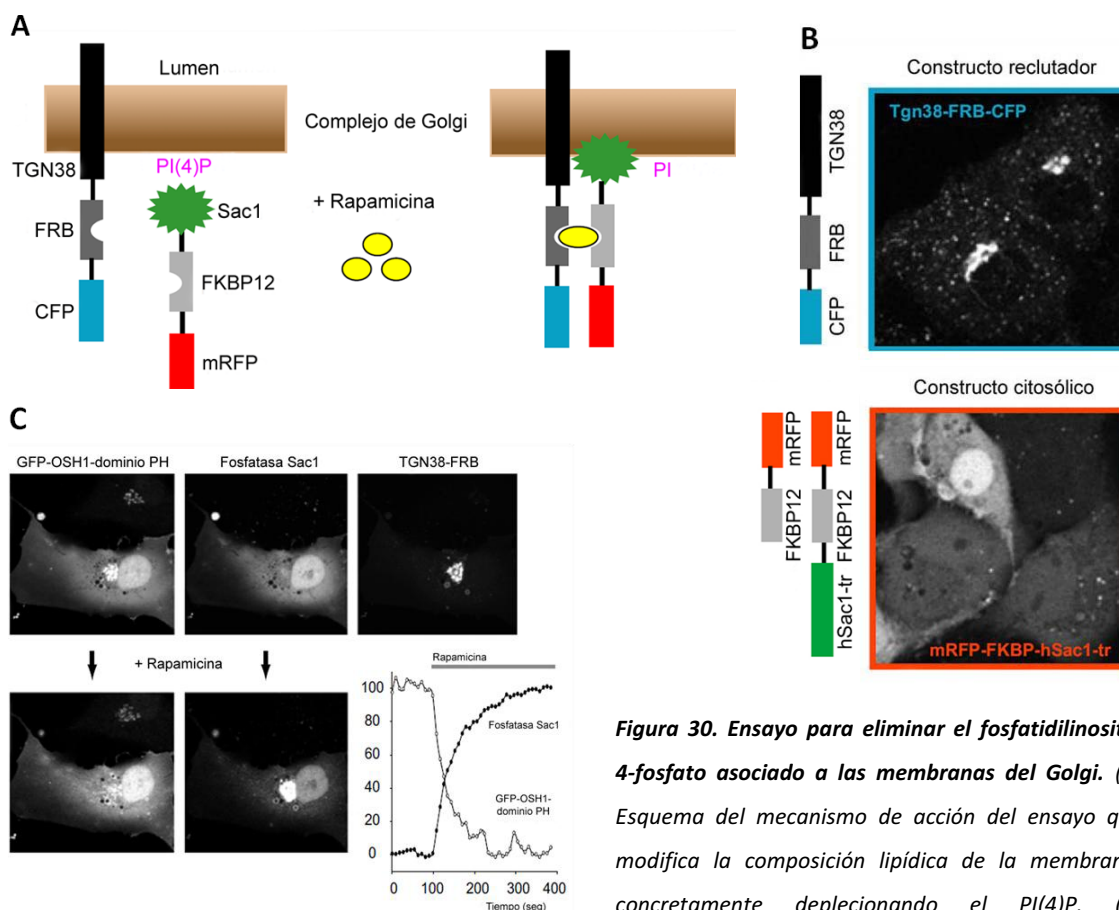
#### **Antecedentes y Objetivo**

Se ha descrito previamente que tanto el dominio de unión a actina como el dominio 1 de asociación a membrana dirigen a la  $\beta$ I $\Sigma$ \* espectrina hacia el Golgi en células MDCK (Devarajan y col., 1997). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que la subunidad de la dinactina Arp1/contractina se une con más eficiencia a la  $\beta$ III espectrina que la actina (Holleran y col., 2001). También se ha descrito que la  $\beta$ III espectrina interacciona con PI(4,5)P<sub>2</sub> (Godi y col., 1998 y 1999; Muresan y col., 2001) y en ausencia de su síntesis, la  $\beta$ III espectrina se fosforila en residuos de serina y/o treonina y se disocia de las membranas del Golgi, causando una fragmentación del orgánulo (Siddhanta y col., 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos investigar cuáles son los elementos determinantes en la localización de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi *in vivo*.

## 1. PAPEL DEL FOSFATIDILINOSITOL 4-FOSFATO EN LA LOCALIZACIÓN DE LA $\beta$ III ESPECTRINA EN EL COMPLEJO DE GOLGI

Experimentos *in vitro* sugieren que el dominio PH de la  $\beta$  espectrina se une a PI(4,5)P<sub>2</sub> con baja afinidad y poca especificidad (Harlan y col., 1994; Hyvönen y col., 1995; Lemmon y col., 2002). A pesar de que otros estudios, también realizados *in vitro*, han demostrado que los niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> son los mediadores de la unión de la  $\beta$ III espectrina a las membranas del Golgi y a los liposomas (Godi y col., 1998; Muresan y col., 2001), es bien sabido que los niveles intrínsecos de PI(4,5)P<sub>2</sub> en el Golgi son muy bajos (De Matteis y col., 2005; ver apartado 4 de la introducción). Estos datos nos hacen pensar que, o bien el dominio PH de la  $\beta$ III espectrina es poco o nada relevante *in vivo*, o bien que existen otras especies de PIs que contribuyen significativamente al reclutamiento de la  $\beta$ III espectrina a las membranas del Golgi. Puesto que el PI(4)P es el PI más abundante en el Golgi (De Matteis y col., 2005; D'Angelo y col., 2012), estudiamos su contribución en la localización de la  $\beta$ III espectrina al Golgi. Para ello, deplecionamos el acúmulo de PI(4)P del Golgi mediante el reclutamiento de la Sac1 al Golgi, una fosfatasa citosólica responsable del recambio del PI(4)P (Szentpetery y col., 2010) (Figura 30 A). Células COS-7 se cotransfectaron con el plásmido TGN38-FRB-CFP, que es el plásmido reclutador al Golgi, conjuntamente con el plásmido mRFP-FKBP12 solo o con el mRFP-FKBP12-Sac1, que codifica para la fosfatasa citosólica. (Figura 30 B). Para comprobar el efecto de la Sac1 sobre el acúmulo de PI(4)P asociado al Golgi, se monitorizó la ausencia de marcaje de Golgi en aquellas células que expresaban el dominio PH de la proteína OSH1 unido a GFP (Figura 30 C). Después de incubar las células con rapamicina, un agente que induce la formación de un dímero formado por las dos proteínas codificadas por los dos constructos, la fosfatasa Sac1 se trasloca al Golgi e hidroliza el PI(4)P. Las células se fijaron (Figura 31 A) y se procesaron para IF con anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina (Figura 31 B). Observamos que en aquellas células en las que la fosfatasa Sac1 se había reclutado al Golgi, no había marcaje de  $\beta$ III espectrina. Al cuantificar los niveles de fluorescencia de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi, determinamos que la  $\beta$ III espectrina se deslocalizaba del orgánulo en las células en las que se había deplecionado el PI(4)P (Figura 31 C). En algunos casos, el control tenía algún efecto sobre la morfología del Golgi que se atribuyó al reclutador TGN38-FRB-CFP y por este motivo sólo nos fijamos en aquellas células que presentaban una expresión baja del plásmido.

Para complementar los resultados obtenidos con el ensayo de la rapamicina, estudiamos cómo la  $\beta$ III espectrina, a través de su dominio PH, interacciona con los PIs y otros lípidos. Examinamos si el dominio PH de algunas proteínas que se localizan en el Golgi, gracias a la

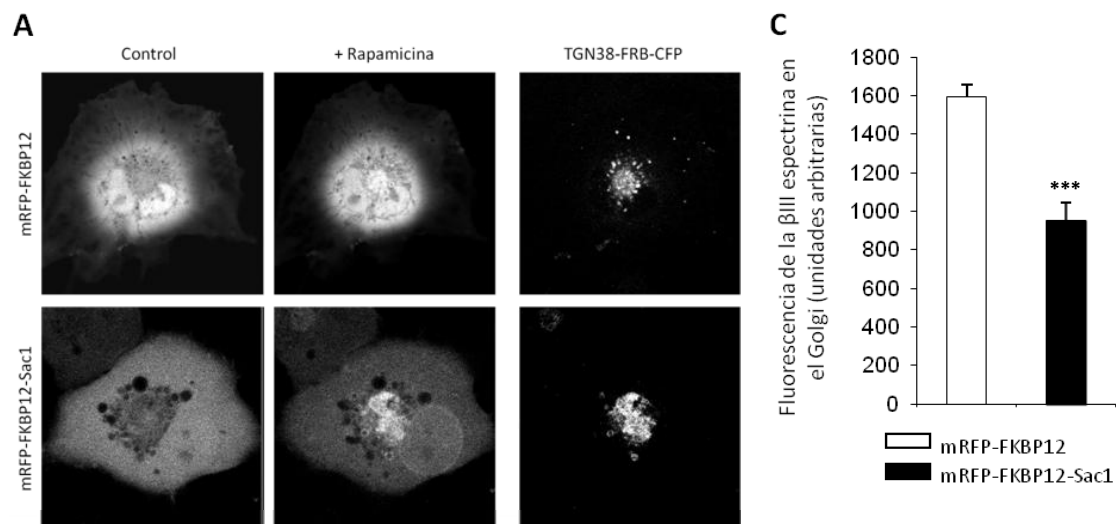


**Figura 30. Ensayo para eliminar el fosfatidilinositol 4-fosfato asociado a las membranas del Golgi.** (A) Esquema del mecanismo de acción del ensayo que modifica la composición lipídica de la membrana, concretamente deplecionando el PI(4)P. (B)

Distribución del TGN38-FRB-CFP y del mRFP-FKBP citosólico unido a la fosfatasa Sac1 en las células COS-7. (C) El reclutamiento de la Sac1 al Golgi disminuye la localización del dominio PH de la OSH1, que se usa como un indicador de los niveles de PI(4)P. La disminución de la intensidad del dominio PH de la OSH1 unido a GFP en el Golgi va paralela al incremento de la señal de la mRFP-FKBP-Sac1 en la misma área de observación (modificado de Szentepey y col., 2010).

unión de este dominio con el PI(4)P de las membranas del orgánulo (Levine y Munro, 2002) era capaz de desplazar a la  $\beta$ III espectrina del Golgi. Se ha demostrado que los dominios PH de las proteínas OSBP (del inglés *oxysterol-binding protein*) y FAPP1 (del inglés *four-phosphate adaptor protein 1*) reconocen específicamente el PI(4)P del Golgi *in vitro* (Dowler y col., 2000). Puesto que niveles elevados de expresión de los dominios PH pueden inducir la fragmentación del Golgi y alterar el tráfico proteico asociado a éste (Colón-Franco y col., 2011), solamente analizamos aquellas células con niveles de expresión bajos de los dominios PH. Así, las células RPE1 que expresaban el dominio PH de la FAPP1 unido a GST o el dominio PH de la OSBP unido a GFP (Figura 32) en el Golgi no tenían marcaje de  $\beta$ III espectrina, reforzando pues la hipótesis de que la  $\beta$ III espectrina se une al PI(4)P del Golgi.

Para estudiar con más detalle el papel del dominio PH de la  $\beta$ III espectrina en su localización en el Golgi, clonamos el dominio en un vector de expresión GFP. Cuando lo expresamos en las

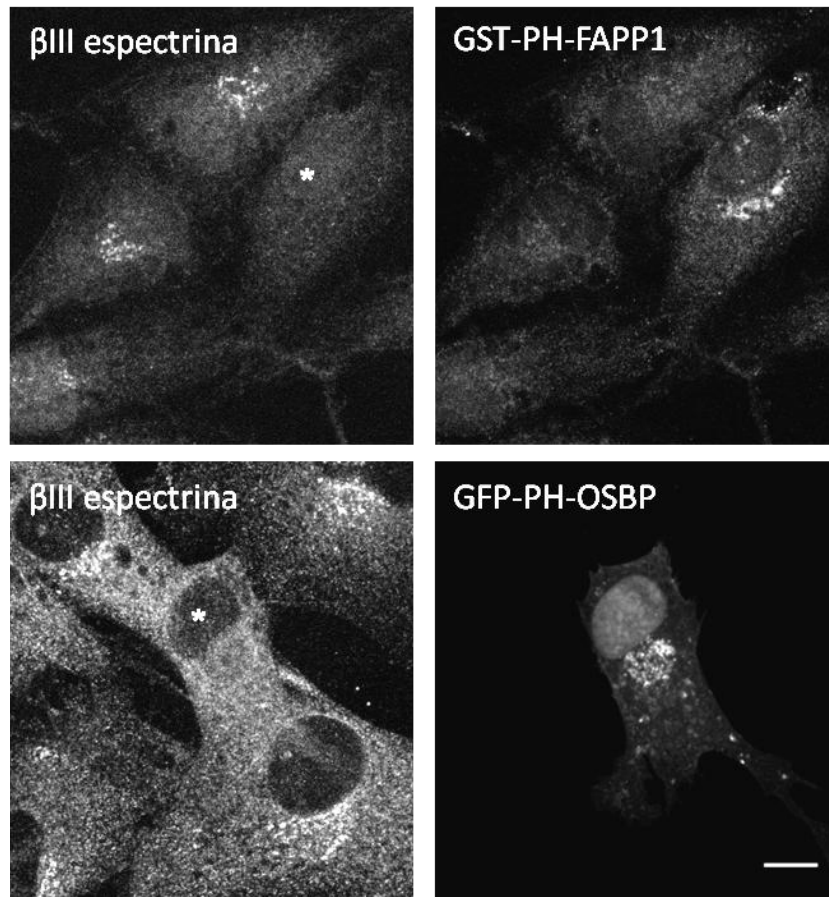


**Figura 31. La depleción del fosfatidilinositol 4-fosfato asociado al complejo de Golgi desplaza la βIII espectrina del complejo de Golgi.** Las células COS-7 se cotransfectaron con los constructos reclutador (TGN38-FRB-CFP) y citosólico (mRFP-FKBP12 o mRFP-FKBP12-Sac1). 16 h después, las células se trataron con rapamicina (100 nM, 5 min), se fijaron (A) y se procesaron para IF utilizando anticuerpos anti-βIII espectrina (B).

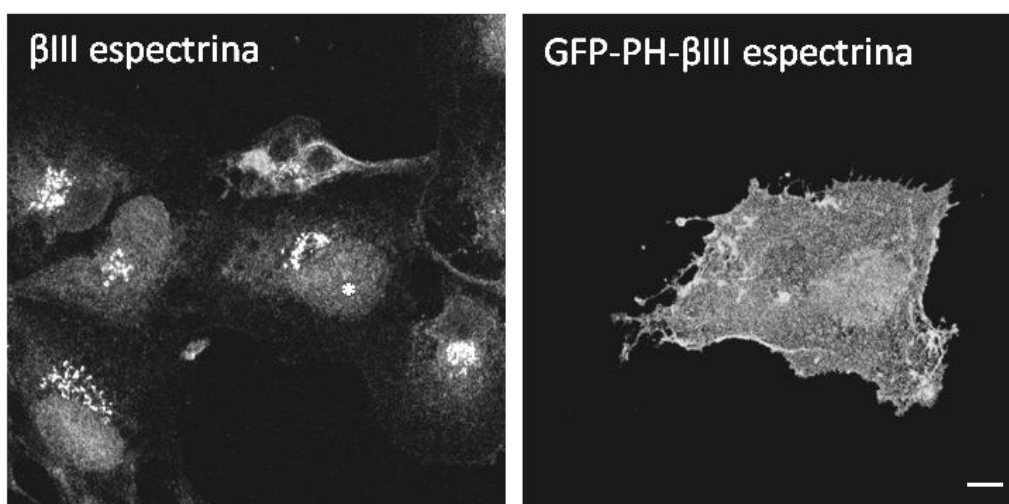
Escala Bar, 10 μM. (C) Cuantificación de la localización de la βIII espectrina en el Golgi después del reclutamiento de la fosfatasa Sac1 al Golgi mostrado en el panel (B). Las columnas representan los niveles de βIII espectrina en el Golgi de células en las que el mRFP-FKBP12 solo o el mRFP-FKBP12-Sac1 se localizan en el Golgi. Se cuantificaron diez células que presentaban el mRFP-FKBP12-Sac1 en el Golgi de cada condición experimental. Los valores son la media ± SEM de tres experimentos independientes. La significación estadística,  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*)

células RPE1 detectamos que la fluorescencia del GFP se localizaba en los llamados *ruffles* u ondulaciones de membrana pero no en el Golgi. También observamos un marcaje citoplasmático muy difuso (Figura 33). Este resultado no nos sorprendió puesto que otros trabajos han demostrado que el dominio PH de otras isoformas de β espectrina, como la βIIII espectrina, se localiza en la MP (Wang et al., 1996). Este resultado es indicativo de que la unión de la βIII espectrina a las membranas del Golgi necesita de otras interacciones a través de este dominio o de otros dominios de la βIII espectrina para localizarse en el Golgi.

El hecho de localizar el dominio PH de la βIII espectrina en la MP nos hizo pensar que probablemente era debido a su mayor afinidad por el PI(4,5)P<sub>2</sub> localizado mayoritariamente en



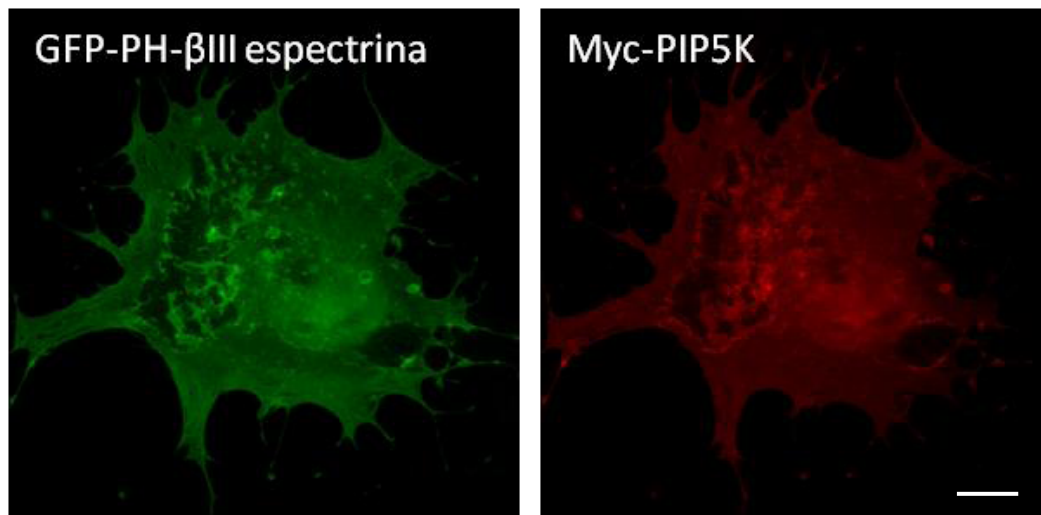
**Figura 32.** La sobreexpresión de dominios PH que se unen específicamente al fosfatidilinositol 4-fosfato del complejo de Golgi desplaza la  $\beta$ III espectrina de las membranas del orgánulo. Las células RPE1 que expresan el dominio PH de la FAPP1 o el dominio PH de la OSBP se fijaron y procesaron para IF con anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina. Los asteriscos muestran las células transfectadas. Escala Bar, 10  $\mu$ m.



**Figura 33.** El dominio PH de la  $\beta$ III espectrina aislado se localiza en la membrana plasmática. Las células RPE1 que expresan el dominio PH unido a GFP se fijaron, se procesaron para IF utilizando anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina y se analizaron por microscopía confocal. El asterisco muestra la célula transfectada. Escala Bar, 10  $\mu$ m.



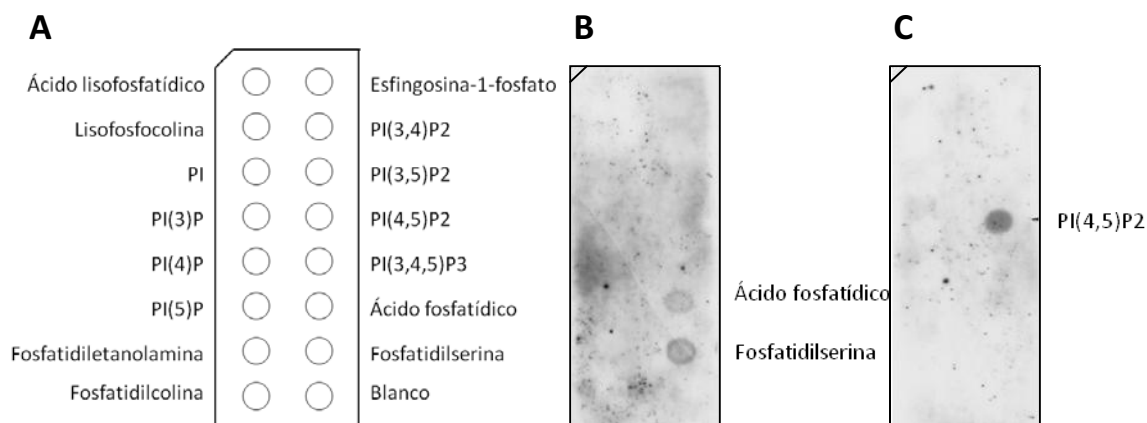
la MP, lo cual ya se había descrito anteriormente *in vitro* (Godi y col., 1998; Muresan y col., 2001). Con la idea de forzar el reclutamiento del dominio PH al Golgi, pensamos en estrategias para aumentar los niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> en el Golgi sabiendo que sus niveles en el mismo son muy bajos. Para ello, las células RPE1 se cotransfectaron con el dominio PH de la βIII espectrina junto con la PIP5K [la quinasa responsable de generar PI(4,5)P<sub>2</sub> a partir de PI(4)P]. Observamos que el dominio PH tampoco se localizaba en el Golgi (Figura 34). El hecho de visualizar cometas de actina nos sirvió como control positivo de la expresión de la PIP5K (Duran y col., 2003).



**Figura 34.** El dominio PH de la βIII espectrina no se localiza en el complejo de Golgi en células que sobreexpresan la PIP5 quinasa. Las células RPE1 se cotransfectaron con el dominio PH de la βIII espectrina y la quinasa PIP5 y se incubaron durante 20 h. Después se procesaron para IF utilizando anticuerpos anti-myc. Escala Bar, 10 μm.

Paralelamente, realizamos un ensayo *in vitro* de unión proteína-lípido con unas membranas hidrofóbicas impregnadas con todas las especies de PIs y otros lípidos importantes (Figura 35 A). Generamos una proteína recombinante que consistía en el dominio PH de la βIII espectrina unido a GST y la incubamos con las membranas de PIs, siguiendo el protocolo habitual de WB. Curiosamente, al revelar las membranas con anticuerpos anti-GST no detectamos ninguna señal de reconocimiento de la proteína para ninguna especie de PI. Sin embargo, observamos un marcaje positivo para el ácido fosfatídico y para la fosfatidilserina (Figura 35 B). Como control positivo, incubamos las membranas de PIs con la proteína recombinante comercial PLC-δ1-dominio PH unida a GST que se une específicamente a PI(4,5)P<sub>2</sub> (Figura 35 C). Este resultado nos sorprendió puesto que esperábamos que el dominio PH de la espectrina se uniera a PI(4)P y a PI(4,5)P<sub>2</sub>, pero también es cierto que estos dominios son poco específicos y está bien establecido el hecho de que necesitan de otras interacciones para unirse a los PIs. Sin

embargo, otros estudios han descrito la interacción de la espectrina con la fosfatidilserina (Momers y col., 1980; Kavran y col., 1998).

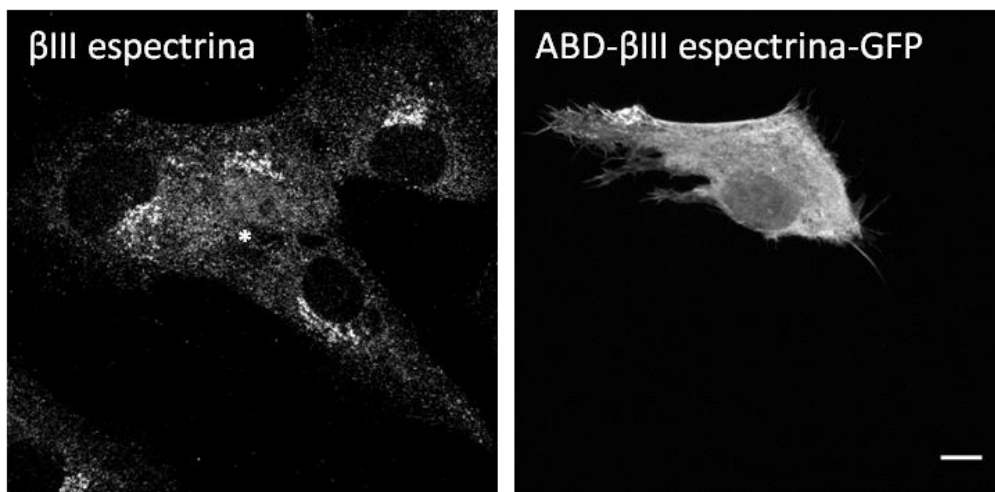


**Figura 35.** La proteína recombinante del dominio PH de la  $\beta$ III espectrina se une *in vitro* al ácido fosfatídico y a la fosfatidilserina pero no al fosfatidilinositol 4-fosfato ni al fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (A) Membrana hidrofóbica impregnada con las distintas especies de PIs y otros lípidos (100 pmoles). (B) La proteína recombinante del dominio PH de la  $\beta$ III espectrina (5  $\mu$ g) se incubó con las membranas de PIs y se procesó para WB utilizando anticuerpos anti-GST. (C) Control positivo utilizando 2.5  $\mu$ g de la proteína recombinante del dominio PH de la PLC $\delta$ 1 unido a GST.

## 2. PAPEL DE LA DINÁMICA DE ACTINA EN LA LOCALIZACIÓN DE LA $\beta$ III ESPECTRINA EN EL COMPLEJO DE GOLGI

Los resultados anteriores sugieren que el dominio PH de la  $\beta$ III espectrina por sí solo no es capaz de dirigir la proteína al Golgi. Nos planteamos si el dominio de unión a actina, el dominio ABD, podría ser determinante en la localización de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi, ya que previamente se había descrito que existe una asociación entre la maquinaria molecular implicada en el reclutamiento y polimerización de los filamentos de actina y las membranas del Golgi (Chen y col., 2004; Matas y col., 2004). Por otro lado, se sabe que todas las  $\beta$  espectrinas tienen un dominio ABD en el N-terminal responsable de su unión con el citoesqueleto de actina y los MTs (Shotton y col., 1979; Holleran y col., 2001). Por tanto, clonamos el dominio ABD en un vector de expresión GFP y lo expresamos en células RPE1 y HeLa. Tal y como observamos con el dominio PH, el dominio ABD también se localizaba en la MP, sobretodo en estructuras que podrían ser lamelipodios (Figura 36), pero no se encontró en el Golgi.

A continuación, nos planteamos averiguar si la dinámica de actina contribuía de alguna forma a la localización de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi. Para ello, tratamos las células RPE1 con agentes anti-actina que despolimerizan (latrunculina) o estabilizan (jasplakinolide) los filamentos de actina y estudiamos su efecto en el emplazamiento de la  $\beta$ III espectrina en el



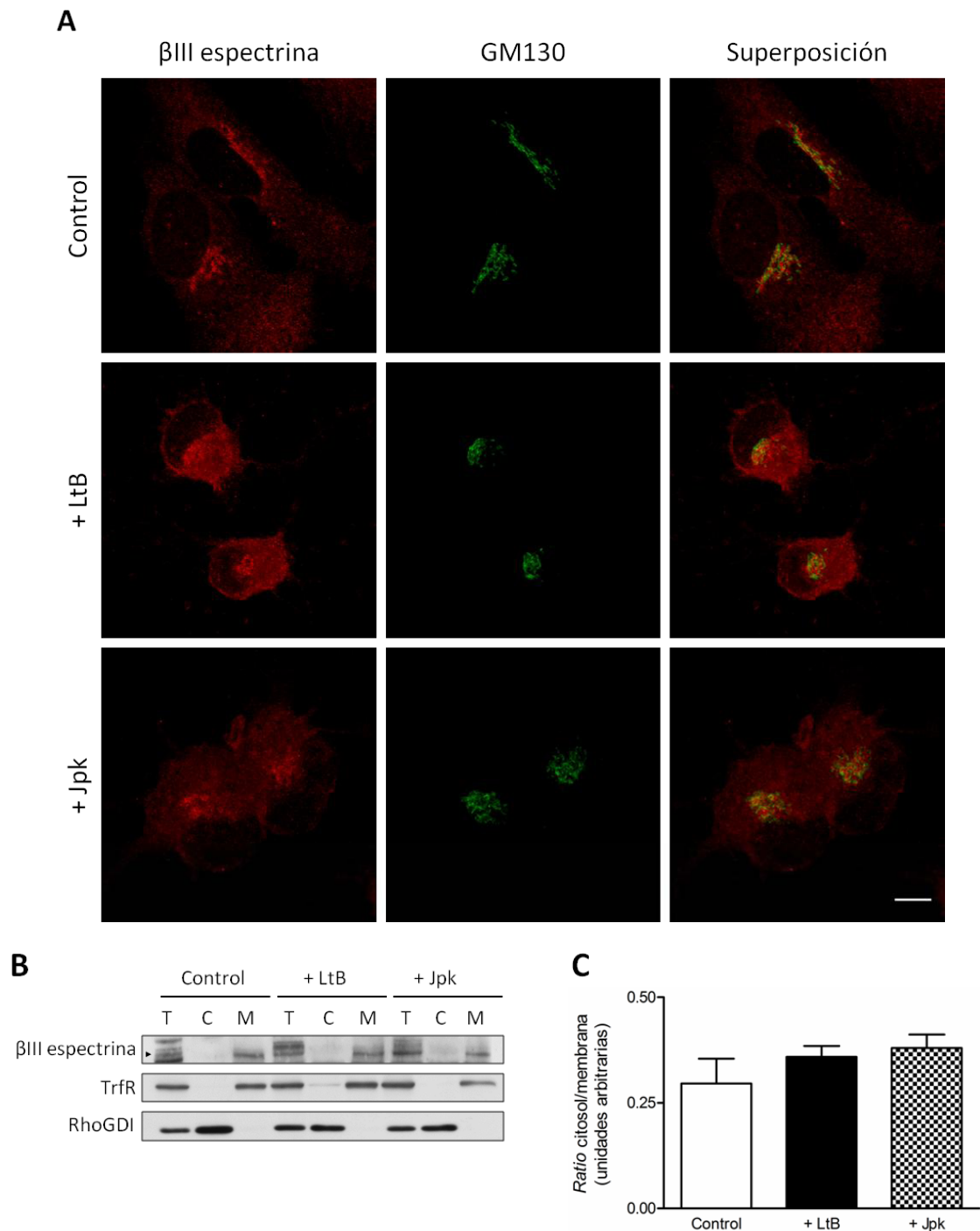
**Figura 36.** El dominio de unión a actina de la  $\beta$ III espectrina se localiza en la membrana plasmática. Las células RPE1 que expresan el dominio ABD unido a GFP se fijaron, se procesaron para IF utilizando anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina y se analizaron por microscopía confocal. El asterisco muestra la célula transfecteda. Escala Bar, 10  $\mu$ m

Golgi. Como esperábamos, el Golgi de las células RPE1 tratadas con LtB estaba compactado y la  $\beta$ III espectrina seguía presente en las membranas del orgánulo. Con el tratamiento de Jpk tampoco vimos ningún cambio de localización respecto a las células control (Figura 37 A). Estas observaciones se confirmaron cuando sometimos a fraccionamiento subcelular las células RPE1 tratadas con LtB o Jpk y aislamos las fracciones citosólicas y de membrana. En las células tratadas con los agentes anti-actina detectamos la  $\beta$ III espectrina en la fracción de membrana (Figura 37 B). La *ratio* entre ambas fracciones permaneció inalterada después del tratamiento (Figura 37 C). Estos resultados muestran que la dinámica de actina no participa activamente en la asociación de la  $\beta$ III espectrina con las membranas del Golgi.

### 3. FOSFORILACIÓN DE LA $\beta$ III ESPECTRINA

Estudios *in vitro* han descrito que la fragmentación del Golgi en respuesta a una disminución de la síntesis de  $PI(4,5)P_2$  se podría atribuir a la disociación de la  $\beta$ III espectrina de las membranas del Golgi como consecuencia de su fosforilación (Siddhanta y col., 2003). Por otra parte, se ha descrito que las fosforilaciones de los dominios PH contribuyen a su unión a las membranas de los orgánulos. Nuestros experimentos muestran que la unión de la  $\beta$ III espectrina al Golgi se debe en parte al  $PI(4)P$ .

Con estos datos nos planteamos averiguar si la  $\beta$ III espectrina podía ser fosforilada en algún residuo del dominio PH. Nos fijamos en otras proteínas que tuvieran elementos en común con

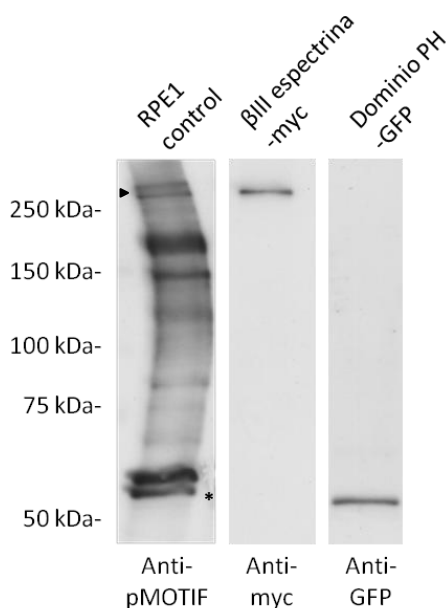


**Figura 37. La disrupción de la dinámica de actina no altera la asociación de la  $\beta$ III espectrina con las membranas del complejo de Golgi.** (A) Las células RPE1 se trataron con LtB (500 nM, 1 h) o con Jpk (500 nM, 1 h), se fijaron y se procesaron para IF con anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina y anti-GM130 para visualizar el Golgi. Escala Bar, 10  $\mu$ m. (B) Fraccionamiento subcelular de las células mostradas en el panel (A). La  $\beta$ III espectrina se detectó con anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina (punta de flecha). El TrfR y la RhoGDI se usaron como indicadores del grado de enriquecimiento y como controles de carga de las fracciones de membrana y citosólicas, respectivamente. T, fracción total; C, fracción citosólica; M, fracción de membrana. (C) Cuantificación de los resultados mostrados en el panel (B), en la cual las columnas representan la ratio obtenida de las densitometrías de la  $\beta$ III espectrina en la fracción citosólica respecto la fracción membranosa. Los valores son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

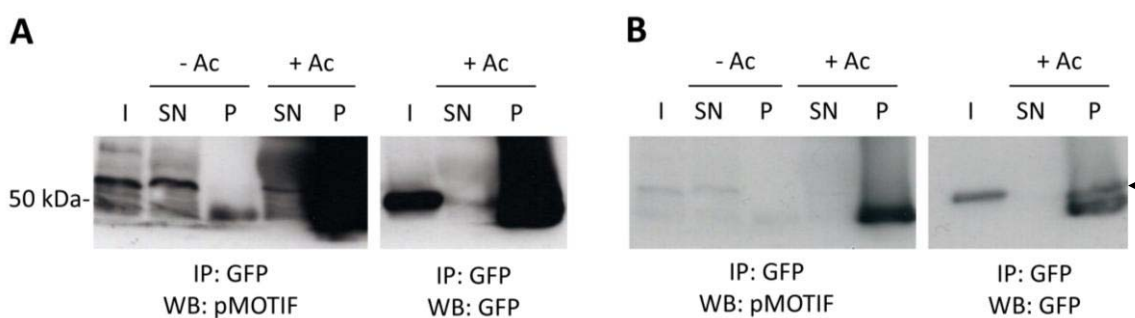
la  $\beta$ III espectrina, como que se localizaran en el Golgi (en los compartimentos *trans*-Golgi) y que tuvieran un dominio PH que se uniera a PI(4)P. Las proteínas OSBP y CERT cumplían ambos requisitos (Levine y Munro, 1998 y 2002; Hanada y col., 2003) siendo además fosforiladas por la proteína quinasa D (PKD), disminuyendo así su afinidad por el PI(4)P y disociándose de las membranas del Golgi (Hanada y col., 2003; Toth y col., 2006; Fugmann y col., 2007; Nhek y col., 2010). Para ello, hicimos uso del programa de predicción de interacciones usando secuencias consenso cortas denominado Scansite. Así, realizamos un análisis de la secuencia de la  $\beta$ III espectrina para poder identificar secuencias consenso que podían ser reconocidas por dominios modulares de señalización, que podían ser fosforiladas por serina/treonina quinasas o por tirosina quinasas o que podían mediar interacciones con ligandos proteicos o lipídicos (Obenauer y col., 2003). Encontramos que la serina en posición 2254 era potencialmente fosforilable, estaba conservada en otras especies y se hallaba dentro del dominio PH. Razonamos, pues, que la fosforilación de esta serina podría afectar a la unión con el PI(4)P incrementando la carga negativa local.

La PKD es un regulador clave en el Golgi que controla la fisión de los ITs destinados a la MP. Hasta hace poco, la PI4KIII $\beta$  era el único sustrato local identificado (Hausser y col., 2005). Para determinar si la  $\beta$ III espectrina podría ser un sustrato para la PKD, utilizamos un anticuerpo que reconocía un péptido sustrato específicamente fosforilable por la PKD conocido como pMOTIF, que contiene motivos consenso de fosforilación por la PKD (Doppler y col., 2005). Esta secuencia es LxRxxS\* donde S es serina fosforilada en posición 0, R es arginina en posición -3, L es lisina en posición -5 y X es un aa cualquiera en posiciones -1, -2 y -4. La serina 2254 de la  $\beta$ III espectrina se encuentra en una secuencia (LxRxS\*) muy parecida a la descrita anteriormente. Las células RPE1 se transfectaron con la  $\beta$ III espectrina unida a una cola myc o con su dominio PH unido a GFP y se procesaron para WB usando anticuerpos anti-pMOTIF (para visualizar los residuos fosforilados por la PKD), anti-GFP (para visualizar el dominio PH) y anti-myc (para visualizar la  $\beta$ III espectrina sobreexpresada). El anticuerpo anti-pMOTIF reconocía bandas con el mismo peso molecular que las reconocidas por los anticuerpos anti-myc y anti-GFP (Figura 38), lo que sugería que podría reconocer tanto la proteína endógena como el dominio PH.

Posteriormente, estudiamos si estas bandas coincidentes con la  $\beta$ III espectrina correspondían realmente a la misma proteína. Para ello transfectamos células RPE1 con el dominio PH unido a GFP, se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-GFP y se procesó para WB con el anticuerpo anti-pMOTIF. Lamentablemente, la banda inmunoprecipitada no se teñía con el anticuerpo anti-pMOTIF (Figura 39).



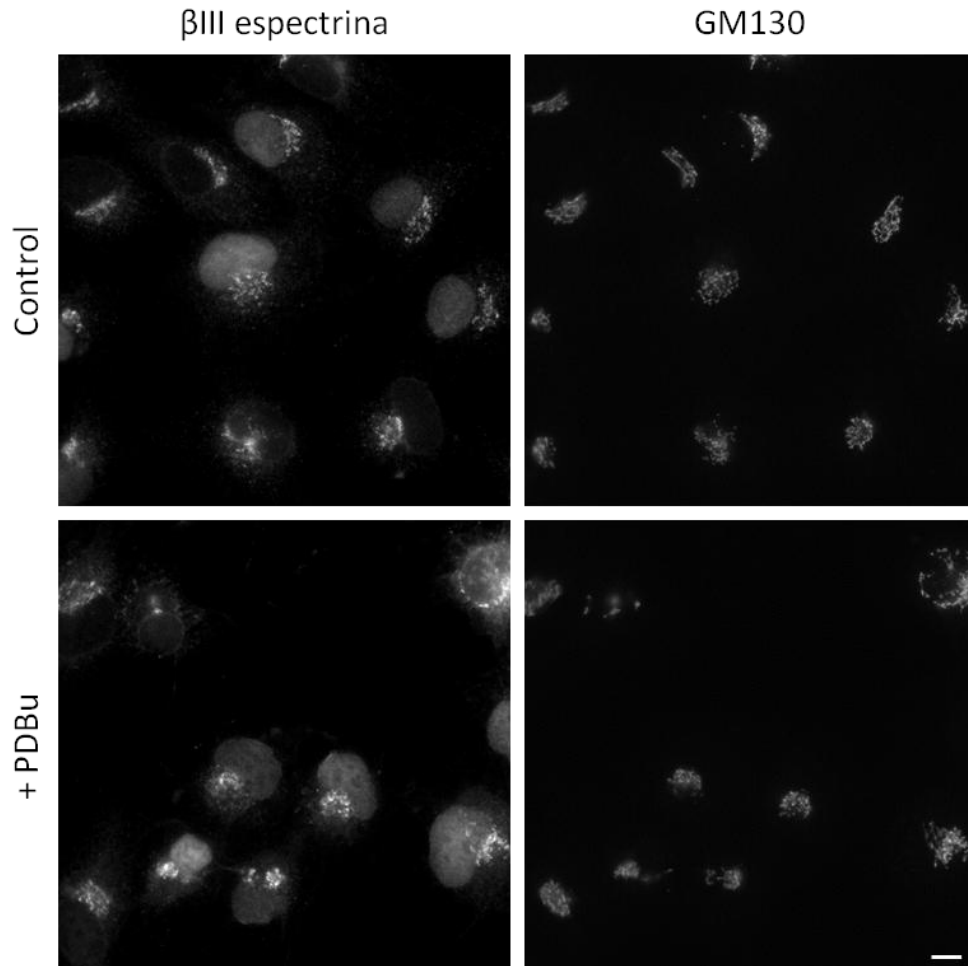
**Figura 38.** El anticuerpo anti-pMOTIF reconoce las bandas del mismo peso molecular que las reconocidas por los anticuerpos anti-myc y anti-GFP. Las células RPE1 sin transfectar o transfectadas con la  $\beta$ III espectrina silvestre unida a myc o con el dominio PH de la  $\beta$ III espectrina unido a GFP se procesaron para WB usando anticuerpos anti-pMOTIF, anti-myc o anti-GFP. La punta de flecha indica la  $\beta$ III espectrina y el asterisco muestra el dominio PH de la misma.



**Figura 39.** El anticuerpo anti-pMOTIF no reconoce el dominio PH de la  $\beta$ III espectrina como sustrato de la proteína quinasa D. Las células RPE1 que expresaban el dominio PH de la  $\beta$ III espectrina unido a GFP se lisaron y se incubaron con anticuerpos anti-GFP para inmunoprecipitar el dominio PH o sin anticuerpos como control. Posteriormente se analizaron para WB usando anticuerpos anti-pMOTIF o anti-GFP como control del ensayo. (A) Film más expuesto, (B) Film menos expuesto. La punta de flecha indica el inmunoprecipitado detectado con los anticuerpos anti-GFP. Ac, anticuerpo; I, input; SN, sobrenadante; P, pellet.

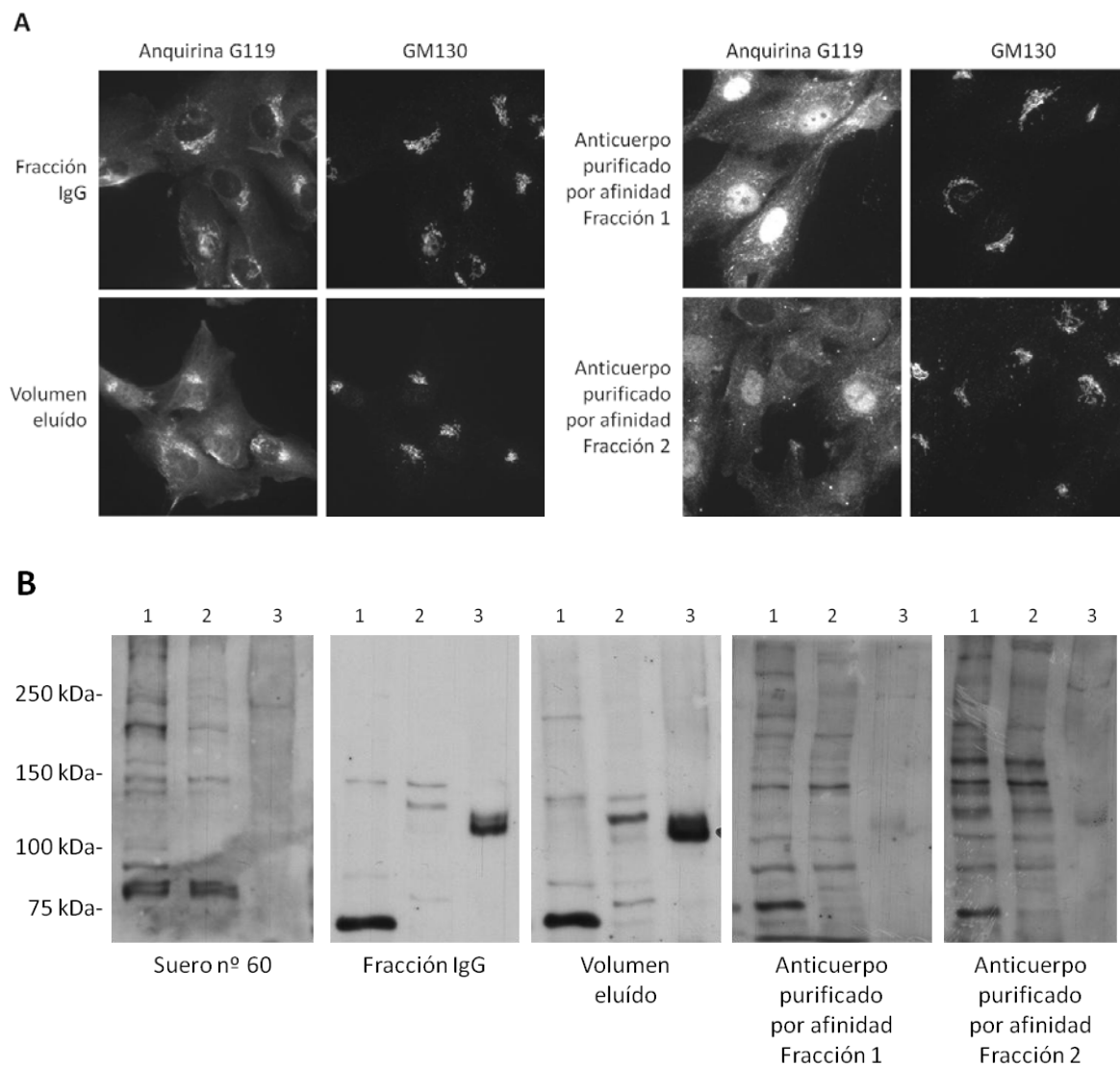
Teniendo en cuenta estos resultados concluimos que la serina 2254 del dominio PH de la  $\beta$ III espectrina no es susceptible de reconocimiento y fosforilación por la PKD. Paralelamente realizamos estudios con forbol 12,13-dibutirato (PDBu), un compuesto que estimula la actividad quinasa de la PKD de forma dependiente de PKC (Wang, 2006). Hipotetizamos que el reclutamiento de la PKD al Golgi por un aumento de los niveles de diacilglicerol (DAG) en el mismo podría incrementar la posibilidad de fosforilar a la  $\beta$ III espectrina (en caso de ser sustrato) y ello produciría su desplazamiento de las membranas del Golgi. Tratamos las células

RPE1 con PDBu y las procesamos para IF. Tampoco observamos cambio alguno en la localización de la  $\beta$ III espectrina (Figura 40). Estos resultados apuntan a que la PKD no fosforila a la  $\beta$ III espectrina.



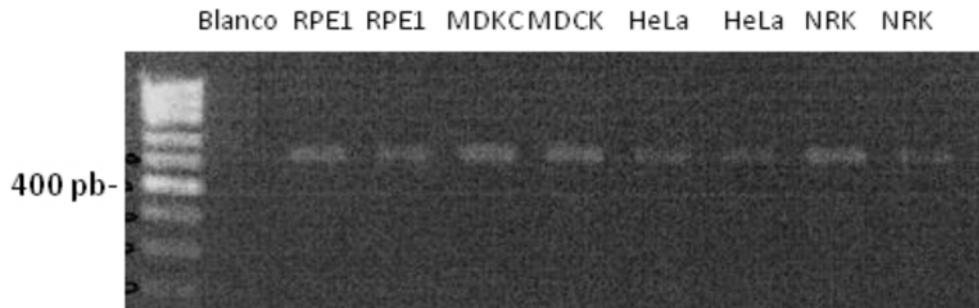
**Figura 40.** La estimulación de la proteína quinasa D con PDBu no altera la distribución de la  $\beta$ III espectrina. Las células RPE1 se trataron con PDBu (1  $\mu$ M, 30 min) y se procesaron para IF con anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina y anti-GM130. Escala Bar, 10  $\mu$ m.

## IV. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

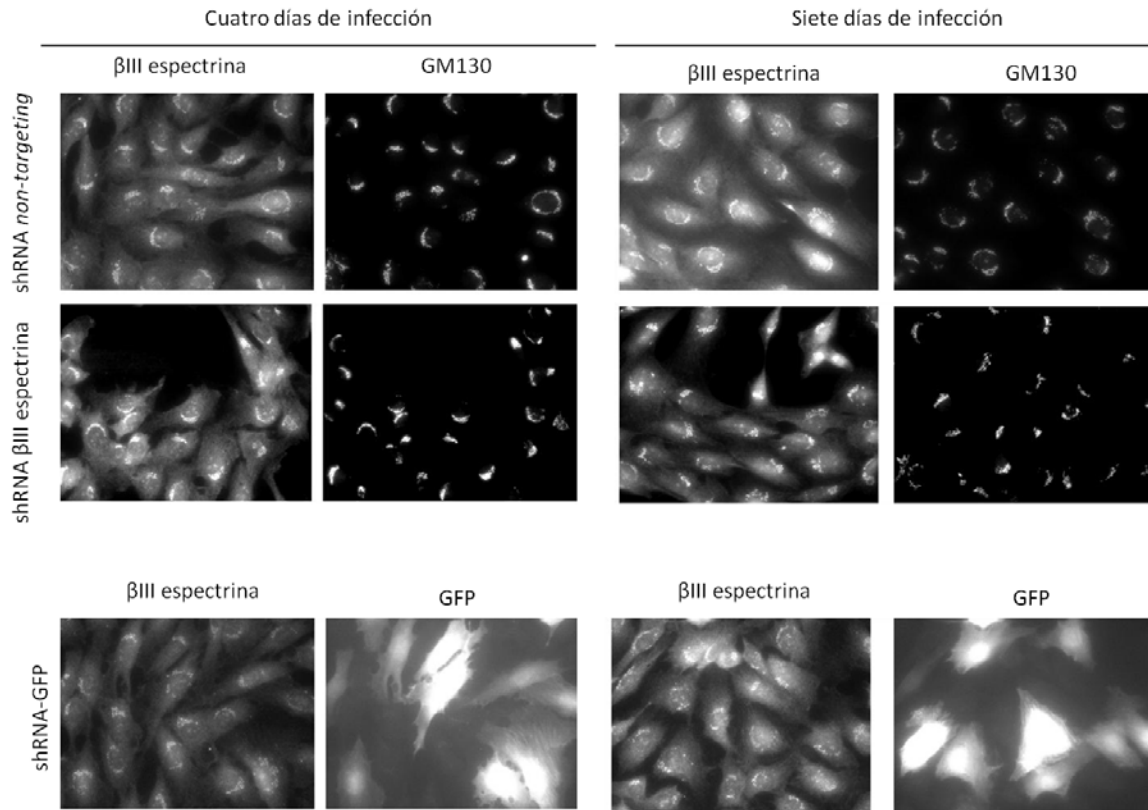


**Figura suplementaria 1. Caracterización de los anticuerpos policlonales de conejo generados contra la anquirina G119.** (A) IF de células RPE1 con el anticuerpo nº 60 (fracción IgG, volumen eluido y fracciones 1 y 2 purificadas por cromatografía de afinidad). (B) WB de lisados de células RPE1 (carril 1), células NRK (carril 2) y fracciones enriquecidas con membranas de Golgi de hígado de rata (carril 3), con el anticuerpo nº 60 (fracción IgG, volumen eluido y fracciones 1 y 2 purificadas por cromatografía de afinidad).

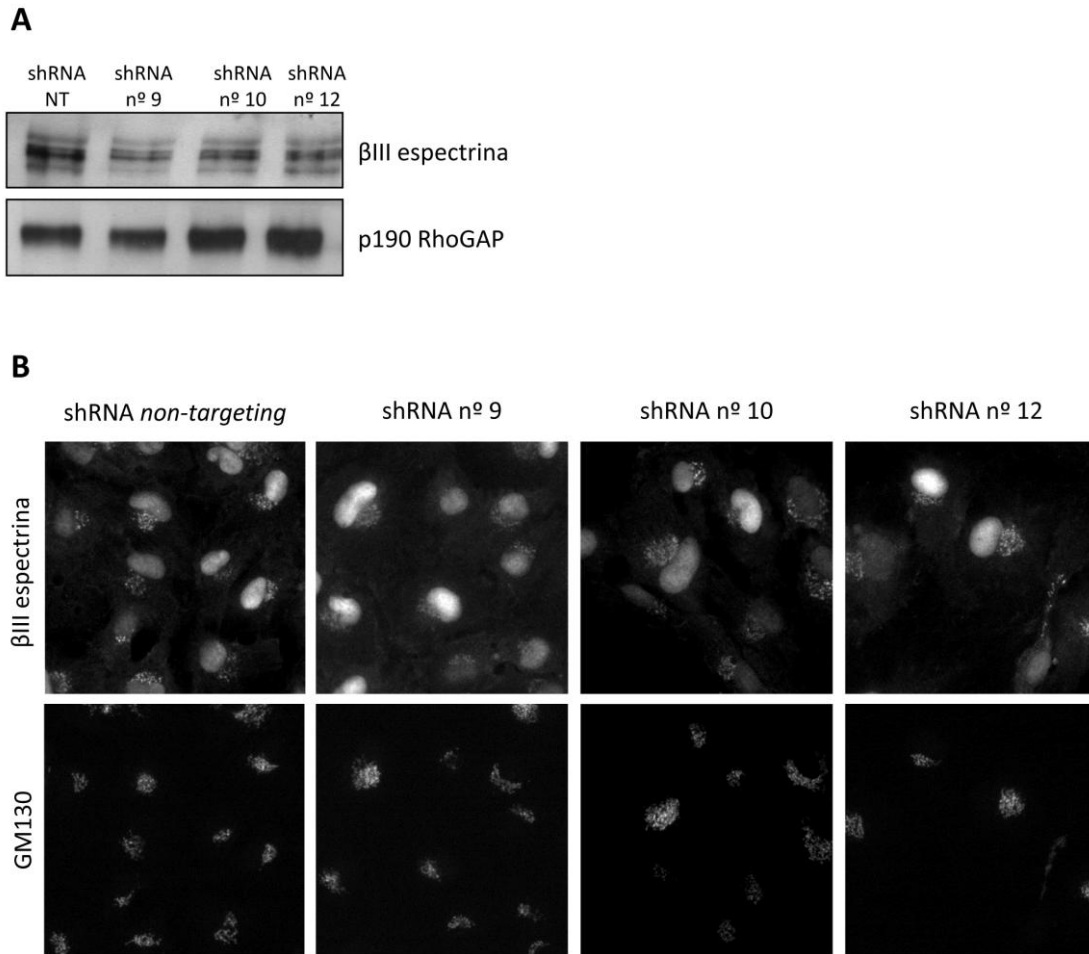




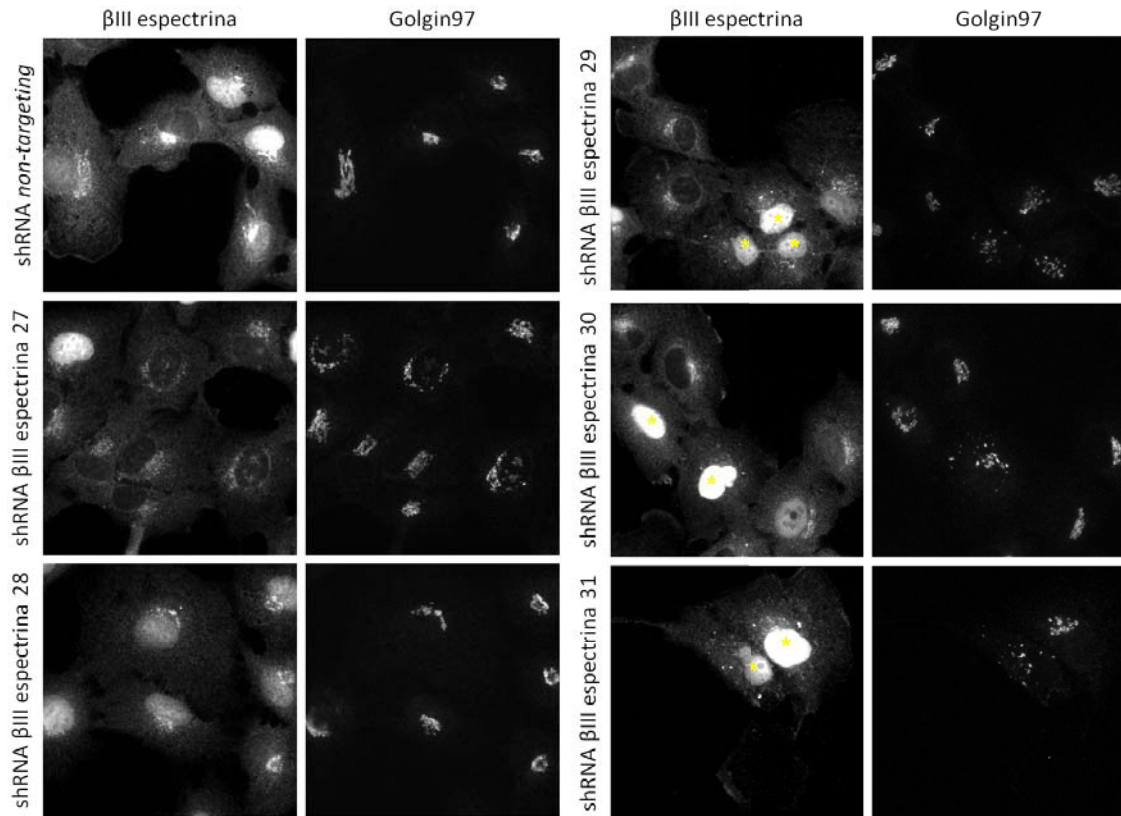
**Figura suplementaria 2.** Ninguno de los tipos celulares muestra el amplicón correspondiente a la anquirina G119. PCR para amplificar el ADNc que codifica para la anquirina G119 humana. El amplicón no aparece en el tamaño esperado, que es de 370 pb.



**Figura suplementaria 3.** La infección de células RPE1 con la primera tanda de lentivirus contra la  $\beta$ III espectrina humana no inhibe la expresión de la proteína. Las células RPE1 infectadas con las partículas lentivirales control o contra la  $\beta$ III espectrina se fijaron a los cuatro y a los siete días después de la infección. Posteriormente se procesaron para IF usando anticuerpos anti-GM130 y anti- $\beta$ III espectrina. Como control adicional infectamos las células RPE1 con el vector lentiviral pLKO.- GFP.



**Figura suplementaria 4. La infección de células RPE1 con la segunda tanda de lentivirus contra la  $\beta$ III espectrina humana no inhibe la expresión de la proteína.** (A) Análisis de la expresión de la  $\beta$ III espectrina en lisados de células RPE1 infectadas con los shRNAs *non-targeting* (NT) o con los shRNAs contra la  $\beta$ III espectrina nº 9, 10 y 12 a MOI 2 después de 96 h de la infección. La p190 RhoGAP se utilizó como control de carga. (B) Paralelamente, las células del panel (A) de procesaron para IF utilizando anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina y anti-GM130.



**Figura suplementaria 5. La infección de células RPE1 con la tercera tanda de lentivirus contra la βIII espectrina humana inhibe la expresión de la proteína.** Análisis de la expresión de la βIII espectrina en células RPE1 infectadas con los shRNAs non-targeting o con los shRNAs contra la βIII espectrina nº 27-31 a MOI 5 después de 96 h de la infección. Posteriormente las células se fijaron y se procesaron para IF usando anticuerpos anti-βIII espectrina y anti-Golgin97. Los asteriscos indican las células que no expresan βIII espectrina.



## **DISCUSIÓN**

---



Los elementos estructurales característicos del Golgi en células de mamífero consisten en una serie de cisternas planas y apiladas que están conectadas lateralmente entre sí formando un sistema continuo de membranas. Su organización, función y localización requieren de la participación de proteínas estructurales, como las golginas y las GRASPs (del inglés *Golgi reassembly protein*) (Ramirez y Lowe, 2009) y del citoesqueleto de MTs (Thyberg y Moskalewski, 1999). Estudios de varios laboratorios han implicado los filamentos de actina (Lázaro-Diéguéz y col., 2006), las proteínas reguladoras y de unión a actina (Matas y col., 2004), los motores de actina (Duran y col., 2003) y varias isoformas del citoesqueleto de espectrina en el mantenimiento de la estructura y del transporte proteico del Golgi (Siddhanta y col., 2003; Devarajan y col., 1997; Gough y Beck, 2004). Se ha especulado sobre la localización de la isoforma  $\beta$ III espectrina dentro del Golgi (Devarajan y col., 1997; De Matteis y Morrow, 1998) y se la ha implicado en el transporte desde el RE al Golgi (Devarajan y col., 1996; De Matteis y Morrow, 2000), pero estos resultados son controvertidos ya que no se han podido reproducir en otros laboratorios y los anticuerpos descritos son de dudosa especificidad. Consecuentemente, todavía no se sabe su precisa distribución en el Golgi, su relevancia en cuanto a su organización en las células de mamífero y su implicación funcional en cuanto al transporte secretor.

#### **I. LA $\beta$ III ESPECTRINA Y SU IMPLICACIÓN EN EL MANTENIMIENTO DE LA ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO DE GOLGI**

Como ya hemos mencionado anteriormente, aunque se ha descrito la existencia de un citoesqueleto de espectrina en el Golgi, las herramientas moleculares existentes son poco fiables debido a la reactividad cruzada que hay entre las distintas isoformas de las espectrinas. Por este motivo desarrollamos nuevos anticuerpos policlonales específicos contra varios dominios funcionales de la proteína  $\beta$ III espectrina humana. Mediante microscopía de fluorescencia detectamos la  $\beta$ III espectrina en la zona perinuclear en varios tipos celulares que corresponde al Golgi y en los ensayos bioquímicos detectamos un doblete por encima de 250 kDa en lisados celulares así como en fracciones enriquecidas en membranas de Golgi obtenidas de hígado de rata. Gracias a los experimentos de silenciamiento e inmunoprecipitaciones desvelamos que la banda de mayor movilidad electroforética es la que corresponde a la  $\beta$ III espectrina, puesto que es la única que desaparece al deplecionar la proteína. También observamos una disminución del marcaje de la  $\beta$ III espectrina en las células silenciadas. Además, comprobamos que éstos también reconocen a la  $\beta$ III espectrina sobreexpresada y pueden inmunoprecipitarla, dándonos seguridad en el uso de nuestras



herramientas. Estos resultados revelan que nuestros anticuerpos son específicos para la  $\beta$ III espectrina.

Los resultados de colocalización muestran que la  $\beta$ III espectrina se encuentra en todos los compartimentos del Golgi, siendo más abundante en las zonas distales, como el *trans*-Golgi y el TGN. Hay que destacar que el patrón de marcaje de nuestros anticuerpos no es continuo a lo largo de la cinta o *ribbon* del Golgi, sino que aparece con un patrón puntiforme que se sitúa a lo largo de los compartimentos del Golgi identificados con los distintos marcadores de proteínas residentes que usamos. No sabemos muy bien qué significado tiene este marcaje discontinuo, pero pensamos que podría representar el marcaje de una de las dos regiones definidas en el *stack* del Golgi: la zona central, más compacta y lisa, o la zona lateral que corresponde al área más dilatada y fenestrada (Kepes y col., 2005). En esta región más periférica aparecen dos tipos de proteínas de cubierta que también están en las vesículas nacientes y en la periferia de las cisternas (Weidman y col., 1993). Si hacemos homología con lo que ocurre en los eritrocitos, la parte central de las cisternas del Golgi correspondería a la zona central y más deprimida del disco bicóncavo, que es donde se encuentra el citoesqueleto de espectrina, dándole esta forma tan característica a los glóbulos rojos y facilitando su deformación a su paso por los capilares (Bennett y Baines, 2001). Esta distribución iría en consonancia con la idea de que la  $\beta$ III espectrina podría actuar como una proteína estabilizadora del Golgi, siendo un elemento clave de la malla proteica del mismo (De Matteis y Morrow, 1998; Lorra y Huttner, 1999). En cambio, si nos fijamos en las porciones laterales de las cisternas, el hecho de encontrar a la  $\beta$ III espectrina enriquecida en estas partes reforzaría la hipótesis de que la  $\beta$ III espectrina podría ser una proteína de cubierta de los ITs, participando así en el movimiento de éstos y en la selección del *cargo* a lo largo de la vía secretora (De Matteis y Morrow, 1998; Devarajan y col., 1997). Sin duda la localización ultraestructural de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi resolvería estas cuestiones, pero lamentablemente todas las aproximaciones que hemos realizado con nuestros anticuerpos para llevar a cabo estudios de inmunomicroscopía electrónica no han tenido éxito.

Se ha especulado mucho sobre el papel de la  $\beta$ III espectrina en el mantenimiento de la integridad de la arquitectura del Golgi. Se postula que el citoesqueleto de espectrina asociado al Golgi podría organizar la maquinaria molecular secretora controlando la distribución lateral de los componentes principales del Golgi (De Matteis y Morrow, 2000). Así, se formaría una barrera física en la región más compacta de las cisternas formada por el citoesqueleto basado en espectrina y actina, conjuntamente con determinados lípidos (por ejemplo aquellos con estructura cilíndrica) y proteínas (como las glicosiltransferasas). Esta estructura restringiría una zona en la membrana en la que biogénesis de ITs estaría impedida.

Los resultados de silenciamiento de la  $\beta$ III espectrina demuestran que ésta es necesaria para conservar la morfología de *ribbon* tan característica del Golgi en las células de mamífero, puesto que la depleción de su expresión mediante técnicas de ARN de interferencia conlleva a una fragmentación del orgánulo. Lo mismo sugiere los resultados de microinyección de anticuerpos anti- $\beta$ III espectrina, que neutralizan su función. Se ha postulado que el Golgi se fragmenta como respuesta a una disminución de la síntesis de PI(4,5)P<sub>2</sub>, hecho que podría ser debido a la disociación de la  $\beta$ III espectrina de las membranas del Golgi y su consiguiente fosforilación *in vitro* (Siddhanta y col., 2003). No podemos descartar que la  $\beta$ III espectrina sea susceptible de ser fosforilada (ver apartado III de la discusión) en las membranas del Golgi pero con nuestros anticuerpos y nuestras condiciones experimentales no hemos podido esclarecerlo, a pesar de que por WB detectamos un doblete que podría corresponder a la  $\beta$ III espectrina fosforilada y no fosforilada. Sin embargo, con los experimentos de silenciamiento solamente la banda de menor peso molecular es la que disminuye.

El análisis ultraestructural del Golgi en las células silenciadas contra la  $\beta$ III espectrina muestra una acumulación de perfiles vesiculares próximos a las cisternas del *trans*-Golgi, lo que concuerda con su mayor localización en los compartimentos distales del orgánulo. En cuanto a la integridad de las cisternas, esperábamos observar una dilatación de éstas al igual que sucede cuando las células se tratan con agentes perturbadores de la dinámica de actina (Lázaro-Diéguez y col., 2006). Sin embargo, la mayoría de las cisternas presentaban una morfología aplanada aunque pudimos apreciar una fragmentación variable de éstas. No obstante, observamos una dilatación en las zonas más distales del Golgi, identificadas por la localización de vesículas de clatrina. Se produjo también una desorganización general de la cinta del Golgi y la aparición de muchos *stacks* de menor tamaño, lo que concuerda con la fragmentación del Golgi vista por microscopía confocal. Este resultado sugiere que la  $\beta$ III espectrina participa en el mantenimiento del *ribbon* del Golgi pero no en la conservación de la morfología aplanada de las cisternas proximales, por lo que no se localizaría en la zona central de las mismas. Lamentablemente, tal y como se ha indicado anteriormente, ninguno de nuestros anticuerpos es apto para su empleo en inmunomicroscopía electrónica. También hemos detectado la presencia de unas estructuras vesiculares grandes con un cuerpo electodenso en su interior en las zonas distales del Golgi. Estos elementos podrían ser elementos muy dilatados del TGN o bien ITs que han quedado retenidos en la zona post-Golgi. Esto último concordaría con el bloqueo observado del transporte anterógrado de proteínas solubles y de membrana. Nuestros resultados irían en consonancia con el modelo SAATS que postula que la  $\beta$ III espectrina podría actuar como una proteína de cubierta vesicular mediando la captación y el transporte anterógrado de determinado *cargo*.

## II. LA $\beta$ III ESPECTRINA Y SU IMPLICACIÓN EN LA FUNCIONALIDAD SECRETORA DEL COMPLEJO DE GOLGI

Nuestros resultados demuestran que la fragmentación del Golgi en múltiples elementos dispersos como consecuencia de la depleción de la  $\beta$ III espectrina conlleva a una perturbación del transporte anterógrado de la glicoproteína G del VSV (una proteína integral de membrana) y de proteínas lumbales desde el RE hasta la MP y al medio extracelular, respectivamente. También hemos observado un bloqueo del reensamblaje del Golgi de las células silenciadas contra la  $\beta$ III espectrina después de eliminar la BFA o el NZ del medio de cultivo, lo cual es indicativo de alteraciones en el flujo de membrana anterógrado desde el RE al Golgi. Estas disfunciones podrían estar relacionadas con la reducida capacidad de reclutar el complejo motor de dineína/dinactina en ausencia de  $\beta$ III espectrina. Se ha propuesto un modelo que postula que la interacción de la subunidad de la dinactina Arp1 con la  $\beta$ III espectrina media la interacción directa del complejo dineína/dinactina con los ITs, manteniendo así activo el transporte de *cargo* vesicular específico mediado por dineína a lo largo de los MTs (Holleran y col., 2001). De este modo, la subunidad Arp1 interactuaría con la  $\beta$ III espectrina, que estaría actuando como cubierta de las vesículas transportadoras, reclutando así a la dineína hacia una población determinada de ITs. Estos resultados complementarían las observaciones anteriores (Muresan y col., 2001) que mostraban que la dineína, la dinactina y la espectrina eran necesarias para reconstituir el transporte dirigido hacia el extremo (-) de los MTs de vesículas axonales purificadas de calamar. Sin embargo, Holleran y col. muestran un solapamiento parcial de la distribución de la Arp1 con la de la  $\beta$ III espectrina, sugiriendo así que estas interacciones entre la dinactina y la  $\beta$ III espectrina podrían estar reguladas espacial y/o temporalmente en la célula (Holleran y col., 2001).

Por otro lado, hemos observado que los fragmentos del Golgi de las células silenciadas no se encuentran totalmente esparcidos por el citoplasma, sino que mantienen cierta localización perinuclear, en la zona del centrosoma. Probablemente este fenotipo más o menos radial de los fragmentos de Golgi que detectamos en muchas de las células silenciadas se debe a la actividad predominante en estas circunstancias del motor cinesina, la cual sólo podría verse compensada (al menos parcialmente) por la actividad residual (después del silenciamiento) de la  $\beta$ III espectrina unida al complejo motor de dineína/dinactina. Sería muy interesante saber el efecto que tendría el silenciamiento de la Arp1 sobre la  $\beta$ III espectrina y sobre la estructura y funcionalidad del Golgi.

Los resultados del transporte del fragmento B de la STx desde la MP hasta el RE y del desensamblaje del Golgi después de tratar a las células silenciadas contra la  $\beta$ III espectrina con

BFA o NZ indican que el transporte retrógrado es independiente de  $\beta$ III espectrina. Esto podría ser debido a la correcta funcionalidad del motor de MTs cinesina, puesto que en estudios anteriores se ha observado que el bloqueo de esta proteína inhibe el transporte del Golgi al RE en células tratadas con BFA (Lippincott-Schwartz y col., 1995) y la diseminación de los *mini-stacks* del Golgi a lo largo de los MTs remanentes en fibroblastos humanos tratados con bajas concentraciones de NZ (Minin, 1997).

En los experimentos de silenciamiento con el sistema lentiviral para generar una línea celular estable que no expresara la  $\beta$ III espectrina hemos observado una interrupción de la división celular que a largo plazo ha derivado en la muerte celular. Estudios anteriores han demostrado la existencia de  $\beta$ III espectrina en el surco de segmentación y en el huso mitótico de las células en división (Holleran y col., 2001). Otras proteínas del citoesqueleto de espectrina también se han localizado en el huso mitótico, como la anquirina de 195 kDa asociada al Golgi (Beck y col., 1997) y se ha demostrado que una isoforma de la proteína 4.1R interacciona con la proteína NuMa localizada en el huso mitótico, formando un complejo con la dineína y la dinactina (Mattagajasingh y col., 1999). La dinactina y la dineína participan en varios aspectos de la división celular, incluida la organización espacial y la orientación del huso mitótico, y las interacciones de los MTs con el cinetocoro (Holleran y col., 1998). Estas proteínas también se encuentran en el surco de segmentación que aparece durante la citocinesis de las células de mamífero en cultivo (Karki y col., 1998). La interacción de la  $\beta$ III espectrina con el complejo dineína/dinactina podría mediar el reclutamiento del complejo hacia el huso mitótico en las células en división. Por otro lado, se ha demostrado que la ausencia de ELF, una isoforma de  $\beta$  espectrina, perturba la señalización del TGF $\beta$  debido a la deslocalización de Smad3 y Smad4 y causa una disrupción de la transición G<sub>1</sub>/S del ciclo celular (Baek y col., 2006). Es posible que la  $\beta$ III espectrina intervenga de forma similar a ELF, desregulando algún punto de control del ciclo celular.

### III. LA ASOCIACIÓN DE $\beta$ III ESPECTRINA CON LAS MEMBRANAS DEL COMPLEJO DE GOLGI

Como ya hemos comentado anteriormente, la  $\beta$ III espectrina se distribuye mayoritariamente en los compartimentos distales del Golgi (*trans*-Golgi y TGN). No sabemos con exactitud qué determinantes establecen esta estructuración en gradiente a lo largo del Golgi, pero postulamos que el PI(4)P podría ser parcialmente responsable de ello. Está bien establecido la existencia de un gradiente de PI(4)P a lo largo del *stack* del Golgi, siendo la zona *cis*-Golgi la que está menos enriquecida en PI(4)P y la zona *trans*-Golgi y TGN la que más (De Matteis y Luini, 2008; Graham y Burd, 2011). Hemos demostrado la importancia que tiene el PI(4)P en la

asociación de la  $\beta$ III espectrina con las membranas del Golgi, puesto que al deplecionar el PI del orgánulo, la  $\beta$ III espectrina se desensambla de las membranas y se redistribuye por todo el citoplasma. Este resultado sugiere que la disposición en gradiente de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi podría seguir el gradiente del PI(4)P. Por consiguiente, la  $\beta$ III podría participar en la organización de las cisternas del Golgi, regulando la disponibilidad espacial del PI(4)P, que actuaría como sustrato en la homeostasis lipídica local.

Por otro lado, la  $\beta$ III espectrina también podría participar en el reclutamiento de proteínas que se unen al PI(4)P del Golgi y que están involucradas en la biogénesis de los ITs y en la homeostasis lipídica, como las proteínas OSBP, FAPP2, CERT y GOLPH3 (Graham y Burd, 2011; Dippold y col., 2009; Wood y col., 2009). La intervención de la  $\beta$ III espectrina en la regulación de la disponibilidad del PI(4)P del Golgi podría explicar el hecho de que los ITs del transporte secretor contengan menos PI(4)P en sus membranas del que hay en las membranas del TGN de las cuales han derivado (Mizuno-Yamasaki y col., 2010).

Sin embargo, todos los estudios realizados anteriormente postulan que la  $\beta$ III espectrina se une al PI(4,5)P<sub>2</sub> del Golgi, aunque éstos se han llevado a cabo *in vitro*. Se ha descrito que la GTPasa de bajo peso molecular ARF regula el ensamblaje del citoesqueleto de espectrina en el Golgi gracias a su habilidad para controlar los niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> de las membranas del Golgi (Godi y col., 1998). Nuestros resultados *in vivo* sugieren que el PI(4)P es más relevante que el PI(4,5)P<sub>2</sub> puesto que cuando sobreexpresamos otros dominios PH de unión al PI(4)P, la  $\beta$ III espectrina se ve desplazada de las membranas del Golgi debido, probablemente, a que su sitio de unión ya no es accesible.

Muchas proteínas citoesqueléticas y proteínas reguladoras del citoesqueleto, como la espectrina, contienen un dominio PH que se une débilmente a todos los PIs. En estos casos, las interacciones individuales con los PIs no serían suficientes para establecer las asociaciones de membrana. Por eso se postula que estas proteínas con dominios PH necesitan asociarse con ellas mismas y/o necesitan cooperación con otros dominios de anclaje en la misma molécula para dirigir la asociación de membrana. La mayoría de dominios PH requieren asistencia de otros dominios para ejercer sus funciones. Las interacciones débiles del dominio PH están dirigidas por atracciones electrostáticas inespecíficas o deslocalizadas entre el ligando aniónico y la carga positiva del dominio PH. Estas interacciones débiles por sí solas no son suficientes para dirigir la asociación de las proteínas que contienen un dominio PH con las membranas. El dominio PH de la  $\beta$  espectrina se une débilmente a todos los PIs. Se presupone, pues, que su ligando fisiológico será el PI más abundante, el PI(4,5)P<sub>2</sub> en la MP y el PI(4)P en el Golgi. Se ha demostrado *in vitro* que el dominio PH de la  $\beta$  espectrina se une a PI(4,5)P<sub>2</sub> con baja afinidad y poca especificidad (Harlan y col., 1994; Hyvönen y col., 1995). La red del citoesqueleto de

espectrina contiene muchas moléculas de espectrina, y por tanto, muchos dominios PH. Estos ensamblajes serían capaces de fortalecer la unión a membrana a pesar de que por sí solos son interacciones débiles. Por tanto el dominio PH de la  $\beta$ III espectrina no sería el responsable de dirigir la proteína hacia el Golgi pero sí que es el determinante de la asociación de la  $\beta$ III espectrina con las membranas del orgánulo.

Es posible que la unión de PIs observada *in vitro* no tenga relevancia *in vivo*, y que otros dominios de esta proteína u otros ligandos puedan ser más relevantes. Sin embargo, los dominios PH de este tipo tienden a permanecer en el citoplasma cuando se expresan de forma aislada. Nuestros resultados corroboran esta afirmación, puesto que al sobreexpresar el dominio PH de la  $\beta$ III espectrina lo detectamos en la MP y por el citoplasma, sugiriendo que la unión del dominio PH de la  $\beta$ III espectrina a las membranas del Golgi a través de los PIs coopera con otras interacciones mediadas por este mismo dominio PH o por otros dominios de la misma proteína.

Estudios *in vitro* han identificado tres sitios de unión a membrana llamados dominios MAD (del inglés *membrane association domain*) en las  $\beta$  espectrinas (MAD1-3) (Morrow y col., 1997; Lombardo y col., 1994; Davis y Bennett, 1994). El dominio MAD1 se encuentra en el N-terminal y se compone del dominio ABD y del sitio de unión a Arp1; el MAD2 está en el C-terminal y está formado por el dominio PH; el MAD3 comprende las repeticiones de espectrina  $\beta$ 3- $\beta$ 7. Se postula que los dominios MAD1 y 2 trabajan conjuntamente para dirigir la localización subcelular de la espectrina. Nuestros experimentos para elucidar la importancia de la unión de la  $\beta$ III espectrina con la actina asociada al Golgi indican claramente que ésta no es requerida para su localización en el Golgi. Hemos demostrado que la disrupción de la dinámica de actina no tiene ningún efecto sobre la localización de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi, lo que indica que la interacción con la actina podría tener un papel secundario (si es que tiene alguno). Otros estudios han revelado que la afinidad de la interacción actina-espectrina aumenta en presencia de aducina (Li y Bennett, 1996), siendo esta interacción mucho menos importante que la de Arp1 y  $\beta$ III espectrina. Sin embargo, a día de hoy no se ha detectado ninguna isoforma de aducina asociada al Golgi.

Una de las potenciales vías reguladoras que acontecen durante la remodelación de la estructura de las membranas es la fosforilación de la espectrina. Se ha demostrado que la fosforilación de la  $\beta$  espectrina es esencial en la desestabilización de la membrana eritrocitaria (Manno y col., 1995; Perrotta y col., 2001; Pinder y col., 1977), en el desensamblaje del citoesqueleto durante la mitosis (Fowler y Adam, 1992) y en el control de la estabilidad del Golgi (Siddhanta y col., 2003). Las  $\beta$  espectrinas de todos los tejidos animales tienen dominios PH en los extremos carboxilos (Macias y col., 1994; Zhang y col., 1995). Sin embargo, la

primera  $\beta$  espectrina que se aisló, la  $\beta$ I espectrina de los eritrocitos humanos, tiene un C-terminal más corto con una región única que puede ser fosforilada (Tang y Speicher, 2004). Lo mismo sucede con la  $\beta$ II espectrina de los mamíferos (Hayes y col., 2000; Bignone y col., 2007). El significado del *splicing* alternativo de la  $\beta$ I espectrina aún se desconoce. A pesar de que parece que está relacionado con las propiedades mecánicas de la membrana del eritrocito, no parece controlar la interacción de los dímeros de espectrina para formar los tetrámeros (Manno y col., 1995; Ungewickell y Gratzner, 1978).

En el caso del extremo carboxilo más corto de la  $\beta$ II espectrina, la fosforilación de un residuo treonina por la quinasa dependiente de AMPc o la proteína quinasa CK2 controla la interacción de los dímeros de espectrina (Bignone y col., 2007). Estudios fosfoproteómicos indican que todas las cadenas de espectrina humana pueden ser fosforiladas en los residuos que son distintos para cada producto génico (Rush y col., 2005; Collins y col., 2005; Olsen y col., 2006). Además, la región entre la última repetición de espectrina y el dominio PH de la isoforma más larga de la  $\beta$ II espectrina es altamente fosforilable aunque la correlación funcional de este evento aún no está clara. La  $\beta$ V espectrina también se puede fosforilar y podría estar involucrada en el mecanismo regulador de los canales de sodio (Nav1.5) a través de su fosforilación directa por parte de la quinasa dependiente de calcio/calmodulina II (Hund y col., 2010).

En cuanto a la  $\beta$ III espectrina, Siddhanta y col., (Siddhanta y col., 2003) observaron que la  $\beta$ III espectrina se puede fosforilar como resultado de una disminución en la síntesis de PI(4,5)P<sub>2</sub>. En su modelo postulan que cuando los niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> son basales, la mayor parte de la  $\beta$ III espectrina no está fosforilada y se encuentra unida a las membranas del Golgi, manteniendo así la morfología normal del orgánulo. Cuando los niveles de PI(4,5)P<sub>2</sub> disminuyen, una proteína quinasa regulada negativamente por el PI(4,5)P<sub>2</sub> se reclutaría y/o activaría en las membranas del Golgi. La fosforilación de la  $\beta$ III espectrina por una quinasa desconocida generaría la fosfoespectrina, que al disociarse de las membranas del Golgi, fragmentaría el orgánulo.

Con estas observaciones y nuestros resultados, nos planteamos establecer un modelo análogo con ciertas proteínas con características similares a las de la  $\beta$ III espectrina. Así, nos fijamos en la proteína FAPP1. La FAPP1 es una proteína adaptadora que controla la formación y fisión de las vesículas post-Golgi y regula el transporte secretor desde el TGN hasta la MP. Esta proteína es reclutada al Golgi a través de la unión de su dominio PH con el PI(4)P del orgánulo y con ARF1. La ARF1 activada recluta la PI4KIII $\beta$  a las membranas del Golgi, aumentando la concentración local de PI(4)P y estimulando la rápida acumulación de FAPP1 (Godi y col.,

2004). A través de este mecanismo, ARF también regula la unión de la espectrina con el Golgi (Godi y col., 1998).

Es interesante resaltar que el PI(4)P del Golgi recluta al TGN las proteínas FAPP1 y FAPP2, CERT y OSBP (Levine y Munro, 1998 y 2002; Nishikawa y col., 1998; Godi y col., 2004). Se postula que estas proteínas de unión a PI(4)P son cruciales para la regulación de la homeostasis lipídica en el TGN. Puesto que la  $\beta$ III espectrina se encuentra mayoritariamente en el TGN y se une al PI(4)P del Golgi, ésta podría participar en el mantenimiento de esta homeostasis lipídica.

Los niveles de estas proteínas en el TGN son controlados por la PKD. La PKD es una serina/treonina quinasa mayoritariamente citosólica que es reclutada al TGN. Su actividad quinasa es necesaria para la formación de un determinado tipo de ITs que llevan a cabo el transporte desde el TGN hasta la MP (Bard y Malhotra, 2006; Malhotra y Campelo, 2011). La PKD tiene dominios de unión a DAG (Baron y Malhotra, 2002) y a ARF1 (Pusapati y col., 2010) que la reclutan al TGN así como un dominio PH que regula negativamente su actividad (Iglesias y Rozengurt, 1998).

Se han identificado al menos tres sustratos de la PKD activada en el TGN: PI4KIII $\beta$ , CERT y OSBP. La fosforilación por parte de la PKD incrementa la actividad quinasa de la PI4KIII $\beta$ , que a su vez aumenta la producción de PI(4)P en el TGN (Hausser y col., 2005). La fosforilación de CERT (Fugmann y col., 2007) y OSBP (Nhek y col., 2010) por la PKD causa su disociación del TGN. Con los trabajos mencionados anteriormente sobre la fosforilación de la  $\beta$ III espectrina, hipotetizamos que la  $\beta$ III espectrina del TGN podría ser fosforilada por la PKD disminuyendo así su afinidad por el PI(4)P con lo que se disociaría de las membranas del Golgi bajo condiciones en las que fuera necesaria una remodelación del citoesqueleto, como por ejemplo durante la mitosis. Nuestros resultados muestran que la  $\beta$ III espectrina no es un sustrato fosforilable por la PKD, lo que nos inclina a descartar esta hipótesis. A pesar de ello, nuestros resultados sobre la fragmentación del Golgi son similares a los observados por Nhek y col., en los que sugieren que la localización constitutiva de la OSBP en el Golgi previene su fragmentación (Nhek y col., 2010). Consistentes con estos resultados, también se ha observado una fragmentación del Golgi al deplecionar los niveles de otra proteína de la familia OSBP (Ngo y Ridgway, 2009).

Recapitulando, este trabajo aporta nuevos datos sobre el papel de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi:

(1) La  $\beta$ III espectrina se distribuye a lo largo de todo el Golgi pero está enriquecida en los compartimentos distales de éste (*trans*-Golgi y TGN). El análisis ultraestructural de las células silenciadas contra la  $\beta$ III espectrina sugiere que ésta podría participar en el mantenimiento de la organización del Golgi puesto que se aprecia cierta desorganización estructural del *ribbon* del Golgi acompañada de una fragmentación de las cisternas en grado variable en ausencia de



$\beta$ III espectrina. En cambio, parece que no sería necesaria para compactar las cisternas ya que éstas no estaban tan dilatadas como esperábamos (sólo las cisternas más distales). Por tanto, proponemos un modelo mixto entre el modelo de malla y el modelo SAATS, en donde la  $\beta$ III espectrina estaría formando parte del andamiaje de proteínas que mantienen la cinta del Golgi.

**(2)** El hecho de que la  $\beta$ III espectrina se localice también en los compartimentos proximales explica el bloqueo del flujo de membrana y del transporte del VSV-G anterógrado en la zona RE/Golgi. Estas alteraciones pueden ser debidas a la incapacidad del complejo proteico dineína/dinactina de reclutar la  $\beta$ III espectrina al complejo motor. Sin embargo, el flujo de membrana retrógrado permanece inalterado, probablemente gracias al inalterado funcionamiento normal del motor cinesina, que se encarga del transporte de los ITs a través de los MTs hacia el extremo (+). Por otra parte, también observamos alteraciones en el transporte post-Golgi de proteínas solubles y de membrana, ya que como hemos comentado anteriormente la  $\beta$ III espectrina se encuentra enriquecida en las zonas distales. En el análisis ultraestructural, se observan estructuras vesiculares de gran tamaño que contienen un elemento electrodenso en su interior y que podrían ser transportadores que han quedado bloqueados en la zona post-Golgi debido a la ausencia de  $\beta$ III espectrina o bien elementos muy dilatados del TGN.

**(3)** Hasta ahora no se sabía qué elementos eran determinantes para la asociación de la  $\beta$ III espectrina al Golgi. Como hemos comentado anteriormente, existen al menos dos MADs en la  $\beta$ III espectrina. El MAD1 se encuentra en el N-terminal y es responsable de la unión de la  $\beta$ III espectrina con la actina y con la Arp1. Nuestros resultados han demostrado que la dinámica de actina no participa activamente en la localización de la  $\beta$ III espectrina en el Golgi. Además, al sobreexpresar el dominio ABD se observó marcaje de fibras de estrés y lamelipodios pero en ningún caso de Golgi. Estos resultados refuerzan otros estudios que han demostrado que la unión de espectrina-actina es débil y que predomina la unión con la subunidad Arp1 de la dineína. Por otra parte, hay que tener en cuenta que esta interacción con la actina se fortalece gracias a las proteínas 4.1 y aducina. El MAD2 se encuentra en el C-terminal y es dónde se dispone el dominio PH de unión a PIs. Hay muchos trabajos que describen la asociación de la  $\beta$ III espectrina con el Golgi a través del dominio PH que se une al PI(4,5)P<sub>5</sub> del Golgi. Se sugiere que esta asociación se debe principalmente a ARF1, una GTPasa pequeña que incrementa los niveles de PI(4)P y por tanto los de PI(4,5)P<sub>2</sub>. Nuestros resultados no descartan estas observaciones, pero demuestran que el PI(4)P resulta determinante en la unión de la  $\beta$ III espectrina con las membranas del Golgi. Por otro lado, la fosforilación de la  $\beta$ III espectrina también podría ser un factor a tener en cuenta en cuanto a los determinantes de unión al

Golgi, pero los resultados apuntan a que no es sustrato de la PKD, quinasa que es reclutada y activada en el TGN. Sí se sabe que la PKD fosforila a la PI4KIII $\beta$ , incrementando así la producción de PI(4)P en el TGN. Los niveles elevados de PI(4)P podrían favorecer la asociación de la  $\beta$ III espectrina con las membranas del Golgi a través de su dominio PH, con lo que la importancia de la fosforilación a través de este mecanismo sería indirecta.



## **CONCLUSIONES**

---



- 1.** La  $\beta$ III espectrina está enriquecida en los compartimentos distales del complejo de Golgi y participa en el transporte secretor tanto de proteínas luminales como de membrana.
  
- 2.** La  $\beta$ III espectrina es necesaria para el mantenimiento de la arquitectura en cinta del complejo de Golgi y muy probablemente en el aplanamiento de las cisternas distales.
  
- 3.** El fosfatidilinositol 4-fosfato es un determinante esencial en la asociación de la  $\beta$ III espectrina con las membranas del complejo de Golgi. En cambio, la actina no participa en esta asociación.
  
- 4.** La  $\beta$ III espectrina no es un sustrato fosforilable de la proteína quinasa D en el complejo de Golgi.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---





Abazeed ME, Fuller RS (2008) Yeast Golgi-localized, gamma-Ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins are but adaptor protein-1 is not required for cell-free transport of membrane proteins from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment. *Mol Biol Cell* 19: 4826-4836.

Allan VJ, Schroer TA (1999) Membrane motors. *Curr Opin Cell Biol* 11: 476-482.

Allan VJ, Thompson HM, McNiven MA (2002) Motoring around the Golgi. *Nat Cell Biol* 4: 236-242.

Almeida CG, Yamada A, Tenza D, Louvard D, Raposo G, 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: 779-789.

An X, Guo X, Gratzner W, Mohandas N (2005) Phospholipid binding by proteins of the spectrin family: a comparative study. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 794-800.

An X, Zhang X, Debnath G, Baines AJ, Mohandas N (2006) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) differentially regulates the interaction of human erythrocyte protein 4.1 (4.1R) with membrane proteins. *Biochemistry* 45: 5725-5732.

An XL, Takakuwa Y, Manno S, Han BG, Gascard P, Mohandas N (2001) Structural and functional characterization of protein 4.1R-phosphatidylserine interaction: potential role in 4.1R sorting within cells. *J Biol Chem* 276: 35778-35785

Anderson RG, Jacobson K (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296: 1821-1825.

Appenzeller C, Andersson H, Kappeler F, Hauri HP (1999) The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat Cell Biol* 1: 330-334.

Aridor M, Weissman J, Bannykh S, Nuoffer C, Balch WE (1998) Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J Cell Biol* 141: 61-70.

Attree O, Olivos IM, Okabe I, Bailey LC, Nelson DL, Lewis RA, McInnes RR, Nussbaum RL (1992) The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature* 358: 239-242.

Atz ME, Rollins B, Vawter MP (2007) NCAM1 association study of bipolar disorder and schizophrenia: polymorphisms and alternatively spliced isoforms lead to similarities and differences. *Psychiatr Genet* 17: 55-67.

Audhya A, Foti M, Emr SD (2000) Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Mol Biol Cell* 11: 2673-2689.

Axelsson MA, Karlsson NG, Steel DM, Ouwendijk J, Nilsson T, Hansson GC (2001) Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins. *Glycobiology* 11: 633-644.

Baek HJ, Kim SS, da Silva FM, Volpe EA, Evans S, Mishra B, Mishra L, Marshall MB (2006) Inactivation of TGF-beta signaling in lung cancer results in increased CDK4 activity that can be rescued by ELF. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 1150-1157.

Bagnato P, Barone V, Giacomello E, Rossi D, Sorrentino V (2003) Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J Cell Biol* 160: 245-253.

Baines AJ (2006) A FERM-adjacent (FA) region defines a subset of the 4.1 superfamily and is a potential regulator of FERM domain function. *BMC Genomics* 7: 85. 1471-2164.

Baines AJ (2010) The spectrin-ankyrin-4.1-adducin membrane skeleton: adapting eukaryotic cells to the demands of animal life. *Protoplasma* 244: 99-131.

Bannykh SI, Rowe T, Balch WE (1996) The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol* 135: 19-35.

Bannykh SI, Balch WE (1997) Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *J Cell Biol* 138: 1-4.

Bannykh SI, Nishimura N, Balch WE (1998) Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol* 8: 21-25.

Bañuelos S, Saraste M, Djinojic CK (1998) Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. *Structure* 6: 1419-1431.

Bard F, Mazelin L, Pechoux-Longin C, Malhotra V, Jurdic P (2003) Src regulates Golgi structure and KDEL receptor-dependent retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 278: 46601-46606.

Bard F, Malhotra V (2006) The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 439-455.

Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77: 895-907.

- Barlowe C (1998) COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1404: 67-76.
- Baron CL, Malhotra V (2002) Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* 295: 325-328.
- Barr FA, Nakamura N, Warren G (1998) Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *EMBO J* 17: 3258-3268.
- Bascom RA, Srinivasan S, Nussbaum RL (1999) Identification and characterization of golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain. *J Biol Chem* 274: 2953-2962.
- Becamel C, Gavarini S, Chanrion B, Alonso G, Galeotti N, Dumuis A, Bockaert J, Marin P (2004) The serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *J Biol Chem* 279: 20257-20266.
- Beck KA, Buchanan JA, Malhotra V, Nelson WJ (1994) Golgi spectrin: identification of an erythroid beta-spectrin homolog associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* 127: 707-723.
- Beck KA, Buchanan JA, Nelson WJ (1997) Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex. *J Cell Sci* 110 ( Pt 10): 1239-1249.
- Beck KA, Nelson WJ (1998) A spectrin membrane skeleton of the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* 1404: 153-160.
- Behnia R, Munro S (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438: 597-604.
- Bennett V (1978) Purification of an active proteolytic fragment of the membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *J Biol Chem* 253: 2292-2299.
- Bennett V (1979) Immunoreactive forms of human erythrocyte ankyrin are present in diverse cells and tissues. *Nature* 281: 597-599.
- Bennett V, Stenbuck PJ (1979) Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *J Biol Chem* 254: 2533-2541.
- Bennett V, Davis J, Fowler WE (1982) Brain spectrin, a membrane-associated protein related in structure and function to erythrocyte spectrin. *Nature* 299: 126-131.

Bennett V, Gardner K, Steiner JP (1988) Brain adducin: a protein kinase C substrate that may mediate site-directed assembly at the spectrin-actin junction. *J Biol Chem* 263: 5860-5869.

Bennett V, Baines AJ (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 81: 1353-1392.

Bennett V, Chen L (2001) Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol* 13: 61-67.

Bennett V, Healy J (2008) Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. *Trends Mol Med* 14: 28-36.

Bennett V, Healy J (2009) Membrane domains based on ankyrin and spectrin associated with cell-cell interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a003012.

Benting JH, Rietveld AG, 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: 313-320.

Benz PM, Blume C, Moebius J, Oschatz C, Schuh K, Sickmann A, Walter U, Feller SM, Renne T (2008) Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by alphaIIb-spectrin-VASP complexes. *J Cell Biol* 180: 205-219.

Berezuk MA, Schroer TA (2007) Dynactin enhances the processivity of kinesin-2. *Traffic* 8: 124-129.

Berghs S, Aggujaro D, Dirx R, Jr., Maksimova E, Stabach P, Hermel JM, Zhang JP, Philbrick W, Slepnev V, Ort T, Solimena M (2000) betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* 151: 985-1002.

Bethune J, Kol M, Hoffmann J, Reckmann I, Brugger B, Wieland F (2006) Coatamer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins. *Mol Cell Biol* 26: 8011-8021.

Bialkowska K, Saido TC, Fox JE (2005) SH3 domain of spectrin participates in the activation of Rac in specialized calpain-induced integrin signaling complexes. *J Cell Sci* 118: 381-395.

Bignone PA, King MD, Pinder JC, Baines AJ (2007) Phosphorylation of a threonine unique to the short C-terminal isoform of betaII-spectrin links regulation of alpha-beta spectrin interaction to neuritogenesis. *J Biol Chem* 282: 888-896.

Blackshear PJ (1993) The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J Biol Chem* 268: 1501-1504.

- Blagoveshchenskaya A, Cheong FY, Rohde HM, Glover G, Knodler A, Nicolson T, Boehmelt G, Mayinger P (2008) Integration of Golgi trafficking and growth factor signaling by the lipid phosphatase SAC1. *J Cell Biol* 180: 803-812.
- Blazquez M, Shennan KI (2000) Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway. *Biochem Cell Biol* 78: 181-191.
- Bloch RJ, Morrow JS (1989) An unusual beta-spectrin associated with clustered acetylcholine receptors. *J Cell Biol* 108: 481-493.
- Blumental-Perry A, Haney CJ, Weixel KM, Watkins SC, Weisz OA, Aridor M (2006) Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export. *Dev Cell* 11: 671-682.
- Bodine DM, Birkenmeier CS, Barker JE (1984) Spectrin deficient inherited hemolytic anemias in the mouse: characterization by spectrin synthesis and mRNA activity in reticulocytes. *Cell* 37: 721-729.
- Bonfanti L, Mironov AA, Jr., Martinez-Menarguez JA, Martella O, Fusella A, Baldassarre M, Buccione R, Geuze HJ, Mironov AA, Luini A (1998) Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* 95: 993-1003.
- Bonifacino JS, Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72: 395-447.
- Bonifacino JS, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153-166.
- Borzok MA, Catino DH, Nicholson JD, Kontogianni-Konstantopoulos A, Bloch RJ (2007) Mapping the binding site on small ankyrin 1 for obscurin. *J Biol Chem* 282: 32384-32396.
- Bournier O, Kroviarski Y, Rotter B, Nicolas G, Lecomte MC, Dhermy D (2006) Spectrin interacts with EVL (Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein), a protein involved in actin polymerization. *Biol Cell* 98: 279-293.
- Burkhardt JK, Echeverri CJ, Nilsson T, Vallee RB (1997) Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol* 139: 469-484.
- Burrige K, Kelly T, Mangeat P (1982) Nonerythrocyte spectrins: actin-membrane attachment proteins occurring in many cell types. *J Cell Biol* 95: 478-486.

Buss F, Luzio JP, Kendrick-Jones J (2002) Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic* 3: 851-858.

Byers TJ, Branton D (1985) Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6153-6157.

Byers TJ, Dubreuil R, Branton D, Kiehart DP, Goldstein LS (1987) *Drosophila* spectrin. II. Conserved features of the alpha-subunit are revealed by analysis of cDNA clones and fusion proteins. *J Cell Biol* 105: 2103-2110.

Byers TJ, Brandin E, Lue RA, Winograd E, Branton D (1992) The complete sequence of *Drosophila* beta-spectrin reveals supra-motifs comprising eight 106-residue segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6187-6191.

Campbell JL, Schekman R (1997) Selective packaging of cargo molecules into endoplasmic reticulum-derived COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 837-842.

Cao H, Weller S, Orth JD, Chen J, Huang B, Chen JL, Stamnes M, McNiven MA (2005) Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nat Cell Biol* 7: 483-492.

Carreno S, Engqvist-Goldstein AE, Zhang CX, McDonald KL, Drubin DG (2004) Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 165: 781-788.

Caviston JP, Holzbaur EL (2006) Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol* 16: 530-537.

Che A, Morrison IE, Pan R, Cherry RJ (1997) Restriction by ankyrin of band 3 rotational mobility in human erythrocyte membranes and reconstituted lipid vesicles. *Biochemistry* 36: 9588-9595.

Chen JL, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Stamnes M (2004) Cytosol-derived proteins are sufficient for Arp2/3 recruitment and ARF/coatomer-dependent actin polymerization on Golgi membranes. *FEBS Lett* 566: 281-286.

Chen JL, Fucini RV, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Stamnes M (2005) Coatomer-bound Cdc42 regulates dynein recruitment to COPI vesicles. *J Cell Biol* 169: 383-389.

Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, Liu SC, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N, Chasis JA, Conboy JG, Gascard P, Takakuwa Y, Huang SC, Benz EJ, Jr., Bretscher A, Fehon RG, Gusella JF, Ramesh V, Solomon F, Marchesi VT, Tsukita S, Tsukita S,

Hoover KB, . (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* 23: 281-282.

Chorzalska A, Lach A, Borowik T, Wolny M, Hryniewicz-Jankowska A, Kolondra A, Langner M, Sikorski AF (2010) The effect of the lipid-binding site of the ankyrin-binding domain of erythroid beta-spectrin on the properties of natural membranes and skeletal structures. *Cell Mol Biol Lett* 15: 406-423.

Cianci CD, Giorgi M, Morrow JS (1988) Phosphorylation of ankyrin down-regulates its cooperative interaction with spectrin and protein 3. *J Cell Biochem* 37: 301-315.

Cianci CD, Zhang Z, Pradhan D, Morrow JS (1999) Brain and muscle express a unique alternative transcript of alphaII spectrin. *Biochemistry* 38: 15721-15730.

Clarke M (1971) Isolation and characterization of a water-soluble protein from bovine erythrocyte membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 45(4): 1063-70.

Clarkson YL, Gillespie T, Perkins EM, Lyndon AR, Jackson M (2010) Beta-III spectrin mutation L253P associated with spinocerebellar ataxia type 5 interferes with binding to Arp1 and protein trafficking from the Golgi. *Hum Mol Genet* 19: 3634-3641.

Cockcroft S, Taylor JA, Judah JD (1985) Subcellular localisation of inositol lipid kinases in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 845: 163-170.

Collec E, Lecomte MC, El NW, Colin Y, Le Van KC (2011) Novel role for the Lu/BCAM-spectrin interaction in actin cytoskeleton reorganization. *Biochem J* 436: 699-708.

Collins MO, Yu L, Coba MP, Husi H, Campuzano I, Blackstock WP, Choudhary JS, Grant SG (2005) Proteomic analysis of in vivo phosphorylated synaptic proteins. *J Biol Chem* 280: 5972-5982.

Conboy J, Kan YW, Shohet SB, Mohandas N (1986) Molecular cloning of protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9512-9516.

Conboy J (1999) The role of alternative pre-mRNA splicing in regulating the structure and function of skeletal protein 4.1. *Proc Soc Exp Biol Med* 220: 73-78.

Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44.

Conrotto P, Yakymovych I, Yakymovych M, Souchelnytskyi S (2007) Interactome of transforming growth factor-beta type I receptor (TbetaRI): inhibition of TGFbeta signaling by Epac1. *J Proteome Res* 6: 287-297.



Coppolino MG, Dierckman R, Loijens J, Collins RF, Pouladi M, Jongstra-Bilen J, Schreiber AD, Trimble WS, Anderson R, Grinstein S (2002) Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase  $\alpha$  impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *J Biol Chem* 277: 43849-43857.

Corda D, Hidalgo CC, Bonazzi M, Luini A, Spano S (2002) Molecular aspects of membrane fission in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci* 59: 1819-1832.

Correas I, Speicher DW, Marchesi VT (1986a) Structure of the spectrin-actin binding site of erythrocyte protein 4.1. *J Biol Chem* 261: 13362-13366.

Correas I, Leto TL, Speicher DW, Marchesi VT (1986b) Identification of the functional site of erythrocyte protein 4.1 involved in spectrin-actin associations. *J Biol Chem* 261: 3310-3315.

Cox D, Berg JS, Cammer M, Chingwundoh JO, Dale BM, Cheney RE, Greenberg S (2002) Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nat Cell Biol* 4: 469-477.

Craig SW, Pardo JV (1983) Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites. *Cell Motil* 3: 449-462.

Cremona O, Di PG, Wenk MR, Luthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, McCormick DA, De CP (1999) Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99: 179-188.

Cronin TC, DiNitto JP, Czech MP, Lambright DG (2004) Structural determinants of phosphoinositide selectivity in splice variants of Grp1 family PH domains. *EMBO J* 23: 3711-3720.

Czech MP (2003) Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu Rev Physiol* 65: 791-815.

Czogalla A, Sikorski AF (2005) Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci* 62: 1913-1924.

D'Angelo G, Vicinanza M, di CA, De Matteis MA (2008) The multiple roles of PtdIns(4)P-not just the precursor of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. *J Cell Sci* 121: 1955-1963.

Davis L, Abdi K, Machius M, Brautigam C, Tomchick DR, Bennett V, Michaely P (2009) Localization and structure of the ankyrin-binding site on beta2-spectrin. *J Biol Chem* 284: 6982-6987.

- Davis LH, Bennett V (1994) Identification of two regions of beta G spectrin that bind to distinct sites in brain membranes. *J Biol Chem* 269: 4409-4416.
- De Matteis MA, Morrow JS (1998) The role of ankyrin and spectrin in membrane transport and domain formation. *Curr Opin Cell Biol* 10: 542-549.
- De Matteis MA, Morrow JS (2000) Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci* 113: 2331-2343.
- De Matteis MA, di CA, Godi A (2005) The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* 1744: 396-405.
- De Matteis MA, Luini A (2008) Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 273-284.
- De Matteis MA, Luini A (2011) Mendelian disorders of membrane trafficking. *N Engl J Med* 365: 927-938.
- de Cuevas M, Lee JK, Spradling AC (1996) alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the *Drosophila* ovary. *Development* 122: 3959-3968.
- Deacon SW, Serpinskaya AS, Vaughan PS, Lopez FM, Vernos I, Vaughan KT, Gelfand VI (2003) Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J Cell Biol* 160: 297-301.
- del Rio M, Imam A, DeLeon M, Gomez G, Mishra J, Ma Q, Parikh S, Devarajan P (2004) The death domain of kidney ankyrin interacts with Fas and promotes Fas-mediated cell death in renal epithelia. *J Am Soc Nephrol* 15: 41-51.
- Delaunay J (2007) The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev* 21: 1-20.
- Demaurex N (2002) pH Homeostasis of cellular organelles. *News Physiol Sci* 17: 1-5.
- Derick LH, Liu SC, Chishti AH, Palek J (1992) Protein immunolocalization in the spread erythrocyte membrane skeleton. *Eur J Cell Biol* 57: 317-320.
- Derry JM, Ochs HD, Francke U (1994) Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 78: 635-644.
- Devarajan P, Stabach PR, Mann AS, Ardito T, Kashgarian M, Morrow JS (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: 819-830.

Devarajan P, Stabach PR, De Matteis MA, Morrow JS (1997) Na,K-ATPase transport from endoplasmic reticulum to Golgi requires the Golgi spectrin-ankyrin G119 skeleton in Madin Darby canine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10711-10716.

di Campli A, Valderrama F, Babia T, De Matteis MA, Luini A, Egea G (1999) Morphological changes in the Golgi complex correlate with actin cytoskeleton rearrangements. *Cell Motil Cytoskeleton* 43: 334-348.

di Paolo G, Moskowitz HS, Gipson K, Wenk MR, Voronov S, Obayashi M, Flavell R, Fitzsimonds RM, Ryan TA, De CP (2004) Impaired PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* 431: 415-422.

di Paolo G, De CP (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443: 651-657.

DiNitto JP, Lambright DG (2006) Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains. *Biochim Biophys Acta* 1761: 850-867.

Dinter A, Berger EG (1998) Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* 109: 571-590.

Dippold HC, Ng MM, Farber-Katz SE, Lee SK, Kerr ML, Peterman MC, Sim R, Wiharto PA, Galbraith KA, Madhavarapu S, Fuchs GJ, Meerloo T, Farquhar MG, Zhou H, Field SJ (2009) GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4-phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell* 139: 337-351.

Discher D, Parra M, Conboy JG, Mohandas N (1993) Mechanochemistry of the alternatively spliced spectrin-actin binding domain in membrane skeletal protein 4.1. *J Biol Chem* 268: 7186-7195.

Discher DE, Winardi R, Schischmanoff PO, Parra M, Conboy JG, Mohandas N (1995) Mechanochemistry of protein 4.1's spectrin-actin-binding domain: ternary complex interactions, membrane binding, network integration, structural strengthening. *J Cell Biol* 130: 897-907.

Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ (1963) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100: 119-130.

Dong L, Chapline C, Mousseau B, Fowler L, Ramsay K, Stevens JL, Jaken S (1995) 35H, a sequence isolated as a protein kinase C binding protein, is a novel member of the adducin family. *J Biol Chem* 270: 25534-25540.

- Döppler H, Storz P, Li J, Comb MJ, Toker A (2005) A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* 280: 15013-15019.
- Drenckhahn D, Schluter K, Allen DP, Bennett V (1985) Colocalization of band 3 with ankyrin and spectrin at the basal membrane of intercalated cells in the rat kidney. *Science* 230: 1287-1289.
- Drenckhahn D, Bennett V (1987) Polarized distribution of Mr 210,000 and 190,000 analogs of erythrocyte ankyrin along the plasma membrane of transporting epithelia, neurons and photoreceptors. *Eur J Cell Biol* 43: 479-486.
- Dressman MA, Olivos-Glander IM, Nussbaum RL, Suchy SF (2000) Ocr1, a PtdIns(4,5)P(2) 5-phosphatase, is localized to the trans-Golgi network of fibroblasts and epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 48: 179-190.
- Drubin DG, Nelson WJ (1996) Origins of cell polarity. *Cell* 84: 335-344.
- Dubielecka PM, Grzybek M, Kolondra A, Jazwiec B, Draga A, Aleksandrowicz P, Kolodziejczyk M, Serwotka A, Dolinska-Krajewska B, Warchol J, Kuliczowski K, Sikorski AF (2010) Aggregation of spectrin and PKCtheta is an early hallmark of fludarabine/mitoxantrone/dexamethasone-induced apoptosis in Jurkat T and HL60 cells. *Mol Cell Biochem* 339: 63-77.
- Dubielecka PM, Ladwein KI, Xiong X, Migeotte I, Chorzalska A, Anderson KV, Sawicki JA, Rottner K, Stradal TE, Kotula L (2011) Essential role for Abi1 in embryonic survival and WAVE2 complex integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7022-7027.
- Dubreuil RR, Byers TJ, Sillman AL, Bar-Zvi D, Goldstein LS, Branton D (1989) The complete sequence of *Drosophila* alpha-spectrin: conservation of structural domains between alpha-spectrins and alpha-actinin. *J Cell Biol* 109: 2197-2205.
- Dubreuil RR, Maddux PB, Grushko TA, MacVicar GR (1997) Segregation of two spectrin isoforms: polarized membrane-binding sites direct polarized membrane skeleton assembly. *Mol Biol Cell* 8: 1933-1942.
- Dubreuil RR, Grushko T (1998) Genetic studies of spectrin: new life for a ghost protein. *Bioessays* 20: 875-878.
- Dubreuil RR, Wang P, Dahl S, Lee J, Goldstein LS (2000) *Drosophila* beta spectrin functions independently of alpha spectrin to polarize the Na,K ATPase in epithelial cells. *J Cell Biol* 149: 647-656.
- Duncan MC, Payne GS (2003) ENTH/ANTH domains expand to the Golgi. *Trends Cell Biol* 13: 211-215.

Duran JM, Valderrama F, Castel S, Magdalena J, Tomas M, Hosoya H, Renau-Piqueras J, Malhotra V, 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: 445-459.

Eber S, Lux SE (2004) Hereditary spherocytosis--defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Semin Hematol* 41: 118-141.

Echard A, Jollivet F, Martinez O, Lacapere JJ, Rousselet A, Janoueix-Lerosey I, Goud B (1998) Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* 279: 580-585.

Egea G (2001) Train trip into the cell: the Golgi Apparatus as the central station of the intracellular membrane traffic. *Ciencia al día Interacional* 4: 1-20.

Egea G, Ríos RM (2002) The role of the cytoskeleton in the structure and function of the Golgi apparatus. *The Golgi Apparatus-State of the art 110 after Camillo's Golgi discovery*, 270-300 (Capítulo de libro).

Egea G, Lazaro-Dieguez F, Vilella M (2006) Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 18: 168-178.

Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-2617.

Farquhar MG, Palade GE (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol* 8: 2-10.

Fath KR, Trimbur GM, Burgess DR (1997) Molecular motors and a spectrin matrix associate with Golgi membranes in vitro. *J Cell Biol* 139: 1169-1181.

Fath KR (2005) Characterization of myosin-II binding to Golgi stacks in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton* 60: 222-235.

Faulhammer F, Kanjilal-Kolar S, Knodler A, Lo J, Lee Y, Konrad G, Mayinger P (2007) Growth control of Golgi phosphoinositides by reciprocal localization of sac1 lipid phosphatase and pik1 4-kinase. *Traffic* 8: 1554-1567.

Field C, Li R, Oegema K (1999) Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr Opin Cell Biol* 11: 68-80.

Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, McMahon HT (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419: 361-366.

Fossel ET, Solomon AK (1981) Relation between red cell membrane (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase and band 3 protein. *Biochim Biophys Acta* 649: 557-571.

- Foti M, Audhya A, Emr SD (2001) Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology. *Mol Biol Cell* 12: 2396-2411.
- Fowler VM, Adam EJ (1992) Spectrin redistributes to the cytosol and is phosphorylated during mitosis in cultured cells. *J Cell Biol* 119: 1559-1572.
- Fucini RV, Navarrete A, Vadakkan C, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Stamnes M (2000) Activated ADP-ribosylation factor assembles distinct pools of actin on golgi membranes. *J Biol Chem* 275: 18824-18829.
- Fucini RV, Chen JL, Sharma C, Kessels MM, Stamnes M (2002) Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1. *Mol Biol Cell* 13: 621-631.
- Fugmann T, Hausser A, Schoffler P, Schmid S, Pfizenmaier K, Olayioye MA (2007) Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J Cell Biol* 178: 15-22.
- Fukuda M, Mikoshiba K (1996) Structure-function relationships of the mouse Gap1m. Determination of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding domain. *J Biol Chem* 271: 18838-18842.
- Gagelin C, Constantin B, Deprette C, Ludosky MA, Recouvreux M, Cartaud J, Cognard C, Raymond G, Kordeli E (2002) Identification of Ank(G107), a muscle-specific ankyrin-G isoform. *J Biol Chem* 277: 12978-12987.
- Gardner K, Bennett V (1987) Modulation of spectrin-actin assembly by erythrocyte adducin. *Nature* 328: 359-362.].
- Gascard P, Lee G, Coulombel L, Auffray I, Lum M, Parra M, Conboy JG, Mohandas N, Chasis JA (1998) Characterization of multiple isoforms of protein 4.1R expressed during erythroid terminal differentiation. *Blood* 92: 4404-4414.
- Gascard P, Nunomura W, Lee G, Walensky LD, Krauss SW, Takakuwa Y, Chasis JA, Mohandas N, Conboy JG (1999) Deciphering the nuclear import pathway for the cytoskeletal red cell protein 4.1R. *Mol Biol Cell* 10: 1783-1798.
- Gascard P, Parra MK, Zhao Z, Calinisan VR, Nunomura W, Rivkees SA, Mohandas N, Conboy JG (2004) Putative tumor suppressor protein 4.1B is differentially expressed in kidney and brain via alternative promoters and 5' alternative splicing. *Biochim Biophys Acta* 1680: 71-82.

Gauthier E, El NW, Wautier MP, Renaud O, Tchernia G, Delaunay J, Le Van KC, Colin Y (2010) Role of the interaction between Lu/BCAM and the spectrin-based membrane skeleton in the increased adhesion of hereditary spherocytosis red cells to laminin. *Br J Haematol* 148: 456-465.

Gaynor EC, Chen CY, Emr SD, Graham TR (1998) ARF is required for maintenance of yeast Golgi and endosome structure and function. *Mol Biol Cell* 9: 653-670.

Geli MI, Riezman H (1996) Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* 272: 533-535.

Ghaffari-Tabrizi N, Bauer B, Villunger A, Baier-Bitterlich G, Altman A, Utermann G, Uberall F, Baier G (1999) Protein kinase C $\theta$ , a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *Eur J Immunol* 29: 132-142.

Gimm JA, An X, Nunomura W, Mohandas N (2002) Functional characterization of spectrin-actin-binding domains in 4.1 family of proteins. *Biochemistry* 41: 7275-7282.

Girod A, Storrie B, Simpson JC, Johannes L, Goud B, Roberts LM, Lord JM, Nilsson T, Pepperkok R (1999) Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 1: 423-430.

Glantz SB, Cianci CD, Iyer R, Pradhan D, Wang KK, Morrow JS (2007) Sequential degradation of  $\alpha$ II and  $\beta$ II spectrin by calpain in glutamate or maitotoxin-stimulated cells. *Biochemistry* 46: 502-513.

Glenney JR, Jr., Glenney P, Osborn M, Weber K (1982a) An F-actin- and calmodulin-binding protein from isolated intestinal brush borders has a morphology related to spectrin. *Cell* 28: 843-854.

Glenney JR, Jr., Glenney P, Weber K (1982b) Erythroid spectrin, brain fodrin, and intestinal brush border proteins (TW-260/240) are related molecules containing a common calmodulin-binding subunit bound to a variant cell type-specific subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 4002-4005.

Glenney JR, Jr., Glenney P, Weber K (1983) The spectrin-related molecule, TW-260/240, cross-links the actin bundles of the microvillus rootlets in the brush borders of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 96: 1491-1496.

Glick BS, Malhotra V (1998) The curious status of the Golgi apparatus. *Cell* 95: 883-889.

Godi A, Santone I, Pertile P, Devarajan P, Stabach PR, Morrow JS, Di TG, Polishchuk R, Petrucci TC, Luini A, De Matteis MA (1998) ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8607-8612.

Godi A, Pertile P, Meyers R, Marra P, Di TG, Iurisci C, Luini A, Corda D, De Matteis MA (1999) ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 1: 280-287.

Godi A, di CA, Konstantakopoulos A, Di TG, Alessi DR, Kular GS, Daniele T, Marra P, Lucocq JM, De Matteis MA (2004) FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol* 6: 393-404.

Goodman SR, Zagon IS, Kulikowski RR (1981) Identification of a spectrin-like protein in nonerythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7570-7574.

Goodman SR, Yu J, Whitfield CF, Culp EN, Posnak EJ (1982) Erythrocyte membrane skeletal protein bands 4.1 a and b are sequence-related phosphoproteins. *J Biol Chem* 257: 4564-4569.

Gough LL, Beck KA (2004) The spectrin family member Syne-1 functions in retrograde transport from Golgi to ER. *Biochim Biophys Acta* 1693: 29-36.

Graham TR, Burd CG (2011). Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends Cell Biol* 21: 113-121.

Greenquist AC, Shohet SB, Bernstein SE (1978) Marked reduction of spectrin in hereditary spherocytosis in the common house mouse. *Blood* 51: 1149-1155.

Grum VL, Li D, MacDonald RI, Mondragon A (1999) Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility. *Cell* 98: 523-535.

Grzybek M, Chorzalska A, Bok E, Hryniewicz-Jankowska A, Czogalla A, Diakowski W, Sikorski AF (2006) Spectrin-phospholipid interactions. Existence of multiple kinds of binding sites? *Chem Phys Lipids* 141: 133-141.

Gu F, Aniento F, Parton RG, Gruenberg J (1997) Functional dissection of COP-I subunits in the biogenesis of multivesicular endosomes. *J Cell Biol* 139: 1183-1195.

Guo S, Stolz LE, Lemrow SM, York JD (1999) SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J Biol Chem* 274: 12990-12995.

Gyoeva FK, Bybikova EM, Minin AA (2000) An isoform of kinesin light chain specific for the Golgi complex. *J Cell Sci* 113: 2047-2054.



Haghnia M, Cavalli V, Shah SB, Schimmelpfeng K, Bruschi R, Yang G, Herrera C, Pilling A, Goldstein LS (2007) Dynactin is required for coordinated bidirectional motility, but not for dynein membrane attachment. *Mol Biol Cell* 18: 2081-2089.

Hall TG, Bennett V (1987) Regulatory domains of erythrocyte ankyrin. *J Biol Chem* 262: 10537-10545.

Hama H, Schnieders EA, Thorner J, Takemoto JY, DeWald DB (1999) Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 34294-34300.

Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, Nishijima M (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426: 803-809.

Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371: 168-170.

Haslam RJ, Coorsen JR (1993) Evidence that activation of phospholipase D can mediate secretion from permeabilized platelets. *Adv Exp Med Biol* 344: 149-164.

Hauri HP, Schweizer A (1992) The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr Opin Cell Biol* 4: 600-608.

Hausser A, Storz P, Martens S, Link G, Toker A, Pfizenmaier K (2005) Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 7: 880-886.

Hayes NV, Scott C, Heerkens E, Ohanian V, Maggs AM, Pinder JC, Kordeli E, Baines AJ (2000) Identification of a novel C-terminal variant of beta II spectrin: two isoforms of beta II spectrin have distinct intracellular locations and activities. *J Cell Sci* 113 ( Pt 11): 2023-2034.

He J, Haney RM, Vora M, Verkhusha VV, Stahelin RV, Kutateladze TG (2008) Molecular mechanism of membrane targeting by the GRP1 PH domain. *J Lipid Res* 49: 1807-1815.

Heimann K, Percival JM, Weinberger R, Gunning P, Stow JL (1999) Specific isoforms of actin-binding proteins on distinct populations of Golgi-derived vesicles. *J Biol Chem* 274: 10743-10750.

Helms JB, Zurzolo C (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5: 247-254.

- Heming TA, Traber DL, Hinder F, Bidani A (1995) Effects of bafilomycin A1 on cytosolic pH of sheep alveolar and peritoneal macrophages: evaluation of the pH-regulatory role of plasma membrane V-ATPases. *J Exp Biol* 198: 1711-1715.
- Hille-Rehfeld A (1995) Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1241: 177-194.
- Hiller G, Weber K (1977) Spectrin is absent in various tissue culture cells. *Nature* 266: 181-183.
- Hirschberg K, Miller CM, Ellenberg J, Presley JF, Siggia ED, Phair RD, Lippincott-Schwartz J (1998) Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol* 143: 1485-1503.
- Holappa K, Suokas M, Soininen P, 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.
- Holleran EA, Tokito MK, Karki S, Holzbaur EL (1996) Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. *J Cell Biol* 135: 1815-1829.
- Holleran EA, Karki S, Holzbaur EL (1998) The role of the dynactin complex in intracellular motility. *Int Rev Cytol* 182: 69-109.
- Holleran EA, Ligon LA, Tokito M, Stankewich MC, Morrow JS, Holzbaur EL (2001) beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. *J Biol Chem* 276: 36598-36605.
- Holzinger A, De RN, Emons AM, Lutz-Meindl U (1999) Spectrin-like proteins in green algae (Desmidiaceae). *Cell Biol Int* 23: 335-344.
- Hooek TC, Peters LL, Lux SE (1997) Isoforms of ankyrin-3 that lack the NH2-terminal repeats associate with mouse macrophage lysosomes. *J Cell Biol* 136: 1059-1070.
- Hopitzan AA, Baines AJ, Ludosky MA, Recouvreur M, Kordeli E (2005) Ankyrin-G in skeletal muscle: tissue-specific alternative splicing contributes to the complexity of the sarcolemmal cytoskeleton. *Exp Cell Res* 309: 86-98.
- Hopitzan AA, Baines AJ, Kordeli E (2006) Molecular evolution of ankyrin: gain of function in vertebrates by acquisition of an obscurin/titin-binding-related domain. *Mol Biol Evol* 23: 46-55.
- Hortsch M, Paisley KL, Tian MZ, Qian M, Bouley M, Chandler R (2002) The axonal localization of large *Drosophila* ankyrin2 protein isoforms is essential for neuronal functionality. *Mol Cell Neurosci* 20: 43-55.

Hu RJ, Moorthy S, Bennett V (1995) Expression of functional domains of beta G-spectrin disrupts epithelial morphology in cultured cells. *J Cell Biol* 128: 1069-1080

Hund TJ, Koval OM, Li J, Wright PJ, Qian L, Snyder JS, Gudmundsson H, Kline CF, Davidson NP, Cardona N, Rasband MN, Anderson ME, Mohler PJ (2010) A beta(IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest* 120: 3508-3519.

Hung LY, Tang CJ, Tang TK (2000) Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the gamma-tubulin complex. *Mol Cell Biol* 20: 7813-7825.

Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3: 661-669.

Hyvonen M, Macias MJ, Nilges M, Oschkinat H, Saraste M, Wilmanns M (1995) Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J* 14: 4676-4685.

Iglesias T, Rozengurt E (1998) Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 273: 410-416.

Iida N, Lokeshwar VB, Bourguignon LY (1994) Mapping the fodrin binding domain in CD45, a leukocyte membrane-associated tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 269: 28576-28583.

Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, Stevanin G, Durr A, Zuhlke C, Burk K, Clark HB, Brice A, Rothstein JD, Schut LJ, Day JW, Ranum LP (2006) Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 38: 184-190.

Ipsaro JJ, Huang L, Mondragon A (2009) Structures of the spectrin-ankyrin interaction binding domains. *Blood* 113: 5385-5393.

Ipsaro JJ, Mondragon A (2010) Structural basis for spectrin recognition by ankyrin. *Blood* 115: 4093-4101.

Irvine RF (2003) Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 349-360.

Isakoff SJ, Cardozo T, Andreev J, Li Z, Ferguson KM, Abagyan R, Lemmon MA, Aronheim A, Skolnik EY (1998) Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel in vivo assay in yeast. *EMBO J* 17: 5374-5387.

Jackson M, Song W, Liu MY, Jin L, Dykes-Hoberg M, Lin CI, Bowers WJ, Federoff HJ, Sternweis PC, Rothstein JD (2001) Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. *Nature* 410: 89-93.

Johannes L, Tenza D, Antony C, Goud B (1997) Retrograde transport of KDEL-bearing B-fragment of Shiga toxin. *J Biol Chem* 272: 19554-19561.

Jones AT (2007) Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med* 11: 670-684.

Jones DH, Morris JB, Morgan CP, Kondo H, Irvine RF, Cockcroft S (2000) Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment. *J Biol Chem* 275: 13962-13966.

Joshi R, Gilligan DM, Otto E, McLaughlin T, Bennett V (1991) Primary structure and domain organization of human alpha and beta adducin. *J Cell Biol* 115: 665-675.

Kakiuchi S, Sobue K, Kanda K, Morimoto K (1982) Purification of a 155 000 Mr calmodulin-binding protein from a microsomal fraction of brain. *FEBS Lett* 138: 173-177.

Kamal A, Ying Y, Anderson RG (1998) Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol* 142: 937-947.

Kang Q, Wang T, Zhang H, Mohandas N, An X (2009) A Golgi-associated protein 4.1B variant is required for assimilation of proteins in the membrane. *J Cell Sci* 122: 1091-1099.

Karinch AM, Zimmer WE, Goodman SR (1990) The identification and sequence of the actin-binding domain of human red blood cell beta-spectrin. *J Biol Chem* 265: 11833-11840.

Karki S, LaMonte B, Holzbaur EL (1998) Characterization of the p22 subunit of dynactin reveals the localization of cytoplasmic dynein and dynactin to the midbody of dividing cells. *J Cell Biol* 142: 1023-1034.

Kavran JM, Klein DE, Lee A, Falasca M, Isakoff SJ, Skolnik EY, Lemmon MA (1998) Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 273 (46): 30497-508.

Keller P, Toomre D, Diaz E, White J, Simons K (2001) Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat Cell Biol* 3: 140-149.

Kennedy SP, Warren SL, Forget BG, Morrow JS (1991) Ankyrin binds to the 15th repetitive unit of erythroid and nonerythroid beta-spectrin. *J Cell Biol* 115: 267-277.

Kepes F, Rambourg A, Satiat-Jeunemaitre B (2005) Morphodynamics of the secretory pathway. *Int Rev Cytol* 242: 55-120.

Kerkhoff E, Simpson JC, Leberfinger CB, Otto IM, Doerks T, Bork P, Rapp UR, Raabe T, Pepperkok R (2001) The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr Biol* 11: 1963-1968.

Kessels MM, Dong J, Leibig W, Westermann P, Qualmann B (2006) Complexes of syndapin II with dynamin II promote vesicle formation at the trans-Golgi network. *J Cell Sci* 119: 1504-1516.

Kim SS, Shetty K, Katuri V, Kitisin K, Baek HJ, Tang Y, Marshall B, Johnson L, Mishra B, Mishra L (2006) TGF-beta signaling pathway inactivation and cell cycle deregulation in the development of gastric cancer: role of the beta-spectrin, ELF. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 1216-1223.

Kirchhausen T (2007) Making COPII coats. *Cell* 129: 1251-1252.

Kitisin K, Saha T, Blake T, Golestaneh N, Deng M, Kim C, Tang Y, Shetty K, Mishra B, Mishra L (2007) Tgf-Beta signaling in development.

Kizhatil K, Davis JQ, Davis L, Hoffman J, Hogan BL, Bennett V (2007a) Ankyrin-G is a molecular partner of E-cadherin in epithelial cells and early embryos. *J Biol Chem* 282: 26552-26561.

Kizhatil K, Yoon W, Mohler PJ, Davis LH, Hoffman JA, Bennett V (2007b) Ankyrin-G and beta2-spectrin collaborate in biogenesis of lateral membrane of human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 282: 2029-2037.

Klarlund JK, Guilherme A, Holik JJ, Virbasius JV, Chawla A, Czech MP (1997) Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* 275: 1927-1930.

Komada M, Soriano P (2002) [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol* 156: 337-348.

Kontogianni-Konstantopoulos A, Jones EM, Van Rossum DB, Bloch RJ (2003) Obscurin is a ligand for small ankyrin 1 in skeletal muscle. *Mol Biol Cell* 14: 1138-1148.

Kordeli E, Lambert S, Bennett V (1995) AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J Biol Chem* 270: 2352-2359.

Kordeli E, Ludosky MA, Deprette C, Frappier T, Cartaud J (1998) AnkyrinG is associated with the postsynaptic membrane and the sarcoplasmic reticulum in the skeletal muscle fiber. *J Cell Sci* 111 ( Pt 15): 2197-2207.

Korsgren C, Peters LL, Lux SE (2010) Protein 4.2 binds to the carboxyl-terminal EF-hands of erythroid alpha-spectrin in a calcium- and calmodulin-dependent manner. *J Biol Chem* 285: 4757-4770.

- Kozlov MM (2001) Fission of biological membranes: interplay between dynamin and lipids. *Traffic* 2: 51-65.
- Kreis TE, Pepperkok R (1994) Coat proteins in intracellular membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 6: 533-537.
- Kuhlman PA, Hughes CA, Bennett V, Fowler VM (1996) A new function for adducin. Calcium/calmodulin-regulated capping of the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem* 271: 7986-7991.
- Kuhlman PA, Hughes CA, Bennett V, Fowler VM (1996) A new function for adducin. Calcium/calmodulin-regulated capping of the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem* 271: 7986-7991.
- Kuhlman PA, Fowler VM (1997) Purification and characterization of an alpha 1 beta 2 isoform of CapZ from human erythrocytes: cytosolic location and inability to bind to Mg<sup>2+</sup> ghosts suggest that erythrocyte actin filaments are capped by adducin. *Biochemistry* 36: 13461-13472.
- Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, Yoo LI, Vuopala K, Poyhonen M, Uhari M, Rogers M, Speck SH, Chatila T, Thomas ML (2000) Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med* 6: 343-345.
- Kunimoto M, Otto E, Bennett V (1991) A new 440-kD isoform is the major ankyrin in neonatal rat brain. *J Cell Biol* 115: 1319-1331.
- Kutateladze TG (2010) Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol* 6: 507-513.
- Kwiatkowska K, Sobota A (1999) Engagement of spectrin and actin in capping of FcγRIII revealed by studies on permeabilized U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 287-293.
- Lambert S, Yu H, Prchal JT, Lawler J, Ruff P, Speicher D, Cheung MC, Kan YW, Palek J (1990) cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1730-1734.
- Lazarides E, Nelson WJ (1982) Expression of spectrin in nonerythroid cells. *Cell* 31: 505-508..
- Lazarides E, Nelson WJ (1983) Erythrocyte and brain forms of spectrin in cerebellum: distinct membrane-cytoskeletal domains in neurons. *Science* 220: 1295-1296.
- Lázaro-Diéguéz F, Jimenez N, Barth H, Koster AJ, Renau-Piqueras J, Llopis JL, Burger KN, Egea G (2006) Actin filaments are involved in the maintenance of Golgi cisternae morphology and intra-Golgi pH. *Cell Motil Cytoskeleton* 63: 778-791.

Lázaro-Diéguez F, Colonna C, Cortegano M, Calvo M, Martínez SE, 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 (2008) Implicación de los filamentos de actina en la arquitectura, homeostasis y tráfico de salida del aparato de Golgi y estudio de la formación y degradación de un agrosoma de actina (Tesis doctoral).

Leclerc E, Vetter S (1998) Characterization of a calcium-dependent calmodulin-binding domain in the 135-kD human protein 4.1 isoform. *Eur J Biochem* 258: 567-571.

Lee A, Morrow JS, Fowler VM (2001) Caspase remodeling of the spectrin membrane skeleton during lens development and aging. *J Biol Chem* 276: 20735-20742.

Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 87-123.

Lefferts JA, Wang C, Sridharan D, Baralt M, Lambert MW (2009) The SH3 domain of alphaII spectrin is a target for the Fanconi anemia protein, FANCG. *Biochemistry* 48: 254-263.

Legendre K, Safieddine S, Kussel-Andermann P, Petit C, El-Amraoui A (2008) AlphaII-betaV spectrin bridges the plasma membrane and cortical lattice in the lateral wall of the auditory outer hair cells. *J Cell Sci* 121: 3347-3356.

Lemmon MA, Ferguson KM (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 350 Pt 1: 1-18.

Lemmon MA (2004) Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans* 32: 707-711.

Lemmon MA (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 99-111.

Lenart P, Bacher CP, Daigle N, Hand AR, Eils R, Terasaki M, Ellenberg J (2005) A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature* 436: 812-818.

Leshchynska I, Sytnyk V, Morrow JS, Schachner M (2003) Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKCbeta2 via betaII spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Cell Biol* 161: 625-639.

Leshchynska I, Tanaka MM, Schachner M, Sytnyk V (2011) Immobilized pool of NCAM180 in the postsynaptic membrane is homeostatically replenished by the flux of NCAM180 from extrasynaptic regions. *J Biol Chem* 286: 23397-23406.

- Levine J, Willard M (1981) Fodrin: axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells. *J Cell Biol* 90: 631-642.
- Levine TP, Munro S (1998) The pleckstrin homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes. *Curr Biol* 8: 729-739.
- Levine TP, Munro S (2002) Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr Biol* 12: 695-704.
- Lewis MJ, Pelham HR (1990) A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348: 162-163.
- Li D, Tang HY, Speicher DW (2008) A structural model of the erythrocyte spectrin heterodimer initiation site determined using homology modeling and chemical cross-linking. *J Biol Chem* 283: 1553-1562.
- Li X, Bennett V (1996) Identification of the spectrin subunit and domains required for formation of spectrin/adducin/actin complexes. *J Biol Chem* 271: 15695-15702.
- Li X, Matsuoka Y, Bennett V (1998). Adducin preferentially recruits spectrin to the fast growing ends of actin filaments in a complex requiring the MARCKS-related domain and a newly defined oligomerization domain. *J Biol Chem* 273: 19329-19338.
- Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van LJ, Malhotra V (2001) Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 104: 409-420.
- Lindmo K, Stenmark H (2006) Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci* 119: 605-614.
- Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, Berger EG, Hauri HP, Yuan LC, Klausner RD (1990) Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 60: 821-836.
- Lippincott-Schwartz J, Cole NB, Marotta A, Conrad PA, Bloom GS (1995) Kinesin is the motor for microtubule-mediated Golgi-to-ER membrane traffic. *J Cell Biol* 128: 293-306.
- Lippincott-Schwartz J (1998) Cytoskeletal proteins and Golgi dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 10: 52-59.
- Lippincott-Schwartz J, Liu W (2006) Insights into COPI coat assembly and function in living cells. *Trends Cell Biol* 16: e1-e4.



Liu SC, Derick LH, Palek J (1987) Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J Cell Biol* 104: 527-536.

Lombardo CR, Weed SA, Kennedy SP, Forget BG, Morrow JS (1994) Beta II-spectrin (fodrin) and beta I epsilon 2-spectrin (muscle) contain NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal membrane association domains (MAD1 and MAD2). *J Biol Chem* 269: 29212-29219.

Lorenzo DN, Li MG, Mische SE, Armbrust KR, Ranum LP, Hays TS (2010) Spectrin mutations that cause spinocerebellar ataxia type 5 impair axonal transport and induce neurodegeneration in *Drosophila*. *J Cell Biol* 189: 143-158.

Lorra C, Huttner WB (1999) The mesh hypothesis of Golgi dynamics. *Nat Cell Biol* 1: E113-E115.

Low PS (2009) Where spectrin snuggles with ankyrin. *Blood* 113: 5372-5373.

Luna A, Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Mato E, Duran JM, Ballesta J, Way M, Egea G (2002) Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. *Mol Biol Cell* 13: 866-879.

Luna EJ, Kidd GH, Branton D (1979) Identification by peptide analysis of the spectrin-binding protein in human erythrocytes. *J Biol Chem* 254: 2526-2532.

Lundberg S, Buevich AV, Sethson I, Edlund U, Backman L (1997) Calcium-binding mechanism of human nonerythroid alpha-spectrin EF-structures. *Biochemistry* 36: 7199-7208.

Luque CM, Lallena MJ, Perez-Ferreiro CM, de IY, De CG, Alonso MA, Correas I (1999) The N-terminal 209-aa domain of high molecular-weight 4.1R isoforms abrogates 4.1R targeting to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14925-14930.

Luque CM, Correas I (2000) A constitutive region is responsible for nuclear targeting of 4.1R: modulation by alternative sequences results in differential intracellular localization. *J Cell Sci* 113 ( Pt 13): 2485-2495.

Lux SE, John KM, Bennett V (1990) Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* 344: 36-42.

**M**achnicka B, Grochowalska R, Boguslawska DM, Sikorski AF, Lecomte MC (2012) Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling. *Cell Mol Life Sci* 69: 191-201.

Macias MJ, Musacchio A, Ponstingl H, Nilges M, Saraste M, Oschkinat H (1994) Structure of the pleckstrin homology domain from beta-spectrin. *Nature* 369: 675-677.

- Malhotra V, Campelo F (2011) PKD regulates membrane fission to generate TGN to cell surface transport carriers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. ppi: a005280. doi: 10.1101/cshperspect.a005280.
- Mangeat PH, Burridge K (1984) Immunoprecipitation of nonerythrocyte spectrin within live cells following microinjection of specific antibodies: relation to cytoskeletal structures. *J Cell Biol* 98: 1363-1377.
- Manna D, Albanese A, Park WS, Cho W (2007) Mechanistic basis of differential cellular responses of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate- and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 282: 32093-32105.
- Manno S, Takakuwa Y, Nagao K, Mohandas N (1995) Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta-spectrin phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 270: 5659-5665.
- Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N (2005) Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. *J Biol Chem* 280: 7581-7587.
- Marchesi VT, Steers E Jr (1968) Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. *Science* 159: 203-204.
- Marfatia SM, Lue RA, Branton D, Chishti AH (1994) In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C. *J Biol Chem* 269: 8631-8634.
- Marfatia SM, Lue RA, Branton D, Chishti AH (1995) Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 270: 715-719.
- Martinez O, Antony C, Pehau-Arnaudet G, Berger EG, Salamero J, Goud B (1997) GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1828-1833.
- Masso-Welch PA, Black JD, Erikson J, Repasky EA (1999) Polarized expression of immunoglobulin, spectrin, and protein kinase C beta II occurs in B cells from normal BALB/c, autoimmune lpr, and anti-ssDNA transgenic, tolerant mice. *J Leukoc Biol* 66: 617-624.
- Matanis T, Akhmanova A, Wulf P, Del NE, Weide T, Stepanova T, Galjart N, Grosveld F, Goud B, De Zeeuw CI, Barnekow A, Hoogenraad CC (2002) Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat Cell Biol* 4: 986-992.

Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Egea G (2004) Association of Cdc42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway with Golgi membranes. *Traffic* 5: 838-846.

Matsuoka Y, Hughes CA, Bennett V (1996) Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C. *J Biol Chem* 271: 25157-25166.

Matsuoka Y, Li X, Bennett V (1998) Adducin is an in vivo substrate for protein kinase C: phosphorylation in the MARCKS-related domain inhibits activity in promoting spectrin-actin complexes and occurs in many cells, including dendritic spines of neurons. *J Cell Biol* 142: 485-497.

Matsuoka Y, Li X, Bennett V (2000) Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci* 57: 884-895.

Mattagajasingh SN, Huang SC, Hartenstein JS, Snyder M, Marchesi VT, Benz EJ (1999) Anonerythroid isoform of protein 4.1R interacts with the nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein. *J Cell Biol* 145: 29-43.

Maxfield FR, McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 121-132.

Mayer AM, Pittner RA, Lipscomb GE, Spitzer JA (1993) Effect of in vivo TNF administration on superoxide production and PKC activity of rat alveolar macrophages. *Am J Physiol* 264: L43-L52.

McKeown C, Praitis V, Austin J (1998) sma-1 encodes a betaH-spectrin homolog required for *Caenorhabditis elegans* morphogenesis. *Development* 125: 2087-2098.

McMahon LW, Sangerman J, Goodman SR, Kumaresan K, Lambert MW (2001) Human alpha spectrin II and the FANCA, FANCC, and FANCG proteins bind to DNA containing psoralen interstrand cross-links. *Biochemistry* 40: 7025-7034.

McMahon LW, Zhang P, Sridharan DM, Lefferts JA, Lambert MW (2009) Knockdown of alphaII spectrin in normal human cells by siRNA leads to chromosomal instability and decreased DNA interstrand cross-link repair. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 288-293.

McNeill H, Ozawa M, Kemler R, Nelson WJ (1990) Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* 62: 309-316.

McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI, David C, Zhang X, Grabs D, Sossin WS, Bauerfeind R, Nemoto Y, De CP (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* 379: 353-357.

- Meary F, Metral S, Ferreira C, Eladari D, Colin Y, Lecomte MC, Nicolas G (2007) A mutant alphaII-spectrin designed to resist calpain and caspase cleavage questions the functional importance of this process in vivo. *J Biol Chem* 282: 14226-14237.
- Merrifield CJ, Feldman ME, Wan L, Almers W (2002) Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol* 4: 691-698.
- Merrifield CJ, Qualmann B, Kessels MM, Almers W (2004) Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 83: 13-18.
- Metral S, Machnicka B, Bigot S, Colin Y, Dhermy D, Lecomte MC (2009) AlphaII-spectrin is critical for cell adhesion and cell cycle. *J Biol Chem* 284: 2409-2418.
- Michaely P, Bennett V (1995) The ANK repeats of erythrocyte ankyrin form two distinct but cooperative binding sites for the erythrocyte anion exchanger. *J Biol Chem* 270: 22050-22057.
- Michaely P, Tomchick DR, Machius M, Anderson RG (2002) Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. *EMBO J* 21: 6387-6396.
- Miki H, Okada Y, Hirokawa N (2005) Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol* 15: 467-476.
- Milosevic I, Sorensen JB, Lang T, Krauss M, Nagy G, Haucke V, Jahn R, Neher E (2005) Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci* 25: 2557-2565.
- Minin AA (1997) Dispersal of Golgi apparatus in nocodazole-treated fibroblasts is a kinesin-
- Mironov AA, Weidman P, Luini A (1997) Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules. *J Cell Biol* 138: 481-484.
- Mironov AA, Weidman P, Luini A (1997) Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules. *J Cell Biol* 138: 481-484.
- Miserey-Lenkei S, Chalancon G, Bardin S, Formstecher E, Goud B, Echard A (2010) Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 12: 645-654.
- Mishra L, Cai T, Yu P, Monga SP, Mishra B (1999) Elf3 encodes a novel 200-kD beta-spectrin: role in liver development. *Oncogene* 18: 353-364.

Mizuno-Yamasaki E, Medkova M, Coleman J, Novick P (2010) Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev Cell* 18: 828-840.

Mohandas N, Gallagher PG (2008) Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112: 3939-3948.

Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V (2002) Ankyrins. *J Cell Sci* 115: 1565-1566.

Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le MH, Bennett V (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 421: 634-639.

Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, Priori SG, Keating MT, Bennett V (2004a) A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci* 101: 9137-9142.

Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG, Bennett V (2004b) Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci* 101: 17533-17538.

Mohler PJ, Davis JQ, Bennett V (2005) Ankyrin-B coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca exchanger, and InsP3 receptor in a cardiac T-tubule/SR microdomain. *PLoS Biol* 3:e423.

Mombers C, de GJ, Demel RA, van Deenen LL (1980) Spectrin-phospholipid interaction. A monolayer study. *Biochim Biophys Acta* 603: 52-62.

Moon RT, McMahon AP (1990) Generation of diversity in nonerythroid spectrins. Multiple polypeptides are predicted by sequence analysis of cDNAs encompassing the coding region of human nonerythroid alpha-spectrin. *J Biol Chem* 265: 4427-4433.

Moorthy S, Chen L, Bennett V (2000) *Caenorhabditis elegans* beta-G spectrin is dispensable for establishment of epithelial polarity, but essential for muscular and neuronal function. *J Cell Biol* 149: 915-930.

Moriyama Y, Nelson N (1989) H<sup>+</sup>-translocating ATPase in Golgi apparatus. Characterization as vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and its subunit structures. *J Biol Chem* 264: 18445-18450.

Morrow JS, Rimm DL, Kennedy SP, Cianci CD, Sinard JH, Weed SA (1997) Of membrane stability and mosaics: the spectrin cytoskeleton. *Handbook of Physiology* 485-540.

- Munro S, Pelham HR (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48: 899-907.
- Muresan V, Stankewich MC, Steffen W, Morrow JS, Holzbaaur EL, Schnapp BJ (2001) Dynactin-dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins: a role for spectrin and acidic phospholipids. *Mol Cell* 7: 173-183.
- Musacchio A, Noble M, Pauptit R, Wierenga R, Saraste M (1992) Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature* 359: 851-855.
- Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J, Saraste M (1993) The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biochem Sci* 18: 343-348.
- Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE, Warren G (1995) Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* 131: 1715-1726.
- Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K, Kanazawa H (2005) Four Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem* 280: 1561-1572.
- Nebi T, Pestonjamas KN, Leszyk JD, Crowley JL, Oh SW, Luna EJ (2002) Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J Biol Chem* 277: 43399-43409.
- Nedrelow JH, Cianci CD, Morrow JS (2003) c-Src binds alpha II spectrin's Src homology 3 (SH3) domain and blocks calpain susceptibility by phosphorylating Tyr1176. *J Biol Chem* 278: 7735-7741.
- Nelson WJ, Veshnock PJ (1986) Dynamics of membrane-skeleton (fodrin) organization during development of polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol* 103: 1751-1765.
- Nelson WJ, Shore EM, Wang AZ, Hammerton RW (1990) Identification of a membrane-cytoskeletal complex containing the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin), ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol* 110: 349-357.
- Nezis IP, Sagona AP, Schink KO, Stenmark H (2010) Divide and ProsPer: the emerging role of PtdIns3P in cytokinesis. *Trends Cell Biol* 20: 642-649.
- Ngo M, Ridgway ND (2009) Oxysterol binding protein-related Protein 9 (ORP9) is a cholesterol transfer protein that regulates Golgi structure and function. *Mol Biol Cell* 20: 1388-1399.

Nhek S, Ngo M, Yang X, Ng MM, Field SJ, Asara JM, Ridgway ND, Toker A (2010) Regulation of oxysterol-binding protein Golgi localization through protein kinase D-mediated phosphorylation. *Mol Biol Cell* 21: 2327-2337.

Nickel W (2005) Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 6: 607-614.

Nicolas G, Fournier CM, Galand C, Malbert-Colas L, Bournier O, Kroviarski Y, Bourgeois M, Camonis JH, Dhermy D, Grandchamp B, Lecomte MC (2002) Tyrosine phosphorylation regulates alpha II spectrin cleavage by calpain. *Mol Cell Biol* 22: 3527-3536.

Nicolas G, Fournier CM, Galand C, Malbert-Colas L, Bournier O, Kroviarski Y, Bourgeois M, Camonis JH, Dhermy D, Grandchamp B, Lecomte MC (2002) Tyrosine phosphorylation regulates alpha II spectrin cleavage by calpain. *Mol Cell Biol* 22: 3527-3536.

Nigg E, Cherry RJ (1979) Dimeric association of band 3 in the erythrocyte membrane demonstrated by protein diffusion measurements. *Nature* 277: 493-494.

Nilsson T, Jackson M, Peterson PA (1989) Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 58: 707-718.

Nishikawa K, Toker A, Wong K, Marignani PA, Johannes FJ, Cantley LC (1998) Association of protein kinase C $\mu$  with type II phosphatidylinositol 4-kinase and type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J Biol Chem* 273: 23126-23133.

Nonoyama S, Ochs HD (1998) Characterization of the Wiskott-Aldrich syndrome protein and its role in the disease. *Curr Opin Immunol* 10: 407-412.

Nunomura W, Takakuwa Y (2006) Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. *Front Biosci* 11: 1522-1539. 1901 [pii].

Nunomura W, Takakuwa Y (2006) Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. *Front Biosci* 11: 1522-1539.

Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB (2003) Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 31: 3635-3641.

Odell AF, Van Helden DF, Scott JL (2008) The spectrin cytoskeleton influences the surface expression and activation of human transient receptor potential channel 4 channels. *J Biol Chem* 283: 4395-4407.

Odorizzi G, Babst M, Emr SD (2000) Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* 25: 229-235.

- Okabe T, Sobue K (1987) Identification of a new 84/82 kDa calmodulin-binding protein, which also interacts with actin filaments, tubulin and spectrin, as synapsin I. *FEBS Lett* 213: 184-188.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnädig F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127: 635-648.
- Orci L, Stannan M, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, Sollner TH, Rothman JE (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 90: 335-349.
- Orci L, Ravazzola M, Volchuk A, Engel T, Gmachl M, Amherdt M, Perrelet A, Sollner TH, Rothman JE (2000) Anterograde flow of cargo across the golgi stack potentially mediated via bidirectional "percolating" COPI vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10400-10405.
- Otto E, Kunimoto M, McLaughlin T, Bennett V (1991) Isolation and characterization of cDNAs encoding human brain ankyrins reveal a family of alternatively spliced genes. *J Cell Biol* 114: 241-253.
- Palade G (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 867. 189
- Palek J, Lambert S (1990) Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 27: 290-332.
- Palmer KJ, Watson P, Stephens DJ (2005) The role of microtubules in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in mammalian cells. *Biochem Soc Symp* 1-13.
- Palokangas H, Ying M, Vaananen K, Saraste J (1998) Retrograde transport from the pre-Golgi intermediate compartment and the Golgi complex is affected by the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor bafilomycin A1. *Mol Biol Cell* 9: 3561-3578.
- Parkinson NJ, Olsson CL, Hallows JL, McKee-Johnson J, Keogh BP, Noben-Trauth K, Kujawa SG, Tempel BL (2001) Mutant beta-spectrin 4 causes auditory and motor neuropathies in quivering mice. *Nat Genet* 29: 61-65.
- Parra M, Gascard P, Walensky LD, Snyder SH, Mohandas N, Conboy JG (1998) Cloning and characterization of 4.1G (EPB41L2), a new member of the skeletal protein 4.1 (EPB41) gene family. *Genomics* 49: 298-306.
- Parra M, Gascard P, Walensky LD, Gimm JA, Blackshaw S, Chan N, Takakuwa Y, Berger T, Lee G, Chasis JA, Snyder SH, Mohandas N, Conboy JG (2000) Molecular and functional characterization of protein 4.1B, a novel member of the protein 4.1 family with high level, focal expression in brain. *J Biol Chem* 275: 3247-3255.



Parra M, Gee S, Chan N, Ryaboy D, Dubchak I, Mohandas N, Gascard PD, Conboy JG (2004) Differential domain evolution and complex RNA processing in a family of paralogous EPB41 (protein 4.1) genes facilitate expression of diverse tissue-specific isoforms. *Genomics* 84: 637-646.

Pelham HR (1991) Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Curr Opin Cell Biol* 3: 585-591.

Pelham HR, Rothman JE (2000) The debate about transport in the Golgi--two sides of the same coin? *Cell* 102: 713-719.

Percival JM, Hughes JA, Brown DL, Schevzov G, Heimann K, Vrhovski B, Bryce N, Stow JL, Gunning PW (2004) Targeting of a tropomyosin isoform to short microfilaments associated with the Golgi complex. *Mol Biol Cell* 15: 268-280.

Perkins EM, Clarkson YL, Sabatier N, Longhurst DM, Millward CP, Jack J, Toraiwa J, Watanabe M, Rothstein JD, Lyndon AR, Wyllie DJ, Dutia MB, Jackson M (2010) Loss of beta-III spectrin leads to Purkinje cell dysfunction recapitulating the behavior and neuropathology of spinocerebellar ataxia type 5 in humans. *J Neurosci* 30: 4857-4867.

Perrotta S, del Giudice EM, Iolascon A, De VM, Di PD, Cutillo S, Nobili B (2001) Reversible erythrocyte skeleton destabilization is modulated by beta-spectrin phosphorylation in childhood leukemia. *Leukemia* 15: 440-444.

Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N (2008) Hereditary spherocytosis. *Lancet* 372: 1411-1426.

Peters LL, John KM, Lu FM, Eicher EM, Higgins A, Yialamas M, Turtzo LC, Otsuka AJ, Lux SE (1995) Ank3 (epithelial ankyrin), a widely distributed new member of the ankyrin gene family and the major ankyrin in kidney, is expressed in alternatively spliced forms, including forms that lack the repeat domain. *J Cell Biol* 130: 313-330.

Peters LL, Weier HU, Walensky LD, Snyder SH, Parra M, Mohandas N, Conboy JG (1998) Four paralogous protein 4.1 genes map to distinct chromosomes in mouse and human. *Genomics* 54: 348-350.

Pinder JC, Bray D, Gratzer WB (1977) Control of interaction of spectrin and actin by phosphorylation. *Nature* 270: 752-754.

Pinder JC, Phethean J, Gratzer WB (1978). Spectrin in primitive erythrocytes. *FEBS Lett* 92: 278-282.

- Pinder JC, Pekrun A, Maggs AM, Brain AP, Gratzner WB (1995) Association state of human red blood cell band 3 and its interaction with ankyrin. *Blood* 85: 2951-2961.
- Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-465.
- Ponnambalam S, Baldwin SA (2003) Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol Membr Biol* 20: 129-139.
- Porter NC, Resneck WG, O'Neill A, Van Rossum DB, Stone MR, Bloch RJ (2005) Association of small ankyrin 1 with the sarcoplasmic reticulum. *Mol Membr Biol* 22: 421-432.
- Potter BA, Ihrke G, Bruns JR, Weixel KM, Weisz OA (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.
- Pradhan D, Morrow J (2002) The spectrin-ankyrin skeleton controls CD45 surface display and interleukin-2 production. *Immunity* 17: 303-315.
- Praefcke GJ, McMahon HT (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 133-147.
- Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ, Lippincott-Schwartz J (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389: 81-85.
- Pusapati GV, Krndija D, Armacki M, von WG, von BJ, Malhotra V, Adler G, Seufferlein T (2010) Role of the second cysteine-rich domain and Pro275 in protein kinase D2 interaction with ADP-ribosylation factor 1, trans-Golgi network recruitment, and protein transport. *Mol Biol Cell* 21: 1011-1022.
- Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 150: 111-116.
- Quintyne NJ, Gill SR, Eckley DM, Crego CL, Compton DA, Schroer TA (1999) Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. *J Cell Biol* 147: 321-334.
- Rabouille C, Klumperman J (2005) Opinion: The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 812-817.
- Rambourg A, Clermont Y (1990) Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus. *Eur J Cell Biol* 51: 189-200.

Ramez M, Blot-Chabaud M, Cluzeaud F, Chanan S, Patterson M, Walensky LD, Marfatia S, Baines AJ, Chasis JA, Conboy JG, Mohandas N, Gascard P (2003) Distinct distribution of specific members of protein 4.1 gene family in the mouse nephron. *Kidney Int* 63: 1321-1337. k

Ramirez IB, Lowe M (2009) Golgins and GRASPs: holding the Golgi together. *Semin Cell Dev Biol* 20: 770-779.

Ramser EM, Buck F, Schachner M, Tilling T (2010) Binding of alphall spectrin to 14-3-3beta is involved in NCAM-dependent neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 45: 66-74.

Raposo G, Cordonnier MN, Tenza D, Menichi B, Durrbach A, Louvard D, Coudrier E (1999) Association of myosin I alpha with endosomes and lysosomes in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 10: 1477-1494.

Repasky EA, Pollina CM, Menold MM, Hudecki MS (1986) Increased concentration of spectrin is observed in avian dystrophic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 802-806.

Rios RM, Bornens M (2003) The Golgi apparatus at the cell centre. *Curr Opin Cell Biol* 15: 60-66.

Robb VA, Gerber MA, Hart-Mahon EK, Gutmann DH (2005) Membrane localization of the U2 domain of Protein 4.1B is necessary and sufficient for meningioma growth suppression. *Oncogene* 24: 1946-1957.

Robinson MS, Bonifacino JS (2001) Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13: 444-453.

Rohatgi R, Ho HY, Kirschner MW (2000) Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* 150: 1299-1310.

Ross JL, Wallace K, Shuman H, Goldman YE, Holzbaur EL (2006) Processive bidirectional motion of dynein-dynactin complexes in vitro. *Nat Cell Biol* 8: 562-570.

Rothman JE (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372: 55-63.

Rotter B, Kroviarski Y, Nicolas G, Dhermy D, Lecomte MC (2004) Alphall-spectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding. *Biochem J* 378: 161-168.

Rotter B, Kroviarski Y, Nicolas G, Dhermy D, Lecomte MC (2004) Alphall-spectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding. *Biochem J* 378: 161-168.

Rotter B, Bournier O, Nicolas G, Dhermy D, Lecomte MC (2005) Alphall-spectrin interacts with Tes and EVL, two actin-binding proteins located at cell contacts. *Biochem J* 388: 631-638.

- Rowe T, Aridor M, McCaffery JM, Plutner H, Nuoffer C, Balch WE (1996) COPII vesicles derived from mammalian endoplasmic reticulum microsomes recruit COPI. *J Cell Biol* 135: 895-911.
- Roy A, Levine TP (2004) Multiple pools of phosphatidylinositol 4-phosphate detected using the pleckstrin homology domain of Osh2p. *J Biol Chem* 279: 44683-44689.
- Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, Roth MG, Luby-Phelps K, Marriott G, Hall A, Yin HL (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* 10: 311-320.
- Rubtsov AM, Lopina OD (2000) Ankyrins. *FEBS Lett* 482: 1-5.
- Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha XM, Polakiewicz RD, Comb MJ (2005) Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* 23: 94-101.
- Rybakin V, Stumpf M, Schulze A, Majoul IV, Noegel AA, Hasse A (2004) Coronin 7, the mammalian POD-1 homologue, localizes to the Golgi apparatus. *FEBS Lett* 573: 161-167.
- Saarikangas J, Zhao H, Lappalainen P (2010) Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev* 90: 259-289.
- Sahr KE, Laurila P, Kotula L, Scarpa AL, Coupal E, Leto TL, Linnenbach AJ, Winkelmann JC, Speicher DW, Marchesi VT (1990) The complete cDNA and polypeptide sequences of human erythroid alpha-spectrin. *J Biol Chem* 265: 4434-4443.
- Sakaguchi G, Orita S, Naito A, Maeda M, Igarashi H, Sasaki T, Takai Y (1998) A novel brain-specific isoform of beta spectrin: isolation and its interaction with Munc13. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 846-851.
- Salomao M, Chen K, Villalobos J, Mohandas N, An X, Chasis JA (2010) Hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis: aberrant protein sorting during erythroblast enucleation. *Blood* 116: 267-269.
- Saraste M, Hyvonen M (1995) Pleckstrin homology domains: a fact file. *Curr Opin Struct Biol* 5: 403-408.
- Sasaki T, Takasuga S, Sasaki J, Kofuji S, Eguchi S, Yamazaki M, Suzuki A (2009) Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog Lipid Res* 48: 307-343.
- Schafer DA (2002) Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14: 76-81.

Schafer DA, Weed SA, Binns D, Karginov AV, Parsons JT, Cooper JA (2002) Dynamin2 and cortactin regulate actin assembly and filament organization. *Curr Biol* 12: 1852-1857.

Schekman R, Orci L (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271: 1526-1533.

Schliwa M, Woehlke G (2003) Molecular motors. *Nature* 422: 759-765.

Schorr M, Then A, Tahirovic S, Hug N, Mayinger P (2001) The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. *Curr Biol* 11: 1421-1426.

Schroer TA (2004) Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 759-779.

Schuck S, Simons K (2004) Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* 117: 5955-5964.

Scott C, Keating L, Bellamy M, Baines AJ (2001) Protein 4.1 in forebrain postsynaptic density preparations: enrichment of 4.1 gene products and detection of 4.1R binding proteins. *Eur J Biochem* 268: 1084-1094.

Semenza JC, Hardwick KG, Dean N, Pelham HR (1990) ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* 61: 1349-1357.

Sesso A, de Faria FP, Iwamura ES, Correa H (1994) A three-dimensional reconstruction study of the rough ER-Golgi interface in serial thin sections of the pancreatic acinar cell of the rat. *J Cell Sci* 107 (Pt 3): 517-528.

Seto ES, Bellen HJ, Lloyd TE (2002) When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev* 16: 1314-1336.

Shen BW, Josephs R, Steck TL (1986) Ultrastructure of the intact skeleton of the human erythrocyte membrane. *J Cell Biol* 102: 997-1006.

Short B, Haas A, Barr FA (2005) Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1744: 383-395.

Shorter J, Watson R, Giannakou ME, Clarke M, Warren G, Barr FA (1999) GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *EMBO J* 18: 4949-4960.

Shorter J, Warren G (1999) A role for the vesicle tethering protein, p115, in the post-mitotic stacking of reassembling Golgi cisternae in a cell-free system. *J Cell Biol* 146: 57-70.

- Siddhanta A, Backer JM, Shields D (2000) Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the Golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. *J Biol Chem* 275: 12023-12031.
- Siddhanta A, Radulescu A, Stankewich MC, Morrow JS, Shields D (2003) Fragmentation of the Golgi apparatus. A role for beta III spectrin and synthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 278: 1957-1965.
- Sikorski AF, Terlecki G, Zagon IS, Goodman SR (1991) Synapsin I-mediated interaction of brain spectrin with synaptic vesicles. *J Cell Biol* 114: 313-318.
- Sikorski AF, Hanus-Lorenz B, Jezierski A, Dluzewski AR (2000) Interaction of membrane skeletal proteins with membrane lipid domain. *Acta Biochim Pol* 47: 565-578.
- Singh SM, Murray D (2003) Molecular modeling of the membrane targeting of phospholipase C pleckstrin homology domains. *Protein Sci* 12: 1934-1953.
- Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 12: 112-120.
- Soldati T, Schliwa M (2006) Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 897-908.
- Speicher DW, Weglarz L, DeSilva TM (1992) Properties of human red cell spectrin heterodimer (side-to-side) assembly and identification of an essential nucleation site. *J Biol Chem* 267: 14775-14782.
- Speicher DW, Ursitti JA (1994) Spectrin motif. Conformation of a mammoth protein. *Curr Biol* 4: 154-157.
- Sridharan D, Brown M, Lambert WC, McMahon LW, Lambert MW (2003) Nonerythroid alphaII spectrin is required for recruitment of FANCA and XPF to nuclear foci induced by DNA interstrand cross-links. *J Cell Sci* 116: 823-835.
- Sridharan DM, McMahon LW, Lambert MW (2006) AlphaII-Spectrin interacts with five groups of functionally important proteins in the nucleus. *Cell Biol Int* 30: 866-878.
- Stabach PR, Morrow JS (2000) Identification and characterization of beta V spectrin, a mammalian ortholog of *Drosophila* beta H spectrin. *J Biol Chem* 275: 21385-21395.
- Stabach PR, Simonovic I, Ranieri MA, Aboodi MS, Steitz TA, Simonovic M, Morrow JS (2009) The structure of the ankyrin-binding site of beta-spectrin reveals how tandem spectrin-repeats generate unique ligand-binding properties. *Blood* 113: 5377-5384.

Stamnes M (2002) Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol* 14: 428-433.

Stankewich MC, Tse WT, Peters LL, Ch'ng Y, John KM, Stabach PR, Devarajan P, Morrow JS, Lux SE (1998) A widely expressed betaIII spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14158-14163.

Stankewich MC, Gwynn B, Ardito T, Ji L, Kim J, Robledo RF, Lux SE, Peters LL, Morrow JS (2010) Targeted deletion of betaIII spectrin impairs synaptogenesis and generates ataxic and seizure phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 6022-6027.

Stefan CJ, Audhya A, Emr SD (2002) The yeast synaptojanin-like proteins control the cellular distribution of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. *Mol Biol Cell* 13: 542-557.

Storrie B, White J, Rottger S, Stelzer EH, Sukanuma T, Nilsson T (1998) Recycling of golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering. *J Cell Biol* 143: 1505-1521.

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.

Stow JL, Heimann K (1998) Vesicle budding on Golgi membranes: regulation by G proteins and myosin motors. *Biochim Biophys Acta* 1404: 161-171.

Sweeney DA, Siddhanta A, Shields D (2002) Fragmentation and re-assembly of the Golgi apparatus in vitro. A requirement for phosphatidic acid and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *J Biol Chem* 277: 3030-3039.

Tang HY, Speicher DW (2004) In vivo phosphorylation of human erythrocyte spectrin occurs in a sequential manner. *Biochemistry* 43: 4251-4262.

Tang Y, Katuri V, Dillner A, Mishra B, Deng CX, Mishra L (2003) Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science* 299: 574-577.

Taylor-Harris PM, Felkin LE, Birks EJ, Franklin RC, Yacoub MH, Baines AJ, Barton PJ, Pinder JC (2005a) Expression of human membrane skeleton protein genes for protein 4.1 and betaIIISigma2-spectrin assayed by real-time RT-PCR. *Cell Mol Biol Lett* 10: 135-149.

Taylor-Harris PM, Keating LA, Maggs AM, Phillips GW, Birks EJ, Franklin RC, Yacoub MH, Baines AJ, Pinder JC (2005b) Cardiac muscle cell cytoskeletal protein 4.1: analysis of transcripts and subcellular location-relevance to membrane integrity, microstructure, and possible role in heart failure. *Mamm Genome* 16: 137-151.

Tchilian EZ, Wallace DL, Wells RS, Flower DR, Morgan G, Beverley PC (2001) A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *J Immunol* 166: 1308-1313.

Tchilian EZ, Beverley PC (2006) Altered CD45 expression and disease. *Trends Immunol* 27: 146-153.

Thevananther S, Kolli AH, Devarajan P (1998) Identification of a novel ankyrin isoform (AnkG190) in kidney and lung that associates with the plasma membrane and binds alpha-Na, K-ATPase. *J Biol Chem* 273: 23952-23958.

Thomas GH, Zarnescu DC, Juedes AE, Bales MA, Londergan A, Korte CC, Kiehart DP (1998) Drosophila betaHeavy-spectrin is essential for development and contributes to specific cell fates in the eye. *Development* 125: 2125-2134.

Thompson JM, Ellis RE, Green EM, Winlove CP, Petrov PG (2008) Spectrin maintains the lateral order in phosphatidylserine monolayers. *Chem Phys Lipids* 151: 66-68.

Thorne-Tjomsland G, Dumontier M, Jamieson JC (1998) 3D topography of noncompact zone Golgi tubules in rat spermatids: a computer-assisted serial section reconstruction study. *Anat Rec* 250: 381-396.

Thyberg J, Moskalewski S (1999) Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* 246: 263-279.

Tillack TW, Marchesi SL, Marchesi VT, Steers E Jr (1970) A comparative study of spectrin: a protein isolated from red blood cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 200: 125-131.

Toth B, Balla A, Ma H, Knight ZA, Shokat KM, Balla T (2006) Phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi. *J Biol Chem* 281: 36369-36377.

Tran YK, Bogler O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF (1999) A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res* 59: 35-43.

Trave G, Lacombe PJ, Pfuhl M, Saraste M, Pastore A (1995) Molecular mechanism of the calcium-induced conformational change in the spectrin EF-hands. *EMBO J* 14: 4922-4931.

Trave G, Pastore A, Hyvonen M, Saraste M (1995) The C-terminal domain of alpha-spectrin is structurally related to calmodulin. *Eur J Biochem* 227: 35-42.



Trucco A, Polishchuk RS, Martella O, Di PA, Fusella A, Di GD, San PE, Beznoussenko GV, Polishchuk EV, Baldassarre M, Buccione R, Geerts WJ, Koster AJ, Burger KN, Mironov AA, Luini A (2004) Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat Cell Biol* 6: 1071-1081.

Trucco A, Polishchuk RS, Martella O, Di PA, Fusella A, Di GD, San PE, Beznoussenko GV, Polishchuk EV, Baldassarre M, Buccione R, Geerts WJ, Koster AJ, Burger KN, Mironov AA, Luini A (2004) Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat Cell Biol* 6: 1071-1081.

Trushin SA, Pennington KN, Algeciras-Schimmich A, Paya CV (1999) Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B in T lymphocytes. *J Biol Chem* 274: 22923-22931.

Tse WT, Tang J, Jin O, Korsgren C, John KM, Kung AL, Gwynn B, Peters LL, Lux SE (2001) A new spectrin, beta IV, has a major truncated isoform that associates with promyelocytic leukemia protein nuclear bodies and the nuclear matrix. *J Biol Chem* 276: 23974-23985.

Tyler JM, Reinhardt BN, Branton D (1980) Associations of erythrocyte membrane proteins. Binding of purified bands 2.1 and 4.1 to spectrin. *J Biol Chem* 255: 7034-7039.

Ungewickell E, Gratzer W (1978) Self-association of human spectrin. A thermodynamic and kinetic study. *Eur J Biochem* 88: 379-385.

Ungewickell E, Bennett PM, Calvert R, Ohanian V, Gratzer WB (1979) In vitro formation of a complex between cytoskeletal proteins of the human erythrocyte. *Nature* 280: 811-814.

Upadhyaya A, Sheetz MP (2004) Tension in tubulovesicular networks of Golgi and endoplasmic reticulum membranes. *Biophys J* 86: 2923-2928.

Ursitti JA, Fowler VM (1994) Immunolocalization of tropomodulin, tropomyosin and actin in spread human erythrocyte skeletons. *J Cell Sci* 107 ( Pt 6): 1633-1639.

Ursitti JA, Kotula L, DeSilva TM, Curtis PJ, Speicher DW (1996) Mapping the human erythrocyte beta-spectrin dimer initiation site using recombinant peptides and correlation of its phasing with the alpha-actinin dimer site. *J Biol Chem* 271: 6636-6644.

Valderrama F, Babia T, Ayala I, Kok JW, Renau-Piqueras J, 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, Babia T, Martinez-Menarguez JA, Ballesta J, Barth H, Chaponnier C, Renau-Piqueras J, Egea G (2000) The golgi-associated COPI-coated buds and vesicles contain beta/gamma -actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1560-1565.
- Valderrama F, Duran JM, Babia T, Barth H, Renau-Piqueras J, Egea G (2001) Actin microfilaments facilitate the retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *Traffic* 2: 717-726.
- Van Kim CL, Colin Y, Cartron JP (2006) Rh proteins: key structural and functional components
- van Deurs B, Roepstorff K, Hommelgaard AM, Sandvig K (2003) Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol* 13: 92-100.
- Varnai P, Balla T (2008) Live cell imaging of phosphoinositides with expressed inositide binding protein domains. *Methods* 46: 167-176.
- Vivero-Salmeron G, Ballesta J, Martinez-Menarguez JA (2008) Heterotypic tubular connections at the endoplasmic reticulum-Golgi complex interface. *Histochem Cell Biol* 130: 709-717.
- Volchuk A, Amherdt M, Ravazzola M, Brugger B, Rivera VM, Clackson T, Perrelet A, Sollner TH, Rothman JE, Orci L (2000) Megavesicles implicated in the rapid transport of intracisternal aggregates across the Golgi stack. *Cell* 102: 335-348.
- Walch-Solimena C, Novick P (1999) The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase pik1 regulates secretion at the Golgi. *Nat Cell Biol* 1: 523-525.
- Walensky LD, Blackshaw S, Liao D, Watkins CC, Weier HU, Parra M, Haganir RL, Conboy JG, Mohandas N, Snyder SH (1999) A novel neuron-enriched homolog of the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1. *J Neurosci* 19: 6457-6467.
- Wallace VA, Penninger JM, Kishihara K, Timms E, Shahinian A, Pircher H, Kundig TM, Ohashi PS, Mak TW (1997) Alterations in the level of CD45 surface expression affect the outcome of thymic selection. *J Immunol* 158: 3205-3214.
- Wang C, Lambert MW (2010) The Fanconi anemia protein, FANCG, binds to the ERCC1-XPF endonuclease via its tetratricopeptide repeats and the central domain of ERCC1. *Biochemistry* 49: 5560-5569.
- Wang DS, Miller R, Shaw R, Shaw G (1996) The pleckstrin homology domain of human beta I sigma II spectrin is targeted to the plasma membrane in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 420-426.

Wang J, Sun HQ, Macia E, Kirchhausen T, Watson H, Bonifacino JS, Yin HL (2007) PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Mol Biol Cell* 18: 2646-2655.

Wang KK, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, Glantz SB, Morrow JS (1998) Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* 273: 22490-22497.

Wang QJ (2006) PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci* 27: 317-323.

Wang YJ, Wang J, Sun HQ, Martinez M, Sun YX, Macia E, Kirchhausen T, Albanesi JP, Roth MG, Yin HL (2003) Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* 114: 299-310.

Watson P, Forster R, Palmer KJ, Pepperkok R, Stephens DJ (2005) Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin. *Nat Cell Biol* 7: 48-55.

Watt SA, Kular G, Fleming IN, Downes CP, Lucocq JM (2002) Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J* 363: 657-666.

Weidman P, Roth R, Heuser J (1993) Golgi membrane dynamics imaged by freeze-etch electron microscopy: views of different membrane coatings involved in tubulation versus vesiculation. *Cell* 75: 123-133.

Weixel KM, Blumental-Perry A, Watkins SC, Aridor M, Weisz OA (2005) Distinct Golgi populations of phosphatidylinositol 4-phosphate regulated by phosphatidylinositol 4-kinases. *J Biol Chem* 280: 10501-10508.

Wenk MR, De CP (2004) Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8262-8269.

Winkelman JC, Chang JG, Tse WT, Scarpa AL, Marchesi VT, Forget BG (1990) Full-length sequence of the cDNA for human erythroid beta-spectrin. *J Biol Chem* 265: 11827-11832.

Winkelman JC, Forget BG (1993) Erythroid and nonerythroid spectrins. *Blood* 81: 3173-3185.

Wolny M, Grzybek M, Bok E, Chorzalska A, Lenoir M, Czogalla A, Adamczyk K, Kolondra A, Diakowski W, Overduin M, Sikorski AF (2011) Key amino acid residues of ankyrin-sensitive

phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine-lipid binding site of beta-spectrin. *PLoS One* 6: e21538. 1

Wood CS, Schmitz KR, Bessman NJ, Setty TG, Ferguson KM, Burd CG (2009) PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking. *J Cell Biol* 187: 967-975.

Wozniak MJ, Allan VJ (2006) Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms. *EMBO J* 25: 5457-5468.

Wu S, Sangerman J, Li M, Brough GH, Goodman SR, Stevens T (2001) Essential control of an endothelial cell ISOC by the spectrin membrane skeleton. *J Cell Biol* 154: 1225-1233.

Wu WJ, Erickson JW, Lin R, Cerione RA (2000) The gamma-subunit of the coatamer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature* 405: 800-804.

Ye K, Compton DA, Lai MM, Walensky LD, Snyder SH (1999) Protein 4.1N binding to nuclear mitotic apparatus protein in PC12 cells mediates the antiproliferative actions of nerve growth factor. *J Neurosci* 19: 10747-10756.

Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ (1999) New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* 79: 73-98.

Yu J, Tarnecki R, Chambers WW, Liu CN, Konorski J (1973) Mechanisms mediating ipsilateral limb hyperflexion after cerebellar paravermal cortical ablation or cooling. *Exp Neurol* 38: 144-156.

Yu J, Steck TL (1975) Isolation and characterization of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 250: 9170-9175.

Yu J, Goodman SR (1979). Syndeins: the spectrin-binding protein(s) of the human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 2340-2344.

Zhang P, Talluri S, Deng H, Branton D, Wagner G (1995) Solution structure of the pleckstrin homology domain of *Drosophila* beta-spectrin. *Structure* 3: 1185-1195.

Zhang X, Hartz PA, Philip E, Racusen LC, Majerus PW (1998) Cell lines from kidney proximal tubules of a patient with Lowe syndrome lack OCRL inositol polyphosphate 5-phosphatase and accumulate phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 273: 1574-1582.

Zhang Y, Resneck WG, Lee PC, Randall WR, Bloch RJ, Ursitti JA (2010) Characterization and expression of a heart-selective alternatively spliced variant of alpha II-spectrin, cardi+, during development in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 48: 1050-1059.

Zhou D, Birkenmeier CS, Williams MW, Sharp JJ, Barker JE, Bloch RJ (1997) Small, membrane-bound, alternatively spliced forms of ankyrin 1 associated with the sarcoplasmic reticulum of mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol* 136: 621-631.

Ziemnicka-Kotula D, Xu J, Gu H, Potempska A, Kim KS, Jenkins EC, Trenkner E, Kotula L (1998) Identification of a candidate human spectrin Src homology 3 domain-binding protein suggests a general mechanism of association of tyrosine kinases with the spectrin-based membrane skeleton. *J Biol Chem* 273: 13681-13692.

**ANEXO**

---



**Manuscrito enviado a Journal of Biological Chemistry**

Dear Dr. Egea:

We have received your manuscript entitled: " $\beta$ III spectrin regulates the structural integrity and the secretory protein transport of the Golgi complex".

It has been given the number JBC/2012/406462 and has been assigned to:

Dr. Simoni

Associate Editor

Journal of Biological Chemistry



$\beta$ III spectrin regulates the structural integrity and the secretory protein transport of the Golgi complex

Laia Salcedo-Sicilia<sup>1</sup>, Susana Granell<sup>1</sup>, Marko Jovic<sup>2</sup>, Adrià Sicart<sup>1</sup>, Eugenia Mato<sup>1,5</sup>, Ludger Johannes<sup>3,4</sup>, Tamas Balla<sup>2</sup> and Gustavo Egea<sup>1,6,7</sup>

<sup>1</sup>From the Department de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Section on Molecular Signal Transduction, Program for Developmental Neuroscience, NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, USA; <sup>3</sup>Institut Curie, Centre de Recherche, Traffic, Signaling and Delivery group, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France; <sup>4</sup>CNRS UMR144, France; <sup>5</sup>CIBER-BBN (Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Instituts d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS) i de Nanociència i Nanotecnologia (IN2UB), 08036 Barcelona, Spain.

<sup>7</sup>To whom correspondence should be addressed: Gustavo Egea, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, C/ Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain. Tel: (34) 934021909; Fax: (34) 934021907; E-mail: gegea@ub.edu

**Keywords:** Spectrin; Golgi; membrane trafficking; phosphatidylinositol 4-phosphate

**Background:**  $\beta$ III spectrin localizes to Golgi complex but its function remains unclear.

**Results:**  $\beta$ III spectrin is necessary for the organization of the Golgi complex and for the anterograde but not retrograde transport.

**Conclusion:**  $\beta$ III spectrin is a major skeletal component of distal Golgi compartments that maintains its structure and secretory pathway, and that, PI4P contributes to its association with Golgi membranes.

**Significance:** We here show new in vivo evidences about the role of  $\beta$ III spectrin at the Golgi complex.

#### SUMMARY

A spectrin-based cytoskeleton is associated with endomembranes including the Golgi complex and cytoplasmic vesicles but its role remains poorly understood. Using new generated antibodies to specific peptide sequences of the human  $\beta$ III spectrin, we here show its distribution in the Golgi complex, where it is enriched in the *trans*-Golgi and *trans*-Golgi network (TGN). The use of a drug-inducible enzymatic assay that deplete the Golgi-associated pool of PI4P as well as the

expression of PH domains of Golgi proteins that specifically recognize this phosphoinositide both displaced  $\beta$ III spectrin from the Golgi. However, the interference with actin dynamics using actin toxins did not affect the localization of  $\beta$ III spectrin to Golgi membranes. Depletion of  $\beta$ III spectrin using siRNA technology and the microinjection of anti- $\beta$ III spectrin antibodies into the cytoplasm lead to the fragmentation of the Golgi. Using a variety of protein transport assays, we show that the ER-to-Golgi and post-Golgi protein transports were impaired in  $\beta$ III spectrin-depleted cells. However, the internalization of the Shiga toxin subunit B to the ER was unaffected. We state that  $\beta$ III spectrin constitutes a major skeletal component of distal Golgi compartments, where it is necessary to maintain its structural integrity and secretory activity, and unlike actin, PIP4 appears to be highly relevant for the association of  $\beta$ III spectrin the Golgi complex.

There is a spectrin-based skeleton that supports cell shape and maintains the organization and stability of the plasma membrane and its mechanical properties (1–3). Spectrin is a

cytoskeletal protein that binds simultaneously to integral membrane proteins, cytosolic proteins and certain phospholipids to create a multifunctional scaffold. Spectrins are composed of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, which are assembled side by side to form rod-like  $\alpha\beta$  dimers, which in turn self-associate to form tetramers. However,  $\beta$ -spectrins can also exist as homopolymeric complexes. While mammalian red blood cells contain only one type of spectrin tetramer ( $\alpha\beta$  subunits), nucleated cells contain numerous isoforms of both subunits, which are located in diverse endomembrane systems. The existence of a Golgi-localized, spectrin membrane skeleton was reported almost 20 years ago (4). Similarly to what occurs in erythrocytes and other cell types, such as epithelial cells (5,6), Golgi-localized spectrin could act as an extensive, two-dimensional interactive platform on the cytoplasmic surface of Golgi cisternae regulating its shape and transport functions (7–9). First evidences of spectrin on Golgi and cytoplasm vesicles were based on the reactivity of erythroid  $\beta$ I spectrin-specific antibodies with a single polypeptide in purified rat liver Golgi membranes with a similar molecular weight to erythroid  $\beta$  spectrin ( $\approx$ 220 KDa), and on the ability of  $\beta$ I spectrin peptides to compete with the function of Golgi spectrin (10,11). Due to the problems with its precise molecular identification, this band was initially referred to as  $\beta$ I $\Sigma^*$  spectrin, but after definite identification it was named  $\beta$ III spectrin (12). Over the years, specific isoforms of spectrin-binding partners typically present in the plasma membrane of red blood cells have been localized in the Golgi, such as ankyrin (Ank<sub>G119</sub> and Ank<sub>195</sub>) (13,14), protein 4.1 (4.1B) (15), anion exchanger (AE2) (16), and tropomyosin (17).

Disruption of the Golgi by brefeldin A (BFA) quickly releases spectrin from the Golgi, which suggests that its recruitment to Golgi membranes is ARF-dependent (4,18).  $\beta$ III spectrin interacts with PI(4,5)P<sub>2</sub> (18–20), and in the absence of its synthesis,  $\beta$ III spectrin is phosphorylated at Ser and/or Thr residues leading to its partial dissociation from the Golgi and to its fragmentation (21). In respect to protein trafficking, overexpression of the N-terminal five repeats of  $\beta$ I $\Sigma^*$  spectrin disrupts Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase delivery to the plasma membrane (22). Post-Golgi trafficking of

glutamate transporter EAAT4 and other synaptic proteins is also impaired when mutations in the  $\beta$ III spectrin occur in spinocerebellar ataxia type 5 (23–27).  $\beta$  spectrin participates in the dynein-mediated cargo (melanin) and organelle transport (melanosomes) along microtubules (28), and  $\beta$ III spectrin binds to the dynactin subunit Arp1 *in vitro* (29). In late endosomes, it requires the active action of the tripartite complex Rab7-RILP and ORP1L for their dynein-dependent translocation to the minus-end of microtubules (30).

In the present report, using new polyclonal antibodies generated against different peptides of the human  $\beta$ III spectrin, we provide new insights into the role of the protein at the Golgi. We found that (i)  $\beta$ III spectrin is enriched in distal Golgi compartments; (ii)  $\beta$ III spectrin is necessary to maintain both the perinuclear ribbon-like morphology of the Golgi and the anterograde, but not retrograde protein transport; and (iii) PI4P contributes to the association of  $\beta$ III spectrin with Golgi membranes.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Antibodies and reagents** – Mouse monoclonal antibodies to GM130 and Golgin97 were from Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA) and Molecular Probes (Paisley, UK), respectively. Sheep anti-TGN46 and mouse anti-GST were purchased from Abcam (Cambridge, UK), and mouse anti-p190 RhoGAP was from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Mouse monoclonal antibodies to myc (clone 9E10) and transferrin receptor, and rabbit polyclonal antibody to RhoGDI and GFP were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Santa Cruz (Delaware, CA, USA) and Molecular Probes, respectively. Mouse monoclonal antibody to CTR433 was kindly provided by M. Bornens (Institute Curie, Paris, France). Cyanine 3-conjugated rabbit secondary antibodies were from Jackson Laboratories (West Grove, PA, USA) and Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse, anti-rabbit and anti-sheep antibodies were obtained from Molecular Probes. Peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Promega (Eugene, OR, USA). Latrunculin B (LtB), nocodazole (NZ), rapamycin and mowiol were from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Brefeldin A (BFA) was

provided by Sigma-Aldrich and jasplakinolide (Jpk) was from Invitrogen. [<sup>35</sup>S] protein labeling mix (<sup>35</sup>S-EXPRESS) was from PerkinElmer (Waltham, MA, USA). Endoglycosylase H (Endo H) was purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA).

*Cell lines and cell culture* – Immortalized human pigment epithelial hTERT-RPE1 cells were cultured in DMEM/F12 1:1 (Invitrogen). NRK, COS-7 and HeLa cells that constitutively express VSV-G-GFP (a gift of V. Malhotra, Centre for Genomic Regulation, Barcelona, Spain) were grown in DMEM, all of them containing 10% of FBS. All culture media were supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were grown in a humidified incubator in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

*Transfection of plasmids and siRNAs* – Plasmids were transfected with FuGENE® HD (Promega) following the manufacturer's recommendations. Experiments to evaluate the effects of transfection were performed at least 16 h later. siRNAs for human βIII spectrin were purchased from Dharmacon (ON-TARGETplus siRNAs; Ref. L-012770-01-0005). siRNAs were employed in two cycles of siRNA treatment (20 nM each) with a delay between them of 24 h, and for a total of 96 h using Hiperfect® as transfection agent (Qiagen, Hilden, Germany). All siRNA-mediated knock-down experiments were validated with a pool of four non-targeting siRNAs (Dharmacon, Ref. D-001810-10-05).

*Immunofluorescence microscopy* – Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min, rinsed in PBS and incubated in PBS containing 50 mM ammonium chloride. Then, cells were permeabilized for 10 min in PBS containing 1% BSA and 0.1% saponin. Primary antibodies were incubated for 1 h and secondary antibodies for 45 min diluted in PBS containing 1% BSA. Working dilutions are: anti-βIII spectrin, 1:150; anti-GM130, 1:1000; anti-CTR433, 1:5; anti-Golgin97, 1:300; anti-TGN46, 1:500; anti-GST, 1:200; anti-myc, 1:200; Cy3-anti-rabbit, 1:250 and Alexa Fluor 488 anti-mouse, anti-rabbit or anti-sheep, 1:500. Immunostained coverslips were mounted on microscope slides using mowiol. Microscopy and imaging were performed either with an Olympus BX60 epifluorescence microscope with a cooled Orca-ER CCD camera (Hamamatsu Photonics, Japan)

or with a Leica TCS-SL confocal microscope (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Germany). The images were processed using Image J software and Adobe Photoshop CS (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). The analysis of the compactness of the Golgi was carried out as described (31).

*Subcellular fractionation* – A pellet of RPE1 cells was resuspended in XB buffer (20 mM Hepes, 150 mM KCl, pH 7.7) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), five times the volume of the pellet. Extracts were mechanically cracked with an insulin syringe and centrifuged at 1000 g for 10 min to remove cell debris and nuclei. The supernatant (total fraction) was subsequently subjected to a 60 min ultracentrifugation at 60,000 rpm using a MLA-130 rotor (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). The resulting supernatant was the cytosolic fraction, whereas the membrane pellet was solubilized in the same volume as the cytosolic fraction in RIPA 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) for 60 min at 4°C. The membrane fraction was then re-centrifuged for 60 min at 60,000 rpm to remove insoluble material. All subcellular fractions were subjected to 6% or 10% (v/v) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. We used βIII spectrin antibodies (1:500) to detect the βIII spectrin, anti-RhoGDI antibodies (1:1000) as a cytosolic marker and anti-transferrin receptor antibodies (1:5000) as a membrane marker. Golgi-enriched fractions from rat liver were prepared as described previously (32).

*Protein transport assays* – To examine the VSV-G protein transport, 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. The cells were then incubated at 40°C for 16 or 24 h. Cycloheximide was added to a final concentration of 100 µg/ml (on the last 30 min) and then the cells were shifted to 32°C to allow transport. At the indicated times, cells were fixed and processed for immunofluorescence analysis. In addition, the cells were solubilized with 0.5% SDS and 1% 2-mercaptoethanol (0.1 ml/dish) and heated at 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 (1:25,000) antibody, and intensities of the immunostained bands were quantified.

For the protein secretion experiments, RPE1 cells transfected with siRNA non-targeting, siRNA  $\beta$ III spectrin or treated with BFA (acting as a positive control) were starved for 30 min in Met/Cys-free media and then pulse-labeled with 20  $\mu$ Ci of [ $^{35}$ S]-Met/Cys mix per well in a 6-well plate for 10 min. Then, cells were rinsed with cold complete media and transferred to 19°C for 3h to let the accumulation of [ $^{35}$ S]-labeled proteins synthesized *de novo*. After the incubation, cells were washed twice with 5% BSA in PBS and then shifted to 37°C. To determine the kinetics of secretion, culture supernatants were collected at different times. [ $^{35}$ S]-labeled secreted proteins were precipitated with 20% trichloroacetic acid (TCA), washed with 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. For additional control, cells remained on ice before supernatants were collected.

To follow the retrograde transport of Shiga toxin (STxB), RPE1 cells treated with siRNA non-targeting or siRNA  $\beta$ III spectrin were starved for 30 min in medium without FBS and then incubated with 0.5  $\mu$ g/ml of cyanine 3-tagged STxB-KDEL for 1 h at 4°C, washed with cold PBS to remove the unbound toxin and transferred to 37°C for indicated times. Cells were then processed by indirect immunofluorescence.

*Microinjection experiments* – NRK cells were plated onto 25-mm-diameter poly-D-lysine coated-coverslips one day before the microinjection. Purified IgG fractions of anti- $\beta$ III spectrin antibody #33 or preimmune serum together with dextran red were co-microinjected into the cell cytoplasm with an automated microinjection system (Leica AS TP). After microinjection, the coverslips were transferred to a Petri dish containing fresh culture medium and returned to the incubator. After 5 h, cells were fixed and the Golgi was immunostained as indicated above.

*Plasmids* - Plasmids encoding GST-PH-FAPP1 and GFP-PH-OSBP were provided by M. A. de Matteis (University of Naples, Italy) and T. Levine (University College London, London, UK), respectively. Untagged and myc-tagged human  $\beta$ III spectrin plasmids were kindly provided by L. Ranum (University of Minnesota, MN, USA). The PH domain of  $\beta$ III spectrin was amplified from the untagged  $\beta$ III spectrin plasmid with the forward and reverse primers: 5'-TTTGAATTCTCCACCATCCACACAAGCACCC-3' and 5'-TTTGGATCCCTACTTGTTCTTCTTAAAGAAGCT-3'. Then, the PCR product was subcloned into the pEGFP-C1 vector after cutting with EcoRI and BamHI restriction enzymes. The actin-binding domain (ABD) of  $\beta$ III spectrin was generated from the untagged  $\beta$ III spectrin construct using the following forward and reverse primer pairs: 5'-AGCTGAATTCACCACCATGAGCAGCAGCTGTCACCC-3' and 5'-AGCTGGTACCCAGCTCCGAAGGCCAGGGACTC-3'. This piece was then inserted between the EcoRI-KpnI sites of the pEGFP-N3 vector. Human mRFP-FKBP12-Sac1, mRFP-FKBP12 only and TGN38-FRB-CFP have been used as previously described (33).

*$\beta$ III spectrin antibody preparation* – A first round of anti- $\beta$ III spectrin antibodies was produced at the University Pompeu Fabra, Barcelona, Spain. Briefly, peptides #3 and #5 were synthesized, conjugated to a keyhole limpet hemocyanin (KLH) and used to immunize rabbits to produce antibodies #33 to #38 (see figure 1A). Final bleedings were purified by affinity chromatography with the respective peptides. A second round of anti- $\beta$ III spectrin antibodies was produced by Eurogentec (Liège, Belgium) using peptides #1, #2 and #4 which were also conjugated to KLH and injected to immunize rabbits. Final bleedings were also affinity purified.

## RESULTS

*$\beta$ III spectrin is enriched in distal Golgi compartments* – We generated a set of new rabbit polyclonal antibodies from synthesized peptides corresponding to different regions of  $\beta$ III spectrin (Fig. 1A). For each antiserum, the corresponding IgG fraction and high-affinity purified antibodies were tested for their ability to stain the Golgi by indirect immunofluorescence and/or by western blotting to recognize a band with the expected

molecular weight of the protein ( $\approx 270$  KDa). By indirect immunofluorescence, antibody #33 stained a peri- or juxtannuclear nuclear compartment corresponding to the Golgi complex in several clonal cell lines (Figs. 1B and 2). Antibody #82 recognized by western blotting an immunoreactive double band above 250 KDa in a variety of whole cell lysates and in Golgi-enriched fractions from rat liver (Fig. 1C). However, after knocking-down  $\beta$ III spectrin expression by RNAi, only the lower band of the doublet was affected (see Figs. 3A and supplemental Fig. S1). Antibody #82 also recognized the exogenously expressed myc-tagged  $\beta$ III spectrin in RPE1 cells (supplemental Fig. S1). The rest of antibodies were much less efficient, and therefore, we chose antibodies #33 and #82 for immunofluorescence and western blotting experiments, respectively. To examine in more detail the subcellular distribution of  $\beta$ III spectrin in the Golgi, we performed co-localization studies using confocal microscopy with well-established markers of the proximal (GM130 and CTR433) and distal (Golgin97 and TGN46) Golgi compartments (Fig. 2). In RPE1 cells,  $\beta$ III spectrin distribution overlapped with all the Golgi markers tested (Fig. 2A), but the co-localization was much tighter with the *trans*-Golgi and TGN markers (Fig. 2B). Furthermore, we always observed persistent cytoplasmic and nuclear (excluding nucleoli) stainings (Fig. 3B), the presence and intensity of which was variable depending on the cell examined.

*$\beta$ III spectrin is necessary for the structural integrity of the Golgi* – To determine the contribution of  $\beta$ III spectrin to the structural organization of the Golgi, we imaged RPE1 cells following  $\beta$ III spectrin depletion using siRNA technology (Fig. 3). Cells transfected for a total of 96 h with a pool of four siRNAs against human  $\beta$ III spectrin exhibited a significant reduction in  $\beta$ III spectrin protein level (up to 85%) (Fig. 3A). Note that the use of individualized siRNA did not improve the level of protein reduction and therefore, we chose the pool of siRNAs (Fig. 3A, lane 2) for subsequent knock-down experiments. In knocked-down cells,  $\beta$ III spectrin was not observed at the Golgi, although the diffuse nuclear and/or cytoplasmic staining persisted. Concomitantly to the absence of  $\beta$ III spectrin, knocked-down cells showed a

fragmented Golgi (Fig. 3B), which was quantified using an index of “compactness” calculated from measurements of the area and perimeter of each Golgi element in control and knocked-down cells (31). Results showed that the Golgi in  $\beta$ III spectrin-depleted cells is significantly less compact than in non-silenced cells (Fig. 3C). A fragmented Golgi phenotype was also observed in cells microinjected with purified anti- $\beta$ III spectrin IgG fraction or affinity purified antibodies into their cytoplasm (supplemental Fig. S2).

*$\beta$ III spectrin participates in the secretory but not the retrograde protein transport* – We next investigated whether the depletion of  $\beta$ III spectrin and the resultant Golgi fragmentation have impact on the secretory membrane trafficking. We first examined the anterograde (ER-to-Golgi) and retrograde (Golgi-to-ER) membrane flux at the ER-Golgi interface using BFA. Whereas the addition of BFA produced the rapid redistribution of  $\beta$ III spectrin from the Golgi to the cytoplasm (4), no delay in the disassembly of the Golgi and subsequent merging with the ER was observed (supplemental Fig. S3). However, when the anterograde membrane flux was examined after the BFA wash-out, the reassembly of the Golgi was blocked in  $\beta$ III spectrin-silenced cells (Fig. 4A, C). We also examined the dynamic disassembly and reassembly of the Golgi in cells treated and subsequently washed-out with nocadazole (NZ). No difference in the kinetics of Golgi fragmentation after NZ treatment was observed between control and silenced cells (supplemental Fig. S3). However, after the wash-out of NZ, the Golgi remained largely fragmented in knocked-down cells, whereas the Golgi was normally reformed in control cells (Fig. 4B, C). These results are indicative that the anterograde but not the retrograde membrane trafficking between the ER and the Golgi is impaired by the absence of  $\beta$ III spectrin.

To explore these alterations in more detail, we monitored the trafficking of cargo such as membrane VSV-G and soluble proteins for the anterograde transport (ER-to-Golgi/plasma membrane), and the Shiga toxin subunit B for the retrograde transport (plasma membrane-to-Golgi-to-ER). We first investigated whether depletion of  $\beta$ III spectrin interferes with VSV-G transport (Fig. 5). HeLa cells constitutively

expressing VSV-G-GFP were transfected for 96 h with non-targeting or  $\beta$ III spectrin pool of siRNAs. The transfected cells were incubated at 40°C to accumulate VSV-G in the ER. Upon the shift to the permissive temperature (32°C), the VSV-G exits from the ER and travels to the plasma membrane passing through the Golgi (Fig. 5A). The arrival of VSV-G to the plasma membrane in knocked-down cells was slower than in control cells (Fig. 5B and C). The analysis of the kinetics of the acquisition of Endo H resistance showed that the delivery of VSV-G from the ER to the Golgi was significantly delayed in  $\beta$ III spectrin-depleted cells (Fig. 5D). We next examined whether the depletion of  $\beta$ III spectrin equally affected the secretion of [<sup>35</sup>S]-labeled proteins from the Golgi. RPE1 cells were transfected with non-targeting or  $\beta$ III spectrin targeting siRNA pools. As additional controls, cells were previously treated with BFA or incubated at 4°C. We observed that  $\beta$ III spectrin depleted cells showed a two-fold reduction in the secretion of labeled proteins (Fig. 5E).

The impact of  $\beta$ III spectrin on retrograde transport of the subunit B of the Shiga toxin that contains in its carboxyl-terminus the ER retention sequence KDEL (STxB-KDEL) was also investigated (supplemental Fig. S4). Briefly, control and  $\beta$ III spectrin-depleted RPE1 cells were incubated with STxB-KDEL at 4°C for 1 h, rinsed and then shifted to 37°C to allow its internalization until the ER with transit in early endosomes and the Golgi (33). No difference in the appearance of the STxB-KDEL to the Golgi and to the ER was observed between control and  $\beta$ III spectrin-silenced cells.

*PI4P but not actin contributes to the association of  $\beta$ III spectrin to the Golgi* – It has been previously reported that the actin-binding domain (ABD) and the membrane associated domain MAD1 target  $\beta$ I $\Sigma$ \* spectrin to the Golgi in MDCK cells (22). On the other hand, the dynactin subunit Arp1 binds *in vitro* more efficiently than actin to  $\beta$ III spectrin (29). Keeping all this in mind, we next investigated to what extent phosphoinositides and actin dynamics contribute to the localization of  $\beta$ III spectrin to the Golgi *in vivo*. It has been previously reported *in vitro* that the PH domain of  $\beta$  spectrin binds to PI(4,5)P<sub>2</sub> with low affinity and poor specificity (35–37). Whereas previous work have shown that PI(4,5)P<sub>2</sub> levels mediate *in*

*vitro* the association of  $\beta$ III spectrin with Golgi membranes and liposomes (18,20), it is also well-known that the intrinsic level of PI(4,5)P<sub>2</sub> in the Golgi is very low (38). Therefore, the PH domain of  $\beta$ III spectrin either has little or no relevance *in vivo* or, alternatively, other phosphoinositide(s) significantly contribute to  $\beta$ III spectrin recruitment to Golgi membranes. Since PI4P is highly enriched in Golgi membranes (38,39), we investigated its potential contribution to the association of  $\beta$ III spectrin to Golgi membranes. For this purpose, the Golgi-associated pool of PI4P was depleted by the rapamycin-induced targeting of a recruitable Sac1 phosphatase to the Golgi (33). COS-7 cells were co-transfected with the Golgi-targeted CFP-TGN38-FRB and the cytosolic mRFP-FKBP12 or the cytosolic mRFP-FKB12-Sac1 phosphatase, whose action onto the Golgi-associated PI4P pool was monitored by the GFP-fused PH domain of OSH1. Cells were fixed and incubated with  $\beta$ III spectrin antibodies after incubation with rapamycin. We observed a loss of  $\beta$ III spectrin staining in cells where the Sac-1 phosphatase was recruited to the Golgi (Fig. 6A). Recruitment of FKBP12 without the Sac1 phosphatase was used as a control. Although this negative control also showed some effect in a few cells, its much smaller effect was attributable to the expression of the TGN38 recruiter construct. Therefore, special attention was paid to compare cells where the TGN38 recruiter was not expressed at high level. As a complementary approach, we also examined whether the PH domain of proteins that are recruited to the Golgi through binding to PI4P were able to displace  $\beta$ III spectrin from the Golgi (40). The PH domains of oxysterol-binding protein (OSBP) and the four-phosphate-adaptor protein 1 (FAPP1) have been shown to recognize PI4P (41). It has to be noted that Golgi recruitment of these PH domains is Arf1-dependent and at high expression levels, they can also sequester Arf1 to induce Golgi fragmentation and interfere with Golgi trafficking via this mechanism (42). Nevertheless, RPE1 cells expressing the GST-tagged PH domain of FAPP1 or the GFP-PH domain of OSBP at moderate levels did effectively displace  $\beta$ III spectrin from the Golgi (Fig. 6B). Next, the isolated PH domain of  $\beta$ III spectrin was cloned into a eukaryotic expression

vector tagged with GFP. Strikingly, when this construct was expressed in RPE1 cells, the GFP fluorescence was localized only to the plasma membrane (supplemental Fig. S5A). This result indicated that the lipid binding by the  $\beta$ III spectrin PH domain alone is not sufficient for Golgi localization and has to cooperate with other interactions to drive multivalent Golgi membrane association of the full  $\beta$ III spectrin molecule. In this respect, we reasoned that the ABD could be one of them. Thus, we cloned and GFP tagged the isolated ABD of  $\beta$ III spectrin and it was subsequently expressed in RPE1 cells. As with the PH domain, the ABD-GFP only localized to the plasma membrane (supplemental Fig. S5B). Next, we examined the contribution of actin dynamics in the localization of  $\beta$ III spectrin to the Golgi. Thus, RPE1 cells were treated with actin drugs that either depolymerize (latrunculin) or stabilize (jasplakinolide) actin filaments and subsequently co-stained for GM130 and  $\beta$ III spectrin (supplemental Fig. S6A). Confocal analysis of immunofluorescence images showed that the compact Golgi was invariably stained for  $\beta$ III spectrin with no significant changes in response to treatment with either drug. This observation was confirmed when the cytosolic and membrane-associated pools of  $\beta$ III spectrin were examined by cell fractionation and western blotting analysis (supplemental Figs. S6B, C).

## DISCUSSION

Studies from several laboratories, including our own, have implicated actin filaments, actin-binding and regulatory proteins, actin motors and spectrin-based cytoskeleton isoforms in maintaining the structure and protein transport of the Golgi complex in mammalian cells. Whereas the importance of a non-erythroid spectrin-based cytoskeleton at the Golgi in mammalian cells preceded the evidence concerning the involvement of actin-binding and regulatory proteins and myosins, new insights to define the role of spectrin in the Golgi and in the secretory pathway was lagging due, at least in part, to the limited availability of specific molecular tools. Here we provide new insights in the role of spectrin-based cytoskeleton at the Golgi using new antibodies raised against specific peptide sequences of human  $\beta$ III spectrin and the siRNA technology to knock-

down the expression of the protein. We show that PI4P is necessary for the binding of  $\beta$ III spectrin to the Golgi and that  $\beta$ III spectrin is important for the maintenance of normal Golgi morphology and for anterograde transport of both membrane and soluble proteins.

In regard to the subcellular localization of  $\beta$ III spectrin at the Golgi, we found that (i)  $\beta$ III spectrin is enriched in distal Golgi compartments (see below), and (ii) the staining pattern observed under the confocal microscopy does not show a continuity, but a punctated and dashed pattern that variably matches the Golgi compartment. We do not know what might be the significance of this observation, but we speculate that it might represent the staining of some of the two regions that defines the Golgi stack: the central, compact or poorly fenestrated, or the lateral, non-compact or highly fenestrated (43). The former would be analogous to what occurs in red blood cells whose submembraneous localization determines their characteristic discoid shape; conversely, the latter would be consistent with the previously postulated role of  $\beta$  spectrin as an exocytic coat protein (9). Ultrastructural localization of  $\beta$ III spectrin at the Golgi should definitively resolve this possibility but, unfortunately, none of our antibodies were suitable for immuno-EM techniques.

The co-localization of  $\beta$ III spectrin was the highest with markers of the distal Golgi compartments. A gradient of PI4P enrichment across the Golgi stack has been postulated with *cis*-Golgi harboring the least amount of PI4P and the TGN the greatest (44,45). Given the importance of PI4P for the association of  $\beta$ III spectrin to the Golgi, the enrichment of  $\beta$ III spectrin to distal Golgi could also follow this PI4P gradient. Conversely,  $\beta$ III spectrin could actively participate in the membrane organization of cisternae by regulating the spatial availability of the pool of PI4P which is used as substrate in the local lipid homeostasis, and/or as a lipid recruiter of PI4P-binding proteins involved both in transport carrier biogenesis (cargo sorting, packaging and trafficking) and lipid homeostasis such as OSBP1, FAPP2, CERT or GOLPH3 (45–47). The potential regulation of  $\beta$ III spectrin on the PI4P availability could also explain the observation that secretory transport carriers contain less PI4P than do the

TGN membranes from which they are budded (48).

$\beta$ III spectrin participates in the maintenance of the characteristic morphology of the Golgi complex since depletion of the protein by siRNAs leads to the fragmentation of the organelle. Previously it was postulated that the fragmentation of the Golgi in response to decreased PI(4,5)P<sub>2</sub> synthesis might be attributed to the dissociation of  $\beta$ III spectrin from Golgi membranes and concomitantly to its phosphorylation observed *in vitro* (21). We cannot rule out that  $\beta$ III spectrin is subject to phosphorylation in Golgi membranes, but our antibodies and experimental conditions do not allow to reach any conclusion concerning this question. Although some of the antibodies labeled two closely migrating bands in total cell lysates with the expected molecular weight of the protein, only the lower band was affected after silencing with the siRNAs. Therefore, the structural integrity of the Golgi architecture seems to be linked to a function of  $\beta$ III spectrin related to phosphoinositide homeostasis, in which PI4P appears more relevant than PI(4,5)P<sub>2</sub>.

The fragmentation of the Golgi complex as a result of the depletion of  $\beta$ III spectrin is accompanied by a blockade in the protein transport of the integral membrane VSV-G and luminal proteins to the plasma membrane and the extracellular medium, respectively. We also observed a complete blockade of the Golgi reassembly during recovery from BFA and NZ treatments, consistent with a defect in the anterograde membrane flow from the ER. Such impairments could be linked to the reduced capacity to recruit dynein/dynactin motor complex in the absence of  $\beta$ III spectrin. Under normal conditions this motor complex mediates binding to Arp1 (29). Curiously, the dispersion of the fragments of the Golgi are not completely scattered throughout the cytoplasm, but are restricted around the centrosome area, whose phenotype probably reflects the predominant unaffected activity of microtubule plus-end kinesin motor activity which can be only partially compensated by the residual minus-end directed activity of  $\beta$ III spectrin linked to dynein/dynactin complex motor.

In conclusion, the use of new antibodies to human  $\beta$ III spectrin unequivocally demonstrates

its presence in the Golgi complex in a variety of mammalian cell lines and reveals its enrichment in distal compartments of the organelle. Moreover, knock-down experiments provided clear evidence for the importance of  $\beta$ III spectrin in the maintenance of the structural integrity of the Golgi and in the anterograde secretory trafficking. Finally, PI4P is found to be a major determinant for the association of  $\beta$ III spectrin to Golgi membranes.

## REFERENCES

1. Delaunay, J. (2007) *Blood Rev.* **21**, 1-20
2. Bennett, V. and Healy, J. (2008) *Trends Mol. Med.* **14**, 28-36
3. Machnicka, B., Grochowalska, R., Boguslawska, D. M., Sikorski, A. F., and Lecomte, M. C. (2012) *Cell Mol. Life Sci.* **69**, 191-201
4. Beck, K. A., Buchanan, J. A., Malhotra, V., and Nelson, W. J. (1994) *J. Cell Biol.* **127**, 707-723
5. Bennett, V. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **988**, 107-121
6. Bennett, V. and Baines, A. J. (2001) *Physiol Rev.* **81**, 1353-1392
7. Beck, K. A. and Nelson, W. J. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 153-160
8. Holleran, E. A. and Holzbaur, E. L. (1998) *Trends Cell Biol.* **8**, 26-29
9. De Matteis, M. A. and Morrow, J. S. (2000) *J. Cell Sci.* **113 ( Pt 13)**, 2331-2343
10. De Matteis, M. A. and Morrow, J. S. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 542-549
11. Holleran, E. A., Karki, S., and Holzbaur, E. L. (1998) *Int. Rev. Cytol.* **182**, 69-109
12. Stankewich, M. C., Tse, W. T., Peters, L. L., Ch'ng, Y., John, K. M., Stabach, P. R., Devarajan, P., Morrow, J. S., and Lux, S. E. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 14158-14163
13. Beck, K. A., Buchanan, J. A., and Nelson, W. J. (1997) *J. Cell Sci.* **110 ( Pt 10)**, 1239-1249
14. Devarajan, P., Stabach, P. R., Mann, A. S., Ardito, T., Kashgarian, M., and Morrow, J. S. (1996) *J. Cell Biol.* **133**, 819-830
15. Kang, Q., Wang, T., Zhang, H., Mohandas, N., and An, X. (2009) *J. Cell Sci.* **122**, 1091-1099
16. Holappa, K., Munoz, M. T., Egea, G., and Kellokumpu, S. (2004) *FEBS Lett.* **564**, 97-103
17. Percival, J. M., Hughes, J. A., Brown, D. L., Schevzov, G., Heimann, K., Vrhovski, B., Bryce, N., Stow, J. L., and Gunning, P. W. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**, 268-280



18. Godi, A., Santone, I., Pertile, P., Devarajan, P., Stabach, P. R., Morrow, J. S., Di, T. G., Polishchuk, R., Petrucci, T. C., Luini, A., and De Matteis, M. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 8607-8612
19. Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di, T. G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D., and De Matteis, M. A. (1999) *Nat. Cell Biol.* **1**, 280-287
20. Muresan, V., Stankewich, M. C., Steffen, W., Morrow, J. S., Holzbaur, E. L., and Schnapp, B. J. (2001) *Mol. Cell* **7**, 173-183
21. Siddhanta, A., Radulescu, A., Stankewich, M. C., Morrow, J. S., and Shields, D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 1957-1965
22. Devarajan, P., Stabach, P. R., De Matteis, M. A., and Morrow, J. S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 10711-10716
23. Ikeda, Y., Dick, K. A., Weatherspoon, M. R., Gincel, D., Armbrust, K. R., Dalton, J. C., Stevanin, G., Durr, A., Zuhlke, C., Burk, K., Clark, H. B., Brice, A., Rothstein, J. D., Schut, L. J., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2006) *Nat. Genet.* **38**, 184-190
24. Clarkson, Y. L., Gillespie, T., Perkins, E. M., Lyndon, A. R., and Jackson, M. (2010) *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3634-3641
25. Perkins, E. M., Clarkson, Y. L., Sabatier, N., Longhurst, D. M., Millward, C. P., Jack, J., Toraiwa, J., Watanabe, M., Rothstein, J. D., Lyndon, A. R., Wyllie, D. J., Dutia, M. B., and Jackson, M. (2010) *J. Neurosci.* **30**, 4857-4867
26. Stankewich, M. C., Gwynn, B., Ardito, T., Ji, L., Kim, J., Robledo, R. F., Lux, S. E., Peters, L. L., and Morrow, J. S. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 6022-6027
27. Lorenzo, D. N., Li, M. G., Mische, S. E., Armbrust, K. R., Ranum, L. P., and Hays, T. S. (2010) *J. Cell Biol.* **189**, 143-158
28. Watabe, H., Valencia, J. C., Le, P. E., Yamaguchi, Y., Nakamura, M., Rouzaud, F., Hoashi, T., Kawa, Y., Mizoguchi, M., and Hearing, V. J. (2008) *J. Invest Dermatol.* **128**, 162-174
29. Holleran, E. A., Ligon, L. A., Tokito, M., Stankewich, M. C., Morrow, J. S., and Holzbaur, E. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 36598-36605
30. Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V. M., and Neefjes, J. (2007) *J. Cell Biol.* **176**, 459-471
31. Bard, F., Mazelin, L., Pechoux-Longin, C., Malhotra, V., and Jurdic, P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 46601-46606
32. Hui, N., Nakamura, N., Slusarewicz, P. and Warren, G. (1998) *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd Ed., Vol II, Academic Press, Inc., NY
33. Szentpetery, Z., Varnai, P., and Balla, T. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 8225-8230
34. Johannes, L., Tenza, D., Antony, C., and Goud, B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19554-19561
35. Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S., and Fesik, S. W. (1994) *Nature* **371**, 168-170
36. Hyvonen, M., Macias, M. J., Nilges, M., Oschkinat, H., Saraste, M., and Wilmanns, M. (1995) *EMBO J.* **14**, 4676-4685
37. Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., and Abrams, C. S. (2002) *FEBS Lett.* **513**, 71-76
38. De Matteis, M. A., Di, C. A., and Godi, A. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1744**, 396-405
39. D'Angelo, G., Vicinanza, M., Wilson, C., and De Matteis, M. A. (2012) *Subcell. Biochem.* **59**, 255-270
40. Levine, T. P. and Munro, S. (2002) *Curr. Biol.* **12**, 695-704
41. Dowler, S., Currie, R. A., Campbell, D. G., Deak, M., Kular, G., Downes, C. P., and Alessi, D. R. (2000) *Biochem. J.* **351**, 19-31
42. Colon-Franco, J. M., Gomez, T. S., and Billadeau, D. D. (2011) *J. Cell Sci.* **124**, 3118-3126
43. Kepes, F., Rambourg, A., and Satiat-Jeunemaitre, B. (2005) *Int. Rev. Cytol.* **242**, 55-120
44. De Matteis, M. A. and Luini, A. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 273-284
45. Graham, T. R. and Burd, C. G. (2011) *Trends Cell Biol.* **21**, 113-121
46. 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., Fuchs, G. J., Meerloo, T., Farquhar, M. G., Zhou, H., and Field, S. J. (2009) *Cell* **139**, 337-351
47. Wood, C. S., Schmitz, K. R., Bessman, N. J., Setty, T. G., Ferguson, K. M., and Burd, C. G. (2009) *J. Cell Biol.* **187**, 967-975
48. Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J., and Novick, P. (2010) *Dev. Cell* **18**, 828-840

*Acknowledgements* –We thank to colleagues for generous gift of reagents and Maite Muñoz for technical support.

**FIGURE LEGENDS****FIGURE 1. Characterization of antibodies against specific peptide sequences of human  $\beta$ III spectrin.**

(A) Schematic representation of human  $\beta$ III spectrin and targeted regions are indicated by arrows. Peptide #1 targets the actin-binding domain (ABD); peptide #2 to the first spectrin repeat (Sp); peptides #3 and #4 to the non-specific region; and peptide #5 to the PH domain. Table shows the complete aminoacid sequence of the five selected peptides. The names of obtained antibodies are also given. (B) Immunostaining of RPE1, COS-7 and NRK cells employing antibody #33. The images were analyzed by confocal microscopy. Bar, 10  $\mu$ m. (C) Western blotting analysis using preimmune serum or affinity purified antibody #82 of whole cell lysates from indicated cell types and Golgi-enriched fractions from rat liver. Arrowhead indicates the expected  $\beta$ III spectrin band.

**FIGURE 2.  $\beta$ III spectrin is enriched in distal Golgi compartments.**

(A) Co-localization of  $\beta$ III spectrin with Golgi markers. RPE1 cells were co-stained with anti- $\beta$ III spectrin antibody #33 and antibodies against *cis*- (GM130), *medial*- (CTR433), *trans*-Golgi (Golgin97) or the TGN (TGN46) proteins. Merge pixels are shown in white to facilitate the visualization of the co-labeling. Bar, 10  $\mu$ m. (B) Quantitative analysis of the co-localization shown in (A).

**FIGURE 3. Depletion of  $\beta$ III spectrin fragments the Golgi.**

(A). Silencing of  $\beta$ III spectrin in RPE1 cells. Total cell lysate from RPE1 cells transfected for 96 h with control siRNA (non-targeting siRNA pool; lane 1) or  $\beta$ III spectrin siRNA pool composed of four siRNAs (lane 2) or individualized siRNA (from #1 to #4; lanes 3, 4, 5 and 6, respectively) were subjected to immunoblot analysis using affinity purified antibodies against  $\beta$ III spectrin. Note the reduction of the lower electrophoretic band indicated with the arrowhead. Values are the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Statistical significance according to one-way ANOVA, using Bonferroni's multiple comparison test ( $***p \leq 0.001$  respect to siRNA non-targeting). p190 RhoGAP was used as a loading control. (B) Fragmentation of the Golgi in  $\beta$ III spectrin-depleted RPE1 cells. Cells transfected with control siRNA or  $\beta$ III spectrin siRNA pool were stained with anti- $\beta$ III spectrin antibodies and the *trans*-Golgi marker Golgin97. Note the fragmented and variably dispersed Golgi phenotypes observed in  $\beta$ III spectrin-depleted cells (asterisks). Bar, 10  $\mu$ m. (C) Quantitative analysis of the fragmentation of the Golgi in control and  $\beta$ III spectrin-depleted cells shown in (B). The data show the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Statistical significance using the Student's *t*-test,  $***p \leq 0.001$ .

**FIGURE 4. Depletion of  $\beta$ III spectrin blocks the reassembly of the Golgi.**

Cells transfected with control or  $\beta$ III spectrin siRNA pools were first treated with (A) BFA (2.5  $\mu$ g/ml for 90 min; +BFA) or (B) NZ (10  $\mu$ M for 3 h; +NZ). Thereafter, cells were washed-out, fixed at different time points (until 60 min for BFA or 2 h for NZ treatments), and co-stained with antibodies to  $\beta$ III spectrin (not shown) and to TGN46. Insets are representative images of enlarged cells. Bar, 10  $\mu$ m. (C) Quantitative analysis of the reassembly of the Golgi marker GM130 after BFA or NZ washed-out in control and  $\beta$ III spectrin-depleted cells. Values are the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (100 cells each). Statistical significance according to two-way ANOVA using Bonferroni's post-tests ( $*p \leq 0.05$ ;  $**p \leq 0.01$ ;  $***p \leq 0.001$ ).

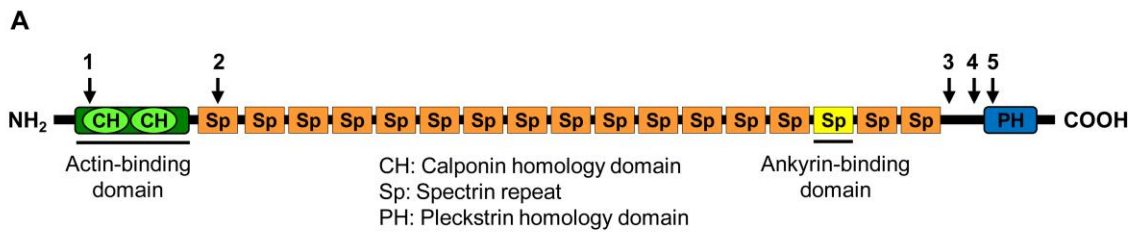
**FIGURE 5. Depletion of  $\beta$ III spectrin impairs the anterograde transport of the VSV-G and the post-**

**Golgi secretion of [ $^{35}$ S]-labeled proteins.** (A) Representative images of HeLa cells constitutively expressing VSV-G-GFP mutant form ts045 show the viral protein in the ER at 40°C, or in the Golgi (30 min) or the plasma membrane (PM; 90 min) when cells were shifted to 32°C. Bar, 10  $\mu$ m. (B) Representative images of VSV-G-GFP expressing HeLa cells silenced with non-targeting or  $\beta$ III spectrin siRNAs after 15 and 60 min after being shifted to 32°C. (C) Quantitative analysis of results partially shown in B. The graph shows the percentage of the cells in which VSV-G-GFP is mainly visualized to the ER, to the Golgi or to the PM. Data is shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (100 cells each). (D) Biochemical transport assay for VSV-G-GFP using Endo H. HeLa cells constitutively expressing VSV-G-GFP were transfected for 96 h with siRNA control or against  $\beta$ III spectrin 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 -sensitive forms, respectively. The ratio of the amount of Endo H-resistant form to that of total amount is plotted. Values are represented as the mean  $\pm$  SEM of

three independent experiments. Statistical significance according to two-way ANOVA using Bonferroni's post-tests ( $*p \leq 0.05$ ). (E) RPE1 cells were transfected with control or with  $\beta$ III spectrin siRNA. Ninety-six h after the transfection, cells were pulse labeled with [ $^{35}\text{S}$ ] Met/Cys, incubated at 19°C for 3 h and then shifted to 37°C. At the indicated times, proteins in the culture supernatants and the cell lysates were precipitated and quantified by scintillation counting. As additional controls, the secretion assay was performed at 4°C or in cells treated with BFA. Results are the mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. Statistical significance according to two-way ANOVA using Bonferroni's post-tests ( $**p \leq 0.01$  and  $***p \leq 0.001$ ).

**FIGURE 6. The association of  $\beta$ III spectrin to Golgi membranes requires PI4P.** (A) COS-7 cells were transfected with the Golgi-targeted TGN38-FRB-CFP and the cytosolic mRFP12-FKBP only or with the cytosolic mRFP-FKBP12-Sac1 phosphatase. Live cells were preincubated for 5 min with rapamycin (100 nM), fixed and incubated with antibodies against  $\beta$ III spectrin. Bar, 10  $\mu\text{m}$ . (B) RPE1 cells either expressing the GST-tagged PH domain of FAPP1 or the GFP-tagged PH domain of OSBP were fixed and stained with anti-GST and anti- $\beta$ III spectrin antibodies, or only with anti- $\beta$ III spectrin antibodies, respectively. Note that cells with the Golgi-recruited PI4P Sac1 phosphatase or with the presence of the PH domain of either FAPP1 or OSBP in the Golgi showed no staining for  $\beta$ III spectrin (asterisks). Bar, 10  $\mu\text{m}$ .

FIGURE 1.



Peptide number	Amino acid sequence and position	Antibody number
1	YSDINNRWDLPSDWDN (20-35 aa)	82 and 83
2	LRANNQKVYTPREGR (376-390 aa)	86 and 87
3	TALEEREKERKRKREE (2076-2091 aa)	36, 37 and 38
4	EGPGPGSGDEANGPRGER (2165-2182 aa) (Stankewich et al., 1998)	84 and 85
5	CRQEMEAFGKKAANRS (2226-2242 aa)	33, 34 and 35

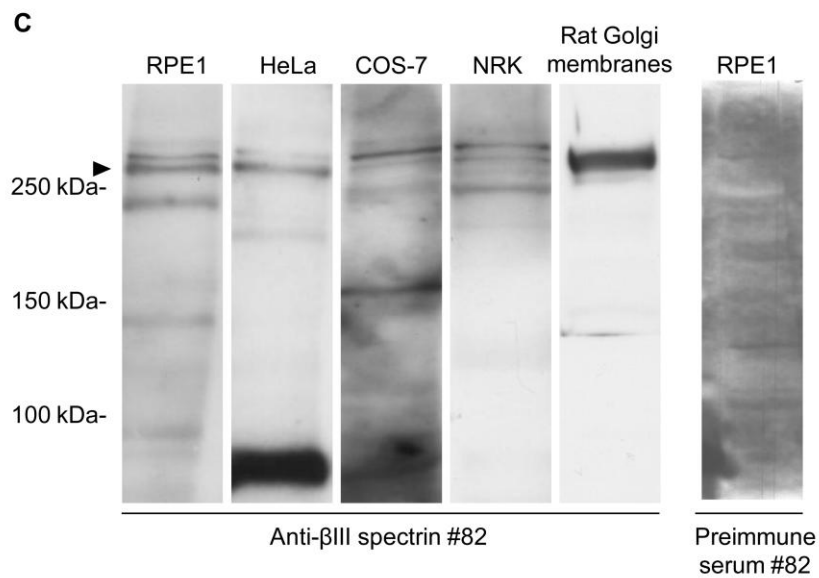
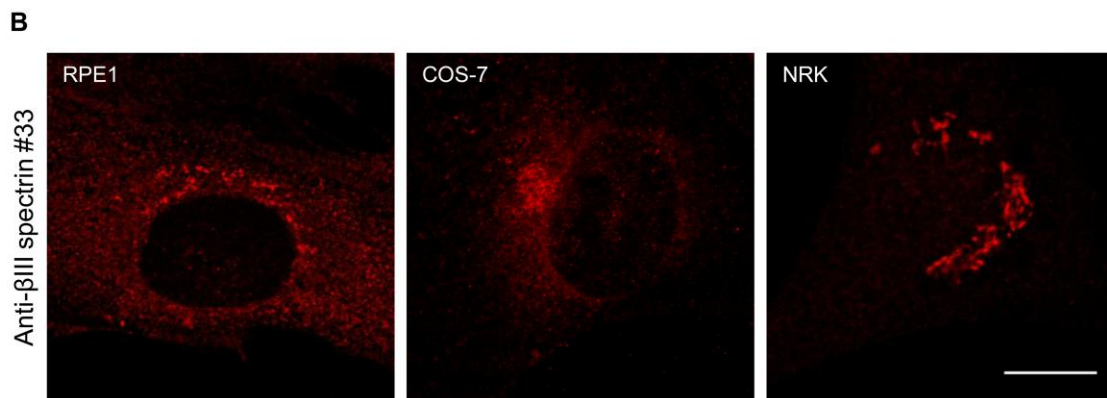
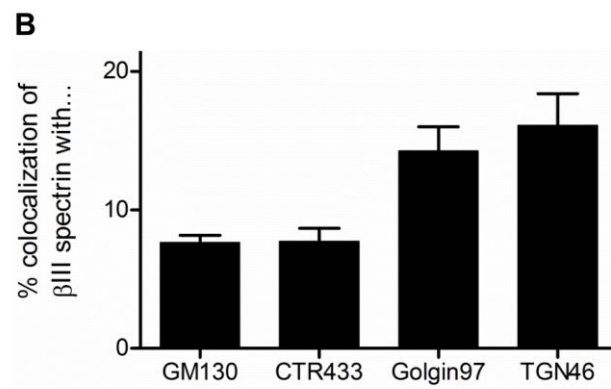
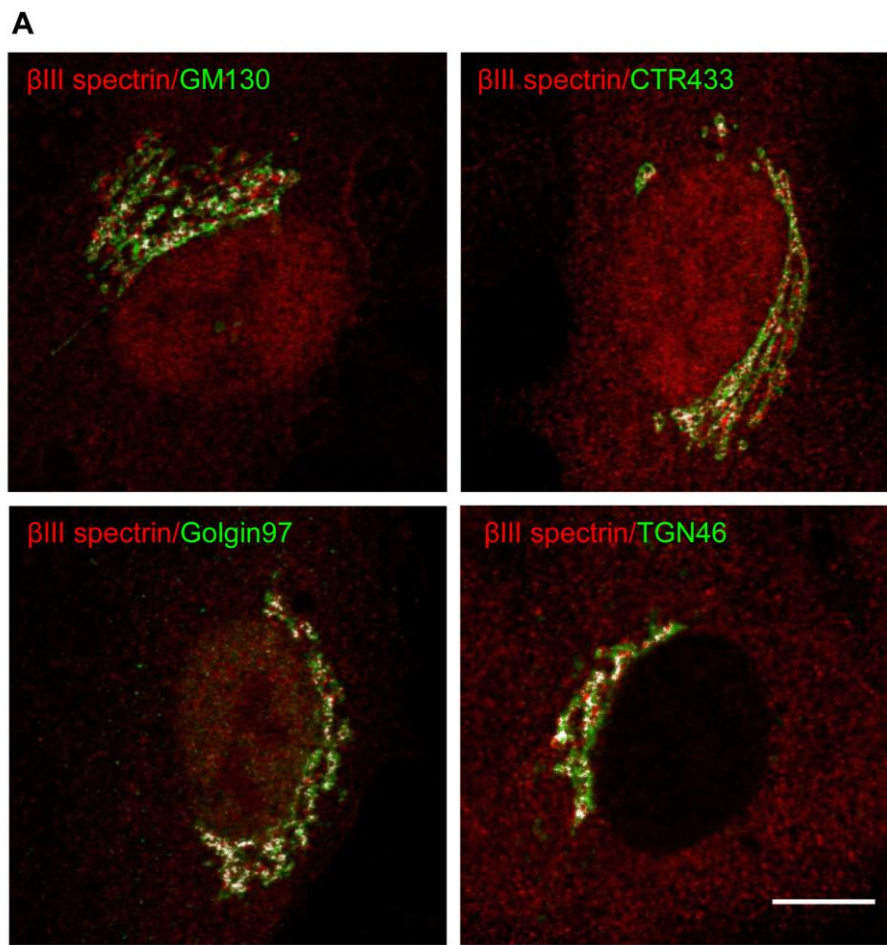
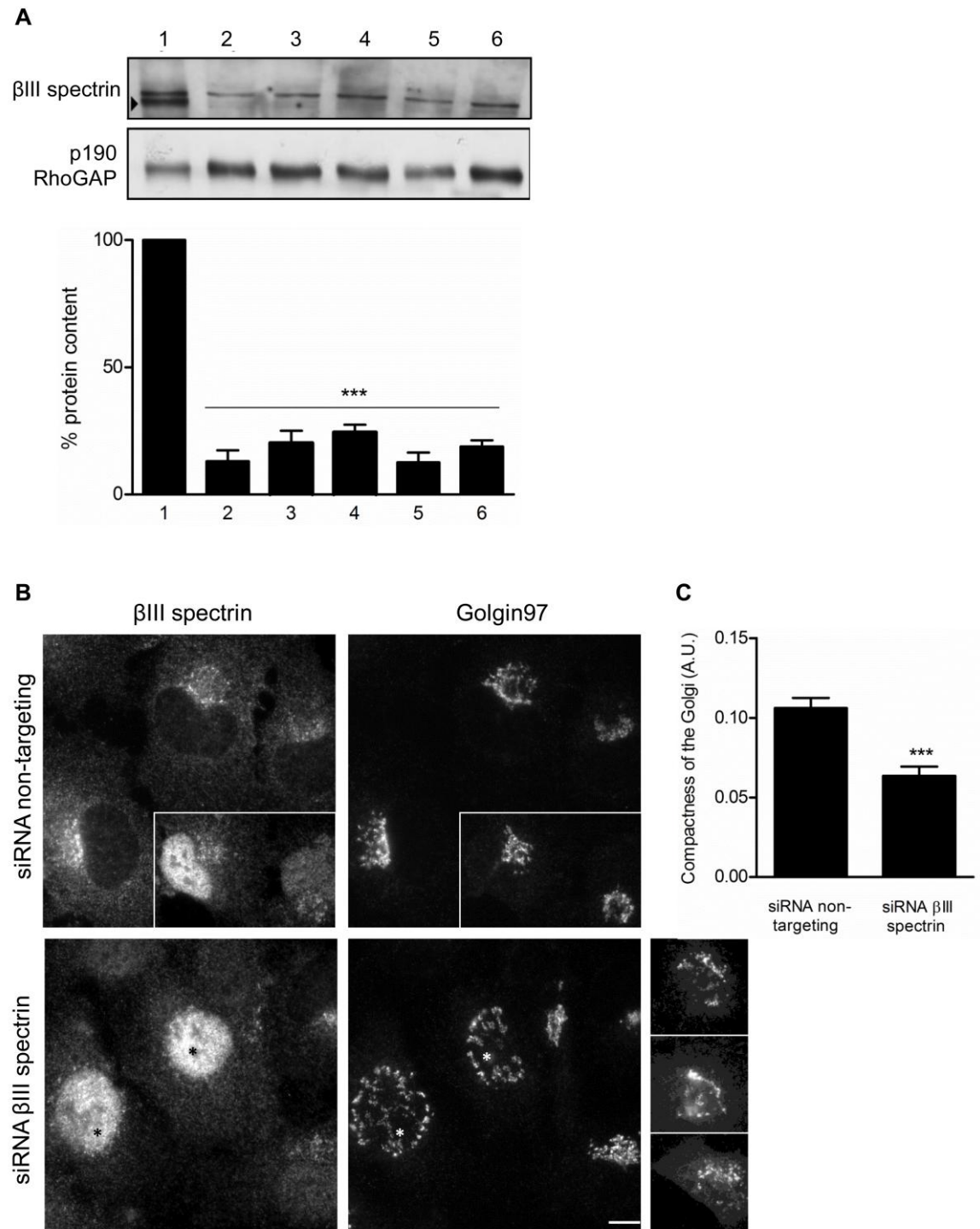


FIGURE 2.



**FIGURE 3.**





**FIGURE 4.**

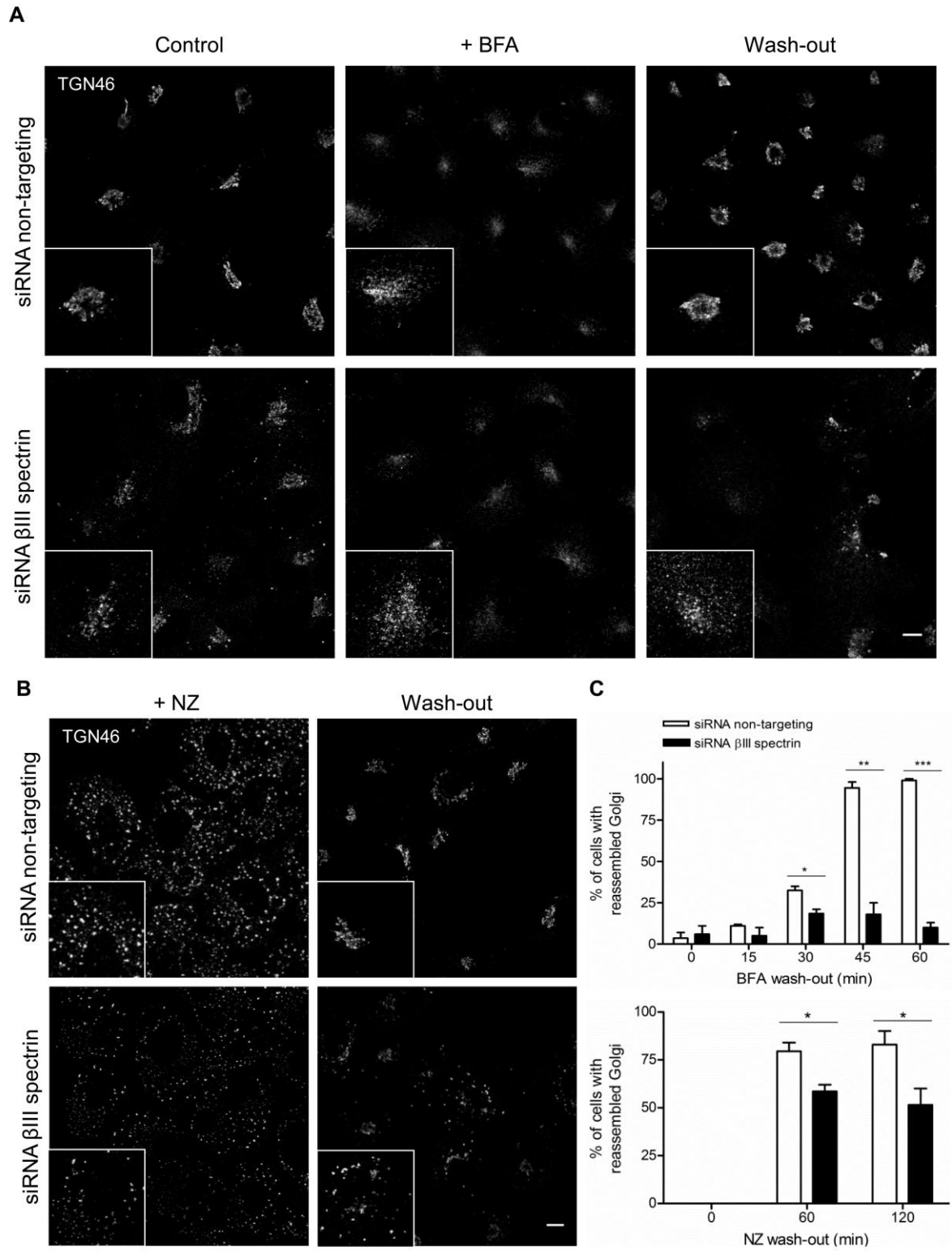


FIGURE 5.

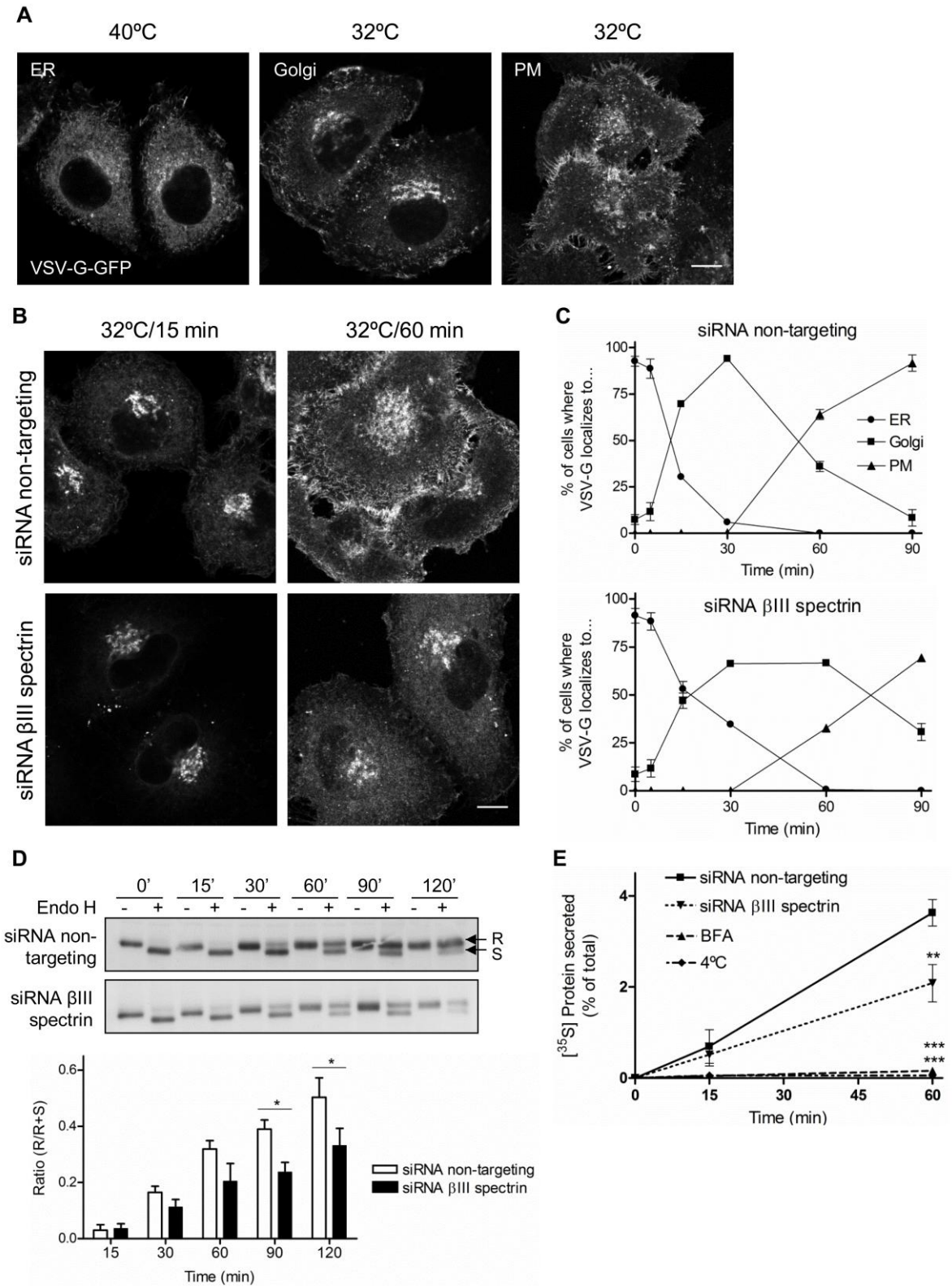
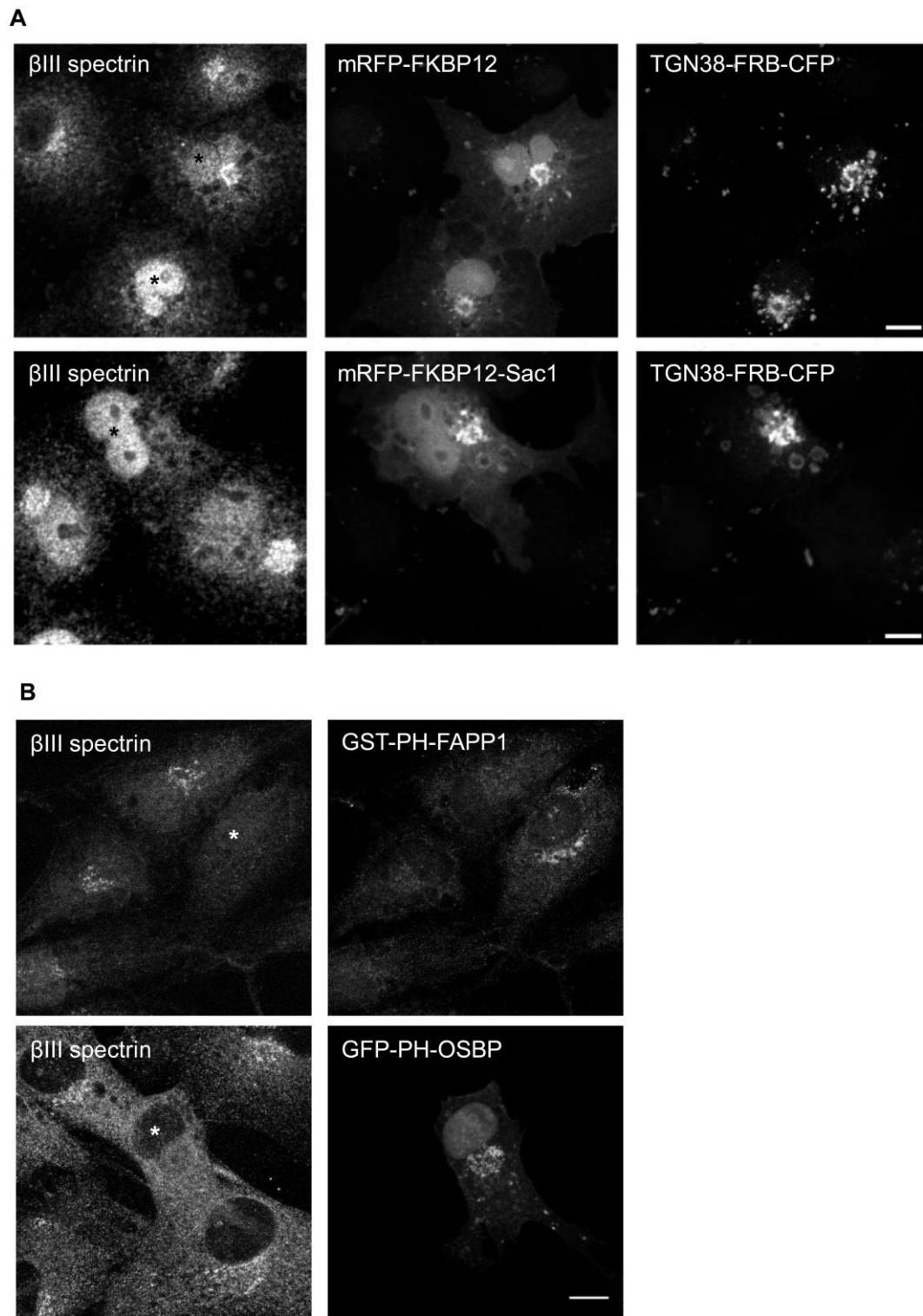




FIGURE 6.



**SUPPLEMENTAL DATA**

**FIGURE S1. Further characterization of antibodies raised to specific peptide sequences of human  $\beta$ III spectrin.** Western blotting analysis of RPE1 cells expressing myc-tagged  $\beta$ III spectrin using anti-myc or anti- $\beta$ III spectrin antibodies #82. As shown,  $\beta$ III spectrin antibodies reveal the same immunoreactive band using anti-myc antibodies. Furthermore, this experiment help us to undoubtedly identify the  $\beta$ III spectrin band as the lower electrophoretic one observed in whole cell lysates of RPE1 cells (arrowhead), which is in addition the only immunoreactive band that decreases after the depletion of  $\beta$ III spectrin.

**FIGURE S2. Fragmentation of the Golgi in cells microinjected with anti- $\beta$ III spectrin antibodies.** NRK cells were co-microinjected with dextran red (to identify microinjected cells) and preimmune or purified IgG fraction #33 against  $\beta$ III spectrin serum. After 5 h, cells were fixed and stained for the Golgi marker GM130. Note that the Golgi of microinjected cells (asterisks) with anti- $\beta$ III spectrin IgG fraction resulted in a variable fragmentation in contrast to the virtually unaltered Golgi observed in cells microinjected with the preimmune serum or neighboring non-microinjected cells. Bar, 10  $\mu$ m.

**FIGURE S3. Depletion of  $\beta$ III spectrin alters neither the Golgi disassembly nor the Golgi fragmentation induced respectively by BFA and NZ.** RPE1 cells transfected with control siRNAs or with siRNA pool directed against  $\beta$ III spectrin were treated with BFA (30 min) or with NZ (2 h) for different times, fixed and co-stained for  $\beta$ III spectrin (not shown) and TGN46. The Golgi was equally disassembled in control and knock-down cells after drug treatments. Insets are representative images of enlarged cells. Bar, 10  $\mu$ m.

**FIGURE S4. The retrograde transport of STxB-KDEL to the ER is unaltered in the absence of  $\beta$ III spectrin.** Immunofluorescence microscopy of the retrograde transport kinetics of the cy3-tagged Shiga toxin fragment B containing the ER-retention signal KDEL (STxB-KDEL) in control and  $\beta$ III spectrin knocked-down RPE1 cells. Plasma membrane internalization of bound STxB-KDEL at 4°C was performed at 37°C for different times until the arrival to the ER (identified by the reticular staining pattern), crossing firstly the Golgi (identified by the juxtannuclear staining). Both in control and silenced cells, the arrival to the ER occurred simultaneously. Bar, 10  $\mu$ m.

**FIGURE S5. Isolately expressed GFP-tagged Pleckstrin homology (PH) or actin-binding (ABD) domains of  $\beta$ III spectrin localize only in the plasma membrane.** RPE1 cells expressing for 18 h the GFP-PH domain (A) or ABD-GFP domain (B) of  $\beta$ III spectrin, were fixed, stained for  $\beta$ III spectrin and analyzed by confocal microscopy. The localization of  $\beta$ III spectrin of transfected cells resulted unaffected (asterisks). Bar, 10  $\mu$ m.

**FIGURE S6. The interference with the actin dynamics does not alter the association of  $\beta$ III spectrin to the Golgi.** (A) RPE1 cells were treated with latrunculin B (LtB; 500 nM for 1 h) or jasplakinolide (Jpk; 500 nM for 1 h), fixed and co-stained for  $\beta$ III spectrin and GM130. Bar, 10  $\mu$ m. (B) Cellular fractionation assay showing total lysate (T) membrane (M) and cytosolic (C) fractions of RPE1 cells treated or not with actin toxins indicated in panel A. The transferrin receptor (TrfR) and RhoGDI were used as indicators of the enrichment degree and loading controls of membrane and cytosolic fractions, respectively. (C) Quantitative analysis of results shown in panel B. Values are the mean  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. Note that actin toxin treatments perturb neither the localization of  $\beta$ III spectrin to the Golgi nor its membrane and cytosolic-associated pools.

**FIGURE S1.**

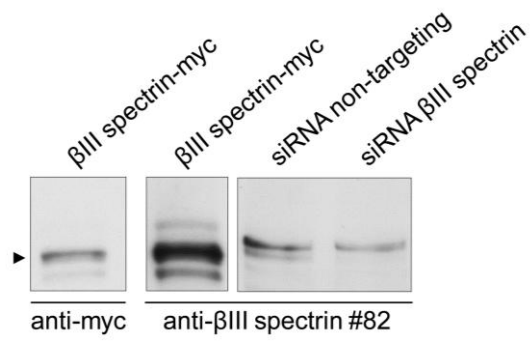


FIGURE S2.

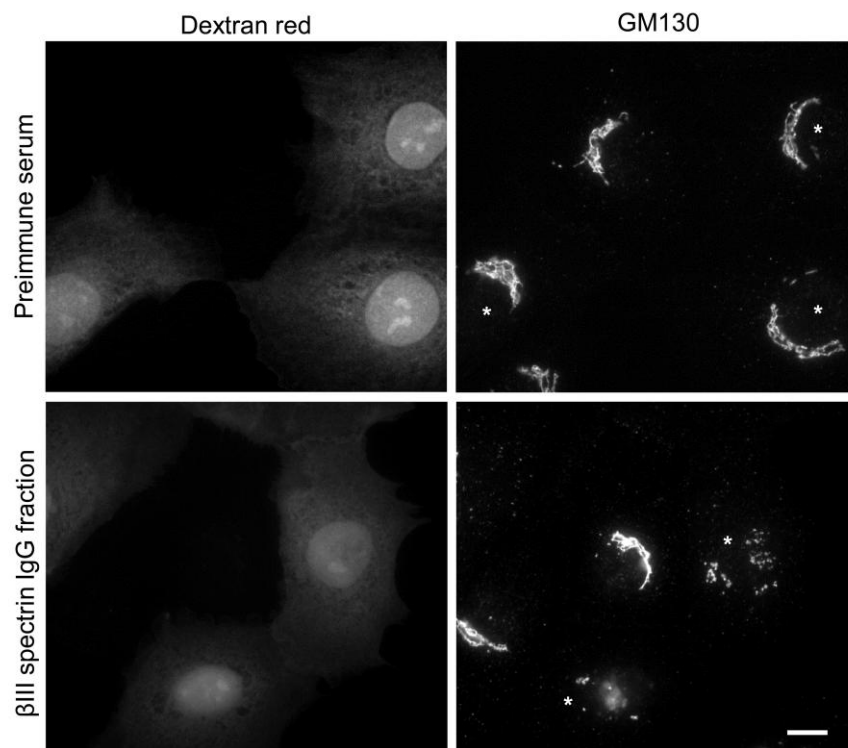


FIGURE S3.

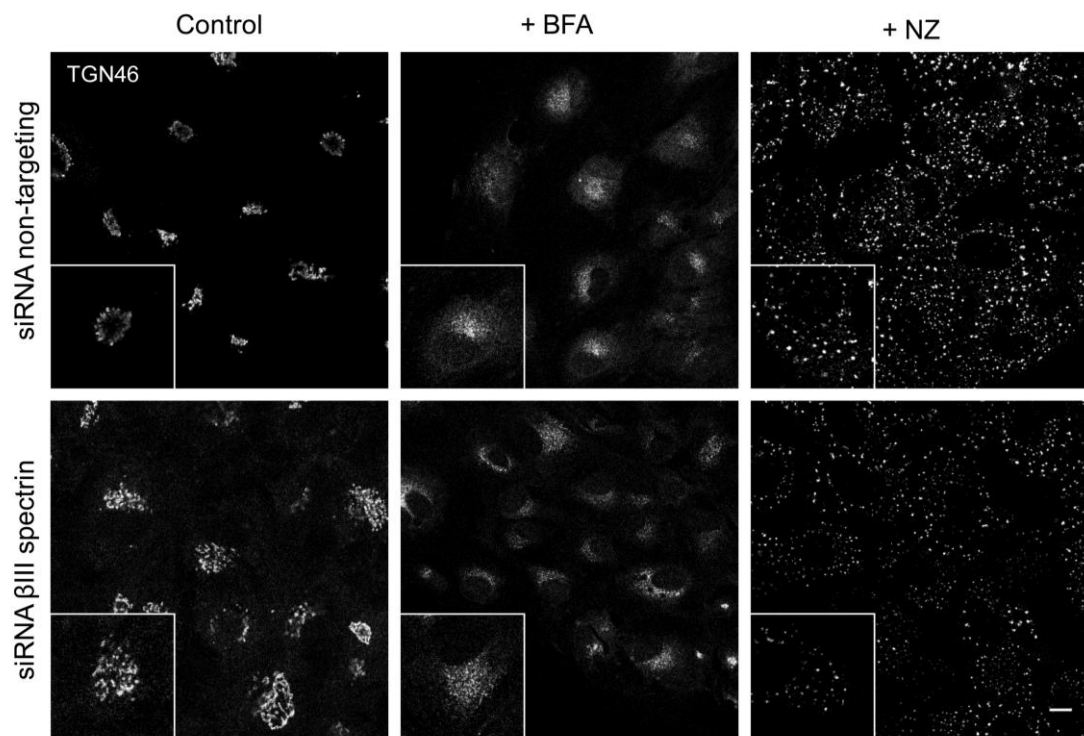


FIGURE S4.

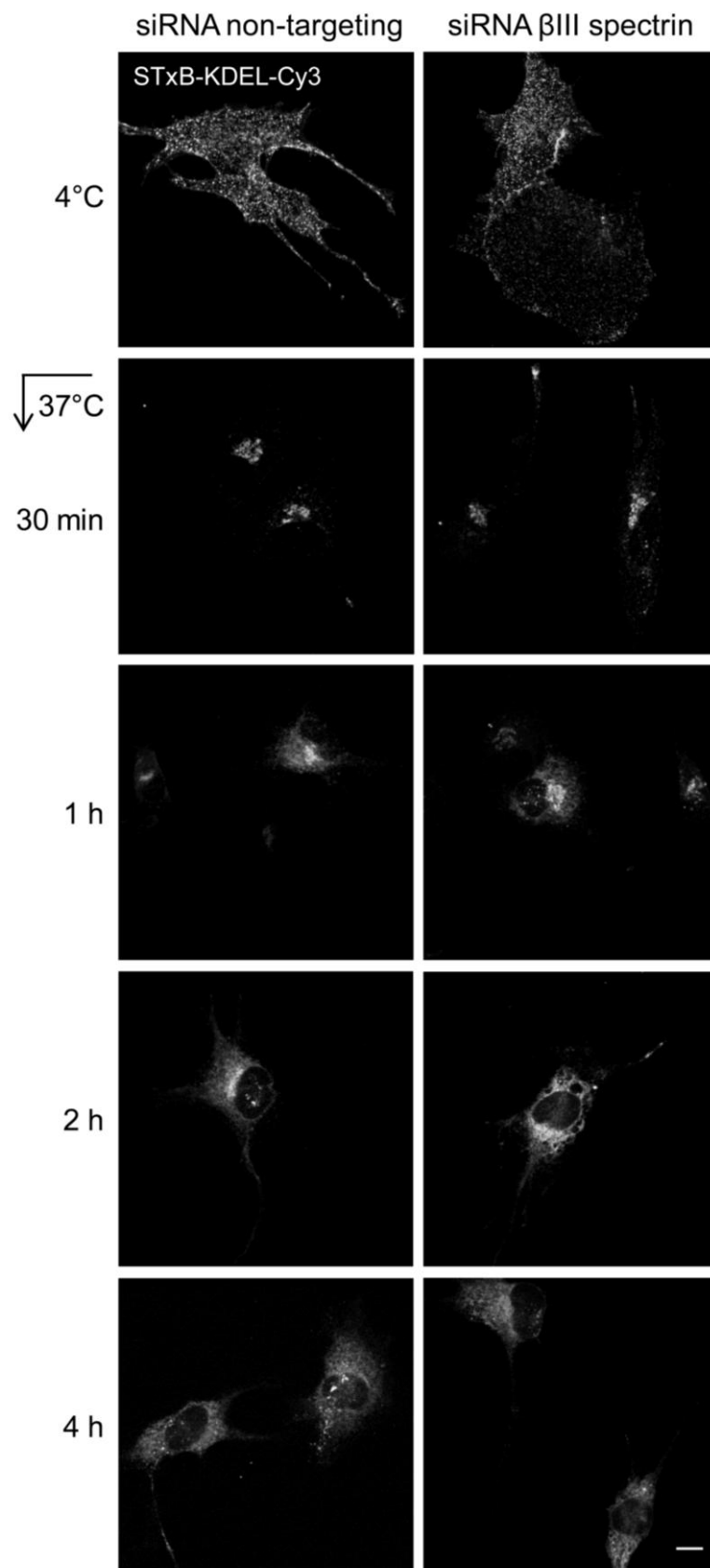


FIGURE S5.

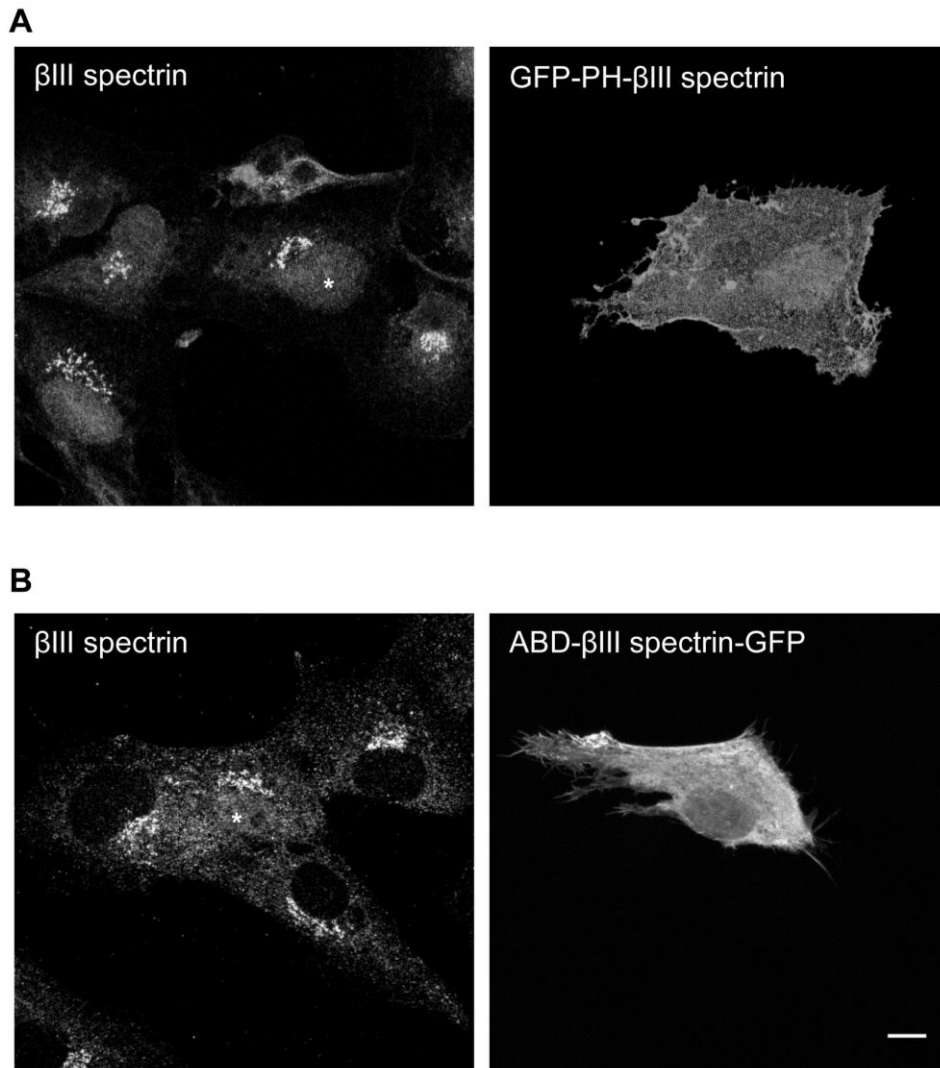


FIGURE S6.

