

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y ANATOMÍA PATOLÓGICA  
FACULTAD DE MEDICINA



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

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

## *Discusión*



Los lípidos están implicados en numerosas funciones asociadas al transporte de proteínas y al tráfico intracelular. Existen numerosas evidencias de que los fosfoinosítidos participan en estos procesos, pero poco se sabe sobre el papel de los glicerolípidos. Estudios recientes sugieren que el DAG es esencial en la formación de los ITs en el transporte desde el TGN a la membrana plasmática, tanto por reclutar la maquinaria molecular implicada como por regular directamente la dinámica de las membranas. Sin embargo, no se ha estudiado la implicación funcional del DAG en el transporte en las etapas tempranas de la vía secretora. El DAG, gracias a sus características moleculares, es un lípido idóneo para regular procesos de tráfico y es muy probable que también participe en la formación de ITs que median el transporte en la zona RE/Golgi.

### **El DAG y el tráfico de membranas en la zona RE/Golgi**

Los resultados del transporte de la glicoproteína G del VSV (VSV-G) desde el RE al Golgi y del reensamblaje del Golgi después de eliminar la BFA en células tratadas con propanolol, U73122 o FB1 indican que el transporte anterógrado no depende del DAG. A diferencia del tratamiento con la FB1, tanto el propanolol como el U73122 alteran el transporte retrógrado dado el retraso en el desensamblaje de Golgi por la BFA y el cambio en el patrón de distribución subcelular del receptor del KDEL, que era exclusivamente de Golgi (*Golgi-like*). Es interesante destacar que el DOG y el PDBu, los cuales se incorporan en las membranas de Golgi, previenen las alteraciones morfológicas provocadas por el propanolol y el U73122, indicando que dichas alteraciones están causadas por la reducción del DAG asociado a Golgi. Además, nuestros resultados sugieren que el propanolol, el U73122 y la FB1 reducen diferentes especies moleculares de DAG, lo que explicaría por qué el propanolol tiene un efecto más pronunciado sobre el tráfico retrógrado que el U73122 y por qué la FB1 no tiene ningún efecto. Esta hipótesis puede también aplicarse al TGN puesto que el propanolol y la FB1 bloquean el transporte post-Golgi de la VSV-G pero, en cambio, no se afecta por el U73122. Esto sugiere que al igual que ocurre en el transporte retrógrado en la zona ER/Golgi, diferentes especies moleculares de DAG deben participar en la formación de vesículas generadas en el TGN. Por lo tanto, sería muy interesante averiguar si las vesículas derivadas de los diferentes compartimentos del Golgi (*cis* o TGN) se asocian específicamente a las diferentes especies moleculares del DAG. Además, también podrían determinar el reclutamiento de una maquinaria molecular de fisión específica para cada compartimento de Golgi generando distintos intermediarios de transporte con sus *cargos* correspondientes. (ver más adelante 'El papel del DAG en

el proceso de fisión de intermediarios de transporte'). En cualquier caso, no podemos descartar otras posibilidades que expliquen la sensibilidad del tráfico de membranas frente a estos agentes como por ejemplo, la diferente composición de colesterol y/o otros lípidos vecinos y/o la localización de las enzimas en los diferentes compartimentos del Golgi

### **Papel del DAG en el proceso de fisión de intermediarios de transporte que median el transporte retrógrado desde el Golgi al RE**

El análisis ultraestructural del Golgi en células tratadas con propanolol o U73122 muestra una acumulación de perfiles vesiculares con cubierta COPI próximos a las cisternas de Golgi. La tomografía electrónica y el modelo tridimensional muestran un predominio de gemas con cubierta COPI, indicando que la disminución del DAG en el Golgi causado por el propanolol y el U73122 altera la escisión de las vesículas COPI de las cisternas de Golgi. La aparición de los numerosos perfiles vesiculares es consistente con el papel estructural del DAG en la formación de las vesículas o túbulos derivados del Golgi<sup>246</sup>, tanto si se originan en el TGN<sup>143;247</sup> como en el compartimento *cis* del Golgi (nuestros resultados). Este papel estructural se basa en la forma cónica del DAG que viene determinado por su pequeña cabeza polar. Consecuentemente, el DAG reduce el empaquetamiento de los lípidos en la membrana creando "sitios de inserción" donde se anclan ciertas proteínas periféricas (como ArfGAP1, ver abajo) que facilitan la curvatura de la bicapa<sup>89</sup>. De manera que al disminuir el DAG en el Golgi, la superficie de la membrana quedaría fuertemente empaquetada reduciendo la eficiencia o incluso la inactivación de la maquinaria molecular necesaria para producir la fisión de los ITs. Lo que puede marcar la diferencia entre la formación de intermediarios de transporte derivados del *cis* Golgi y del TGN son las distintas especies moleculares de DAG generadas en cada compartimento y, consecuentemente, la maquinaria de fisión reclutada. De acuerdo con esta suposición, explicaríamos los diferentes resultados obtenidos en el tráfico de membrana usando FB1 en el TGN<sup>143</sup> (donde bloquea el transporte post-Golgi) o en la zona RE/Golgi (donde no hay alteración; presente trabajo). Esto sugiere que el DAG derivado de la SMS localizada en el Golgi<sup>224</sup> podría estar implicado sólo en el tráfico post-Golgi. Por otro lado, el papel estructural del DAG también estaría muy relacionado con el reclutamiento y activación de proteínas que deforman la membrana o de la maquinaria implicada en la fisión de las vesículas COPI, al igual que lo descrito para vesículas sin cubierta en el TGN<sup>143</sup>. En este sentido, la disminución del DAG en el Golgi desencadena la redistribución citoplasmática de ArfGAP1 del Golgi, que es esencial para ensamblar

el coatómero y juntos deformar la membrana para generar las vesículas COPI<sup>81;118</sup>. Hay que tener en cuenta que, a pesar de la disminución de ArfGAP1 en el Golgi, no se altera la localización del coatómero ni de CtBP3/BARS. Respecto al primero, las imágenes de MET muestran que las gemas están recubiertas con el coatómero. Este resultado no resulta sorprendente puesto que, aunque ArfGAP1 y CtBP3/BARS interaccionan directamente con la cubierta COPI, se reclutan de manera independiente<sup>113</sup>. Además, el pretratamiento con DOG atenúa significativamente la translocación citoplasmática de ArfGAP1 inducida por el propanolol. Por lo tanto, nuestros resultados indican que el DAG es necesario para reclutar ArfGAP1 en el Golgi, facilitando la fisión de las vesículas COPI. Sin embargo, resulta mucho menos claro cómo el flujo de membrana retrógrado mediado por la BFA se ve alterado por el propanolol o el U73122. Es interesante destacar que resultados similares se obtuvieron con antagonistas de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)<sup>299</sup>, aunque sólo podemos especular que el DAG y los lípidos derivados de la PLA<sub>2</sub> facilitan el mismo grado de curvatura de membrana para la formación de los túbulos en el Golgi.

Finalmente, el DAG también puede estar implicado en el proceso de fusión de membrana en la zona RE/Golgi como muestra el continuo pero errático avance y retroceso de los túbulos con morfología anormal derivados del Golgi en células tratadas con propanolol (al menos en aquellas células que muestran túbulos). Esta observación sugiere, por un lado, que los túbulos inducidos por el propanolol son anormales, y por otro, que el retraso en el desensamblaje se debe a un defecto en la fusión de los túbulos con las membranas de RE. Sin embargo, el hecho de que el Golgi se desensamble correctamente cuando el propanolol o el U73122 se añaden después de la BFA sugiere que la causa primaria no es un defecto en el proceso de fusión. Si esta fuera la causa, el desensamblaje del Golgi se afectaría igualmente con independencia de si estos agentes se añadieran antes, después o al mismo tiempo que la BFA.

En resumen, nuestros datos indican que el DAG es necesario para la formación de vesículas COPI en el compartimento temprano del Golgi a través del reclutamiento de ArfGAP1. Además, estos resultados sugieren que diferentes especies moleculares de DAG pueden determinar el reclutamiento específico de proteínas directamente responsables para la fisión de membrana en los diferentes compartimentos del Golgi.

## La LPP3 en la regulación de los niveles de DAG en el complejo de Golgi

Las LPPs (*lipids phosphate phosphatases*) convierten el PA en DAG<sup>197;202;204</sup>. De las tres isoformas de la familia (LPP1, LPP2, LPP3), sólo la LPP3 se ha descrito en el Golgi<sup>205</sup>. Los experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-LPP3 confirman su presencia en este comportamiento. Además, los experimentos con BFA en células que sobreexpresan la construcción LPP3-GFP demuestran que la LPP3 se comporta como una proteína residente de Golgi, indicando que su localización en el Golgi no depende de Arf1. Este resultado es consistente con el hecho de que las LPPs son proteínas integrales de membrana. En este contexto, pensamos que la LPP3 era una posible candidata en el control de la homeostasis de los niveles de DAG en el Golgi. Con este objetivo, utilizamos dos estrategias experimentales para comprobarlo: el dominio C1 de la proteína PKC $\theta$  (que es un sensor de los niveles de DAG) y los anticuerpos anti-p-PKC $\epsilon$ . Los experimentos del silenciamiento de la LPP3 muestran una disminución del C1b-PKC $\theta$ -GFP en el Golgi, al igual que lo observado con el propanolol. Sin embargo, en las células que sobreexpresan la LPP3-GFP, no se observa ningún aumento de la fluorescencia de este dominio en el Golgi como cabría esperar por el esperado incremento del DAG. Este resultado "negativo" no nos resulta sorprendente ya que tampoco observamos un cambio en la distribución del dominio C1b-PKC $\theta$ -GFP en las células tratadas con DOG (un análogo de DAG), en las que previamente habíamos comprobado que se incorporaba en las membranas del Golgi. Por tanto, el dominio C1b-PKC $\theta$ -GFP sólo es una buena herramienta para detectar la disminución de los niveles de DAG en el Golgi pero no su aumento. Este fenómeno puede explicarse por la dificultad de resolver el aumento del dominio C1 en el Golgi debido a la saturación de la señal de fluorescencia. Por lo tanto, decidimos utilizar la PKC $\epsilon$  que, a diferencia del dominio C1b, se localiza mayoritariamente en el citoplasma. El comportamiento de la PKC $\epsilon$  frente al tratamiento con propanolol o con DOG fue clave para determinar el éxito de esta herramienta como sensor del incremento de los niveles de DAG en el Golgi (ver más adelante 'El papel del DAG en la localización de la PKC $\epsilon$  en el Golgi'). En los experimentos de sobreexpresión de la LPP3-GFP, al igual que ocurre en las células tratadas con DOG, vimos que la PKC $\epsilon$  fosforilada se recluta al Golgi como consecuencia del aumento de DAG. Además, en las células que expresan el mutante catalíticamente inactivo, no sólo no aumenta la p-PKC $\epsilon$  en el Golgi sino que incluso disminuye. Estos resultados sugieren un papel relevante de la actividad fosfatasa de la LPP3 en el control de los niveles de DAG en el Golgi.

Es importante destacar que la cuantificación de DAG (ensayo DAGK) en extractos celulares muestra que ni la sobreexpresión ni el silenciamiento de la LPP3

modifican el contenido total del DAG, lo que coincide con otros trabajos ya publicados<sup>205;208;300</sup>. Se postula que la LPP3 no es el mayor contribuyente de la actividad total de las LPPs, sino que es la LPP1. Por tanto, cambios en la actividad de la LPP3 no afectarían globalmente la composición total del DAG<sup>300</sup>. Sin embargo, en el caso de que se vieran afectados, es posible que el ensayo de la DAGK no sea suficientemente resolutivo para detectar cambios pequeños y transitorios de niveles de DAG<sup>205</sup> que tuvieran lugar sólo en el Golgi. Es decir, cabe pensar que si la LPP3 se localiza casi exclusivamente en el de Golgi, cambios locales en su actividad no se reflejaría en la masa (*pool*) total del DAG detectado por la DAGK.

### **Papel de la LPP3 en la estructura del Golgi y en el tráfico de membranas en la zona ER/Golgi**

Hemos demostrado que la disminución de los niveles de DAG por el propanolol altera el proceso de fisión de los ITs que median en transporte retrógrado en la zona ER/Golgi y, además, que la LPP3 regula la producción de DAG en el Golgi. Por tanto, cabe pensar que la LPP3 es la enzima responsable de generar la especie molecular de DAG necesaria para llevar a cabo la formación de las vesículas COPI. Para comprobarlo, hicimos un estudio detallado de la organización estructural del Golgi mediante MET y analizamos el transporte retrógrado de proteínas en las células con la LPP3 silenciada. Como muestran las imágenes de MET, el silenciamiento de la LPP3 induce claramente una acumulación de perfiles vesiculares con cubierta COPI muy próximas a las cisternas del Golgi. Este resultado coincide con los resultados previos observados con el propanolol en los que provoca el mismo efecto, aunque de forma más contundente. Esto se debe a que el propanolol es un inhibidor general de todas las isoformas de las LPPs, por lo que es de esperar que tenga un efecto mayor sobre la disminución de DAG y, consecuentemente, en la formación de los ITs. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la MET convencional no es suficientemente resolutiva para confirmar si estas vesículas están unidas o no a las cisternas del Golgi. Utilizando técnicas de tomografía electrónica confirmamos que en las células tratadas con propanolol las vesículas adyacentes a las cisternas no están libres, sino que permanecen unidas a través de un cuello estrecho. Por tanto, es probable que el silenciamiento de la LPP3 también impida el proceso de fisión de las vesículas COPI. Esto explicaría el enlentecimiento del desensamblaje del Golgi por la BFA y del transporte de la toxina Shiga desde el Golgi al RE y también el cambio de distribución del KDELr al alterar su ciclaje. A diferencia de lo observado en el silenciamiento de la LPP3, su sobreexpresión no altera el transporte retrógrado de proteínas, hecho que coincide



con lo que ocurre en las células tratadas con DOG. Esto sugiere que la capacidad de reclutamiento de la maquinaria molecular implicada en la formación de las vesículas COPI está saturada, por lo que un aumento de DAG ya no induce una mayor asociación de proteínas citoplasmáticas que participan en este proceso. Sorprendentemente, el mutante catalíticamente inactivo de la LPP3 tampoco altera la distribución subcelular del KDELR a diferencia de lo observado en los resultados del silenciamiento de la LPP3. Trabajos recientes han postulado que las LPPs interactúan entre sí formando homodímeros o heterodímeros pero que las actividades catalíticas de cada uno de los monómeros funcionan independientemente<sup>192</sup>. En el caso de que la LPP3 homo o heterodimerizara (con la LPP2 o la LPP1), nuestros resultados se podrían explicar de la siguiente manera: Cuando la proteína está silenciada, no hay dímero de LPP3 activo que produzca los niveles de DAG necesarios para la formación de vesículas COPI y, consecuentemente, el transporte retrógrado se bloquea. Sin embargo, cuando se expresa el mutante inactivo de la LPP3, se forma un dímero entre la LPP3 endógena (u otra LPP) y el mutante inactivo. En este contexto, el dominio catalítico de la proteína endógena funcionaría independientemente del dominio del mutante inactivo produciendo el DAG suficiente para permitir el transporte retrógrado. Actualmente, estamos examinando en el laboratorio si el silenciamiento conjunto de la LPP2 y de la LPP3 o de la LPP1 y de la LPP3 tiene un efecto sinérgico sobre el transporte retrógrado.

Además, sabemos que el DAG también es necesario en el transporte del TGN a la membrana plasmática<sup>143;247</sup>. Hasta el momento, no se conocen las enzimas responsables de generar el DAG implicado en la formación de los ITs en el TGN. Basándonos en los siguientes argumentos, es probable que la LPP3 se encuentre en el TGN facilitando el reclutamiento de la PKD: (i) los trabajos del grupo de Malhotra (y también nuestros) muestran que el propanolol impide la formación de ITs en el TGN<sup>143;247</sup>, (ii) la LPP3 sigue la vía secretora pasando por todos los compartimentos del Golgi hasta llegar a la membrana plasmática<sup>205</sup>, lo que significa que en algún momento estará en el TGN y (iii) la sobreexpresión de la LPP3 aumenta el reclutamiento de la p-PKCε en el Golgi, en particular al TGN, como parecen demostrar nuestros resultados de colocalización. De momento, no disponemos de buenos anticuerpos anti-TGN para células de ratón, pero sería interesante estudiar si la LPP3 se encuentra en esta zona del Golgi y determinar su papel en el transporte post-Golgi. De esta manera averiguaríamos si la producción del DAG por acción de la LPP3 tiene lugar tanto en la cara *cis* como en la cara *trans* y si es crucial para el respectivo transporte.

Es interesante destacar que el aumento del DAG por la sobreexpresión de la LPP3 induce una desestructuración de la típica cinta (*ribbon*) del Golgi y en donde vemos procesos de tubulación y/o vesiculación. Este resultado concuerda con el papel del DAG en la constricción de la membrana de Golgi para formar los ITs<sup>246</sup>. El DAG, debido a su forma cónica, condiciona fuertemente la flexibilidad y la curvatura de las membranas<sup>301</sup>. En condiciones fisiológicas, el DAG aumenta la flexibilidad y la curvatura de las membranas del Golgi favoreciendo la deformación de éstas. Consecuentemente, se induce una acumulación de energía en la membrana (estrés elástico) que el sistema tiende a relajar por varios mecanismos<sup>246</sup>: (i) reparto en las hemimembranas, (ii) redistribución a lo largo de la membrana y/o (ii) formación de túbulos en la membrana y constricción de éstos. Este modelo sugiere que el aumento descontrolado del DAG provocado de la sobreexpresión de la LPP3 acumula mucho estrés elástico en la membrana lo que se resuelve induciendo procesos de tubulación y/o constricción masiva de las membranas del Golgi. Por este motivo, el análisis ultraestructural del Golgi y la visualización *in vivo* del comportamiento del Golgi en células que sobreexpresan la LPP3 podrían darnos las claves del mecanismo implicado. Actualmente, estos experimentos se están llevando a cabo en el laboratorio. Es importante destacar que el efecto del aumento del DAG inducido por la sobreexpresión de la LPP3 no coincide con el efecto del DOG sobre la organización del Golgi puesto que éste no provoca ninguna alteración. Estas diferencias podrían explicarse por el hecho de que el DOG es un DAG que tiene las cadenas de ácidos grasos la mitad de cortas (8:0) que las del DAG producido por las LPPs (16:0; 18:0; 18:1). Teniendo en cuenta que el grado de empaquetamiento de las membranas está determinado por la longitud de los ácidos grasos, es probable que el DOG no modifique drásticamente el empaquetamiento ni la flexibilidad de la membrana. Consecuentemente, el DOG no desorganiza la arquitectura del Golgi. Sin embargo, el aumento de DAG por la sobreexpresión de la LPP3 genera una membrana poco empaquetada y más flexible que acaba induciendo la desorganización del Golgi. Por otro lado, no hay que descartar que el aumento de DAG inducido por la sobreexpresión de la LPP3 se localiza mayoritariamente en las membranas del Golgi y, por tanto, es probable que dicho aumento sea significativamente mayor que el inducido por el DOG ya que éste se repartiría también por otras membranas celulares. Además, la actividad de la LPP3 podría estar actuando en serie con la PLD para generar e interconvertir el PA en DAG, ya que PLD se ha localizado en el Golgi<sup>182;183</sup>. Esto sugiere que la LPP3 podría jugar un papel selectivo en los procesos relacionados con el tráfico de membranas controlados por la PLD.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la LPP3 controla la producción del DAG en el Golgi y que éstos son necesarios para mantener la organización estructural de este compartimento y para la formación de las vesículas COPI que median el transporte retrógrado. Aunque sea muy poco probable, no podemos descartar que la participación de la LPP3 en estos procesos sea exclusivamente a través de la producción del DAG sino que también puede estar mediado por otro(s) de sus productos ya que no tiene como sustrato únicamente al PA. Se ha descrito, que la LPP3 puede desfosforilar *in vitro* otros lípidos con grupos fosfatos como el LPA, la C1P o la S1P<sup>195;202;204</sup>, cuyo orden de afinidad es: PA ~ LPA > C1P > S1P<sup>202</sup>. De todos modos, estudios *in vivo* demuestran que las células *knockout* para la LPP3 (LPP3<sup>-</sup>/LPP3<sup>-</sup>) presentan un incremento de los niveles de PA y una disminución significativa de la producción del DAG<sup>297</sup>, lo que sugiere que el PA es el principal sustrato.

### **El papel del DAG en la localización de la PKCε en el Golgi**

Los resultados de inmunofluorescencia y *western blotting* muestran que la PKCε se localiza en el Golgi, en concordancia con lo publicado en trabajos anteriores<sup>236;302</sup>. Sin embargo, el mecanismo de reclutamiento es desconocido hasta el momento. Teniendo en cuenta que se ha descrito que la PKCε interacciona con una de las subunidades del COPI (β'-COP)<sup>245</sup>, un posible mecanismo sería a través de la GTPasa Arf1. En los experimentos de la cinética de desensamblaje de Golgi en presencia de BFA, observamos que la PKCε, a diferencia de la β'-COP, se comporta como una proteína residente del Golgi. Este resultado sugiere que la localización de PKCε en el Golgi no depende de Arf1 y que su mecanismo de reclutamiento es independiente del de la β'-COP.

Como la PKCε contiene un dominio C1 (dominio de unión a DAG) y mutaciones puntuales en los residuos Glu<sup>246</sup> y Met<sup>267</sup> en este dominio impiden su reclutamiento en el Golgi<sup>236</sup>, exploramos si el DAG era determinante para la localización de la PKCε en el Golgi. Los experimentos de microscopía confocal *in vivo* muestran que la reducción de los niveles de DAG en el Golgi por el propanolol provoca una redistribución de la PKCε al citoplasma. Además, este resultado se confirmó por *western blotting* ya que observamos una disminución de la PKCε en la fracción de las membranas de Golgi aisladas de células tratadas con propanolol. Estos resultados demuestran que el DAG es esencial para reclutar la PKCε en las membranas del Golgi y son consistentes con los estudios *in vitro* que demuestran que el dominio C1 de la PKCε le confiere una alta afinidad por el DAG<sup>236;237</sup>.

Se ha descrito que la PKCε se fosforila en tres residuos (Thr 566, Ser 703, Ser 729) y que la fosforilación en el residuo Ser 729 determina su localización en el

Golgi<sup>239</sup>. Por lo tanto, quisimos examinar si los niveles de DAG regulan la localización de la PKCε fosforilada (Ser 729) en el Golgi. Los experimentos de colocalización de la PKCε-GFP con los anticuerpos que reconocen la holoenzima PKCε (PKCε) y con los que sólo reconocen la forma fosforilada en el residuo Ser 729 (p-PKCε) pusieron de manifiesto que, como esperábamos, la p-PKCε era la forma mayoritaria en el Golgi. Además, el aumento de DAG se correlaciona con una mayor presencia de la forma fosforilada de la PKCε en el Golgi. Sin embargo, el mecanismo por el cual el DAG determina este aumento de la p-PKCε no está claro. Se han propuesto dos hipótesis: (1) La PKCε se fosforilaría en el residuo Ser 729 en el citoplasma, el cual induciría un cambio conformacional en la proteína que hace accesible el dominio C1 y, a continuación, se reclutaría a las membranas del Golgi por su interacción con el DAG<sup>242</sup>; (2) la PKCε se asociaría primero a las membranas de Golgi y, posteriormente, se fosforilaría<sup>303</sup>. Además la PKCε podría autofosforilarse o bien lo hacen otras quinasas (incluyendo a otras PKCs). Nuestros resultados sugieren que no se autofosforila ya que al sobreexpresar el mutante catalíticamente inactivo de la PKCε no se alteran los niveles de la p-PKCε en el Golgi. Sin embargo, no podemos descartar que la PKCε endógena activa sea capaz de fosforilar a la proteína sobreexpresada en la célula.

### **La PKCε en el transporte retrógrado de proteínas**

Estudios previos demuestran que el DAG es necesario para el transporte asociado a Golgi: el transporte retrógrado<sup>171</sup> y el transporte post-Golgi<sup>143;276</sup>. En el TGN, la formación de los ITs viene determinada por el reclutamiento de la PKD a través de su dominio C1<sup>143</sup>. Teniendo en cuenta que la PKCε se localiza en el Golgi a través de su dominio C1 y que interacciona con uno de los componentes del COPI (β'-COP), pensamos que sería un buen candidato para participar en la formación de las vesículas COPI que median el transporte retrógrado.

Como hemos visto, la localización de la PKCε en el Golgi depende de los niveles del DAG, así que examinamos si la PKCε era un efector del DAG para formar las vesículas COPI. Los experimentos del ciclaje del KDELr y la cinética de desensamblaje de Golgi inducido por la BFA en células que sobreexpresan el mutante catalíticamente inactivo de la PKCε muestran que la PKCε no parece participar en el transporte retrógrado de proteínas. Por tanto, parece que el reclutamiento de la PKCε en el Golgi no es necesario para la formación de los ITs de tipo COPI implicados en esta vía de transporte.

Por otro lado, nuestros experimentos de colocalización de la PKCε con marcadores específicos de diferentes compartimentos del Golgi muestran de forma clara que la PKCε se localiza mayoritariamente en el TGN. Estos resultados ponen

de manifiesto dos cosas: (1) El hecho de que no veamos efectos del mutante catalítico sobre el transporte retrógrado se debe a que la PKC $\epsilon$  no parece estar en la cara *cis* del Golgi, lo que parece contradictorio con lo descrito anteriormente de que la PKC $\epsilon$  interacciona con el componente  $\beta'$  del COPI y (2) la PKC $\epsilon$  participa en la formación de los ITs en el TGN, posiblemente a través de acción sobre PKD. Experimentos *in vitro* demuestran que la PKC $\epsilon$ , activada por el DAG, activa la PKD<sup>290</sup>. En apoyo a esta idea es interesante destacar, que se ha descrito que la PKC $\epsilon$  participa en los procesos de secreción, ya que modula la secreción de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG) procedentes Golgi<sup>23</sup>.