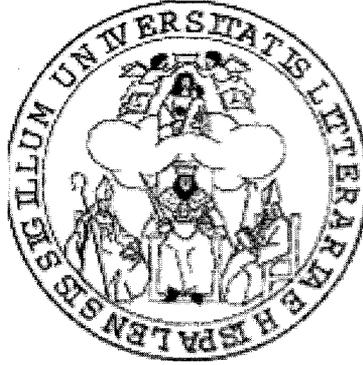


0-10733255

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**



**REGULACIÓN DEL TRANSPORTE RETRÓGRADO DEL  
RECEPTOR DE KDEL POR PROTEÍNA QUINASA A**

**Memoria presentada en el Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctora por**

**MARGARITA CABRERA SOLA**

**Sevilla, 2004**

**Directores:**

**Doctoranda:**

**Dr. D. Ángel Velasco**

**Profesor Titular de  
Biología Celular  
Universidad de Sevilla**

**Dra. Dª. Josefina Hidalgo**

**Catedrática de  
Biología Celular  
Universidad de Sevilla**

**Margarita Cabrera Sola**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 029 número 510 del libro  
correspondiente.

Sevilla

2-11-04

Registrada y clasificada en Tesis

Itérea Raffelli

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS</b> .....	6
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1. FUNDAMENTOS DEL TRÁFICO INTRACELULAR.....	7
1.1. Tráfico molecular entre orgánulos citoplásmicos.....	7
1.2. La ruta exocítica.....	9
1.3. La ruta endocítica.....	10
1.4. Maquinaria molecular que sustenta el transporte.....	10
1.4.1. Proteínas de cubierta.....	11
1.4.2. Proteínas de reconocimiento y fusión.....	13
1.5.Regulación del transporte entre compartimentos.....	15
1.5.1. Proteínas G triméricas.....	15
1.5.2. Enzimas fosforiladoras.....	16
2. RECONOCIMIENTO Y SELECCIÓN MOLECULAR AL COMIENZO DE LA RUTA EXOCÍTICA.....	16
2.1. Tráfico RE-Golgi.....	16
2.2. Señales de exportación del RE.....	20
2.3. Receptores de cargo para el transporte anterógrado RE-Golgi.....	23
2.4. Señales de recuperación para RE.....	26
2.5. Receptores de cargo para el transporte retrógrado Golgi-RE.....	27
3. REGULACIÓN DEL TRANSPORTE RETRÓGRADO GOLGI-RE.....	29
<b>ANTECEDENTES</b> .....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	35

---

<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	36
<b>REACTIVOS</b> .....	36
1. Plásmidos.....	36
2. Anticuerpos.....	36
3. Otros reactivos utilizados.....	37
4. Construcciones de ADN.....	37
5. Purificación de proteínas recombinantes.....	39
6. Obtención de baculovirus recombinantes.....	39
<b>MÉTODOS</b> .....	40
1. Subfraccionamiento celular.....	40
1.1. Preparaciones de citosol.....	40
1.2. Obtención de membranas microsomales.....	40
2. Cultivo de líneas celulares.....	41
3. Transfección transitoria.....	41
4. Microinyección.....	41
5. Ensayo de redistribución Golgi-RE.....	41
6. Inmunofluorescencia indirecta.....	42
7. Marcaje metabólico e inmunoprecipitación de lisozima.....	42
8. Ensayo de fosforilación e inmunoprecipitación del receptor de la secuencia KDEL.....	43
9. Ensayo de unión de proteínas citosólicas a péptidos.....	43
10. Electroforesis de proteínas en geles de archilamida.....	44
11. Electrotransferencia , inmunoblot y cuantificación densitométrica....	45
12. Ensayo de proteínas.....	45

---

<b>RESULTADOS</b> .....	46
1. Diseño molecular de una forma ectópica del receptor de la secuencia KDEL...46	
2. Valoración funcional del extremo C-terminal del receptor de la secuencia KDEL.....	52
3. Papel del dominio C-terminal del receptor de la secuencia KDEL en su transporte retrógrado.....	56
4. Papel del dominio C-terminal del receptor de la secuencia KDEL en su interacción con las proteínas de cubiertas COP I.....	61
5. Papel del residuo de Serina 209 del receptor de KDEL en el transporte retrógrado Golgi-RE.....	68
6. Fosforilación por PKA del receptor de KDEL.....	71
7. Relevancia funcional de la fosforilación por PKA del receptor de KDEL.....	73
<b>DISCUSIÓN</b> .....	78
1. Significación funcional del dominio C-terminal del receptor de la secuencia KDEL.....	78
2. Papel del residuo de serina 209 del receptor de KDEL.....	80
3. Fosforilación del receptor de KDEL por PKA.....	81
4. Interacción del receptor de KDEL con los componentes del complejo COP I...82	
5. Regulación por PKA del transporte retrógrado del receptor de KDEL.....	83
6. Modelo.....	86
<b>CONCLUSIONES</b> .....	87
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	88

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Introducción:

<b>Figura:</b>	Retículo de transición.....	17
----------------	-----------------------------	----

### Resultados:

<b>Figura 1:</b>	Topología del receptor de KDEL.....	46
<b>Figura 2:</b>	Representación esquemática del receptor de KDEL con el epítipo c-myc .....	47
<b>Figura 3:</b>	Localización subcelular de una forma ectópica del receptor de la secuencia KDEL.....	48
<b>Figura 4:</b>	Secreción de lisozima-KDEL.....	49
<b>Figura 5:</b>	Detección por inmunofluorescencia del receptor de KDEL y lisozima- KDEL.....	50
<b>Figura 6:</b>	Efecto de la sobreexpresión del receptor sobre la secreción de lisozima- KDEL.....	51
<b>Figura 7:</b>	Representación esquemática de una versión truncada del receptor de KDEL.....	52
<b>Figura 8:</b>	Localización subcelular de una forma truncada del receptor de KDEL carente del extremo C-terminal.....	53
<b>Figura 9:</b>	Localización subcelular del receptor CXCR4 y una forma quimérica....	54
<b>Figura 10:</b>	Efecto de la delección C-terminal del receptor sobre la secreción de lisozima-KDEL.....	55
<b>Figura 11:</b>	Redistribución Golgi-RE del receptor de KDEL endógeno.....	57
<b>Figura 12:</b>	Requerimientos para la redistribución Golgi-RE del receptor de KDEL endógeno.....	58
<b>Figura 13:</b>	Efecto de la delección C-terminal del receptor sobre su redistribución Golgi-RE.....	59
<b>Figura 14:</b>	Diferencias en la capacidad de redistribución al RE del receptor nativo y la forma truncada C-terminal.....	60

<b>Figura 15:</b>	Interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con componentes del coatómero.....	62
<b>Figura 16:</b>	Efecto de la presencia de un motivo dilisina terminal en la interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con componentes del coatómero.....	63
<b>Figura 17:</b>	Efecto de la eliminación de serina 209 sobre la interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con componentes del coatómero.....	64
<b>Figura 18:</b>	Efecto de la sustitución de serina 209 sobre la interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con componentes del coatómero.....	65
<b>Figura 19:</b>	Efecto de la alteración del motivo dilisina críptico sobre la interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con componentes del coatómero.....	66
<b>Figura 20:</b>	Interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con ARF-GAP.....	67
<b>Figura 21:</b>	Efecto de la sustitución S209A sobre la redistribución Golgi-RE del receptor de la secuencia KDEL.....	69
<b>Figura 22:</b>	Efecto de la mutación S209A sobre la retención intracelular de lisozima-KDEL.....	70
<b>Figura 23:</b>	Fosforilación del receptor de KDEL por subunidades catalíticas C $\alpha$ de PKA.....	72
<b>Figura 24:</b>	Fosforilación del receptor de KDEL por PKA endógena.....	72
<b>Figura 25:</b>	Redistribución del receptor de la secuencia KDEL tras un bloqueo del transporte RE-Golgi.....	74
<b>Figura 26:</b>	Efecto del tratamiento con H89 sobre la redistribución Golgi-RE del receptor de KDEL.....	75
<b>Figura 27:</b>	Efecto de la sustitución S209D sobre la localización subcelular del receptor de la secuencia KDEL.....	76
<b>Figura 28:</b>	Efecto del tratamiento con H89 sobre la redistribución Golgi-RE de la forma mutada S209D del receptor de KDEL.....	77
<b>Figura29:</b>	Modelo.....	86

## **ABREVIATURAS**

<b>ARFs</b> ( <i>ADP-Ribosylation Factors</i> )	Factores de ADP ribosilación
<b>BFA</b> ( <i>Brefeldin A</i> )	Brefeldina A
<b>CGN</b> ( <i>Cis-Golgi Network</i> )	Red <i>cis</i> del Golgi
<b>COPs</b> ( <i>Coated Proteins</i> )	Proteínas de cubierta
<b>GEFs/GEPs</b> ( <i>Guanine nucleotide Exchange Factors/Proteins</i> )	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
<b>H-89</b>	N-(2-( <i>p</i> -bromocinamilamino)etil)-5-isoquinolinsulfonamida
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
<b>NSF</b> ( <i>N-ethylmaleimide Sensitive Factor</i> )	Factor sensible a N-etilmaleimida
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBS</b> ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )	Tampón fosfato salino
<b>PKA</b> ( <i>Protein Kinase A</i> )	Proteína quinasa A
<b>PKI</b> ( <i>Protein Kinase A Inhibitor</i> )	Inhibidor de la proteína quinasa A
<b>PMSF</b>	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
<b>PVDF</b>	Di-fluoruro de polivinilideno
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SNAP</b> ( <i>Soluble NSF Attachment Protein</i> )	Proteína soluble de unión a NSF
<b>SNAREs</b> ( <i>SNAP Receptors</i> )	Receptor de SNAP
<b>TGN</b> ( <i>Trans-Golgi Network</i> )	Red <i>trans</i> del Golgi

## **INTRODUCCIÓN**

## 1. FUNDAMENTOS DEL TRAFICO INTRACELULAR

### 1.1. TRAFICO MOLECULAR ENTRE ORGANULOS CITOPLASMICOS

Los diferentes orgánulos membranosos presentes en la célula no son, en modo alguno, compartimentos aislados. Si bien cada uno de ellos se caracteriza por contar con una dotación molecular autóctona y desempeñar funciones propias, en realidad son estructuras interdependientes. Continuamente se producen trasvases de moléculas de un orgánulo a otro, de forma que flujos de proteínas y otras moléculas recorren el citoplasma celular en cada instante.

En términos generales, el transporte puede ser vesicular o no vesicular. Este último se refiere, por ejemplo, al ingreso y exportación de proteínas solubles en el núcleo o la mitocondria. En suma, son reacciones de transferencia de moléculas individuales desde un compartimento a otro de la célula.

Por el contrario, el transporte vesicular, objeto del presente estudio, comprende la formación de un transportador (*carrier*). Se trata de una estructura transitoria, rodeada por una membrana limitante y en cuyo interior se incluyen una serie de moléculas a transportar denominadas, en conjunto, "carga". El transportador es un intermediario y media la transferencia colectiva de moléculas desde un compartimento donador hasta otro aceptor. Para ello, se desprende o evagina del primero y viaja por el citoplasma hasta fundir su membrana con la del orgánulo de destino (Rothman y Orci, 1992; Rothman, 1994).

Tratándose del transporte simultáneo de diferentes moléculas en un mismo vehículo, la selección del cargo es un aspecto fundamental del proceso. Durante la génesis del intermediario de transporte, las proteínas y lípidos son escogidos para que, básicamente, abandonen el orgánulo donador aquellas moléculas que necesariamente han de viajar a otro destino celular (Rothman y Wieland, 1996). La eficiencia del transporte depende de esta segregación inicial entre las moléculas a exportar y el resto de componentes presentes en el compartimento de origen.

Además, si las transferencias no fuesen selectivas las diferencias en composición entre los diferentes orgánulos quedarían en poco tiempo anuladas.

Por tanto, existen mecanismos moleculares responsables de la selección de unos componentes y retención de otros. De ahí, la denominación de “señales” o “motivos” que, en el caso de proteínas, suelen referirse a grupos de aminoácidos continuos o no en la secuencia. Se habla, por ello, de señales de exportación que permiten la salida de un compartimento, señales de retención que hacen posible su permanencia y señales de recuperación para hacer retornar a moléculas escapadas. Las señales son reconocidas por receptores específicos quienes, en último término, son los responsables de la selección molecular. Generalmente, los receptores acompañan a sus ligandos durante el transporte, por lo que han de ser recuperados y devueltos al orgánulo de partida para ser reciclados y participar en nuevas rondas de transporte (Barlowe, 2003b).

Por tal motivo, las transferencias moleculares entre orgánulos suelen ser bidireccionales. El transporte anterógrado desde un compartimento donador a otro receptor tiene su contrapartida en forma de transporte retrógrado desde el segundo hasta el primero (Lippincott-Schwartz, 1993). La finalidad de este último es doble: reciclaje de receptores y otras moléculas necesarias para el transporte y, al mismo tiempo, recuperación de aquellos componentes integrales del orgánulo donador que, accidentalmente, pudieran haber sido incluidos en intermediarios de transporte y alcanzado un compartimento distinto al de residencia. Resulta, por ello, obvio la imposibilidad práctica de separar ambas vías. Por ejemplo, la inhibición del transporte retrógrado afecta asimismo al flujo anterógrado (Gaynor y Emr, 1997; Letourneur y cols., 1994).

Si bien se suele utilizar comúnmente la denominación de transporte vesicular, la naturaleza de los intermediarios no necesariamente ha de corresponderse con vesículas esféricas. Las observaciones al microscopio electrónico de muestras fijadas revelan la presencia multitudinaria de perfiles vesiculares en el citoplasma celular (Horstmann y cols., 2002). No obstante, los estudios *in vivo* con proteínas cargo fluorescentes parecen indicar que, en muchos casos, se trata de extensiones tubulares o incluso estructuras tubulovesiculares pleomórficas, a veces de gran tamaño (Presley y cols., 1997; Hirschberg y cols., 1998; Polishchuk y cols., 2000).

En el presente trabajo utilizaremos, por ello, el término “intermediario de transporte” o “transportador” para denominar la estructura física encargada de realizar la transferencia.

El citoplasma celular es un "hervidero" de intermediarios de transporte. Aunque morfológicamente pudieran parecer similares, existen diferentes clases funcionales dependiendo de los compartimentos que relacionan y el sentido, anterógrado o retrógrado, en que viajan. La mayoría de ellos se encuentran integrados en, al menos, una de las dos grandes rutas de transporte intracelular que operan en las células eucarióticas.

## 1.2. LA RUTA EXOCÍTICA

La ruta exocítica parte del retículo endoplásmico (RE) y, a través del complejo de Golgi, alcanza la membrana plasmática. Básicamente es la vía biosintética seguida por proteínas secretoras y de la membrana plasmática (Palade, 1975). En parte, también recorren este itinerario las proteínas endógenas de orgánulos como el RE, Golgi, endosomas y lisosomas (Mellman y Warren, 2000).

La síntesis de estas moléculas es llevada a cabo por los ribosomas asociados al RE rugoso. En este orgánulo tiene lugar el plegamiento de la proteína, su modificación co- y post-traducciona l y el establecimiento de asociaciones oligoméricas. Durante todas estas reacciones, las moléculas son continuamente evaluadas por parte de un sistema de calidad a cargo de chaperonas, enzimas de glicosilación, etc. que determinan el momento en que aquella alcanza un estado conformacional apropiado (Kleizen y Braakman, 2004). En este punto, entra en juego la maquinaria encargada de seleccionar a las proteínas y catalizar su exportación con destino a Golgi.

En el complejo de Golgi se realizan múltiples reacciones secuenciales de procesamiento, fundamentalmente glicosilaciones, pero también fosforilación, proteólisis, sulfatación, etc (Helenius y Aebi, 2001). También en el Golgi, y más concretamente en su compartimento más distal o TGN, las proteínas son seleccionadas para ser enviadas a múltiples destinos finales: espacio extracelular, membrana plasmática, endosomas, gránulos de secreción (Griffiths y Simons, 1986).

Mientras tanto, aquellos componentes endógenos del RE que alcanzan el Golgi son reconocidos y devueltos a su orgánulo de origen (Pelham, 1991).

En el Golgi, además, se reciclan los componentes de la membrana plasmática (Farquhar, 1985). Se puede decir, por tanto, que el complejo de Golgi constituye el eje central del flujo exocítico y endocítico, ya que en sus cisternas convergen las moléculas que van a ser exportadas fuera de la célula con aquellas que, por el contrario, ingresan desde el espacio extracelular (Donaldson y Lippincott-Schwartz, 2000).

### **1.3. LA RUTA ENDOCÍTICA**

La contrapartida al flujo exocítico la constituye la ruta endocítica. Consiste en la captación de componentes extracelulares en invaginaciones de la membrana plasmática que, posteriormente, dan lugar a vesículas endocíticas libres en el citoplasma (Conner y Schmid, 2003). Las vesículas endocíticas convergen en los endosomas, en cuyo interior tiene lugar la selección de los complejos ligando-receptor formados con anterioridad a nivel de la superficie celular (Mellman y cols., 1986). A partir de aquí, el itinerario seguido por las diferentes moléculas endocitadas varía. Algunas son degradadas en el interior del endosoma y otras, en cambio, son recicladas a la membrana plasmática, bien directamente o a través del complejo de Golgi (Mellman, 1996).

### **1.4. MAQUINARIA MOLECULAR QUE SUSTENTA EL TRANSPORTE**

Cada uno de los pasos del transporte intracelular comprende la transferencia de moléculas desde un compartimento donador hasta otro receptor o diana. Conceptualmente este tránsito puede ser desglosado en varias etapas correspondientes a los procesos de selección de moléculas, inclusión en un intermediario de transporte y anclaje y fusión con el compartimento u orgánulo receptor. Una serie de proteínas son las encargadas de catalizar las diferentes etapas. La llamada "maquinaria molecular del transporte" comprende aquellas moléculas que no son en si mismas objeto del transporte, pero hacen posible su realización (Rothman, 1994; Rothman y Wieland, 1996). Algunas acompañan a los componentes transportados; otras, en cambio, ejercen su función exclusivamente a nivel del orgánulo donador o receptor. En definitiva, son las moléculas que sustentan el transporte. A decir de algunos autores, forman parte

fundamental del acervo molecular común sobre el que se asienta la organización celular eucariota (Rothman y Orci, 1992).

En algunos casos, se trata de moléculas que participan en múltiples tipos de transferencias; en otros, son específicas de un determinado paso de transporte entre dos compartimentos concretos.

#### 1.4.1. PROTEÍNAS DE CUBIERTA

La formación de un intermediario de transporte a partir de un compartimento donador requiere que, con anterioridad, se asocien a la superficie citosólica de éste un conjunto de proteínas solubles para constituir una cubierta proteica (Schekman y Orci, 1996; McMahan y Mills, 2004). La cubierta tiene dos funciones. Por un lado, interviene en la selección y concentración de las moléculas a transportar (Aridor y Balch, 1996). Por otro, permite la deformación física de la membrana limitante del orgánulo, de forma que se origina un saliente en forma de “burbuja” o “yema” (*bud*) que, tras aumentar de tamaño, termina por desprenderse. Las proteínas de cubierta son, por tanto, los auténticos catalizadores de los procesos de evaginación (Springer y cols., 1999).

Existen múltiples complejos proteicos formadores de cubierta en las células. Cada uno de ellos está especializado en la formación de transportadores para una ruta concreta del tráfico intracelular. Para nuestro estudio, nos interesan particularmente aquellos que intervienen al comienzo de la ruta exocítica; esto es, los encargados de dirigir el tráfico molecular entre el RE y el Golgi.

El complejo COPII interviene exclusivamente en la exportación de moléculas desde el RE con destino al complejo de Golgi (Barlowe y cols., 1994). Está constituido por una pequeña proteína de unión a GTP de 24 kDa llamada Sar1p y los heterodímeros Sec23/24p y Sec13/31p.

Estudios *in vitro* han permitido reconstruir el ensamblaje secuencial de estas proteínas sobre la membrana del RE. La asociación de Sec23/24p requiere que, previamente, se haya unido a la membrana Sar1p en su forma activa (unida a GTP) y, a su vez, es condición imprescindible para que se una Sec13/31p (Bednarek y cols., 1996; Matsuoka y cols., 1998; Haucke, 2003).

El complejo COPII interactúa con motivos de exportación presentes en el tallo citosólico de los receptores de “carga”, haciendo posible la selección molecular durante la evaginación (Barlowe, 2003b).

El complejo COPI incluye una proteína de unión a GTP de 20 kDa denominada ARF1 (ADP-ribosylation factor 1) y un complejo (700 kDa) equimolecular de siete polipéptidos denominado coatómero (Schekman y Orci, 1996). Forman el coatómero las proteínas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta'$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -, y  $\zeta$ -COP, las cuales se encuentran ya asociadas, total o parcialmente, durante su permanencia en el citosol (Waters y cols., 1991). Tras varios años de discusión sobre la participación o no de este complejo en el tráfico anterógrado RE-Golgi, actualmente se acepta de forma general que las cubiertas COPI intervienen fundamentalmente en el transporte retrógrado desde el Golgi al RE (Love y cols., 1998). Sin embargo, es posible también que reemplazen al complejo COPII en el último tramo del tráfico anterógrado, esto es, desde el compartimento intermedio al cis-Golgi (Aridor y cols., 1995; Rowe y cols., 1996; Scales y cols., 1997).

Aunque los componentes moleculares son distintos en un caso y otro, desde el punto de vista de sus respectivos mecanismos de actuación ambos complejos se comportan en forma similar. Así, por ejemplo, el ensamblaje de la cubierta depende de la activación inicial de una pequeña proteína G. En este sentido el papel funcional de ARF1 en el ensamblaje de las cubiertas COPI es análogo al ejercido por Sar1p en el ensamblaje de COPII (Serafini y cols., 1991). En definitiva, la activación de la proteína G favorece su asociación a la membrana, lo cual desencadena la incorporación (secuencial en el caso de COPII y en bloque en el caso de COPI) de los restantes componentes de la cubierta (Schekman y Orci, 1996). Al igual que COPII, los componentes integrantes del complejo COPI interactúan con las proteínas a transportar interviniendo activamente en su selección (Letourneur y cols., 1994; Harter y Wieland, 1998).

Al deformar físicamente la membrana del compartimento donador, las proteínas de cubierta inician el proceso de evaginación. Este culmina cuyo, mediante la fusión periplásmica (fisión) de la membrana, se libera al citoplasma un intermediario de transporte. Es posible que en ésta última parte del proceso participen proteínas de escisión del tipo de la dinamina, implicada en la formación de las vesículas endocíticas

cubiertas de clatrina (Sweitzer y Hinshaw, 1998). También podrían influir cambios localizados en la composición lipídica de las membranas (Godi y cols., 1999).

El tiempo de permanencia de la cubierta proteica es limitado. En el caso de los complejos COPI y COPII, una vez completada la escisión del transportador, las proteínas se desprenden como consecuencia de la hidrólisis del GTP unido a ARF1 y Sar1p respectivamente. Las formas unidas a GDP de ambas proteínas carecen de afinidad por las membranas, por lo que se liberan al citosol. En ausencia de la correspondiente proteína G, los restantes componentes de la cubierta experimentan disociación inmediata y son reutilizados en nuevas rondas de transporte. En realidad, ambos complejos portan, desde el mismo momento de su ensamblaje, a las moléculas GAP (proteínas activadoras de la actividad GTPásica) responsables de desencadenar la despolimerización (Donaldson, 2000). Se trata, por tanto, de controlar temporalmente que este acontecimiento tenga lugar tras la evaginación y no antes.

Por otro lado, la disociación de la cubierta permite exponer aquellas moléculas que identifican al intermediario de transporte y determinan su destino final.

Hallazgos recientes sugieren la existencia en el orgánulo donador de proteínas de membrana que impedirían el reflujo de los intermediarios recién formados (Kamena y Spang, 2004).

#### 1.4.2. PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO Y FUSIÓN

Tras su desprendimiento del orgánulo o compartimento de origen, el intermediario y su cargamento de moléculas transportadas viajan a través del citoplasma hasta aproximarse al orgánulo de destino. En términos generales, el papel desempeñado por los componentes del citoesqueleto y las proteínas motoras durante esta parte del transporte es fundamental, si bien la importancia relativa de microtúbulos y filamentos de actina depende de la ruta concreta de transporte (Lippincott-Schwartz, 1998).

La interacción del intermediario de transporte con el compartimento receptor es un proceso gradual que consta de diferentes etapas: anclaje, reconocimiento y fusión, cada una de las cuales es realizada por una maquinaria proteica particular. Los factores de aproximación y anclaje (*tethering*) suelen ser proteínas de gran tamaño con largas

porciones helicoidales (*coiled-coil*). Estas moléculas dan lugar a conexiones filamentosas que enlazan el transportador al compartimento de destino (Whyte y Munro, 2002). Cada paso del transporte intracelular consta de una dotación característica y particular de proteínas de anclaje. Su incorporación desde el citosol hasta las membranas es un proceso regulado por proteínas G pertenecientes a la familia Rab, siendo éstas igualmente específicas de cada paso de transporte (Zerial y McBride, 2001).

Las SNAREs son proteínas integrales de membrana implicadas en el reconocimiento entre el transportador y el orgánulo aceptor (Nichols y Pelham, 1998). Las v-SNAREs son activamente seleccionadas e incluidas en la membrana del intermediario de transporte durante el proceso de evaginación. Identifican al vehículo transportador para que pueda ser reconocido por las t-SNAREs presentes en la membrana del compartimento diana (Hay y Scheller, 1997).

La interacción de las v-SNAREs con las t-SNAREs se realiza a través de sus respectivos dominios citosólicos con estructura helicoidal y es altamente específica. De este modo, las transferencias moleculares entre orgánulos se hallan predeterminadas y es prácticamente imposible que un transportador funda con un compartimento diferente de aquel al que está destinado (Varlamov y cols., 2004). En definitiva, la especificidad del tráfico intracelular entre compartimentos depende de las interacciones complementarias entre v-SNARE y t-SNARE. Estas interacciones están sometidas a regulación espacial y temporal por parte de otras proteínas (Gerst, 2003).

Tras la formación del complejo SNARE las membranas participantes se encuentran muy próximas, hasta tal punto que podría tener lugar espontáneamente la fusión entre ellas, con o sin la ayuda de factores adicionales (Weber y cols., 1998). NSF y SNAPs son proteínas que participan en los procesos de fusión entre membranas de muy diversa procedencia (Block y cols., 1988; Sollner y cols., 1993). Ambas moléculas están presentes en todos los tipos celulares eucariotas, en forma altamente conservada, y son esenciales en todos los pasos del tráfico intracelular entre compartimentos. En un tiempo se pensó que, de algún modo, se comportarían como proteínas fusógenas y ellas mismas catalizarían la fusión (Rothman y Orci, 1992).

Estudios recientes indican, sin embargo, que la actividad ATPásica de NSF es necesaria para disociar los complejos SNAREs formados durante el reconocimiento de las membranas (Weber y cols., 2000).

Sea como fuere, la disociación de los complejo SNAREs permite llevar a cabo el reciclaje de las v-SNAREs, que deberán retornar al compartimento donador mediante transporte retrógrado, así como disponer en la membrana del orgánulo receptor de una nueva remesa de t-SNAREs listas para recibir transportadores adicionales.

## **1.5. REGULACIÓN DEL TRANSPORTE ENTRE COMPARTIMENTOS**

La compleja maquinaria molecular responsable de la formación y el consumo de los intermediarios de transporte se halla sometida a regulación. La eficiencia de las transferencias entre orgánulos depende de un estricto control espacial y temporal de las múltiples interacciones moleculares implicadas. Además de las proteínas G de bajo peso molecular pertenecientes a las familias Rab y ARF, otras moléculas reguladoras permiten la correcta coordinación de las diferentes etapas de que consta cada uno de los acontecimientos de transporte entre compartimentos (Altan-Bonnet y cols., 2004). Se trata de especies moleculares ya conocidas por su participación en rutas de traducción de señales a nivel de membrana plasmática. El papel funcional que realizan en relación con el transporte dista de ser conocido.

### **1.5.1. PROTEÍNAS G TRIMÉRICAS**

Todas las rutas de transporte analizadas parecen estar moduladas diferencialmente por diversos tipos de proteínas G. De hecho, se han identificado ciertas isoformas de subunidades  $G\alpha$  como componentes integrales del Golgi (Denker y cols., 1996) donde podrían desempeñar un importante papel estructural (Jamora y cols., 1997; Yamaguchi y cols., 1997) además de regular el ensamblaje y disociación de las cubiertas COPI (Donaldson y cols., 1991).

### **1.5.2. ENZIMAS FOSFORILADORAS**

La regulación por fosforilación es una forma rápida y eficaz de modular los procesos de transporte, al tiempo que susceptible de reversión mediante la activación de las correspondientes enzimas fosfatasas.

Entre los acontecimientos del tráfico intracelular que se encuentran sometidos al control por fosforilación figuran: las interacciones de los receptores de cargo con las proteínas de cubierta, el ensamblaje/polimerización de ciertos complejos de cubierta, el reclutamiento de proteínas motoras, la asociación de los intermediarios de transporte con proteínas de anclaje, las interacciones entre v- y t-SNARE (Davidson y cols., 1992; Lee y Linstedt, 2000; Muñiz y cols., 1996; Roth y Sternweis, 1997; Van Lint y cols., 2002; De Matteis y cols., 2002).

Las quinasas implicadas pertenecen a varias clases: PKC, PKA, PKD, Caseinaquinasa, PI-3quinasa, Src quinasa, etc.

## **2. RECONOCIMIENTO Y SELECCIÓN MOLECULAR AL COMIENZO DE LA RUTA EXOCÍTICA**

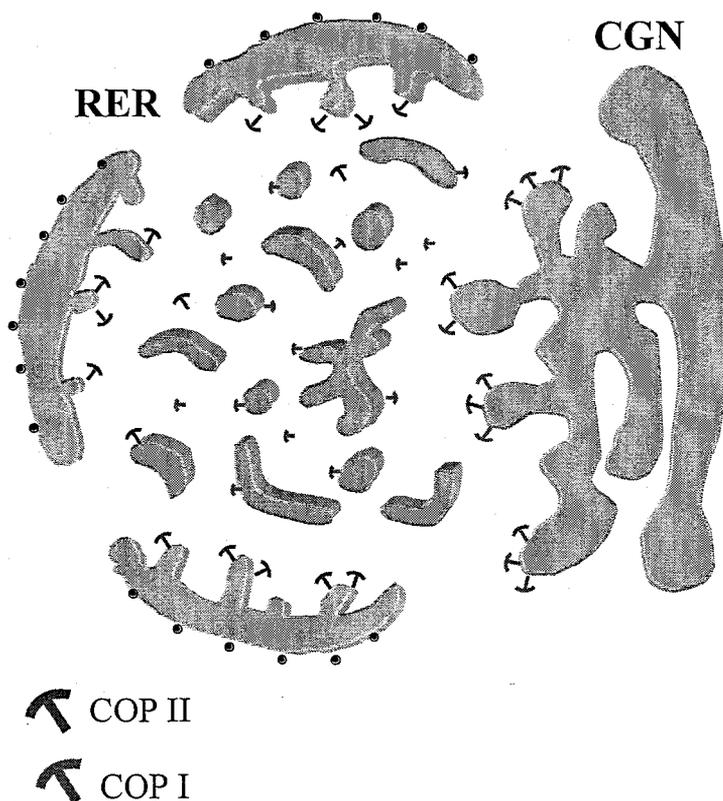
### **2.1. TRAFICO RE-GOLGI**

El tráfico molecular entre el RE y el complejo de Golgi es intenso. Intermediarios de transporte de muy diversos tipos (vesículas y túbulos aislados, así como agrupaciones tubulovesiculares y grandes estructuras pleomórficas) pueblan la interfase citoplásmica entre ambos orgánulos. Funcionalmente, los hay que pertenecen a la modalidad de transporte anterógrado; otros, en cambio, actúan en el flujo retrógrado. Algunos están cubiertos por el complejo COPII, otros por COPI y muchos otros no muestran cubierta. Para mayor complicación, los compartimentos de salida del RE y de entrada al Golgi son estructuralmente complejos, además de muy variables dependiendo del tipo celular y circunstancias fisiológicas.

Tradicionalmente se ha considerado que el llamado retículo de transición representa el lugar de exportación de las proteínas que abandonan el RE (Palade, 1975).

Se trata de un conjunto de cisternas tubulares próximas al complejo de Golgi que tienen como particularidad el presentar parte de su superficie desprovista de ribosomas, a pesar de ser continuas con el RE rugoso. Con posterioridad se ha determinado que los lugares de exportación pueden encontrarse tanto próximos como alejados del Golgi (Bannykh y cols., 1996).

En general, consisten en una serie de cisternas de transición dispuestas alrededor de una región central ocupada por grupos de vesículas y túbulos cubiertos de COPI. La superficie de las cisternas enfrentada al entramado tubulovesicular es lisa y de ella emergen constantemente perfiles vesiculares con cubierta COPII. Por el contrario, en su superficie opuesta las cisternas del RE presentan ribosomas. Esta organización general se presta a múltiples variaciones incluso dentro de una misma célula.



Por su parte, el compartimento cis del Golgi está constituido por 2-3 cisternas fenestradas que se prolongan en un entramado de túbulos interconectados en forma de encaje (Rambourg y Clermont, 1990). La denominación de red cis del Golgi (CGN) hace alusión a las características estructurales de esta parte del orgánulo.

A mitad de camino entre el RE y el Golgi se sitúa un conjunto de membranas pleomórficas, constituido básicamente por agrupaciones de vesículas y túbulos, que en su día recibió la denominación de compartimento intermedio (Hauri y Schweizer, 1992). Su existencia como entidad estructural independiente estuvo avalada por la identificación de proteínas endógenas, (Schweizer y cols., 1988), así como por la asignación de funciones exclusivas tales como la iniciación de la O-glicosilación (Tooze y cols., 1988) o ser el lugar preferente de evaginación de ciertos virus (Sodeik y cols., 1993).

Estudios adicionales demostraron que se trata de una estación más en la ruta exocítica, ya que las proteínas secretoras en elaboración la atraviesan en su marcha hacia el espacio extracelular o membrana plasmática (Schweizer y cols., 1990).

Resultó además que, en determinadas condiciones experimentales (incubación a 15°C o con Brefeldin A), ciertas proteínas se acumulan preferentemente en esta localización (Klumperman y cols., 1998; Rios y cols., 1994).

Actualmente se concibe el compartimento intermedio como un lugar de concentración del cargo anterógrado y, sobre todo, la estructura preferente para el reconocimiento y selección de las moléculas que, habiendo escapado del RE, deben retornar a éste orgánulo (Martínez-Menárguez y cols., 1999). Los receptores encargados de efectuar tal reconocimiento se suelen encontrar concentrados en este lugar, así como las proteínas de cubierta COPI responsables de la formación de los correspondientes intermediarios para el transporte retrógrado.

Precisamente la presencia mayoritaria del complejo COPI, en lugar de COPII, a nivel del compartimento intermedio es tema de discusión. Algunos autores proponen abiertamente la participación de estas proteínas de cubierta en el transporte anterógrado además del flujo retrógrado. Si bien se admite de forma general que inicialmente las proteínas abandonan el RE en intermediarios cubiertos de COPII, se sugiere que pronto este complejo es reemplazado por COPI (Aridor y cols., 1995; Rowe y cols., 1996;

Scales y cols., 1997). El intercambio de cubiertas tendría lugar antes de que las proteínas en tránsito alcancen el compartimento intermedio o bien a nivel de éste (Rowe y cols., 1996).

La naturaleza de los intermediarios que median el transporte RE-Golgi es otro aspecto cuestionado. La monitorización en células vivas del transporte sincronizado de una proteína cargo fluorescente ha mostrado la formación, a la salida del RE, de grandes estructuras de 0.4-1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Lippincott-Schwartz, 1998). Ello contrasta con la visión clásica del transporte mediado por vesículas de 60-80 nm de diámetro. Al microscopio electrónico los intermediarios de gran tamaño se corresponden con estructuras de forma irregular, envueltas por una membrana limitante y con numerosos perfiles vesiculares asociados (Horstmann y cols., 2002; Palmer y Stephens, 2004). Se desplazan a lo largo de microtúbulos desde el citoplasma periférico hasta las proximidades del Golgi en la región perinuclear. Para algunos autores, este tipo de intermediarios mediarían el transporte a larga distancia, es decir, a partir de sitios de exportación del RE muy alejados del Golgi, en tanto que, para distancias cortas, se utilizarían vesículas más o menos típicas.

Por otro lado, hay quien piensa que los intermediarios de gran tamaño sencillamente se corresponden con el compartimento intermedio. Según uno de los varios modelos propuestos (Hong, 1998), el compartimento intermedio es, en realidad, una estructura transitoria y móvil. Se originaría por la fusión homotípica de vesículas derivadas del RE, justo después del desprendimiento de la cubierta COPII. A partir de aquí, el compartimento experimentaría un proceso de maduración gradual al tiempo que se aproxima al Golgi. La maduración consistiría en la evaginación de intermediarios COPI con moléculas de retorno para el RE. Finalmente, el compartimento fundiría con el cis-Golgi, por lo que éste podría ser considerado como una continuación funcional de aquel.

Sea como fuere, los flujos moleculares anterógrado y retrógrado alcanzan su máxima coordinación en la región comprendida entre el RE y el complejo de Golgi. Así, los sitios de exportación del RE se originan en lugares concretos de este orgánulo a partir del flujo retrógrado procedente del Golgi, de forma que la interrupción de este

último afecta a la distribución de aquellos (Hammond y Glick, 2000). Asimismo, los agentes y condiciones que ocasionan un bloqueo en el transporte anterógrado RE-Golgi dan lugar a la desorganización de este último, cuyo mantenimiento estructural depende directamente de la actividad exportadora del RE (Ward y cols., 2001).

RE y Golgi son, por tanto, orgánulos funcional y estructuralmente dependientes. De hecho, las proteínas de membrana endógenas del Golgi periódicamente reciclan a través del RE siguiendo el flujo retrógrado (Storrie y cols., 1998; Miles y cols., 2001).

Por todo ello, la individualidad real de ambos orgánulos es relativa. Las opiniones varían acerca de si algunos de los componentes del Golgi, por ejemplo, las llamadas proteínas de la matriz, constituyen una entidad estable, una especie de andamiaje molecular independiente del RE (Seemann y cols., 2000; Barr, 2002) o si, por el contrario, todo el orgánulo se origina a partir del RE y depende de él (Puri y Linstedt, 2003; Ward y cols., 2001).

## 2.2. SEÑALES DE EXPORTACIÓN DEL RE

Durante años el transporte de moléculas desde el RE al complejo de Golgi fue considerado como un proceso inespecífico en el que proteínas y lípidos eran englobados en vesículas sin ningún tipo de selección previa. La llamada hipótesis del *bulk-flow* se fundamentaba en la observación de que la velocidad de transporte a lo largo de la ruta exocítica de un pequeño glicopéptido carente de algún tipo de señal de destino era equiparable a la de algunas proteínas secretoras (Wieland y cols., 1987). En definitiva, se pensaba que, a diferencia del transporte retrógrado, el flujo anterógrado tendría lugar por ausencia de señal (*by default*). En el momento de formarse el intermediario de transporte, las proteínas solubles y de membrana presentes en el RE entrarían en el interior del intermediario sin haber sido previamente escogidas.

En su lugar, se verían arrastradas por un flujo masivo de moléculas, de suerte que su concentración en el interior del intermediario sería igual a la del orgánulo de origen. El mismo mecanismo operaría en el transporte a través de las cisternas del Golgi y desde éste a otros destinos celulares (Rothman y Orci, 1992).

Esta visión cambió sustancialmente durante los años noventa con la demostración de que proteínas tan significativas como la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Balch y cols., 1994) y la albumina (Mizuno y Singer, 1993) eran concentradas en los sitios de salida del RE con anterioridad a su inclusión en intermediarios de transporte. Estos hallazgos despertaron el interés por identificar señales de exportación presentes en las proteínas destinadas a abandonar el RE.

La primera de tales señales fue descrita por Balch y cols. en el dominio citosólico de la proteína G del virus VSV (Nishimura y Balch, 1997). Se trata de la secuencia diacídica DXE (Asp-X-Glu) cuya eliminación afectó negativamente a la salida del RE de VSV-G, en tanto su incorporación a una proteína endógena del RE permitió la inclusión de ésta en vesículas de transporte (Nishimura y cols., 1999). Con posterioridad se ha comprobado que, en el caso de la proteína G del VSV, la señal de exportación incluye también un motivo basado en tirosina (YXXØ, siendo Ø un aminoácido hidrofóbico de gran tamaño) situado junto a la secuencia diacídica (Sevier y cols., 2000). En cualquier caso, señales parecidas (por ejemplo, EXE o EXD) han sido identificadas en proteínas de membrana de una amplia variedad de especies (Nishimura y Balch, 1997; Votsmeier y Gallwitz, 2001; Ma y cols., 2001) lo que indica que se trata de un motivo de exportación muy extendido.

No obstante, para otras proteínas las secuencias implicadas son claramente diferentes. Por ejemplo, se han descrito motivos basados en la presencia de dos aminoácidos hidrofóbicos consecutivos tales como fenilalanina (FF), leucinas (LL), tirosina (YY, FY), así como la combinación de dos de ellos (Bonifacino y Glick, 2004) y/o la presencia, al parecer determinante, de un residuo de valina en posición C-terminal (Iodice y cols., 2001). Además, recientemente se han caracterizado los motivos dibásicos (RKXRK) presentes en el tallo citoplásmico de un buen número de proteínas de membrana incluyendo canales iónicos y glicosiltransferasas (Giraud y Maccioni, 2003). Así pues, las señales moleculares que favorecen el transporte desde el RE al Golgi varían de una proteína a otra.

<u>Proteínas</u>	<u>Funciones</u>	<u>Señales</u>
Sys1p	Proteína de Golgi, supresor de mutantes ypt6	<u>DLE</u>
Gap1p	Permeasa de aminoácidos	<u>DID</u>
VSV-G	Glicoproteína de la envoltura de VSV	<u>YTDIE</u>
Kir2.1	Canal de potasio	<u>FCYENE</u>
Kir1.1	Canal de potasio	<u>VLSEVDETD</u>
Prm8p	Proteína de membrana regulada por feromona	<u>FF</u>
ERGIC53	Lectina	<u>FF</u>
hp24 $\delta_1$	Miembro de la familia p24	<u>FF</u>
Erv46p	Proteína transmembrana de vesículas de RE	<u>FI</u>
Erv41p	Proteína transmembrana de vesículas de RE	<u>IL</u>
Emp46p	Lectina	<u>YYMF, LL</u>
Emp47p	Lectina	<u>LL</u>
Erv25p	Miembro familia p24	<u>FE, LV</u>
Emp24p	Miembro familia p24, receptor de Gas1p	<u>FE, LV</u>
Sed5p	t-SNARE Golgi	<u>YNNSNPF, LMLME</u>
Bet1p	v-SNARE ER-Golgi	<u>LASLE</u>
GalT2	Enzima de Golgi	<u>RR</u>
GalNacT	Enzima de Golgi	<u>RR</u>

(Bonifacino y Glick, 2004)

A pesar de tal diversidad, la mayoría de las secuencias de exportación parecen funcionar según un mecanismo parecido; esto es, la interacción con algún componente de la cubierta COPII tal como el complejo Sec23/Sec24p o Sar1p (Aridor y cols., 1998; Miller y cols., 2002; Mossessova y cols., 2003; Giraudo y Maccioni, 2003). Por tanto, la selección de las proteínas de membrana se llevaría a cabo mediante la asociación de su dominio específico de exportación con las proteínas de cubierta COPII. Los diferentes motivos de exportación difieren en su afinidad por los componentes del complejo COPII, quienes, a su vez, presentan varios sitios para el reconocimiento de diversas señales de exportación (Barlowe, 2003a; Miller y cols., 2003). Es de imaginar, por ello, que un mismo complejo COPII podría reconocer e interaccionar simultáneamente con varias proteínas cargo distintas.

Otro aspecto relevante del proceso estriba en la oligomerización de las proteínas de membrana. En muchos casos, el transporte desde el RE al Golgi requiere la formación de oligómeros estables (Sato y Nakano, 2003). Tal es así que determinadas mutaciones pueden afectar negativamente al transporte, no tanto por la alteración de una hipotética señal de exportación, como por sus efectos negativos sobre la oligomerización. En este caso, la explicación más razonable es pensar que las proteínas asociadas expondrían múltiples secuencias de interacción con COPII y ello tendría un claro efecto positivo sobre su selección e inclusión en intermediarios de transporte (Otte y Barlowe, 2002).

La situación es claramente diferente para las proteínas solubles. No habiéndose caracterizado señales de exportación para la mayoría de ellas, se admite la posibilidad de que, al menos algunas, pudieran inicialmente abandonar el RE sin selección previa. De hecho, las determinaciones realizadas indican que a su salida del RE la amilasa o el quimiotripsinógeno no experimentan concentración (Martínez-Menárguez y cols., 1999). En tal caso, cabe la posibilidad de que estas proteínas formen agregados en algún compartimento post-RE tal como el compartimento intermedio o cis-Golgi (Martínez-Menárguez y cols., 1999). La selección tendría lugar en estos lugares y dependería del retorno simultáneo de los componentes moleculares autóctonos del RE hacia su lugar de residencia (Martínez-Menárguez y cols., 1999). Alternativamente, las proteínas solubles pueden ser reconocidas por receptores de cargo presentes en las membranas del RE, siendo éstos las moléculas realmente seleccionadas.

### **2.3. RECEPTORES DE CARGO PARA EL TRANSPORTE ANTERÓGRADO RE-GOLGI**

Los receptores de cargo son proteínas integrales de membrana con un dominio luminal capaz de reconocer a las proteínas solubles objeto del transporte y, al menos, un dominio citoplásmico de interacción con la maquinaria de transporte. De este modo, los receptores conectan a las moléculas cargo solubles con las proteínas de cubierta (Kirchhausen y cols., 1997). A diferencia del propio cargo, los receptores son parte de la maquinaria, de forma que, una vez alcanzan el Golgi, regresan a su lugar de origen para realizar múltiples rondas de transporte. De hecho, estas proteínas están continuamente viajando en forma cíclica entre el RE y el Golgi, para lo cual poseen varias señales de

interacción. Ello les permite incorporarse al interior de las vesículas COPII durante el transporte anterógrado y a las COPI durante el transporte retrógrado.

El prototipo de receptor de carga es ERGIC-53, una proteína integral de membrana tipo I localizada mayoritariamente en el compartimento intermedio y cis-Golgi, si bien cicla continuamente entre estas localizaciones y el RE (Hauri y cols., 2000). El dominio luminal de ERGIC-53 posee homología con la región de unión a carbohidratos de ciertas lectinas de leguminosas (Itin y cols., 1996). De hecho, ERGIC-53 muestra propiedades típicas de lectina y, como tal, se une a determinadas glicoproteínas (factores de coagulación, catepsina) en una forma dependiente de iones calcio y del estado de procesamiento de sus oligosacáridos (Appenzeller y cols., 1999).

Por su parte, el dominio citosólico de ERGIC-53 posee señales tanto para el transporte anterógrado como retrógrado, de suerte que, según se localice en el RE o en el compartimento intermedio/cis-Golgi, puede interactuar con las proteínas de cubierta COPII o con las COPI, respectivamente. La importancia del flujo cíclico del receptor queda puesta de manifiesto por la deficiente secreción de las moléculas transportadas cuyo ERGIC-53 es retenido experimentalmente en el RE (Nichols y cols., 1998; Vollenweider y cols., 1998). Por otro lado, la oligomerización de este receptor es un factor determinante para su selección y posterior salida del RE, en tanto que no influye en su capacidad para interactuar con ligandos (Appenzeller y cols., 1999).

El análisis molecular de las vesículas de transporte COPI reveló que, entre sus componentes mayoritarios, se encuentra un grupo de pequeñas proteínas transmembrana tipo I (Stamnes y cols., 1995). Se trata de la familia de receptores p24, presentes en todos los eucariotas. La organización molecular es muy similar en todas ellas. Poseen un gran dominio luminal con capacidad para formar bucles y que, potencialmente, podría interactuar con diferentes proteínas cargo, dado que esta región es la más divergente entre los diferentes miembros de la familia. Asimismo, contienen un corto tallo citoplásmico en el que se localizan señales de interacción con los complejos de cubierta COPI y COPII (Fiedler y cols., 1996; Domínguez y cols., 1998). De hecho, estas proteínas se encuentran localizadas en la región citoplásmica ocupada por el compartimento intermedio/cis-Golgi pero, puesto que ciclan continuamente desde estos lugares al RE, su máxima concentración se alcanza en las vesículas de transporte COPII y COPI (Schimmoller y cols., 1995; Stamnes y cols., 1995; Sohn y cols., 1996).

En estas últimas, se encuentran en cantidades equiparables a las del coatómero y ARF1 (Sohn y cols., 1996).

Debido a su abundancia, conservación evolutiva y recorrido intracelular se pensó que las proteínas p24 desempeñarían un papel clave en el transporte y, entre sus posibles funciones, se sugirió la posibilidad de que actuaran como receptores de cargo (Schimmoller y cols., 1995). Para comprobarlo se llevó a cabo la caracterización funcional de mutantes de levadura carentes de alguna de las ocho isoformas de p24 presentes en estas células. Se observó, por ejemplo, que en ausencia de Emp24p o de Erv25p disminuía significativamente la secreción de algunas proteínas como invertasa o Gas1p, en tanto que no había afectación en la exportación de otras como carboxipeptidasa Y o el factor pro- $\alpha$  (Schimmoller y cols., 1995; Belden y Barlowe, 1996). Así pues, los primeros estudios genéticos sugirieron la posibilidad de que cada una de las proteínas p24 fuese responsable de la exportación de un conjunto de moléculas cargo. Hasta la fecha sólo se ha demostrado la interacción directa de Emp24p y Erv25p con Gas1p. Emp24p es necesaria para la incorporación eficiente de Gas1p en vesículas derivadas de RE *in vitro* y ambas proteínas se asocian en el mismo complejo en vesículas derivadas de RE (Muñiz y cols., 2000). El hecho de que las distintas isoformas formen entre sí complejos heteroméricos permitía postular la existencia de diferentes combinaciones funcionales (Marzioch y cols., 1999). Sin embargo, posteriormente se publicó el aislamiento de células viables carentes de todos los genes codificadores de proteínas p24, sin que ello ocasionase efectos adicionales a los causados por la delección única de Emp24p (Springer y cols., 2000). Por tanto, el carácter receptor de las proteínas p24 es actualmente cuestionado y, en su lugar, se ha propuesto que podrían funcionar como moléculas reguladoras negativas capaces de restringir la incorporación de algunas proteínas al interior de los intermediarios COPII en formación (Springer y cols., 2000).

Por otro lado, estudios recientes indican que las delecciones únicas o múltiples de miembros de la familia p24 desestabilizan los correspondientes complejos y dan lugar a una activación de la llamada “respuesta a la presencia de proteínas desplegadas” (UPR) (Belden y Barlowe, 2001). Una respuesta UPR exacerbada podría servir para contrarrestar los efectos negativos derivados de la ausencia de receptores de cargo

funcionales y explicaría la observación de que, en tales casos, se produce la secreción al medio de chaperonas como BiP y PDI (Elrod-Erickson y Kaiser, 1996).

#### 2.4. SEÑALES DE RECUPERACIÓN PARA RE

El RE está dotado de un conjunto de moléculas endógenas necesarias para realizar sus actividades funcionales. Proteínas tales como chaperonas, enzimas de glicosilación y componentes de la maquinaria de traducción/translocación deben permanecer en el RE. Aun cuando algunas moléculas constantemente lo abandonan durante el curso del transporte anterógrado, existen mecanismos altamente eficientes para hacer retornar a las moléculas escapadas (Pelham, 1991). La recuperación depende de determinadas secuencias de aminoácidos que identifican a las proteínas que las portan como moléculas autóctonas del RE. Asimismo, presentan también este tipo de señales las proteínas que, como los receptores de carga, no residen permanentemente en un orgánulo concreto, sino que ciclan continuamente entre el RE y Golgi. En este caso, la señal hace posible completar un itinerario de cuyo recorrido depende la actividad funcional de la proteína en cuestión.

La señal de recuperación mejor caracterizada es una secuencia de cuatro aminoácidos localizada en el extremo C-terminal de la mayoría de las proteínas solubles residentes en el RE. En mamíferos se trata de la secuencia Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL), en tanto en levaduras es His-Asp-Glu-Leu (HDEL) (Pelham y cols., 1988).

La eliminación o alteración de esta señal afecta drásticamente al destino final de las proteínas. Así, una chaperona como BiP, normalmente localizada en el lumen del RE, abandona este orgánulo y es secretada al medio extracelular cuyo, experimentalmente, se desprovee a la molécula de esta señal. Por el contrario, la incorporación de la secuencia KDEL a una proteína secretora como lisozima la hace quedar retenida en el RE (Munro y Pelham, 1987). Por tanto, las propiedades de la secuencia K(H)DEL son las que cabría esperar para una señal de localización en RE. Sin embargo, en sentido estricto no se trata de una señal de destino o retención, sino de recuperación. Las proteínas portadoras de esta secuencia abandonan periódicamente el RE y viajan hasta el complejo de Golgi, donde pueden incluso ser modificadas por las enzimas de procesamiento de este orgánulo (Pelham y cols., 1988). En el Golgi y, gracias a la señal K(H)DEL, las moléculas son reconocidas como pertenecientes al RE,

seleccionadas e incluidas en intermediarios para su transporte retrógrado hasta él (Pelham, 1991).

Las proteínas transmembrana tipo I residentes en el RE poseen una señal de identificación distinta a la secuencia K(H)DEL. En este caso, el responsable de la retención es el motivo Lys-Lys-X-X (KKXX, siendo X cualquier aminoácido), situado en el extremo C-terminal. Su eliminación ocasiona el transporte a la superficie celular de la proteína afectada, en tanto su inclusión en el dominio citoplásmico de una proteína de la membrana plasmática le confiere retención en el RE (Nilsson y cols., 1989; Jackson y cols., 1990; Jackson y cols., 1993). El motivo dilisina interacciona directamente con el coatómero (Cosson y Letourneur, 1994; Harter y cols., 1996). Este parece ser el acontecimiento de partida para el ensamblaje del complejo COPI implicado en el transporte retrógrado Golgi-RE. Por tanto, la señal KKXX permite acoplar la selección de las proteínas con su recuperación efectiva.

Por su parte, las proteínas transmembrana tipo II presentan una señal algo diferente. Esta consiste en dos residuos de arginina (RR o bien RXR) situados entre los primeros 5 aminoácidos del extremo N-terminal (Schutze y cols., 1994). La sustitución por lisina de uno de los dos residuos de arginina que componen el motivo no afecta a la retención, lo cual pone de manifiesto las similitudes entre ambas señales (Schutze y cols., 1994).

## **2.5. RECEPTORES DE CARGO PARA EL TRANSPORTE RETRÓGRADO GOLGI-RE**

Las proteínas solubles del RE portadoras de la señal K(H)DEL son reconocidas por un receptor específico para esta secuencia. Es una proteína integral de membrana presente en todos los eucariotas en forma altamente conservada (Lewis y Pelham, 1990). Su estructura molecular es muy parecida a la de los receptores de membrana plasmática asociados a proteínas G triméricas y, sin embargo, no existen homologías significativas entre las secuencias de aminoácidos de ambos tipos de proteínas. Consta de siete dominios transmembrana con probable estructura helicoidal, conectados por pequeños bucles, orientados unos hacia el citoplasma y otros hacia el lumen del

orgánulo. El extremo C-terminal, expuesto hacia el citoplasma, es un corto tallo de apenas una docena de aminoácidos de longitud (Lewis y cols., 1990; Townsley y cols., 1993).

Existen dos formas moleculares de este receptor en levaduras y 2 o 3 en mamíferos, surgidas probablemente como consecuencia de una temprana duplicación génica con escasa divergencia posterior (Semenza y cols., 1990; Hardwick y cols., 1990).

El receptor de la secuencia KDEL reconoce al ligando a través de aquellas porciones de su molécula orientadas hacia el lado luminal de la membrana. Mediante análisis mutacional se han podido identificar los residuos implicados en la interacción con el ligando (Townsley y cols., 1993). Puesto que son aminoácidos distantes en la secuencia, es probable que en el receptor nativo estos residuos se encuentren reunidos para constituir una especie de “bolsillo o hueco” hidrofílico en cuyo interior encajaría el extremo C-terminal del ligando. En este contexto, el residuo aspártico-50 desempeñaría un papel relevante al interactuar con el primer aminoácido de la señal de reconocimiento (Scheel y Pelham, 1998; Townsley y cols., 1993).

En condiciones normales el receptor se localiza en el compartimento intermedio y región cis del Golgi. Sin embargo, en células que sobreexpresan un ligando aparece mayoritariamente distribuido en el RE (Lewis y Pelham, 1992). En base a este y otros datos, se admite que el reconocimiento del ligando por parte del receptor tendría lugar a nivel de Golgi y compartimento intermedio, viajando luego el complejo desde estas localizaciones retrógradamente hasta el RE. Allí se produciría la disociación, liberándose el ligando a la luz del RE y retornando el receptor a sus lugares de residencia (Lewis y Pelham, 1990; Tang y cols., 1993; Griffiths y cols., 1994). Así pues, a semejanza de otros receptores de carga, este también cicla continuamente entre el RE y el Golgi. Las diferencias de pH existentes entre el ambiente luminal de uno y otro orgánulo podrían explicar la formación y disociación de los complejos ligando-receptor según la localización subcelular (Wilson y cols., 1993).

Por otro lado, las señales moleculares que dirigen el tráfico de este receptor en particular no han sido aún caracterizadas. No obstante, está demostrado que su traslado desde el Golgi al RE se efectúa en intermediarios COPI (Orci y cols., 1997; Girod y

cols., 1999) y en el dominio C-terminal se encuentra un motivo difenilalanina a través del cual podría, potencialmente, interactuar con COPII. Es probable, por tanto, que los factores determinantes de su itinerario intracelular sean parecidos a los que gobiernan el comportamiento de otros receptores, como ERGIC-53 o las proteínas p24, que igualmente operan al comienzo de la ruta secretora. Contrasta este desconocimiento de las señales moleculares con los estudios funcionales realizados a propósito de este receptor. Tras el reconocimiento del ligando, el receptor de la secuencia K(H)DEL oligomeriza e interactúa con ARF-GAP1 (Aoe y cols., 1997; Majoul y cols., 2001), la cual forma parte integral de la cubierta COPI (Yang y cols., 2002).

Sorprendentemente, algunas proteínas integrales de membrana necesitan viajar acompañadas de otras durante el transporte retrógrado desde el complejo de Golgi al RE. En levaduras este es el caso de Sec12p, una glicoproteína tipo II de la membrana del RE que funciona como factor intercambiador de nucleótidos, y por tanto activador, de Sar1p. Su permanencia en el RE es el resultado de una continua actividad recuperadora que opera a nivel del Golgi (Boehm y cols., 1997). Los estudios genéticos realizados han revelado que en la recuperación de Sec12p escapada del RE interviene una proteína denominada Rer1p que, a todos los efectos, se comporta como un receptor de carga (Sato y cols., 1995). Rer1p es una pequeña proteína con 4 dominios transmembrana que, en conjunto, adopta una topología en W; esto es, ambos extremos N- y C-terminal están orientados hacia el citoplasma. Está presente en todos los eucariotas en forma altamente conservada y cicla continuamente entre el Golgi y el RE (Sato y cols., 2001). Reconoce determinantes presentes en los dominios transmembrana de las proteínas transportadas entre las que se incluyen, además de Sec12p, componentes de la maquinaria de translocación post-traducciona, manosidasas del RE, t-SNAREs, proteínas necesarias para la formación de vesículas, etc, (Sato y cols., 1997).

### **3. REGULACIÓN DEL TRANSPORTE RETRÓGRADO GOLGI-RE**

El transporte retrógrado desencadenado por la activación del receptor de la secuencia K(H)DEL o de Rer1p, así como el de las proteínas de membrana portadoras de una señal de recuperación, es dependiente del complejo COPI. El ensamblaje de este tipo de cubiertas proteicas requiere la participación ineludible de ARF1. El ciclo de

activación/desactivación de esta pequeña proteína G se halla regulado por un juego de proteínas GEF (factor intercambiador de nucleótidos) y GAP (activador de GTPasa), respectivamente. Estos factores controlan el proceso global tanto en sus aspectos temporales como espaciales. Así, el acoplamiento entre las distintas etapas con las que se inicia el transporte retrógrado (selección molecular del cargo, ensamblaje de la cubierta, deformación de la membrana, evaginación, desprendimiento de la cubierta) viene determinado por la secuencia de acontecimientos (activación, incorporación a la membrana, desactivación) referidos al propio ARF1.

La manifestación más evidente de tal relación la constituye el tratamiento con Brefeldin A. Este metabolito fúngico impide la activación de ARF1 mediante la inhibición del factor GEF encargado de catalizar el intercambio de GDP por GTP (Helms y Rothman, 1992). En tales condiciones, tanto ARF1 como el coatómero son incapaces de asociarse a las membranas del Golgi para constituir las cubiertas COPI, permaneciendo ambos en el citosol. El orgánulo completo termina entonces fundiendo con el RE en lo que podría considerarse como una exageración del transporte retrógrado normal (Lippincott-Schwartz y cols., 1989; Klausner y cols., 1992).

Por otro lado, y puesto que ARF1 posee por sí mismo escasa capacidad GTPásica, su inactivación depende de ARF-GAP. Este factor, como el propio ARF1, también ha de ser recolectado desde el citosol a las membranas del complejo de Golgi en un proceso que podría estar regulado por quinasas y fosfatasas (Yu y Roth, 2002; Bernards y Settleman, 2004). Una vez asociado a la membrana, ARF-GAP es necesario para desencadenar la hidrólisis del GTP hasta entonces unido a ARF1, de forma que el complejo ARF1-GDP así generado se libera al citosol y con él la cubierta COPI al completo. Sin embargo, con anterioridad a su acción catalítica sobre ARF1, ARF-GAP permanece asociado a la membrana el tiempo suficiente como para desempeñar otras acciones no menos importantes. De una forma aún no aclarada, interviene en la selección del cargo (Lanoix y cols., 2001) y, de hecho, según datos recientes, su acción sobre ARF1 se retrasa hasta que la deformación de la membrana está suficientemente avanzada (Bigay y cols., 2003).

Si bien la vía principal de transporte Golgi-RE es dependiente de COPI, algunos ligandos viajan retrógradamente en intermediarios de membrana en cuya formación no

participa este tipo de cubiertas. Este es el caso de las enzimas que catalizan las reacciones de glicosilación en el Golgi o de ciertas toxinas bacterianas carentes de una señal de reconocimiento tipo KDEL (Girod y cols., 1999; White y cols., 1999). Esta ruta se halla regulada por Rab6 y no es afectada por los agentes que impiden la actuación de COPI. No se conocen los receptores ni señales moleculares implicadas y, menos aún, el tipo de proteínas de cubierta que podrían participar. Todo indica que podría tratarse de una vía de reciclaje de los componentes endógenos del Golgi (Storrie y cols., 1998). La función de Rab6 parece estar relacionada con el reclutamiento de proteínas motoras tipo dineína necesarias para el desplazamiento de los intermediarios de transporte a lo largo de microtúbulos (Matanis y cols., 2002).

En general, el citoesqueleto desempeña un papel clave en el traslado desde la región del Golgi al RE de los intermediarios del transporte retrógrado. En mamíferos, éstos se corresponden con túbulos membranosos que se desplazan a lo largo de microtúbulos (Presley y cols., 1997). Participan, por ello, proteínas motoras tipo quinesina susceptibles de ser reguladas mediante fosforilación (Lippincott-Schwartz y cols., 1995; Dorner y cols., 1998). Asimismo, Egea y cols. han demostrado la implicación de los filamentos de actina y de motores tipo miosina (Valderrama y cols., 2001; Duran y cols., 2003). Aparentemente, el proceso viene precedido de la activación de cdc42, una pequeña proteína G que se encuentra asociada al complejo de Golgi donde interacciona con  $\gamma$ -COP (Wu y cols., 2000). Cdc42 activada induce la polimerización de la actina próxima al Golgi mediante la estimulación de la capacidad nucleadora del complejo Arp2/3, a través de la participación de N-WASP (Luna y cols., 2002).

En general, la información disponible sobre la regulación del transporte retrógrado Golgi-RE es escasa y fragmentaria. Por ejemplo, apenas hay datos sobre la participación de moléculas de señalización tipo quinasas o proteínas G en esta vía (Hidalgo y cols., 1995). Recientemente, se ha descrito la participación de las quinasas de tirosina tipo Src en el flujo retrógrado mediado por el receptor de la secuencia KDEL (Bard y cols., 2003). Sin embargo, los datos aportados son contradictorios con respecto al papel, estimulador o inhibidor, ejercido por esta clase de fosforilación. Más aún, los efectos sobre el transporte retrógrado podrían ser indirectos puesto que el receptor de la secuencia KDEL carece en sus dominios citoplásmicos de sitios potenciales

susceptibles de fosforilación por este tipo de quinasas. Sin embargo, la organización molecular de este receptor concreto y la importancia funcional de la recuperación de ligandos KDEL hacen pensar que se trataría de una ruta sujeta a estrictos controles de adecuación fisiológica.

**ANTECEDENTES**

El complejo enzimático conocido como quinasa A (PKA) o quinasa dependiente de AMPc consta de dos subunidades catalíticas (C) y dos subunidades reguladoras (R). Cada una de estas últimas posee dos lugares de unión al AMPc, de forma que, cuando son ocupados, las subunidades C se disocian del complejo. Quedan entonces libres y activas para fosforilar a una amplia variedad de sustratos a nivel de las secuencias Arg-Arg-X-Ser/Thr y Lys-Arg-X-X-Ser/Thr (Taylor y cols., 1990).

En las células de Mamíferos la holoenzima PKA se halla asociada, a través de sus subunidades R, a diversas estructuras subcelulares entre las que destaca el centrosoma y el complejo de Golgi como lugares de concentración preferente (Nigg y cols., 1985; De Camilli y cols., 1986). En el Golgi, PKA podría intervenir en el mantenimiento de la organización estructural, así como en el control de las actividades de transporte propias de este orgánulo (Hidalgo y cols., 1995).

En los últimos años nuestro grupo ha descrito la participación de esta quinasa en diferentes tramos del tráfico intracelular de proteínas a lo largo de la vía exocítica. Los resultados obtenidos indican que PKA interviene en la regulación del transporte anterógrado desde el RE al complejo de Golgi, a través de las cisternas del Golgi y desde TGN a la membrana plasmática (Muñiz y cols., 1996). La base molecular de actuación de PKA en estos pasos del transporte aún no ha sido determinada, pero podría estar relacionada con la formación de transportadores, tal y como se demostró para el transporte constitutivo de proteínas desde TGN a membrana plasmática (Muñiz y cols., 1997).

Datos recientes indican que PKA interviene en la regulación de la asociación del factor ARF1 a las membranas de Golgi. Concretamente, PKA estimula la incorporación de ARF1 desde el citosol al complejo de Golgi (Martín y cols., 2000). Puesto que ARF1 forma parte esencial del complejo de cubierta COPI, es previsible que PKA desempeñe igualmente un papel relevante en el transporte retrógrado Golgi-RE.

Por otro lado, la asociación de PKA al complejo de Golgi parece estar modulada por proteínas G triméricas autóctonas de este orgánulo (Martín y cols., 1999). Estos hallazgos nos hicieron pensar en la existencia de una ruta de traducción de señales químicas a nivel de sus membranas. Su finalidad sería adecuar las actividades de

transporte del Golgi a las necesidades reales de la célula, mediante el control temporal y espacial de los procesos de evaginación que dan lugar a los intermediarios de transporte. Integrarían esta vía, además de PKA, receptores, proteínas G y otras moléculas de señalización aún por identificar.

## **OBJETIVOS**

Evaluar la posible actuación de PKA en el tráfico retrógrado Golgi-retículo endoplásmico

Identificar los sustratos moleculares de la acción de PKA a nivel del complejo de Golgi.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## REACTIVOS

### 1. Plásmidos

El plásmido denominado HE24 conteniendo la secuencia completa del receptor de KDEL.1 con el epítipo c-myc fue proporcionado por el Dr. H .R. B. Pelham (MRC, UK). El plásmido conteniendo la secuencia completa de la subunidad reguladora RII $\alpha$  de PKAII de ratón con el epítipo de 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína fue cedido por la Dra. S. Taylor (Universidad de California, San Diego, EEUU). El plásmido pEYFPC2-Sar1<sup>dn</sup> que codifica el mutante dominante negativo de Sar1p (Sar1 [H79G], Sar1<sup>dn</sup>) fue proporcionado por el Dr. R.Pepperkok (EMBL, Heidelberg, Alemania). El plásmido HYKE.4 que codifica el receptor de KDEL-myc y la lisozima-KDEL fue proporcionado por el Dr.L.M.Roberts (Universidad de Warwick, UK). Los vectores pECFPN1 y pEYFPN1 que codifican las variantes de la proteína verde fluorescente, CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) e YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) respectivamente, fueron adquiridos de Clontech, BD Biosciences Clontech (Palo Alto, EEUU) y el vector pfastBac1 utilizado en la obtención de baculovirus, de Life Technologies (Paisley, UK)..

### 2. Anticuerpos

Los siguientes anticuerpos fueron generosamente cedidos por otros investigadores:

F6.26.1 contra la lisozima de gallina (Dr. M .M. Riottot, Instituto Pasteur Paris, Francia) (Goldbaum y cols., 1999).

12G5 contra el receptor de quimioquinas CXCR4 (Dr.A.Caruz, Universidad de Jaén, España) (Amara y cols., 1997).

Anti-GMAP-210 (Dra. R. Rios, Universidad de Sevilla, España) ( Infante y cols., 1999).

Asimismo, se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales:

Anti-  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  y  $\gamma$  COP contra diferentes subunidades del coatómero proporcionado por Dr. F.Wieland (BZH, Heidelberg, Alemania).

Anti-receptor de KDEL dirigido contra el extremo C-terminal del receptor de KDEL bovino de Stressgen Biotechnologies (Victoria, Canada).

Anti-c-myc (9E10) de Roche diagnostics (Mannheim, Alemania).

Anti-ARF-GAP1 de Abcam (Cambridgeshire, UK)

Los anticuerpos secundarios conjugados a fluoresceína (FITC) y peroxidasa (HRP) fueron adquiridos de Biosource International (Camarillo, EEUU) y aquellos conjugados a Texas-Red de Molecular Probes (Eugene, OR).

### 3. Otros reactivos utilizados

Los medios de cultivos y antibióticos fueron adquiridos de Life Technologies. Las enzimas de restricción, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) y lisozima fueron adquiridos de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). De Calbiochem (San Diego, EEUU) obtuvimos subunidades catalíticas de PKA (C-PKA) y el compuesto H89 (N-(2-(p-bromocinamilamino) etil)-5-isoquinolinsulfonamida). Proteína G-Sepharose, ATP, GTP, DTT, imidazol e inhibidores de proteasas fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU). Estreptolisina O (SLO) fue proporcionada por el Dr. H. G. Meyer (Universidad de Mainz, Alemania).

### 4. Construcciones de ADN

La inserción del epítipo c-myc entre el último dominio transmembrana y el comienzo del dominio citoplásmico del receptor de la secuencia KDEL se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por superposición y extensión (Ho y cols. 1989). Como molde inicial de ADN utilizamos el fragmento EcoRV- BamHI procedente del plásmido HE24 clonado previamente en pBluescript II SK (+). Como cebadores usamos los oligonucleótidos T3 y T7, así como dos oligonucleótidos complementarios conteniendo la inserción myc flanqueada por la secuencia del receptor próxima al punto de inserción. En primer lugar, llevamos a cabo dos reacciones de PCR independientes; en cada una de ellas se generó un fragmento pequeño del receptor terminado con la secuencia c-myc. Ambos productos fueron utilizados como molde en una reacción posterior a fin de obtener un fragmento mayor del receptor conteniendo la inserción c-myc. Este último fue clonado, mediante digestión con EcoRV y BamHI, en pBluescript II SK (+) para secuenciación y en el plásmido HE24 a fin de generar la construcción definitiva denominada HE24M.

La delección del dominio C-terminal del receptor se llevó a cabo mediante la inserción de un codón stop al comienzo de dicha región. En este caso particular, usamos, además de T3 y T7, dos oligonucleótidos complementarios conteniendo el codón de parada y el fragmento molde empleado para la construcción anterior. Seguimos esta misma estrategia para la introducción de mutaciones puntuales.

En todos los casos, los fragmentos de PCR generados fueron clonados en pBluescript II SK (+) para verificar la secuencia correcta con anterioridad a la clonación en HE24.

La combinación en un mismo plásmido de las secuencias del receptor de KDEL (tanto la forma silvestre como otras variantes) y de lisozima-KDEL se realizó clonando el fragmento XhoI-NcoI procedente de HE24M en el vector HYKE4, previamente digerido con XhoI y BssHII. Los extremos no compatibles se hicieron romos utilizando la enzima klenow.

Las versiones fluorescentes del receptor de KDEL se obtuvieron mediante la fusión de las secuencias correspondientes a las variantes CFP (*cyan fluorescent protein*) y YFP (*yellow fluorescent protein*) de la proteína verde fluorescente (GFP) con el extremo C-terminal del receptor. El fragmento XhoI-NcoI del plásmido HE24 fue clonado en el correspondiente vector (pECFPN1 o pEYFPN1), previamente digerido con XhoI y BamHI.

Con el fin de obtener baculovirus recombinantes portadores de la secuencia del receptor de KDEL, insertamos en primer lugar sitios de restricción para las endonucleasas EcoRI y XhoI en los extremos N y C respectivamente de la secuencia codificante del plásmido HE24M. El fragmento resultante de la digestión contenía únicamente la secuencia codificadora del receptor y fue clonado en el vector pFastBac1.

Para la sustitución del dominio C-terminal del receptor CXCR4 por el del receptor de la secuencia KDEL utilizamos oligonucleótidos correspondientes a las secuencias fusionadas de ambas proteínas. Los plásmidos pcDNA3, conteniendo la secuencia completa del receptor CXCR4, y el plásmido pBluescript II SK (+), conteniendo el fragmento EcoRV-BamHI de la secuencia del receptor de KDEL, fueron utilizados como molde en dos reacciones de PCR independientes. Los dos fragmentos así obtenidos sirvieron de molde para generar un tercero de mayor tamaño conteniendo la secuencia de la proteína quimera al completo. Para su expresión en células de mamíferos y secuenciación, sin embargo, fue necesario subclonar en el vector pcDNA3 mediante digestión con las enzimas HindIII y XbaI.

Para la expresión en bacterias de una forma mutada fluorescente de la proteína Sar1p (H79G) el plásmido pEYFPC2-Sar1p<sup>dn</sup> fue digerido con NcoI y BamHI y el fragmento resultante clonado en el vector pRSETB, digerido previamente con NcoI y HindIII.

## 5. Purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas RIII $\alpha$  y YFP-Sar1<sup>dn</sup> conteniendo 6 residuos de histidina en posición N-terminal fueron producidas en la estirpe BL21(DE3) de *Escherichia coli* tras la inducción a 30°C durante 3-4 h con 1mM IPTG. Resuspendimos las bacterias correspondientes a 250 ml de cultivo en 20 ml de 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl conteniendo 750  $\mu$ g/ml de lisozima, 10 mM imidazol y 1 mM PMSF. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, homogenizamos las células a 4°C mediante sonicación (5 min, 50% intensidad, Branson Sonifier 250, BRANSON Danbury, EEUU). La suspensión fue centrifugada a 14000xg durante 30 min. La fracción soluble fue entonces incubada a temperatura ambiente durante 2 h con 0,5 ml de la resina Talon (Clontech, Palo Alto, EEUU). Lavamos la matriz varias veces con 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, primero en presencia de 10 mM de imidazol y, posteriormente, con 500 mM imidazol. Esta última solución, conteniendo las proteínas eluidas, fue dializada exhaustivamente contra PBS y PBS/10% (v/v) glicerol en presencia de 1mM PMSF. Finalmente, la proteína fue concentrada (2-3 mg/ml) mediante filtración (Millipore, Bedford, EEUU) y conservada a -80°C en alícuotas. Evaluamos la pureza de las preparaciones mediante electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE).

## 6. Obtención de baculovirus recombinantes

Como el ADN del virus AcNPV contiene múltiples dianas de restricción los baculovirus recombinantes fueron construidos en dos pasos: en primer lugar la clonación de la secuencia del receptor de KDEL en el plásmido pFastBac1 portador del promotor Polh que permite la expresión de proteínas en células de insecto Sf9 y posteriormente la transposición de la secuencia del receptor junto al promotor a un báculo que contiene el ADN del virus. Utilizamos los plásmidos pFastBac1 conteniendo la secuencia del receptor de la secuencia KDEL y su versión truncada para transformar las bacterias competentes de la estirpe DH10B portadora del báculo. Las colonias conteniendo el báculo recombinante fueron seleccionadas y el ADN de alto peso molecular purificado a partir de dichas colonias positivas. Finalmente utilizamos el báculo recombinante aislado para transfectar células de insecto y obtener los baculovirus.

## MÉTODOS

### 1. Subfraccionamiento celular

#### 1.1. Preparaciones de citosol

El hígado de rata fue perfundido a través de la vena porta con PBS frío. Después fue extraído, troceado y lavado abundantemente con el mismo tampón. Asimismo, el cerebro bovino fue manualmente despojado de meninges, troceado y lavado con PBS frío. Ambos órganos fueron lavados con el siguiente tampón de homogenización: 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM de KCl, 250 mM de sacarosa, 1 mM DTT, 1 mM PMSF y resuspendidos en 3 volúmenes del mismo. Para homogenizar utilizamos un dispositivo Potter-Elvehjem en el caso del hígado y una batidora o blender para cerebro. El homogenado fue centrifugado a 100000xg durante 1 h a 4°C. El sobrenadante, conteniendo proteínas citosólicas, fue dializado exhaustivamente contra varios cambios de 25 mM Hepes-KOH, pH 7.2, 25 mM KCl y 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>. La solución fue centrifugada a 30,000xg durante 30 min para eliminar precipitados. Las preparaciones (8-9 mg/ml) fueron distribuidas en alícuotas, congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C.

#### 1.2. Obtención de membranas microsomales

Las células Sf9 fueron infectadas durante 3 h con baculovirus recombinantes (0.1 unidades formadoras de placa por célula) portadores de la secuencia codificadora del receptor de KDEL fusionado al epítipo c-myc. 2-3 días después de la infección, las células ( $5-7 \times 10^8$ ) fueron recolectadas por centrifugación a 400xg durante 10 min, lavadas con PBS frío y resuspendidas en 12-15 ml de tampón de homogenización constituido por 0.25 M sacarosa, 25 mM Hepes, pH 7.2, 5mM MgCl<sub>2</sub> e inhibidores de proteasas (5 mM benzamidina, 1 mM PMSF, 100 µg/ml del inhibidor de tripsina de soja, 20 µg/ml de aprotinina y 10 µg/ml de leupeptina, antipaína y pepstatina). La suspensión celular fue homogeneizada haciéndola pasar repetidamente a través del interior de un dispositivo cilíndrico con una bola de acero en su interior (*cell cracker*) (Industrial Tectonics, Dexter, EEUU). El homogenado resultante fue centrifugado a 12000xg durante 10 min a 4°C para eliminar núcleos, mitocondrias y células enteras. El sobrenadante fue centrifugado a 100000xg durante 1 h a 4°C. Las membranas microsomales fueron incubadas en hielo con 3 M KCl durante 30 min, recuperadas por centrifugación sobre un cojín de sacarosa 2 M y finalmente resuspendidas en 25mM

Hepes-KOH, pH 7.2, 25 mM KCl y 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> a una concentración de proteínas de 5-9 mg/ml. Las alícuotas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

## 2. Cultivo de líneas celulares

Las células COS-7 y Vero fueron cultivadas en monocapa en medio DMEM y MEM, respectivamente, suplementado con 10% suero fetal de ternera, 2 mM L-glutamina, 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire, recibiendo las células periódicamente (cada dos días) medio nuevo precalentado a 37°C.

Por su parte, las células Sf9 de insecto fueron mantenidas a 27°C en frascos de cultivo conteniendo medio Insect-Xpress (BioWhittaker, EEUU), en ausencia de suero y antibióticos.

## 3. Transfección transitoria

Las células fueron transfectadas por electroporación. Brevemente,  $1.2 \times 10^6$  células fueron resuspendidas en 0.2 ml de tampón de electroporación hipoosmolar (Eppendorf, Hamburg, Alemania) conteniendo 12 µg de ADN plasmídico puro y 14 µg de ADN de esperma de salmón usado como portador. La electroporación fue llevada a cabo en el electroporador Multiporator (Eppendorf) a 600 v y  $\tau$  100 µs en una cubeta estéril de 4 mm. La suspensión celular fue entonces diluida con medio de cultivo completo conteniendo 15 mM Hepes y centrifugada a 400xg durante 10 min. Las células fueron usadas en los experimentos 1-2 días después de la transfección.

## 4. Microinyección

Se utilizaron cultivos subconfluentes de células COS-7 o Vero crecidas sobre cubreobjetos durante 1-2 días. La proteína YFP-Sar1<sup>dn</sup> recombinante pura fue previamente diluida en medio de cultivo completo conteniendo 25 mM Hepes a fin de alcanzar una concentración de 2 mg/ml. Se inyectó en el citoplasma celular usando el sistema de microinyección Automated Microinjection System (Eppendorf).

## 5. Ensayo de redistribución Golgi-RE

Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron lavadas con 20 mM Hepes, pH 7.2, 2 mM Mg(AcO)<sub>2</sub>, 90 mM KOAc y 1 mM DTT frío e incubadas en hielo durante 20

min con 1 µg/ml de SLO disuelta en el mismo tampón. Tras lavar abundantemente con el mismo tampón frío para eliminar la toxina no unida a la superficie celular, las células fueron incubadas a 37°C con tampón precalentado conteniendo 1mM de ATP y GTP. A esta última temperatura se produce la oligomerización de SLO previamente unida a la membrana plasmática, formándose orificios en la misma (Bhakdi y cols., 1993).

## 6. Inmunofluorescencia indirecta

Para esta técnica concreta utilizamos monocapas subconfluentes establecidas sobre cubreobjetos. Las células fueron lavadas con 0.1 M tampón fosfato, pH 7.4, y, posteriormente, fijadas a temperatura ambiente durante 20 min con 3% formaldehído (preparado a partir de paraformaldehído) en tampón fosfato. Alternativamente, para la detección de algunos antígenos se realizó la fijación a -20°C con metanol durante 5 min.

Las monocapas fueron lavadas varias veces con PBS y después permeabilizadas mediante incubación con PBS conteniendo 0,5% BSA y 0,05% saponina (solución PBS/BSA/saponina) durante un tiempo mínimo de 10 min. Las incubaciones con anticuerpos diluidos en solución PBS/BSA/saponina se realizaron en cámara húmeda durante 30 min a 37°C o, alternativamente, durante 2 h a temperatura ambiente. Las células fueron, en primer lugar, incubadas con anticuerpo primario, lavadas abundantemente con PBS/BSA/saponina, y, posteriormente, expuestas a anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo. Los cubreobjetos fueron lavados brevemente con PBS/BSA/saponina y después abundantemente con PBS. Finalmente fueron montados sobre portaobjetos utilizando como medio de montaje Fluoromont G (Southern Biotechnology, Birmingham, EEUU). Las células fueron examinadas en un fotomicroscopio Olympus AHBT3 (Tokio, Japón) dotado con dispositivo de epifluorescencia o bien en un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Mannheim, Alemania). Las imágenes fueron procesadas usando el programa Adobe Photoshop 7.0.

## 7. Marcaje metabólico e inmunoprecipitación de lisozima

Tras su transfección,  $0.5 \times 10^6$  células COS fueron sembradas en cada uno de los 6 pocillos de 35 mm de una placa. Un día después, las células fueron incubadas a 37°C durante 30 min en medio carente de metionina y cisteína, a fin de reducir los niveles intracelulares de estos dos aminoácidos. Para el pulso metabólico, a cada pocillo se añadió 1 ml del medio anterior conteniendo 25 mCi Tran<sup>35</sup>S-label (1000 Ci/mmol). Después de 10 min de incorporación, las células fueron lavadas con PBS frío y transferidas a 0.5 ml de medio completo conteniendo 1.5 mg/ml de metionina y cisteína

no radiactivas. A distintos tiempos, el medio fue recolectado mientras que las células fueron lavadas con PBS frío y lisadas con 0.4 ml de tampón de lisis (25mM Tris.HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Tritón X-100) conteniendo los inhibidores de proteasas mencionados anteriormente. Todas las muestras fueron aclaradas mediante centrifugación a 12000xg durante 20 min a 4°C, siendo transferidos los sobrenadantes a tubos nuevos. Los medios fueron mezclados con 0.5 ml de tampón de lisis a doble concentración. La incubación con anticuerpo monoclonal dirigido contra lisozima se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C con rotación. Posteriormente, a cada muestra se añadieron 25 µl de una suspensión de proteína G-Sefarosa al 50%, continuando la incubación durante 1 h a temperatura ambiente. Los inmunoprecipitados fueron lavados 3-4 veces con 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (vol/vol) Triton X-100, 0.5% (wt/vol) deoxicolato sódico, 0.1% (wt/vol) SDS (tampón RIPA) y 1-2 veces con 10 mM Tris-HCl, pH 7.8. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron resueltas mediante electroforesis en SDS-PAGE.

#### **8. Ensayo de fosforilación e inmunoprecipitación del receptor de la secuencia KDEL**

Incubamos 35 µg de membranas microsomales, previamente lavadas con 3 M KCl, a 30°C con 0.1 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/mmol) y 1 unidad de subunidad catalítica de PKA (C $\alpha$ ) en tampón de fosforilación (20 mM TrisHCl, pH 7.5 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT). Alternativamente, en lugar de C $\alpha$ , 100 µg de citosol de hígado de rata e inhibidores de fosfatasas (10 mM pirofosfato sódico, 20 mM NaF) fueron incorporados al medio de incubación. En ambos casos, el volumen final fue 50 µl. Tras 10 min de reacción, las muestras fueron transferidas a hielo y, a cada una de ellas, se añadió 1 ml de 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM ATP, 100mM EDTA. Las membranas fueron centrifugadas a 12000xg durante 20 min a 4°C, lavadas con el mismo tampón y lisadas en 0.5 ml de tampón RIPA. El receptor de KDEL fue inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-myc y proteína G-Sefarosa según lo descrito para la inmunoprecipitación de lisozima. Los inmunoprecipitados fueron procesados para SDS-PAGE y electrotransferidos a membrana.

#### **9. Ensayo de unión de proteínas citosólicas a péptidos**

Dependiendo de su solubilidad, los péptidos sintéticos fueron diluidos inicialmente en metanol puro o bien en tampón de acoplamiento (50 mM Tris-HCl, pH 7.3, 0.5 M NaCl). La solución definitiva contenía 2-5 mg de péptido en 7.5 ml de tampón. La matriz de tiopropil Sefarosa 4B (Amersham Biosciences, Freiburg,

Alemania) fue preparada según las especificaciones del comerciante. En resumen, 1 g de matriz fue lavado varias veces con agua destilada y, posteriormente, con tampón de acoplamiento. La suspensión final contenía 75% (v/v) de matriz y un 25% (v/v) de tampón. 0.5 ml de esta preparación fueron añadidos a la solución del péptido y completados con tampón hasta hacer un volumen final de 15 ml. La reacción de acoplamiento tuvo lugar toda la noche a 4°C con rotación. La matriz con el péptido acoplado fue lavada 3 veces con tampón. En este punto, la eficiencia del acoplamiento fue evaluada mediante absorbancia a 343 nm. Con el fin de bloquear los sitios que pudieran haber permanecido sin reaccionar con el péptido, la matriz fue lavada con tampón conteniendo 5 mM DTT, eliminándose después el exceso de este reactivo mediante 2-3 lavados con tampón. Para su conservación a 4°C añadimos 20% (v/v) de etanol.

Para la realización del ensayo de unión, un volumen de matriz equivalente a 2-3 nmol de péptidos fue añadido a 200 µg de citosol de cerebro bovino en 0.5 ml de 50mM Tris-HCl, pH 7.3, 0.1-1M NaCl. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, la matriz fue lavada varias veces con tampón antes de su procesamiento para electroforesis y electrotransferencia a membrana.

## **10. Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida**

Sistemáticamente, resuspendimos las muestras de proteínas solubles y de membrana en 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glicerol y 0.001% azul de bromofenol. Como agente reductor utilizamos ditioneol, generalmente a concentración 10 mM, excepto en el ensayo de unión de proteínas solubles a péptidos acoplados a una matriz que se usó a 50 mM. La desnaturalización completa de las muestras se consiguió a 100°C durante 5 min o, alternativamente, en el caso de las proteínas integrales de membrana, a 53°C durante 30 min.

Las mezclas de proteínas desnaturalizadas fueron analizadas mediante electroforesis monodimensional en geles de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970). Para la lisozima y el receptor de KDEL se utilizaron geles con una concentración de acrilamida del 15% mientras que las proteínas del coatómero fueron separadas en geles del 10%. La electroforesis se efectuó en condiciones de amperaje constante.

## 11. Electrotransferencia, inmunoblot y cuantificación densitométrica

Tras su resolución electroforética, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o de di-fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore) preactivadas con metanol. La transferencia se realizó en condiciones de voltaje constante, de acuerdo con el método de Towbin (Towbin y cols., 1979) utilizando como tampón 25 mM Tris, pH 8.3, 1.3 mM SDS, 192 mM glicina, 20% metanol.

Las membranas conteniendo proteínas electrotransferidas fueron bloqueadas durante al menos 30 min con 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 1% Tween-20, 5% leche en polvo, 0.01% NaN<sub>3</sub>. La incubación con anticuerpo primario, diluido en esta misma solución, se realizó a temperatura ambiente durante 1 h o bien a 4°C durante toda una noche. Tras varios lavados con solución carente de azida, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario conjugado a HRP durante 30 min a temperatura ambiente, lavadas varias veces con 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 1% Tween-20 y expuestas a los reactivos de quimioluminiscencia SuperSignal Ultra Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, EEUU). Las membranas así tratadas fueron utilizadas para impresionar películas fotográficas de alta sensibilidad (Pierce), las cuales fueron reveladas y las imágenes correspondientes captadas en un ordenador iMac. La cuantificación densitométrica de las bandas de interés se llevó a cabo utilizando el programa NIH Image v. 1.63. Alternativamente, las bandas de proteínas marcadas con <sup>32</sup>P fueron visualizadas en PhosphorImager (FUJIXBas 1000, Fuji, Tokio, Japón) utilizando el programa PC-BAS 2.08.

## 12. Ensayo de proteínas

Generalmente utilizamos el ensayo colorimétrico comercializado por Biorad (Hercules, EEUU) y que está basado en el método de Bradford (Bradford, 1976). Soluciones de BSA de concentración conocida sirvieron para elaborar la correspondiente recta de calibración. Para la cuantificación de proteínas de membrana, un pequeño volumen de las muestras fue previamente solubilizado en 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Tritón X-100. Los agregados insolubles fueron eliminados por centrifugación (12000xg, 10 min, 4°C), determinándose la concentración de proteínas a partir de la fracción soluble. Alternativamente, muestras de membranas intactas fueron cuantificadas mediante absorbancia a 280 nm.

## **RESULTADOS**

Con el fin de evaluar la posible actuación de PKA en el tráfico retrógrado Golgi-RE, centramos nuestro estudio en el receptor de la secuencia KDEL y, más concretamente, en el análisis funcional de su extremo C-terminal.

### 1. DISEÑO MOLECULAR DE UNA FORMA ECTÓPICA DEL RECEPTOR DE LA SECUENCIA KDEL

De acuerdo con los análisis de secuencia de aminoácidos, la topología más probable para el receptor de la secuencia KDEL es la de una proteína integral de membrana de 23 kDa con siete dominios trans-membrana. El extremo N-terminal se localizaría en la luz del orgánulo y el extremo opuesto C-terminal se proyectaría hacia el citosol. Este último consta de una corta secuencia de 12-13 aminoácidos hidrofílicos que, muy probablemente, adopten una configuración en  $\alpha$ -hélice (Fig. 1).

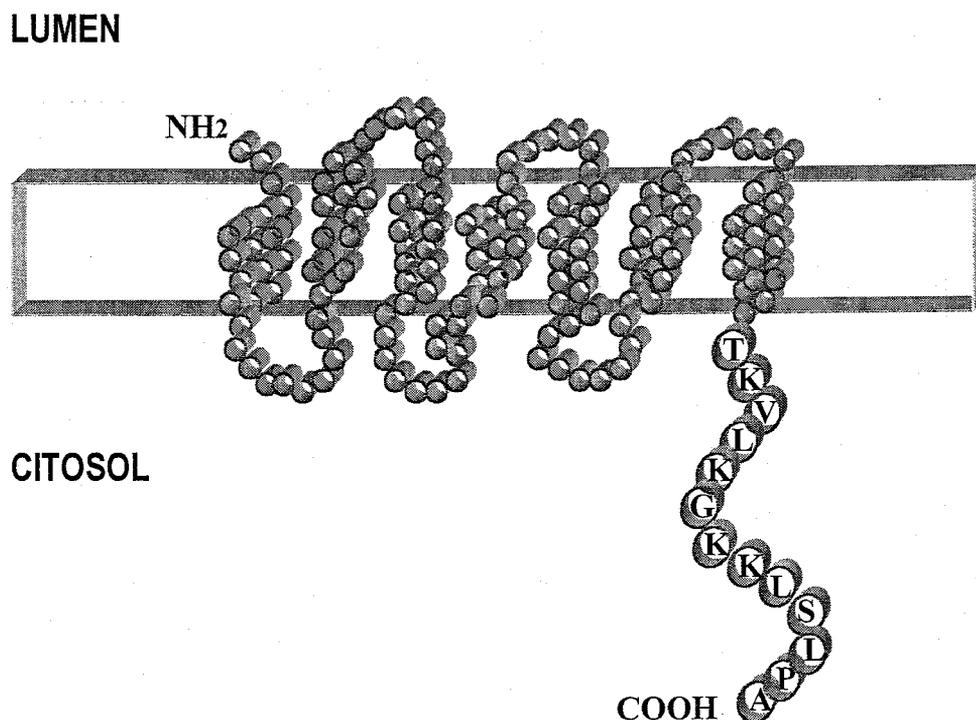
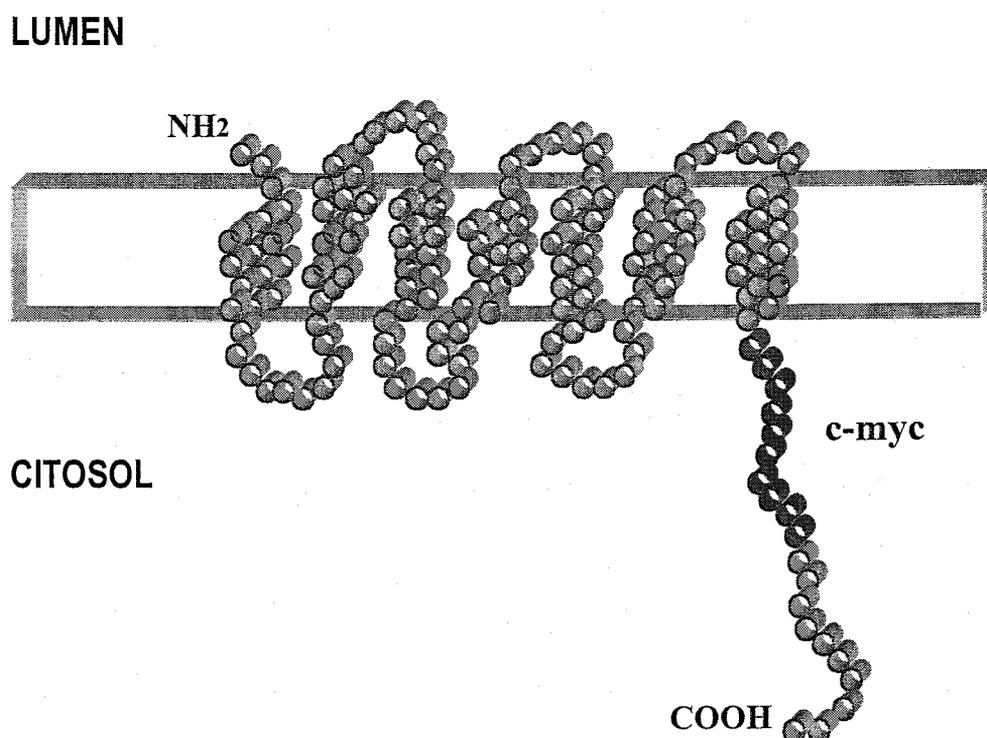


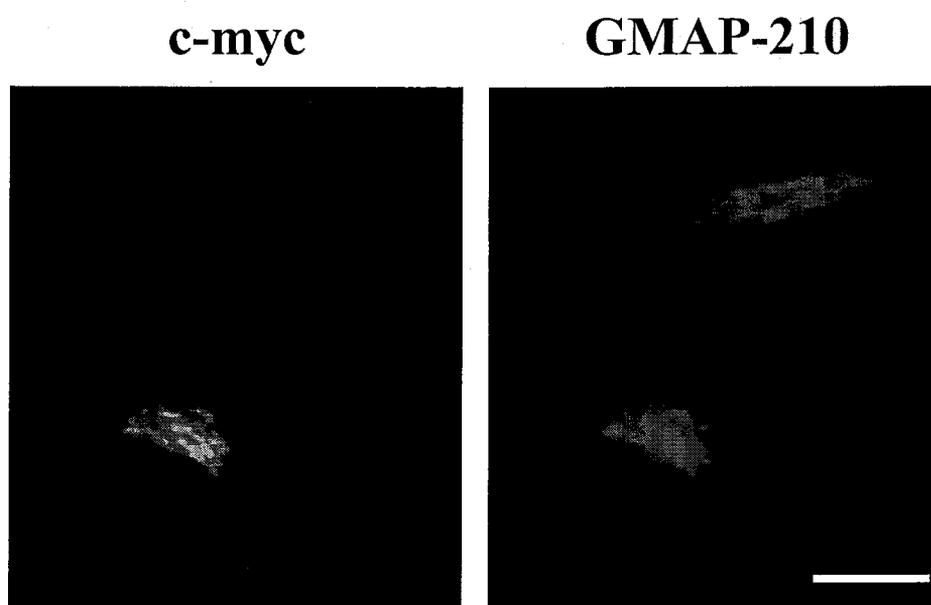
Figura 1. Topología del receptor de KDEL.

Con el fin de analizar el papel funcional del tallo citosólico C-terminal del receptor, diseñamos una forma molecular del mismo que, por contar con algún tipo de marca o epítipo, pudiese ser convenientemente detectada en nuestros ensayos. Para ello, insertamos la secuencia conocida como c-myc (EQKLISEEDL) entre los aminoácidos 199 y 200 de la proteína nativa; esto es, entre el final del último dominio transmembrana y el comienzo del tallo citosólico (Fig. 2).



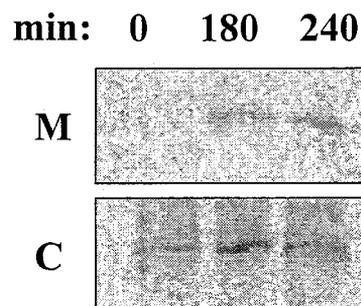
**Figura 2.** Representación esquemática del receptor de KDEL con el epítipo **c-myc**. La secuencia c-myc fue insertada mediante mutagénesis dirigida entre el último dominio transmembrana y el comienzo del dominio citoplásmico del receptor.

En primer lugar, estudiamos los efectos derivados de la inserción de la secuencia c-myc sobre el comportamiento y localización subcelular del receptor. Las células COS transfectadas con el ADNc que codifica para el receptor portador del epítipo c-myc expresaron moderadamente la construcción. Esta se localizó fundamentalmente en un área perinuclear identificada, en detecciones dobles de inmunofluorescencia indirecta, como el complejo de Golgi. Así, la tinción de este orgánulo con un anticuerpo dirigido contra la proteína GMAP-210, localizada en su lado cis (Infante y cols., 1999), coincidió con la detección del receptor con un anticuerpo contra la secuencia c-myc (Fig. 3). Por tanto, la presencia de este epítipo no alteró la localización normal del receptor en el complejo de Golgi.



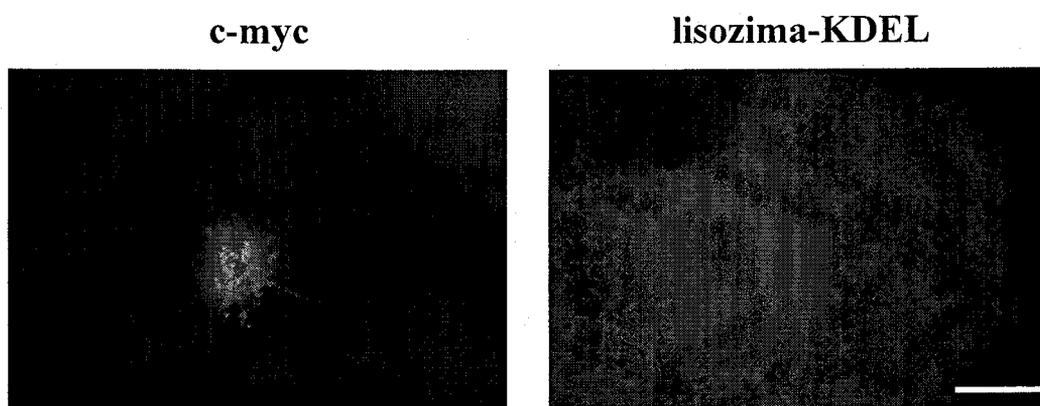
**Figura 3. Localización subcelular de una forma ectópica del receptor de la secuencia KDEL.** Células COS fueron transfectadas con el plásmido HE24M que codifica una versión del receptor de KDEL con el epítipo c-myc intercalado. Las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos anti-myc y anti-GMAP-210. Barra, 20  $\mu$ m.

Asimismo, analizamos la funcionalidad del receptor mediante la utilización de un ensayo destinado a evaluar la retención intracelular de ligandos, es decir, proteínas solubles portadoras de la secuencia KDEL en su extremo C-terminal. A tal fin, modificamos genéticamente la secuencia codificadora de la lisozima de gallina de modo que fuese adecuadamente reconocida por el receptor autóctono. Transfectamos células COS con el cDNA que codifica para lisozima-KDEL y, posteriormente, llevamos a cabo un experimento de pulso-caza e inmunoprecipitación encaminado a monitorizar la secreción de esta proteína al medio de cultivo. Tal y como muestra la Fig. 4, la mayor parte de las moléculas de lisozima-KDEL sintetizadas durante el periodo de pulso fueron reconocidas por el receptor endógeno y retenidas intracelularmente. No obstante, una fracción significativa de las mismas, cifrada en el 20-22%, fue secretada al medio de cultivo durante un periodo de caza metabólica de 4h. Posiblemente ello sea consecuencia de la saturación del receptor endógeno tras la sobreexpresión del ligando.



**Figura 4. Secreción de lisozima-KDEL.** Células COS fueron transfectadas con un plásmido que codifica para lisozima con la secuencia KDEL insertada en su extremo C terminal. Las células fueron marcadas radiactivamente con  $S^{35}$ -metionina y cisteína durante 10 min. A los tiempos de caza indicados, lisozima-KDEL fue inmunoprecipitada del medio (M) y del "pellet" celular (C). Las muestras fueron procesadas para electroforesis en SDS-PAGE y las bandas radiactivas visualizadas en PhosphorImager.

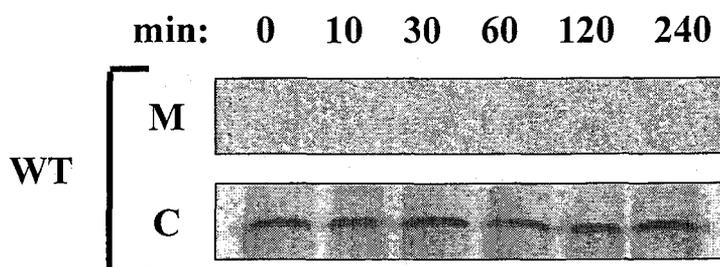
Por otro lado, transfectamos células COS con un plásmido conteniendo dos secuencias codificadoras: la correspondiente a lisozima-KDEL y la de nuestra construcción del receptor de KDEL marcada con c-myc. Comprobamos, en primer lugar, mediante inmunofluorescencia la expresión simultánea de ambas proteínas. La mayoría de las células que sintetizaron una de ellas también produjeron la otra (79% de las que expresaban lisozima-KDEL; >84% de las que expresaban el receptor con c-myc intercalado). Más aún, en tales células lisozima-KDEL se localizó en el RE, en tanto que el receptor apareció concentrado mayoritariamente en el complejo de Golgi (Fig. 5).



**Figura 5. Detección por inmunofluorescencia del receptor de KDEL y lisozima-KDEL.** Células COS fueron transfectadas con un plásmido que codifica el receptor de KDEL conteniendo el epítipo c-myc y lisozima-KDEL. Las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-c-myc y anti-lisozima. Barra, 20 $\mu$ m.

Estas observaciones sugieren la existencia, a nivel del complejo de Golgi, de un sistema efectivo en términos de recuperación de ligandos KDEL.

En contraste con los resultados de marcaje metabólico obtenidos con células transfectadas con el cDNA que únicamente codifica para lisozima-KDEL, aquellas que además de esta proteína expresan el receptor ectópico mostraron una mayor eficiencia en la capacidad de retención intracelular de ligandos. De hecho, tales células no secretaron lisozima-KDEL al medio de cultivo durante un periodo de caza metabólica de 4 h (Fig. 6). De estos resultados se deduce que el receptor conteniendo la secuencia c-myc intercalada es funcionalmente activo, puesto que es capaz de restablecer la eficacia del sistema de retención disminuida tras la sobreexpresión de lisozima-KDEL.



**Figura 6. Efecto de la sobreexpresión del receptor sobre la secreción de lisozima-KDEL.** Células COS fueron transfectadas con un plásmido que codifica para lisozima-KDEL y el receptor de KDEL con el epítipo c-myc. Las células fueron marcadas radiactivamente con  $S^{35}$ -metionina y cisteína durante 10 min. A los tiempos de caza indicados, la lisozima-KDEL fue inmunoprecipitada del medio (M) y del "pellet" celular (C). Las muestras fueron procesadas para electroforesis en SDS-PAGE y visualizadas en PhosphorImager.

En definitiva, los datos obtenidos indican que la inserción descrita del epítipo c-myc no afecta a la localización y funcionalidad del receptor de la secuencia KDEL.

## 2. VALORACIÓN FUNCIONAL DEL EXTREMO C-TERMINAL DEL RECEPTOR DE LA SECUENCIA KDEL

La forma molecular anteriormente descrita del receptor de la secuencia KDEL permitió abordar el análisis de la significación funcional del tallo citosólico o extremo C-terminal de esta molécula. Teóricamente, la delección de los últimos 12 aminoácidos de tal construcción da lugar a una proteína con idéntica orientación topológica y en cuyo extremo C-terminal aparece el epítipo c-myc cubierto únicamente por un residuo de treonina (Fig. 7).

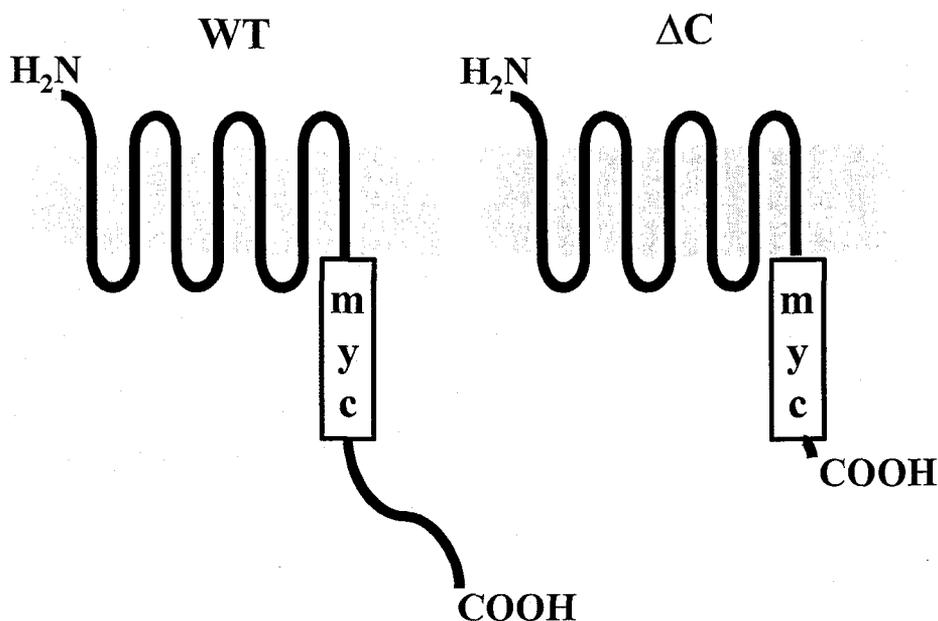
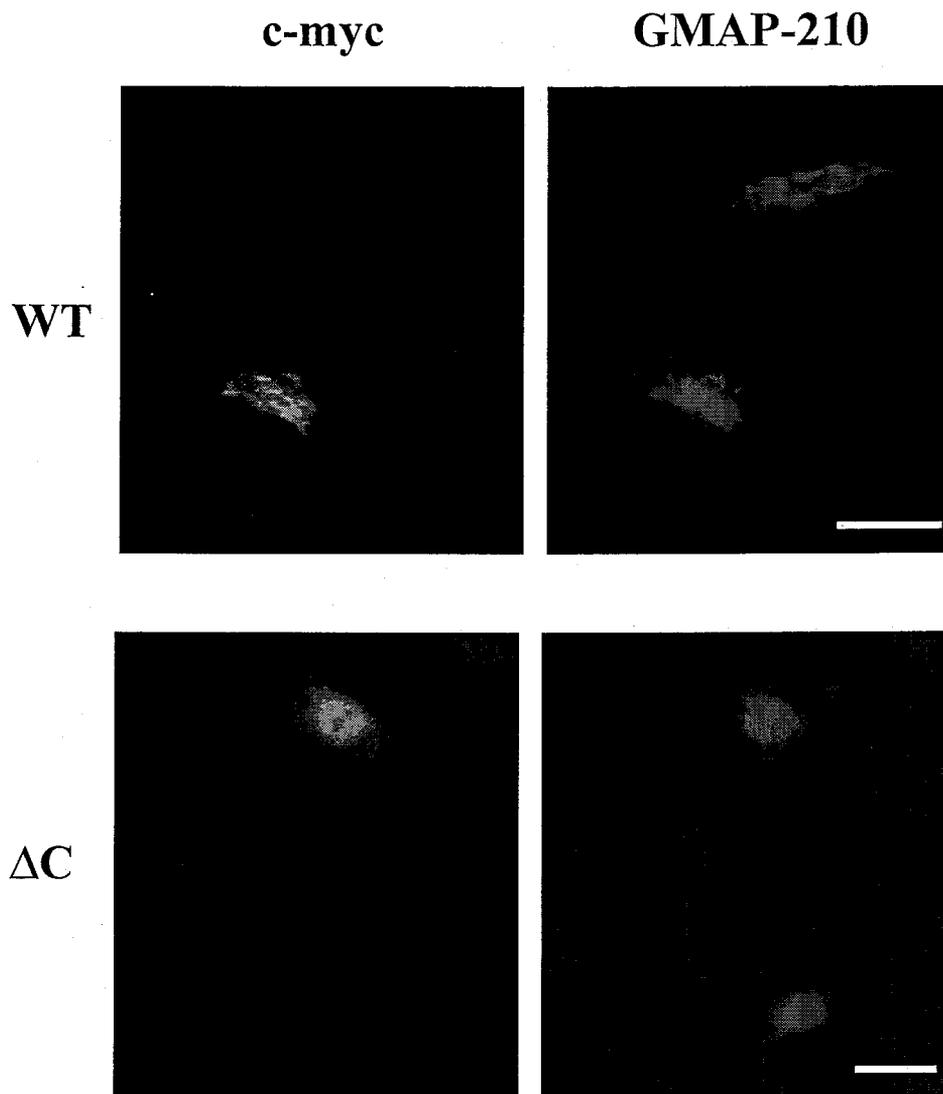


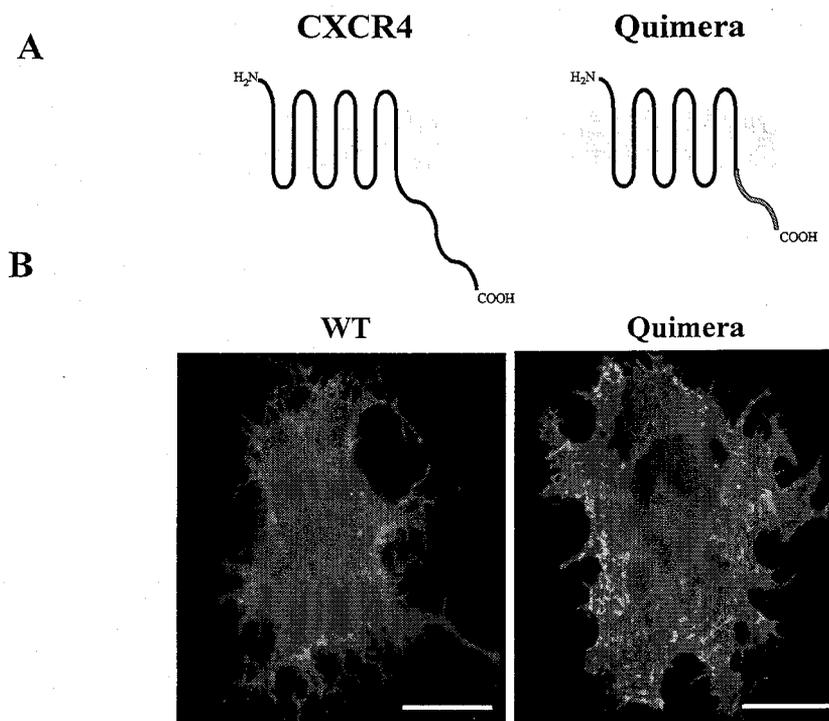
Figura 7. Representación esquemática de una versión truncada del receptor de KDEL. Esta forma del receptor carece de los últimos doce aminoácidos presentes en el tallo citosólico de la proteína nativa.

Al igual que la forma intacta, el receptor carente de tallo citosólico se localizó preferentemente en el aparato de Golgi, donde coincidió con el marcador de cis-Golgi GMAP-210 (Fig. 8).



**Figura 8. Localización subcelular de una forma truncada del receptor de KDEL carente del extremo C-terminal.** Células COS expresando el receptor silvestre (WT) o bien su forma truncada ( $\Delta C$ ) fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos anti-myc y anti-GMAP-210. Barras, 20  $\mu m$ .

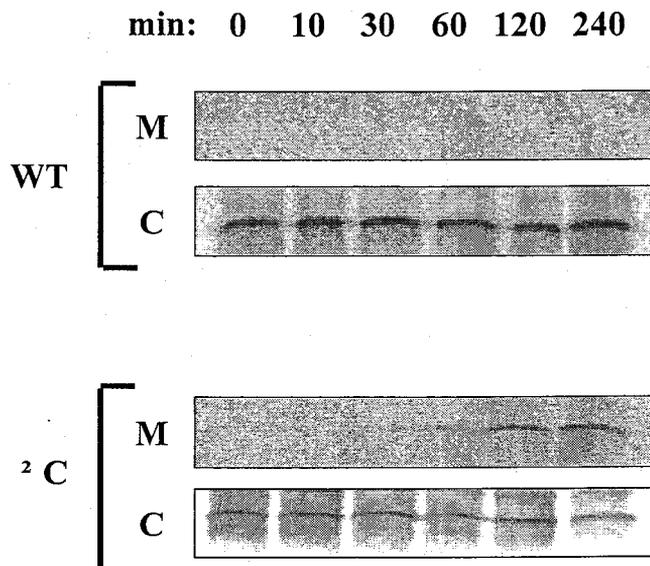
Si bien este resultado podría indicar la ausencia de algún tipo de señal de destino a nivel del extremo C-terminal, existía la posibilidad de oligomerización de la forma truncada con el receptor endógeno de las células. Por ello, llevamos a cabo un experimento encaminado a determinar la capacidad del tallo citosólico del receptor de KDEL para, una vez transplantado a otra proteína de membrana, dirigir su destino intracelular. Como tal utilizamos el receptor CXCR4 de citoquinas cuya estructura molecular es muy similar a la del receptor de KDEL (Amara y cols., 1997). Sustituimos el dominio citosólico C-terminal de este receptor de membrana plasmática por el correspondiente del receptor de KDEL nativo, determinando posteriormente la localización de la proteína quimérica mediante inmunofluorescencia. Como puede comprobarse en la Fig. 9, la presencia del tallo citosólico C-terminal del receptor de KDEL no afectó al destino final del receptor CXCR4. Tanto la forma nativa de esta molécula como la quimérica viajaron sin impedimentos aparentes a través de la vía exocítica hasta alcanzar la membrana plasmática.



**Figura 9. Localización subcelular del receptor CXCR4 y una forma quimérica.** (A) Representación esquemática del receptor CXCR4 silvestre (WT) y la quimera resultante de la sustitución de los últimos 41 aminoácidos de esta proteína por el dominio C-terminal del receptor de KDEL. (B) Células COS fueron transfectadas con un plásmido que codifica el receptor CXCR4 silvestre (WT) o la quimera descrita anteriormente. El procesamiento para inmunofluorescencia se llevó a cabo con un anticuerpo anti-CXCR4. Barras, 20  $\mu$ m.

En conjunto, estos resultados indican que el extremo C-terminal del receptor de la secuencia KDEL no confiere por si mismo localización en Golgi a una proteína de membrana y, por tanto, no sería responsable de la concentración en este orgánulo del receptor endógeno.

Por otro lado, existía la posibilidad de que el dominio C-terminal estuviese de algún modo implicado en la actividad recuperadora de ligandos KDEL llevada a cabo por el receptor. Para determinar tal eventualidad llevamos a cabo los experimentos de marcaje metabólico e inmunoprecipitación antes citados con células que expresaban simultáneamente el receptor truncado y lisozima-KDEL. Detectamos entonces una importante deficiencia en la capacidad celular para retener intracelularmente a las moléculas de lisozima-KDEL (Fig. 10). Un 44-47% de la proteína inicialmente sintetizada durante el pulso fue secretada al medio de cultivo durante un periodo de caza de 4 h. Ello contrasta con la ausencia de secreción de lisozima-KDEL al medio en células que expresan el receptor intacto (Fig. 10).



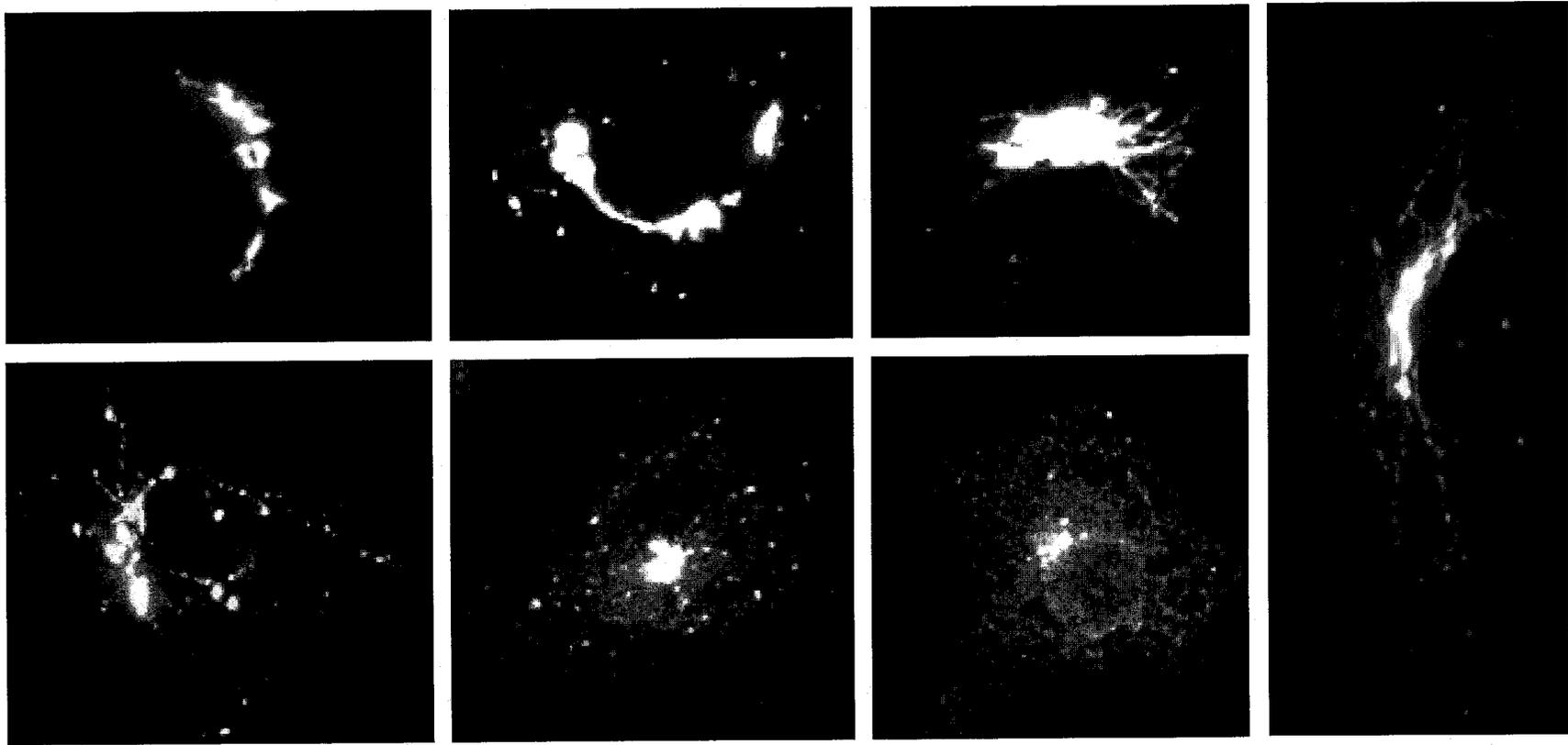
**Figura 10. Efecto de la delección C-terminal del receptor sobre la secreción de lisozima-KDEL.** Células COS fueron transfectadas con un plásmido que codifica para lisozima-KDEL y para el receptor de la secuencia KDEL conteniendo el epítipo c-myc. Las células fueron marcadas radiactivamente con  $S^{35}$ -metionina y cisteína. A los tiempos de caza indicados, lisozima-KDEL fue inmunoprecipitada del medio (M) y del "pellet" celular (C). Las muestras fueron procesadas para electroforesis en SDS-PAGE. Los resultados se refieren a la secreción al medio de lisozima-KDEL por parte de células que expresan el receptor silvestre (WT) o bien una forma truncada del mismo carente del tallo citoplásmico ( $\Delta C$ ).

Así pues, la eliminación del tallo citosólico C-terminal afecta negativamente a la capacidad del receptor para recuperar proteínas autóctonas escapadas del RE y hacerlas retornar a este orgánulo desde el complejo de Golgi.

### **3. PAPEL DEL DOMINIO C-TERMINAL DEL RECEPTOR DE LA SECUENCIA KDEL EN SU TRANSPORTE**

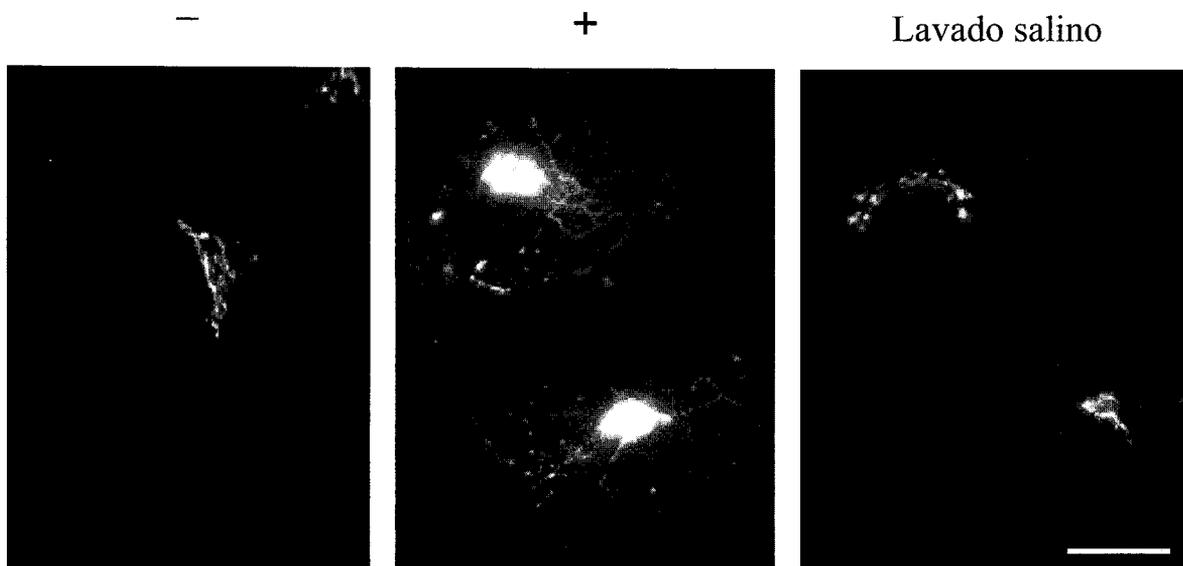
Los datos anteriores nos hicieron pensar que el tallo citosólico C-terminal del receptor de la secuencia KDEL podría desempeñar un papel relevante en el transporte retrógrado con destino al RE de los complejos ligando-receptor formados en el complejo de Golgi. Ello permitiría explicar el que, en células que expresan una forma truncada del receptor carente de tal dominio, una fracción significativa de los ligandos KDEL fuesen secretados al medio extracelular. Decidimos, por tanto, examinar el efecto resultante de eliminar esta región concreta del receptor sobre su propio transporte Golgi-RE.

Para ello diseñamos un ensayo morfológico destinado a reproducir tal flujo retrógrado. Inicialmente utilizamos células Vero no transfectadas, cuya membrana plasmática fue permeabilizada mediante exposición a la toxina bacteriana conocida como estreptolisina O. Comprobamos que la incubación a 37°C de tales células permeabilizadas en presencia de los nucleótidos trifosfatos ATP y GTP ocasionaba la redistribución aparente del receptor endógeno desde la región de Golgi hasta el RE (Fig. 11). El examen detallado de este fenómeno indicó que el proceso comenzaba con la formación de finos túbulos alargados, con engrosamientos regularmente espaciados. Posteriormente, estos túbulos experimentaban fragmentación y fusión gradual con el RE (Fig. 11).



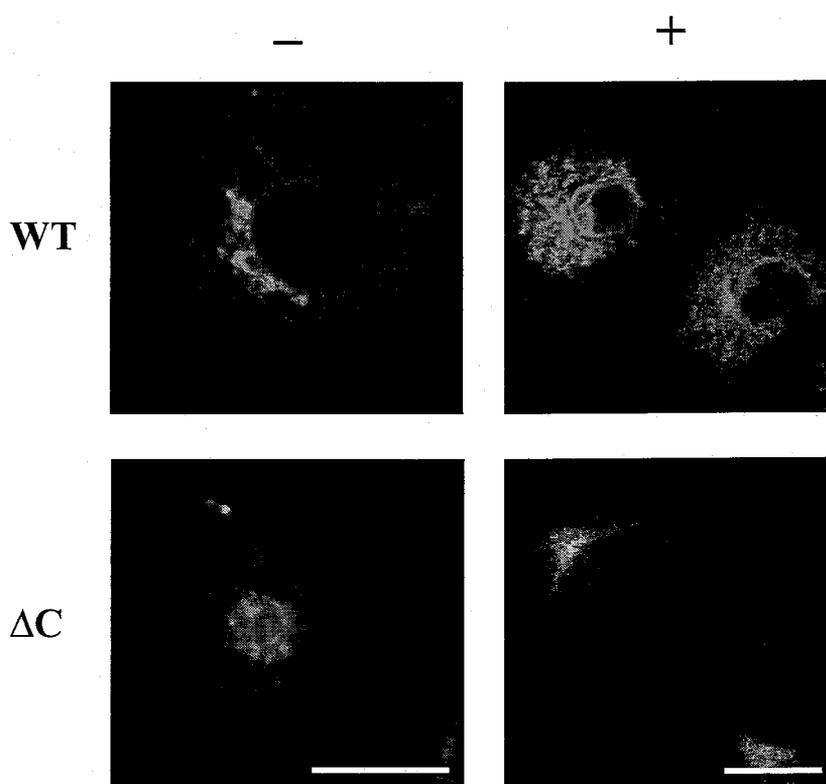
**Figura 11. Redistribución Golgi-RE del receptor de KDEL endógeno.** Células Vero fueron permeabilizadas con SLO e incubadas a 37° C en presencia de ATP y GTP (1 mM) durante los tiempos indicados. Las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo contra el dominio citoplásmico del receptor de la secuencia KDEL. Barras, 20  $\mu$ m.

El proceso completo fue dependiente de ATP y GTP (Fig. 12). Indirectamente comprobamos que también requería factores citosólicos residuales, los cuales permanecerían en las células tras su permeabilización. Así, las células permeabilizadas quedaron incapacitadas para formar túbulos tras la realización de un lavado con alta concentración de sales (Fig. 12), si bien la adición de citosol exógeno no consiguió restablecer tal capacidad (no mostrado).



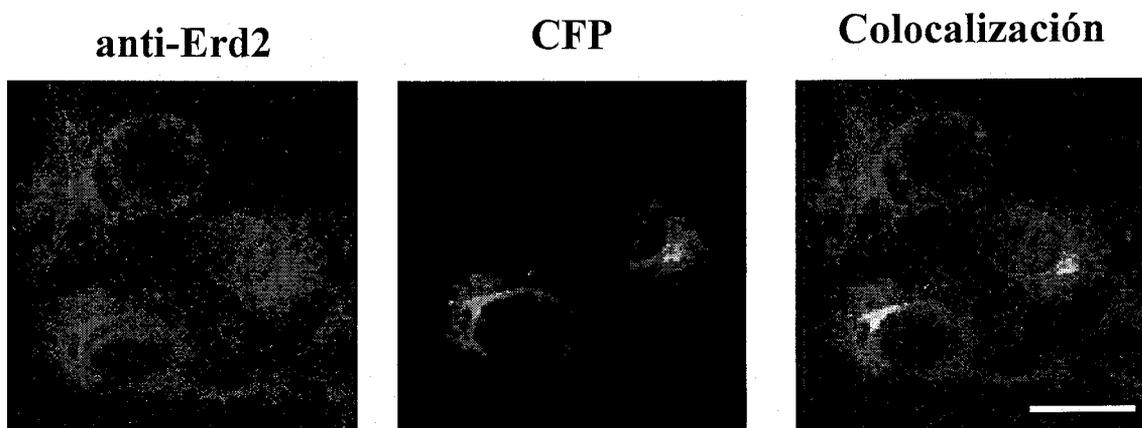
**Figura 12. Requerimientos para la redistribución Golgi-RE del receptor de KDEL endógeno.** Células Vero permeabilizadas con SLO fueron utilizadas en el ensayo de redistribución descrito en la Fig. anterior. Las células fueron incubadas en presencia (+) o ausencia (-) de ATP y GTP (1 mM) en el medio de ensayo y alternativamente preincubadas con 0.1 M NaCl (lavado salino). La fijación y procesamiento para inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo tal y como se describe en la Fig. 11. Barra, 20  $\mu$ m.

Utilizamos, por tanto, este ensayo para testar nuestra hipótesis sobre la participación del dominio C-terminal del receptor en el transporte retrógrado Golgi-RE. Empleamos células COS que expresaban una forma fluorescente del receptor de la secuencia KDEL obtenida tras la fusión génica de la secuencia codificadora de la proteína CFP (*cyan fluorescent protein*) al extremo C-terminal del receptor. Como era de esperar esta versión fluorescente del receptor redistribuyó eficientemente al RE desde el aparato de Golgi al incubar las células permeabilizadas a 37°C durante 30-35 min con ATP y GTP (Fig. 13). Por el contrario, en ausencia de nucleótidos trifosfatos el receptor fluorescente permaneció confinado en el aparato de Golgi. En contraste con este resultado, una forma truncada del receptor carente del dominio C-terminal no redistribuyó al RE, con independencia de la incubación de las células permeabilizadas en presencia o en ausencia de ATP y GTP (Fig. 13).



**Figura 13. Efecto de la delección C-terminal del receptor sobre su redistribución Golgi-RE.** Células COS fueron transfectadas con un plásmido que codifica el receptor de la secuencia KDEL, bien sea su forma silvestre (WT) o bien una forma truncada carente de los últimos 12 aminoácidos ( $\Delta C$ ), fusionado por su extremo C-terminal a la proteína fluorescente CFP. Las células fueron permeabilizadas con SLO e incubadas a 37° C durante 35 min en presencia (+) o ausencia (-) de ATP y GTP. Finalmente, fueron fijadas y observadas en el microscopio. Barras, 16  $\mu\text{m}$ .

Estas observaciones pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas en las capacidades de ambas formas moleculares del receptor de KDEL para participar en la vía de transporte retrógrado Golgi-RE. Con el fin de revelar tales diferencias de forma inequívoca recurrimos a la detección mediante inmunofluorescencia indirecta del receptor endógeno, utilizando para ello un anticuerpo dirigido precisamente contra el dominio C-terminal del mismo. La Fig.14 se corresponde con células que expresaban una forma fluorescente y truncada del receptor, las cuales fueron permeabilizadas e incubadas a 37°C en presencia de ATP y GTP. Tras una incubación prolongada (30-35 min) el receptor endógeno, reconocido por el anticuerpo, apareció redistribuido en el RE, en tanto que la forma truncada fluorescente permaneció retenida en el complejo de Golgi (Fig. 14).



**Figura 14. . Diferencias en la capacidad de redistribución al RE del receptor nativo y la forma truncada C-terminal.** Células COS expresando una forma fluorescente (CFP) y truncada del receptor de KDEL carente del tallo citosólico fueron permeabilizadas con SLO e incubadas a 37°C durante 35 min en presencia de ATP y GTP. Posteriormente fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo contra el dominio C-terminal del receptor de KDEL. Barra, 16  $\mu$ m.

En conjunto, estos resultados indican que el transporte retrógrado desde el complejo de Golgi al RE del receptor de la secuencia KDEL depende de su dominio o extremo C-terminal.

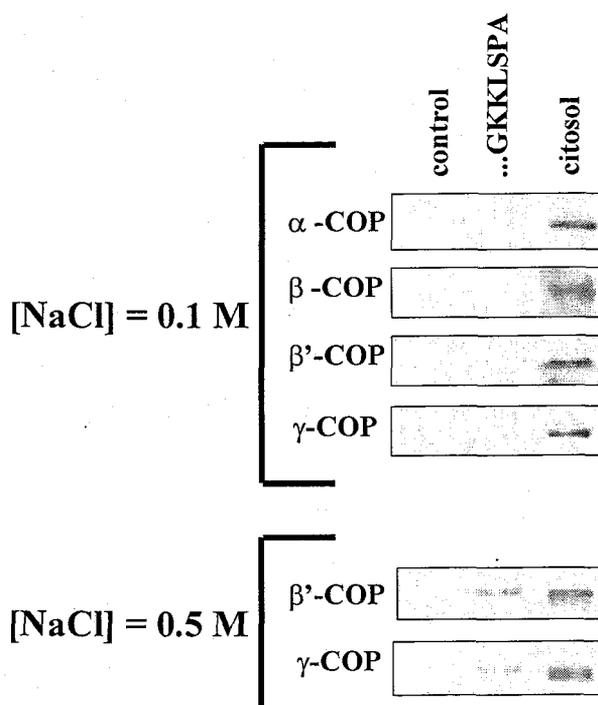
#### 4. PAPEL DEL DOMINIO C-TERMINAL DEL RECEPTOR DE LA SECUENCIA KDEL EN SU INTERACCIÓN CON LAS PROTEÍNAS DE CUBIERTA COPI

Es un hecho establecido que el transporte retrógrado Golgi-RE del receptor de la secuencia KDEL se lleva a cabo en intermediarios de transporte cubiertos del complejo COPI (Orci y cols., 1997; Girod y cols., 1999). Previsiblemente la formación de tales intermediarios requeriría la interacción previa del receptor con este tipo de proteínas de cubierta. Así, las cubiertas COPI son responsables del reconocimiento y selección de un elevado número de proteínas de membrana, como paso previo a su inclusión en intermediarios de transporte que luego viajan desde el complejo de Golgi al RE (Bremser y cols., 1999; Nickel y cols., 2002). Desde el punto de vista molecular, el proceso se inicia con la interacción del complejo COPI con los dominios citoplásmicos de las proteínas a transportar. Para ello es esencial la presencia en estas de algún tipo de señal de reconocimiento que las identifique como moléculas escapadas del RE susceptibles de recuperación. Una señal muy común de este tipo es un motivo dilisina (KKXX) situado en el extremo C-terminal de las proteínas de membrana. Curiosamente el receptor de la secuencia KDEL carece de un motivo dilisina o de algún otro tipo de señal de recuperación conocida que permita explicar su interacción con el complejo COPI. No obstante, por lo mencionado anteriormente, tal interacción debería ocurrir, en cuyo caso, sería un acontecimiento determinante para la funcionalidad del receptor.

Dado que los datos obtenidos indicaban que el dominio C-terminal del receptor de KDEL desempeña un papel relevante en el transporte retrógrado de esta proteína desde el Golgi al RE, decidimos examinar su interacción con las proteínas COPI. Con tal fin, llevamos a cabo una serie de experimentos de “arrastre” (*pull-down*) o purificación de proteínas citosólicas, una vez adheridas a una matriz con péptidos sintéticos acoplados covalentemente. Los péptidos se correspondían con diferentes modificaciones de la secuencia original del extremo C-terminal del receptor de KDEL. Incubamos a temperatura ambiente la matriz conteniendo péptido acoplado con un extracto de proteínas citosólicas y, tras lavar con tampón para desprender las proteínas laxamente unidas, procesamos para electroforesis e identificamos las moléculas asociadas mediante inmunoblot. Como control, muestras de matriz que carecían de péptido unido fueron procesadas en forma idéntica.

La asociación de las proteínas citosólicas fue siempre en estos ensayos dependiente del péptido acoplado a juzgar por la débil o nula señal obtenida en las muestras control.

En primer lugar analizamos la incorporación de diferentes proteínas componentes del coatómero. Ninguna de ellas se asoció a un péptido de 21 aminoácidos de longitud que abarcaba el dominio C-terminal completo del receptor de KDEL cuyo ensayo se realizó en condiciones salinas fisiológicas (0.1 M NaCl) (Fig. 15). No obstante, a mayor concentración salina (0.5-1 M NaCl) detectamos una pequeña incorporación de algunas proteínas como  $\beta'$ -COP y  $\gamma$ -COP (Fig. 15).



**Figura 15. Interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con componentes del coatómero.** Péptidos sintéticos correspondientes al extremo C-terminal del receptor fueron acoplados covalentemente a una matriz de sefarosa y utilizados para el “arrastre” y purificación de proteínas del coatómero presentes en el citosol de cerebro bovino. El péptido indicado como ...GKKLSLPA se corresponde con el dominio C-terminal completo del receptor silvestre de la secuencia KDEL. Como muestra-control se utilizó una cantidad equivalente de matriz sin péptido acoplado (control). Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente durante 5 min en presencia de las concentraciones indicadas de NaCl. Las proteínas citosólicas purificadas fueron resueltas mediante electroforesis en SDS-PAGE e identificadas mediante inmunoblot con anticuerpos específicos contra las moléculas indicadas. Una misma membrana electroforética fue reutilizada para la detección secuencial de varias proteínas del coatómero. Como control positivo de la inmunodetección se procesó una muestra (20  $\mu$ g) de citosol crudo.

Según este último dato, la existencia de algún tipo de condicionamiento estérico que pudiera impedir la unión del coatómero a este péptido concreto parece improbable. En su lugar, estos resultados concuerdan con la ausencia en el receptor nativo de una señal manifiesta de recuperación para el RE. Sin embargo, era posible que tal señal estuviera de algún modo oculta. Por ejemplo, en posiciones 6 y 7 a partir del extremo C se localizan dos residuos consecutivos de lisina que, al menos teóricamente, podrían constituir un motivo dilisina tríptico. Es decir, se trataría de una señal de recuperación encubierta que, en determinadas circunstancias, podría quedar expuesta para ser reconocida por el coatómero. Con el fin de investigar esta última posibilidad ensayamos un péptido similar al anterior pero carente de los tres últimos aminoácidos, de forma que exhibiera un motivo dilisina típico en su extremo C-terminal. A pesar de ello, las proteínas del coatómero tampoco se unieron a este otro péptido (Fig. 16). Así pues, en el caso del receptor de la secuencia KDEL, la interacción de su dominio C-terminal con el coatómero dependería de otros factores diferentes de la presencia de un motivo dilisina.

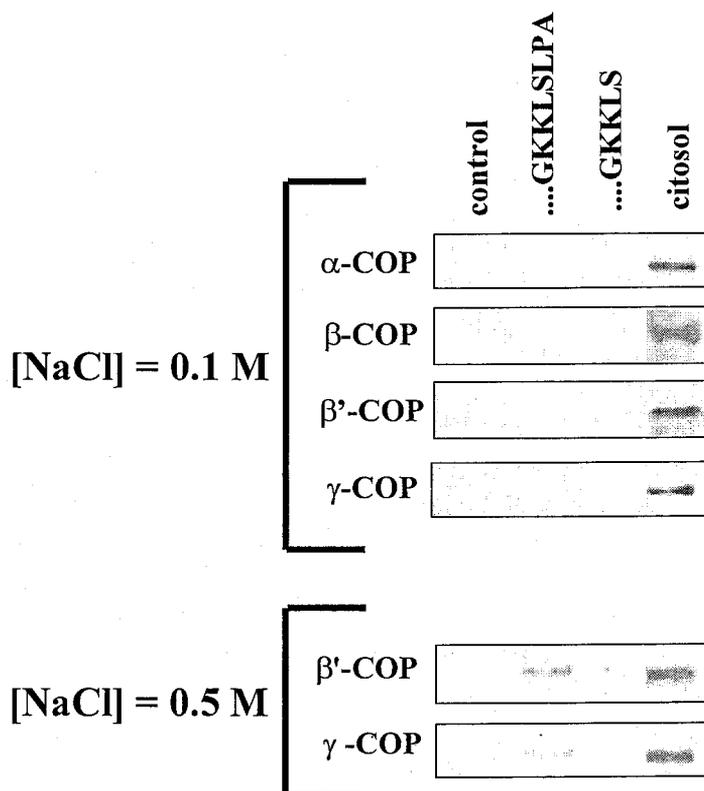
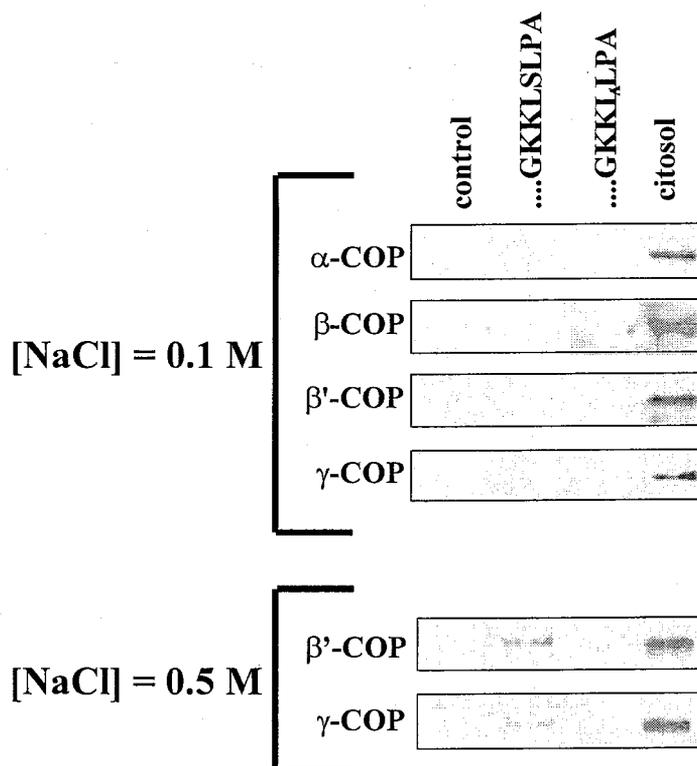


Figura 16. Efecto de la presencia de un motivo dilisina terminal en la interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con componentes del coatómero. En el ensayo de la Fig. 15 se incluyó el péptido ...GKKLS que, por carecer de los 3 últimos aminoácidos del extremo C-terminal, presenta un motivo típico dilisina de recuperación.

Uno de tales factores pudiera ser la presencia de un residuo de serina en la posición 209 del receptor nativo. Así se deduce de la observación de que la eliminación de este residuo impide la unión de las proteínas del coatómero a alta concentración



salina (Fig. 17).

**Figura 17.** Efecto de la eliminación de serina 209 sobre la interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con componentes del coatómero. En el ensayo anterior se incluyó el péptido () carente del residuo de serina que, en la proteína nativa, ocupa la posición 209.

Pensamos que el residuo de serina en cuestión podría ser objeto de fosforilación y que tal modificación afectase a la interacción del receptor de KDEL con las proteínas de cubierta. Para comprobar esta hipótesis analizamos las propiedades de dos nuevos péptidos. En uno de ellos la serina fue reemplazada por alanina, un aminoácido que no puede ser fosforilado; en el otro, la sustitución se realizó por ácido aspártico, cuya estructura se asemeja a un residuo de serina fosforilado. Precisamente el complejo coatómero interaccionó con este último péptido en todas las condiciones ensayadas. En

particular, el péptido con aspártico pudo reclutar a las proteínas del coatómero en presencia de diferentes concentraciones salinas (Fig. 18).

Por otro lado, no apreciamos diferencias significativas en la asociación de las diferentes proteínas detectadas, por lo que puede deducirse que el coatómero en bloque interaccionó con este péptido. Por el contrario, la sustitución por alanina suprimió la interacción (Fig. 18).

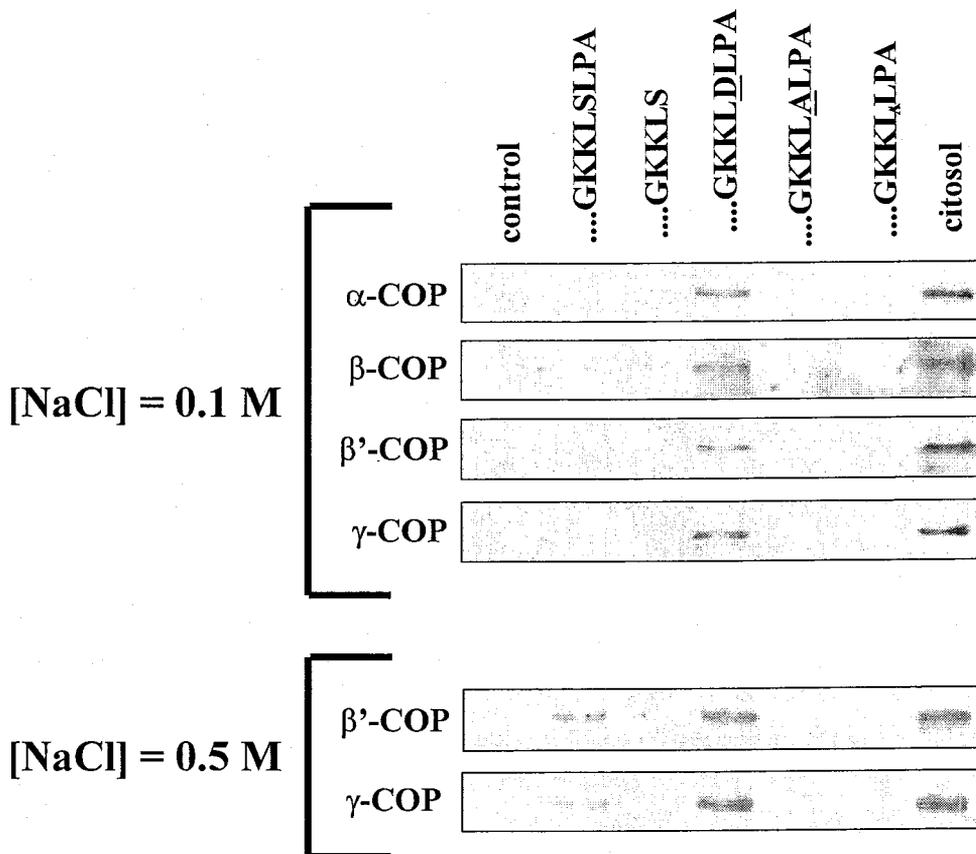
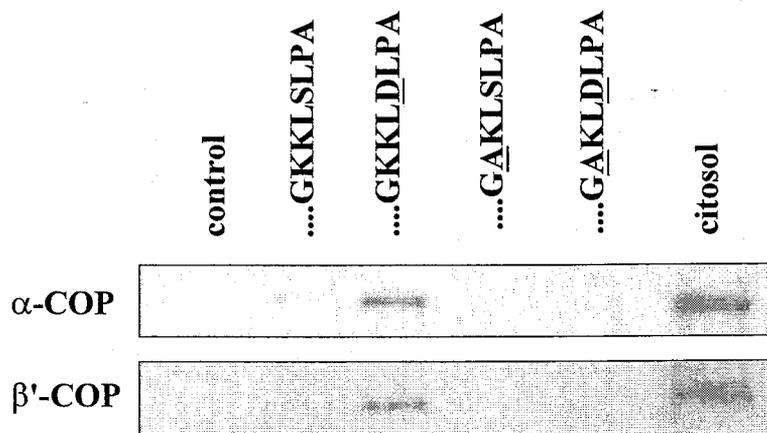


Figura 18. Efecto de la sustitución de serina 209 sobre la interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con componentes del coatómero. El residuo de serina que, en la proteína nativa, ocupa la posición 209 fue reemplazado por otros aminoácidos tales como alanina (A) o ácido aspártico (D) y los correspondientes péptidos fueron utilizados en el ensayo de “arrastre” descrito en la Fig. 15.

Estos resultados sugirieron que la asociación del complejo coatómero al tallo o dominio citosólico del receptor de KDEL podría depender de la fosforilación del residuo de serina 209. Sin embargo, este pudiera no ser el único factor determinante. Como antes se indicó, existe un motivo dilisina potencial en el interior de tallo citosólico del receptor, si bien dada su posición alejada del extremo C terminal no es previsible que esta secuencia sea funcional como tal. Estudiamos entonces la existencia o no de relación entre ambos factores. Comprobamos que al sustituir alguna de las lisinas por alanina se impedía la interacción con el coatómero (Fig. 19). Mas aún, esta inhibición no revertió tras una “fosforilación simulada” del residuo de serina 209. Así, un péptido en el que el motivo dilisina se encontraba alterado y, al mismo tiempo, poseía aspártico en lugar de serina en una posición equivalente a la 209 del receptor nativo resultó ineficaz para atraer al coatómero (Fig. 19).

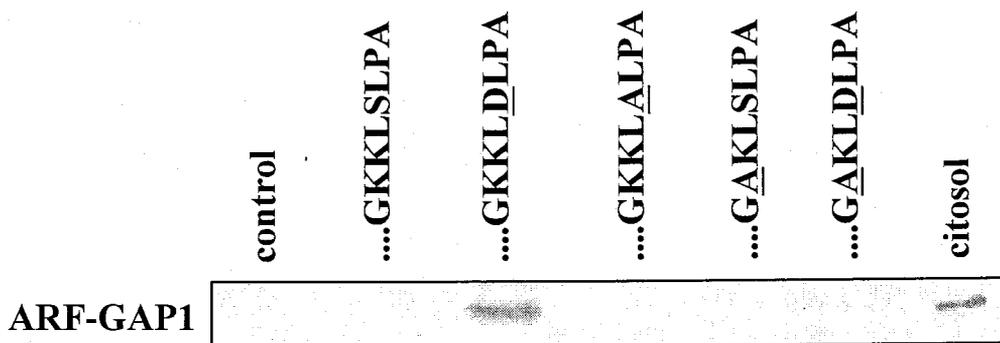


**Figura 19.** Efecto de la alteración del motivo dilisina críptico sobre la interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con componentes del coatómero. El ensayo de “arrastre” descrito en la Fig. 15 fue realizado en presencia de NaCl 0.1 M. Se utilizaron péptidos sintéticos correspondientes al dominio C-terminal del receptor de la secuencia KDEL; los cambios efectuados en la secuencia de la forma silvestre (GKKLSLPA) han sido indicados (aminoácidos subrayados). Los controles realizados son los descritos en la Fig. 15.

Por tanto, la presencia de un motivo dilisina intacto es un requerimiento estricto, aunque no suficiente, para la interacción del receptor de la secuencia KDEL con el

coatómero, estando condicionada por la fosforilación del residuo de serina en posición 209.

Además del coatómero, el receptor de KDEL también interacciona con ARF-GAP (Aoe y cols., 1997; Aoe y cols., 1998). Se ha demostrado que esta última interacción es un proceso inducido por el reconocimiento del ligando. Así, cuyo el receptor une un ligando se produce la incorporación de ARF-GAP desde el citosol a la membrana, donde interviene en su selección e inclusión en intermediarios de transporte cubiertos de COPI (Yang y cols., 2002). Nos preguntábamos si los requerimientos descritos para la interacción del receptor con el coatómero eran igualmente aplicables a su asociación con ARF-GAP. Esta proteína citosólica no se unió a un péptido correspondiente al dominio citosólico C-terminal completo del receptor de KDEL a menos que el residuo equivalente a la serina 209 en la molécula nativa estuviese sustituido por ácido aspártico (Fig. 20). De nuevo, el motivo dilisina interno resultó desempeñar un efecto dominante. Su alteración, mediante sustitución por alanina, impidió la interacción incluso en presencia de ácido aspártico en la posición equivalente a 209 (Fig. 20).



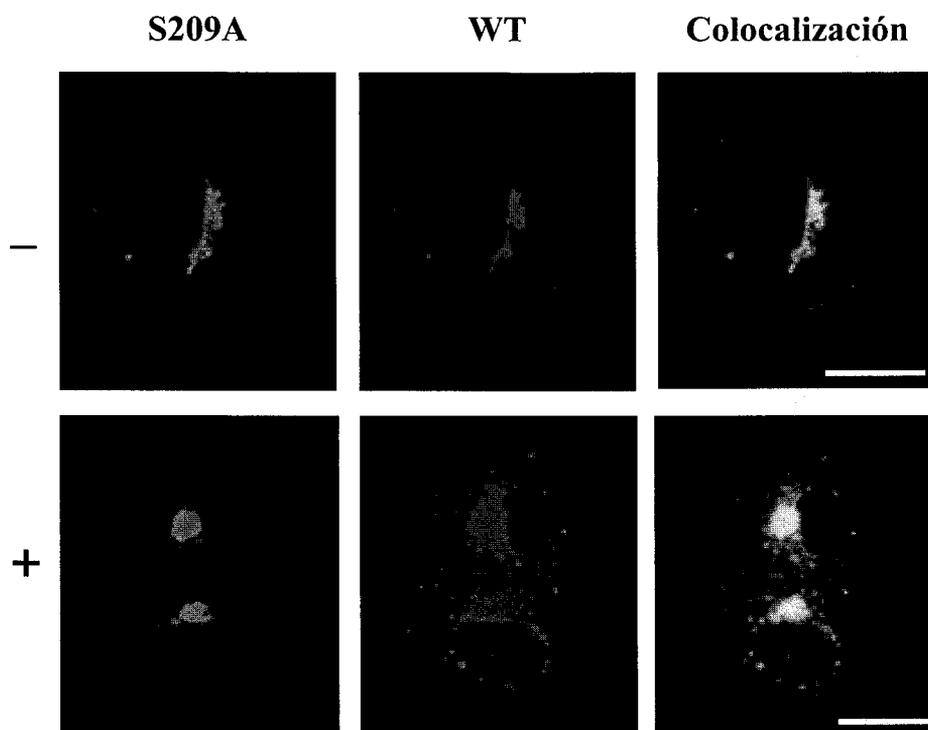
**Figura 20. Interacción del dominio C-terminal del receptor de KDEL con ARF-GAP.** Utilizando un anticuerpo específico para ARF-GAP1 detectamos el reclutamiento de esta proteína desde el citosol a una matriz de sefarosa con péptidos acoplados covalentemente. El péptido ...GKKLSLPA se corresponde con la secuencia nativa del dominio C-terminal del receptor de KDEL. Los cambios efectuados en esta secuencia han sido indicados (aminoácidos subrayados). Las condiciones del ensayo y los controles realizados son los comentados en la Fig. 19.

En suma, los resultados *in vitro* indican que la fosforilación del residuo de serina 209 promueve la interacción del receptor de la secuencia KDEL tanto con los componentes del coatómero como con ARF-GAP.

## 5. PAPEL DEL RESIDUO DE SERINA 209 DEL RECEPTOR DE KDEL EN EL TRANSPORTE RETRÓGRADO GOLGI-RE

Puesto que el residuo de serina 209 parecía ser importante para la interacción del receptor de la secuencia KDEL con las proteínas de cubierta COPI, era de suponer que, en consecuencia, desempeñaría también un papel relevante en el funcionamiento del mismo. Para comprobarlo, estudiamos los efectos resultantes de la sustitución de este aminoácido por alanina (S209A) en dos de los ensayos anteriormente comentados; a saber, el transporte retrógrado Golgi-RE del propio receptor y la capacidad de este último para recuperar ligandos con la secuencia KDEL en el extremo C-terminal.

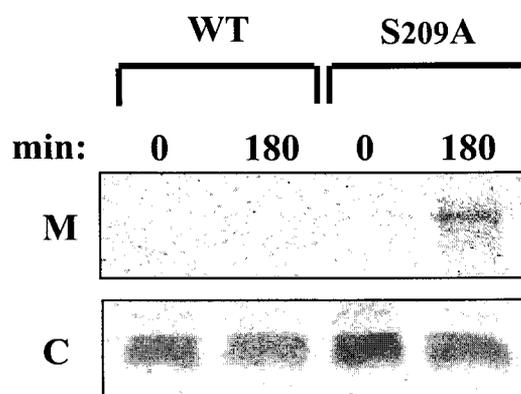
En el primer caso, utilizamos en el ensayo de redistribución Golgi-RE células que expresaban simultáneamente formas fluorescentes del receptor silvestre y de la forma mutada S209A. Ambas versiones del receptor se localizaron en el complejo de Golgi de las células transfectadas con dos plásmidos: uno que codificaba para el receptor silvestre fusionado a YFP y otro para la forma mutante S209A fusionada a CFP. En esta localización subcelular permanecieron ambas proteínas fluorescentes tras la incubación de las células permeabilizadas en ausencia de ATP y GTP (Fig. 21). Por el contrario, en presencia de estos nucleótidos el receptor de KDEL redistribuyó desde el Golgi al RE. La redistribución, no obstante, fue desigual. Así, después de 20-25 min de incubación una cantidad significativa del receptor silvestre no mutado apareció redistribuido en el RE, en tanto la forma mutante S209A básicamente permaneció concentrada en Golgi (Fig. 21).



**Figura 21. Efecto de la sustitución S209A sobre la redistribución Golgi-RE del receptor de la secuencia KDEL.** Células COS fueron transfectadas con dos plásmidos que codifican formas fluorescentes del receptor de KDEL: el receptor silvestre (WT) fusionado a YFP y su forma mutada S209A fusionada a CFP. Las células fueron permeabilizadas e incubadas a 37° C durante 25 min en presencia (+) o ausencia (-) de ATP y GTP antes de la fijación. Barras, 16  $\mu$ m.

En general, la versión mutada redistribuyó al RE más lentamente en comparación con la forma silvestre. Únicamente tras un tiempo de incubación prolongado (40-45 min) detectamos al receptor mutado S209A en el RE y, para entonces, otras muchas proteínas endógenas del Golgi se encontraban igualmente distribuidas (no mostrado). Por tanto, estos resultados revelan la existencia de diferencias significativas entre ambas formas moleculares del receptor en su capacidad para ser transportadas desde el complejo de Golgi al RE. Teniendo en cuenta que tales diferencias se manifiestan para células que expresan los dos tipos moleculares, es evidente que la sustitución S209A afecta negativamente al transporte retrógrado del receptor de la secuencia KDEL.

Analizamos también las consecuencias de la mutación S209A sobre la retención intracelular de lisozima-KDEL. En este caso, utilizamos células que, por haber sido transfectadas con un plásmido con dos secuencias codificadoras, expresaban simultáneamente lisozima-KDEL y el receptor de la secuencia KDEL, bien sea la forma silvestre o la versión mutante. Como era de esperar, las células que expresaban el receptor silvestre no secretaron lisozima-KDEL al medio extracelular. En cambio, si lo hicieron aquellas otras que expresaban el receptor conteniendo la mutación S209A (Fig. 22). Concretamente, 18.2% de la lisozima-KDEL inicialmente sintetizada durante el tiempo de pulso fue secretada al medio durante un periodo de caza de 3 h. Por tanto, la eficiencia del sistema de recuperación de proteínas-ligando conteniendo la secuencia C-terminal KDEL es claramente deficiente en las células que expresan el receptor mutado.



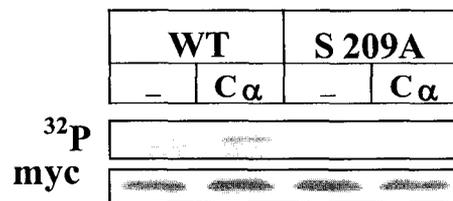
**Figura 22. Efecto de la mutación S209A sobre la retención intracelular de lisozima-KDEL.** Células COS fueron transfectadas con un plásmido con dos secuencias codificadoras, una para lisozima-KDEL y otra para la forma silvestre (WT) o mutada (S209A) del receptor de la secuencia KDEL. Las células fueron marcadas radiactivamente. A los tiempos indicados de caza metabólica, lisozima-KDEL fue inmunoprecipitada del medio (M) y del “pellet” celular (C). Las muestras fueron procesadas para electroforesis en SDS-PAGE y las bandas proteicas visualizadas en PhosphorImager.

Los datos, pues, revelan que el residuo de serina situado en la posición 209 del receptor nativo desempeña un papel clave en el funcionamiento de esta molécula. Este aminoácido está implicado en la interacción del extremo C-terminal del receptor de KDEL con las proteínas de cubierta COPI, de modo que su anulación funcional repercute negativamente en la capacidad celular para retener proteínas integrales del RE debido a que, en tales condiciones, el receptor es retenido en el complejo de Golgi.

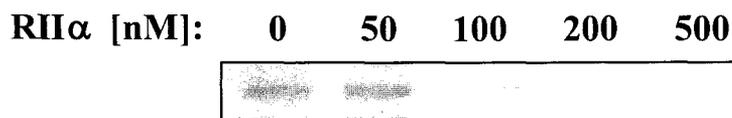
## 6. FOSFORILACIÓN POR PKA DEL RECEPTOR DE KDEL

El residuo de serina 209 se localiza en una secuencia de aminoácidos (KKLS) que potencialmente podría constituir un sitio de fosforilación por PKA, puesto que las secuencias consenso para esta quinasa son del tipo K/R-K/R-X-S-X siendo X un aminoácido cualquiera. Decidimos, por ello, investigar la posibilidad de que el receptor de la secuencia KDEL fuese fosforilado por esta quinasa a nivel de su extremo C-terminal. Con tal fin preparamos membranas microsomales de células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes que codificaban para diferentes versiones moleculares del receptor de KDEL conteniendo el epítipo c-myc. Lavamos las membranas con alta concentración salina para desprender las proteínas periféricas y las sometimos a fosforilación mediante incubación a 30°C con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y subunidades catalíticas  $\text{C}\alpha$  puras de PKA. Posteriormente, lavamos las membranas con tampón y las lisamos con detergente. El receptor de KDEL fue luego purificado mediante inmunoprecipitación con anticuerpo anti-myc, procesado para electroforesis y electrotransferido a membrana. Las byas proteicas, inicialmente visualizadas en PhosphorImager por haber incorporado  $^{32}\text{P}$ , fueron después identificadas mediante inmunoblot con anticuerpo anti-myc. Comprobamos entonces que, durante el tiempo de incubación (10 min), el receptor silvestre fue eficientemente fosforilado en una reacción dependiente de la adición de  $\text{C}\alpha$  al medio (Fig. 23). Por el contrario, en las mismas condiciones, la forma mutante S209A no experimentó fosforilación tanto en ausencia como en presencia de  $\text{C}\alpha$  en el medio de incubación (Fig. 23).

De modo similar, la forma silvestre del receptor pudo ser eficazmente fosforilada durante la incubación de las membranas con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y una preparación de citosol crudo, en sustitución de la proteína  $\text{C}\alpha$  recombinante utilizada anteriormente (Fig. 24). En este caso, la fosforilación fue catalizada por una actividad quinasa endógena presente en el citosol. Tal actividad fue identificada como PKA a juzgar por los resultados obtenidos con citosol preincubado con subunidades reguladoras  $\text{RII}\alpha$  recombinantes puras. Previsiblemente, estas últimas podrían combinarse con las subunidades catalíticas  $\text{C}\alpha$  presentes en la preparación de citosol e inactivarlas. De hecho, observamos que la fosforilación del receptor de KDEL inducida por citosol pudo ser inhibida mediante la preincubación de éste con 50-100 nM  $\text{RII}\alpha$  (Fig. 24).



**Figura 23. Fosforilación del receptor de KDEL por subunidades catalíticas C $\alpha$  de PKA.** Microsomas totales obtenidos a partir de células Sf9, conteniendo la versión silvestre (WT) o bien la forma mutada S209A del receptor de la secuencia KDEL, fueron lavados con alta concentración salina e incubados a 30° C durante 10 min con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP en presencia (+) o ausencia (-) de 1 U de proteína C $\alpha$  recombinante.. Posteriormente fueron lisados con detergente y el receptor inmunoprecipitado con anticuerpo anti-myc. Los inmunoprecipitados fueron procesados para electroforesis en SDS-PAGE y electrotransferidos a papel. Las bandas radiactivas fueron directamente visualizadas en PhosphorImager (<sup>32</sup>P) y caracterizadas mediante inmunoblot con anticuerpo anti-myc.



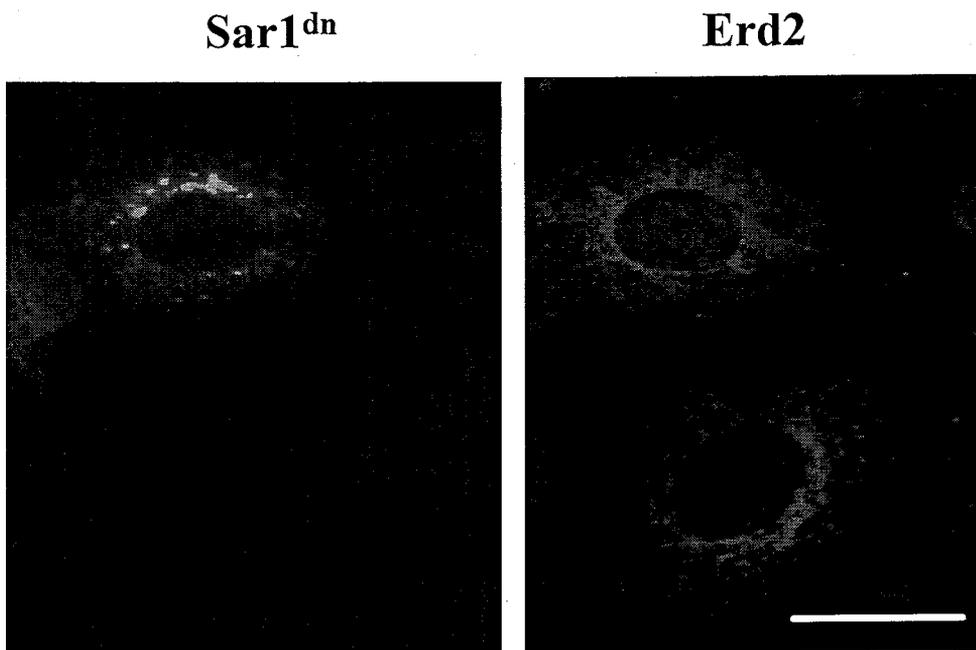
**Figura 24. Fosforilación del receptor de KDEL por PKA endógena.** C $\alpha$  fue sustituida en el ensayo de la Fig. anterior por 100  $\mu$ g de citosol crudo de hígado de rata, incubado previamente a 30° C durante 10 min con inhibidores de fosfatasa y con las concentraciones indicadas de RII $\alpha$  recombinante pura. Las membranas expresando el receptor silvestre fueron lavadas con tampón, lisadas con detergente y el receptor de la secuencia KDEL inmunoprecipitado con anti-myc. Los inmunoprecipitados fueron resueltos mediante electroforesis en SDS-PAGE; las bandas radioactivas fueron visualizadas en PhosphorImager.

Así pues, los datos *in vitro* indicaron que el receptor de la secuencia KDEL es un sustrato potencial de PKA, siendo fosforilado por esta enzima a nivel del residuo de serina 209 situado en el interior de su dominio citosólico C-terminal.

## 7. RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA FOSFORILACIÓN POR PKA DEL RECEPTOR DE KDEL

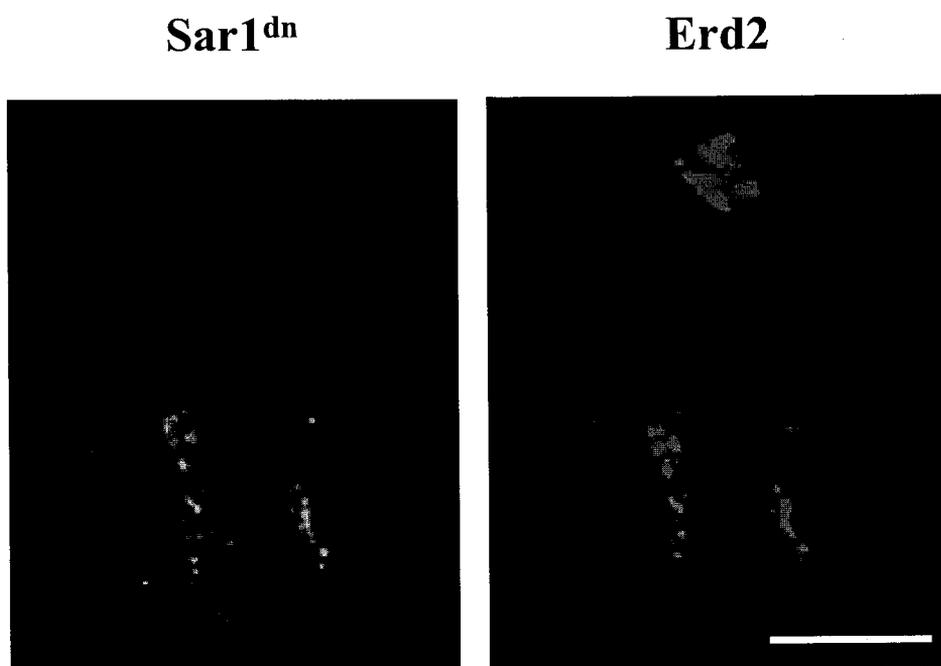
De acuerdo con los resultados hasta ahora expuestos, serina 209 es un residuo particularmente importante para la funcionalidad del receptor de KDEL. Además, este aminoácido es susceptible de ser fosforilado por PKA. Nos cuestionamos que relación existiría entre ambos hechos. Más exactamente, ¿en qué forma afectaría la fosforilación por PKA de serina 209 a la actividad funcional del receptor?

Llevamos a cabo un experimento *in vivo* encaminado a evaluar los efectos de la fosforilación por PKA sobre el recorrido cíclico RE-Golgi realizado por el receptor. Para ello, utilizamos como reactivo una forma mutada, dominante negativa, del factor Sar1p (Sar1[H79G]), denominada abreviadamente como Sar1<sup>dn</sup>. Debido a que esta proteína se encuentra permanentemente unida a GTP, en las células que la expresan se produce una inhibición específica del transporte anterógrado RE-Golgi derivada de la inactivación del complejo COPII, sin que ello se acompañe de una afectación significativa del transporte retrógrado Golgi-RE (Aridor y cols., 1995). Inyectamos una forma recombinante pura de Sar1<sup>dn</sup> fusionada a YFP en el interior de células control no transfectadas y, tras 1 h de incubación a 37°C, procedimos a detectar el receptor de KDEL endógeno mediante inmunofluorescencia indirecta. Tal y como esperábamos, en presencia de Sar1<sup>dn</sup> el receptor, junto con otros componentes del Golgi, se localizó en el RE (Fig. 25). Aparentemente se trata de una situación en la que, como consecuencia del bloqueo en la exportación de proteínas desde el RE y del continuo transporte retrógrado desde el complejo de Golgi, los residentes de este último orgánulo llegan a estar literalmente atrapados en el primero. Por el contrario, las células no inyectadas mostraron el modelo de tinción característico del receptor de KDEL; esto es, complejo de Golgi y compartimento intermedio (Fig. 25).



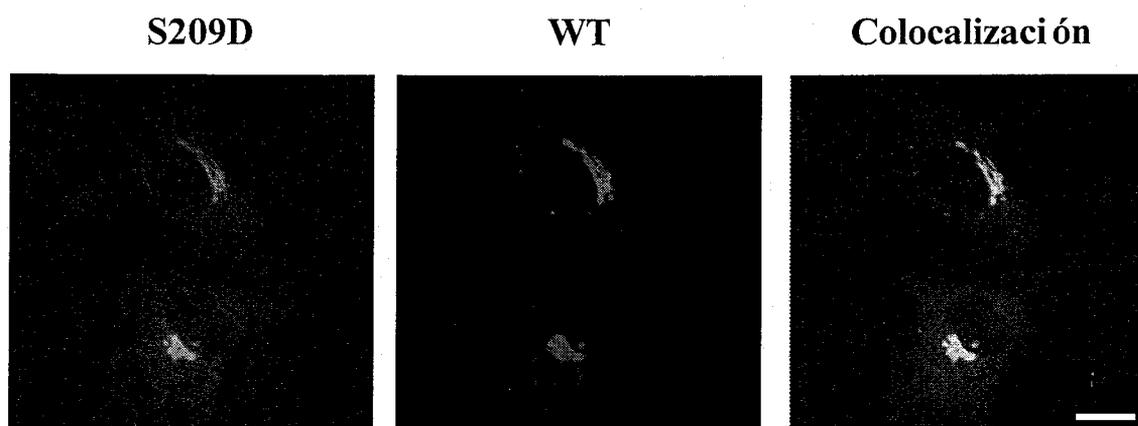
**Figura 25. Redistribución del receptor de la secuencia KDEL tras un bloqueo del transporte RE-Golgi.** Células Vero fueron microinyectadas con la proteína Sar1<sup>dn</sup>-YFP recombinante pura e incubadas a 37° C durante 1h. Las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo contra el dominio citosólico del receptor. Barra, 16  $\mu$ m.

Para evidenciar la participación de PKA empleamos el inhibidor conocido como H89. A baja concentración (5-10  $\mu\text{M}$ ) este agente inhibe específicamente a PKA, en tanto que para inhibir otras quinasas de serina/treonina son necesarias dosis mucho mayores (en el rango mM) del mismo (Chijiwa y cols., 1990). En las células tratadas con 5  $\mu\text{M}$  de H89 el receptor de KDEL se localizó fundamentalmente en el complejo de Golgi, tanto en presencia como en ausencia de Sar1<sup>dn</sup> (Fig. 26). Según la cuantificación de este resultado, el tratamiento con H89 inhibió la redistribución inducida por Sar1<sup>dn</sup> en >70% de las células microinyectadas. Es evidente, pues, que el transporte retrógrado del receptor de KDEL desde el complejo de Golgi al RE se halla modulado por PKA.



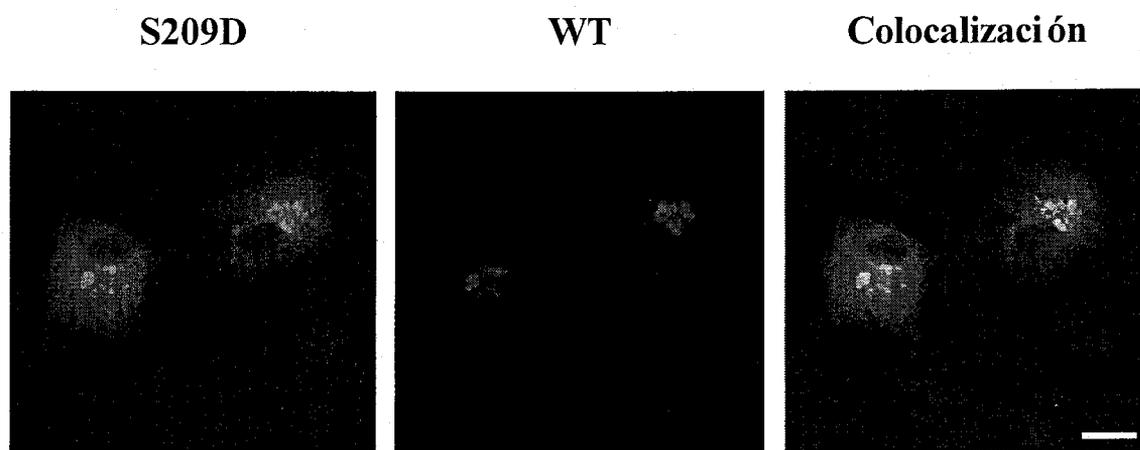
**Figura 26. Efecto del tratamiento con H89 sobre la redistribución Golgi-RE del receptor de KDEL.** Células Vero fueron preincubadas durante 10-15 min con 5  $\mu\text{M}$  H89 en medio sin suero con 25 mM HEPES. Posteriormente fueron microinyectadas con Sar1<sup>dn</sup>-YFP e incubadas a 37° C durante 1h. Las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo contra el receptor de la secuencia KDEL. Barra, 16  $\mu\text{m}$ .

Teóricamente la sustitución de serina 209 por ácido aspártico (S209D) daría lugar a una variante del receptor de KDEL que simularía una proteína permanentemente fosforilada. Razonamos que, siendo así, esta versión molecular redistribuiría desde el Golgi al RE en una forma constitutiva, independiente de PKA y, por tanto, insensible al tratamiento con H89. Para testar esta posibilidad llevamos a cabo un nuevo experimento *in vivo*, basado en el efecto inhibitor ejercido por H89 sobre el transporte anterógrado RE-Golgi según ha quedado establecido en estudios previos (Muñiz y cols., 1996; Aridor y Balch, 2000; Lee y Linstedt, 2000). Si nuestra suposición fuese cierta, en presencia de H89 la forma mutante S209D del receptor, pero no así la forma silvestre, viajaría desde el complejo de Golgi al RE quedando allí retenida debido al bloqueo generalizado del transporte anterógrado ocasionado por este agente. Transfectamos las células con dos plásmidos: uno que codifica para el receptor silvestre no mutado fusionado a YFP, el otro para la forma mutada S209D fusionada a CFP. Ambas proteínas fluorescentes se localizaron en el complejo de Golgi de las células control no tratadas (Fig. 27).



**Figura 27. Efecto de la sustitución S209D sobre la localización subcelular del receptor de la secuencia KDEL.** Células Vero fueron co-transfectadas con dos plásmidos, uno que codifica el receptor de KDEL silvestre (WT) fusionado a YFP y otro la forma mutada S209D fusionada a CFP. Las células fueron fijadas antes de su visualización al microscopio. Barra, 16  $\mu\text{m}$ .

Tras la incubación de las células con una elevada dosis (20-30  $\mu\text{M}$ ) de H89 durante 1 h, el receptor silvestre permaneció invariablemente localizado en el complejo de Golgi (Fig. 28). Esta observación se corresponde con la inhibición inducida por H89 del transporte retrógrado del receptor nativo desde el complejo de Golgi al RE. En cambio, una cantidad significativa de la forma mutada S209D expresada por las mismas células se localizó en el RE (Fig. 28). Tal redistribución concuerda con la esperada insensibilidad del receptor mutante S209D al tratamiento con H89 en lo referente al transporte retrógrado del mismo.



**Figura 28.** Efecto del tratamiento con H89 sobre la redistribución Golgi-RE de la forma mutada S209D del receptor de KDEL. Las células descritas en la Fig. anterior fueron incubadas durante 1 h a 37°C en presencia de 20 $\mu\text{M}$  H89 en medio sin suero con anterioridad a la fijación y observación microscópica. Barra, 16  $\mu\text{m}$ .

En definitiva, estos resultados ponen de manifiesto que la fosforilación por PKA del residuo de serina 209 del receptor de la secuencia KDEL promueve el transporte retrógrado del mismo desde el complejo de Golgi al RE.

## **DISCUSIÓN**

La recuperación de las proteínas endógenas del RE es un acontecimiento esencial para las células eucarióticas. Este proceso forma parte del control de calidad que opera al comienzo de la vía secretora, evitando la pérdida irrecuperable de componentes autóctonos tales como chaperonas, enzimas de procesamiento, etc. necesarios para la funcionalidad del orgánulo (Vashist y cols., 2001). En el caso de las proteínas solubles que ocupan el lumen del RE el receptor responsable de su reconocimiento es una proteína transmembrana presente en forma altamente conservada en todas las células eucarióticas (Semenza y cols., 1990). A nivel del complejo de Golgi y compartimento intermedio, este receptor interacciona con la señal de identificación K(H)DEL situada en el extremo C-terminal de las proteínas escapadas. Los complejos receptor-ligando así formados viajan después mediante transporte retrógrado al RE, donde previsiblemente se produce la disociación (Lewis y Pelham, 1992; Wilson y cols., 1993). El receptor retorna entonces a sus lugares habituales de residencia.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el transporte retrógrado de los complejos ligando-receptor tiene lugar en intermediarios de transporte cubiertos de COPI (Orci y cols., 1997; Girod y cols., 1999). Sin embargo, contrariamente a lo que sería de esperar, el receptor de la secuencia K(H)DEL carece de una señal típica de interacción con este tipo de proteínas de cubierta, tal como pudiera ser un motivo dilisina en su extremo C. Por tanto, la selección molecular de los complejos ligando-receptor y su inclusión en intermediarios de transporte COPI es una cuestión aún no resuelta.

## **1. SIGNIFICACIÓN FUNCIONAL DEL DOMINIO C-TERMINAL DEL RECEPTOR DE LA SECUENCIA KDEL**

Con el fin de abordar la participación de PKA en la regulación del transporte retrógrado Golgi-RE, hemos analizado el papel funcional desempeñado por el dominio citosólico C-terminal del receptor de la secuencia KDEL. Nuestros resultados indican, por un lado, que esta parte de la molécula no es responsable de la localización subcelular del receptor. Así se deduce de la presencia en Golgi de una forma molecular truncada carente de tallo citosólico. Además, a juzgar por los datos de la Fig.9, no parece que esta región del receptor pueda, por si misma, alterar la localización de una proteína de la membrana plasmática. En suma, las evidencias indican que el dominio C-

terminal no constituye una secuencia de aminoácidos con efectos dominantes sobre el destino de las proteínas.

Por otro lado, los datos obtenidos indican que se trata de una región necesaria para la interacción del receptor con la maquinaria de transporte, siendo responsable de su inclusión en intermediarios de transporte COPI. Así, tanto la recuperación efectiva de proteínas portadoras de la secuencia KDEL como el transporte retrógrado Golgi-RE del propio receptor dependen de su dominio C-terminal. Esta última conclusión se deriva de las observaciones realizadas con células permeabilizadas sometidas a un ensayo de redistribución Golgi-RE. A diferencia del receptor nativo que, durante el tiempo de incubación, viajó eficientemente desde el complejo de Golgi al RE, una forma truncada carente de tallo citosólico expresada por las mismas células permaneció retenida en el Golgi. La secreción al medio extracelular de lisozima-KDEL constituye una prueba reveladora de la efectividad del sistema de recuperación de proteínas endógenas del RE. En tanto lisozima-KDEL fue retenida intracelularmente por las células que expresaban la forma silvestre del receptor, aquellas que poseían la versión truncada carente de tallo citosólico en gran parte la secretaron al medio extracelular.

En conjunto, los resultados indican que el dominio C-terminal desempeña un papel clave en el funcionamiento del receptor de la secuencia KDEL. Más exactamente, esta región es relevante para el transporte retrógrado Golgi-RE de los complejos ligando-receptor y, por tanto, para la recuperación de las proteínas portadoras de la secuencia KDEL. Estudios previos avalan esta idea. Así, la microinyección de anticuerpos dirigidos contra el dominio C-terminal del receptor inhibió la llegada al RE, mediante transporte retrógrado, de ciertas toxinas bacterianas conteniendo la señal KDEL (Majoul y cols., 1998; Jackson y cols., 1999). No obstante, es posible interpretar los datos de otro modo. La versión truncada del receptor carente de tallo citosólico podría experimentar algún tipo de agregación anómala durante su permanencia en el complejo de Golgi, de forma que no pudiera intervenir en el transporte retrógrado.

## 2. PAPEL DEL RESIDUO DE SERINA 209 DEL RECEPTOR DE LA SECUENCIA KDEL

Del análisis detallado del dominio C-terminal del receptor de la secuencia KDEL se deduce que el residuo de serina 209 es crucial para el comportamiento funcional de esta molécula. Su sustitución por alanina (S209A) afectó negativamente a la capacidad del receptor para ser transportado desde el complejo de Golgi al RE a tenor de los resultados obtenidos en el ensayo de redistribución. En este caso, la forma mutada del receptor permaneció retenida en Golgi, en tanto la forma silvestre expresada por la misma célula redistribuyó al RE a velocidad normal. Además, la expresión de la forma mutada disminuyó la capacidad celular para retener intracelularmente a lisozima-KDEL.

No es probable que la sustitución S209A induzca algún tipo de agregación molecular. Por tanto, en este caso los efectos observados parecen deberse a una deficiencia real en el transporte retrógrado. Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos por Townsley y cols (1993). Estos autores realizaron un análisis mutacional detallado del receptor de la secuencia KDEL con el fin de caracterizar los determinantes proteicos implicados en el transporte retrógrado Golgi-RE. Para ello utilizaron células que expresaban conjuntamente el receptor y su ligando lisozima-KDEL, tomando como evidencia de transporte retrógrado la redistribución del primero desde el Golgi al RE como consecuencia de la sobreexpresión del segundo. De acuerdo con los resultados obtenidos, la introducción de mutaciones puntuales en los distintos dominios citosólicos, incluido el extremo C-terminal, no afectó al transporte retrógrado. En concreto, la sustitución S209A no impidió la redistribución del receptor al RE inducida por la sobreexpresión de lisozima-KDEL. En cambio, en base a este mismo criterio, un residuo de ácido aspártico situado en el interior del séptimo dominio transmembrana resultó ser esencial para el transporte Golgi-RE (Townsley y cols., 1993). Es de destacar que, según nuestras observaciones, tanto las formas mutadas S209A y S209D del receptor como la versión truncada carente de tallo citosólico se localizan en el complejo de Golgi de las células transfectadas. No obstante, estas versiones difieren en su capacidad para ser transportadas retrógradamente desde el complejo de Golgi al RE, a juzgar por la habilidad exhibida por las células que expresan cada una de ellas para retener intracelularmente a lisozima-KDEL.

Pensamos, por ello, que la localización del receptor es el resultado de varios factores, incluida la velocidad con la que es transportado anterógradamente desde el RE al Golgi, y no necesariamente refleja su funcionalidad.

### **3. FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR DE LA SECUENCIA KDEL POR PKA**

La fosforilación del residuo de serina 209 parece ser un factor clave en el control del comportamiento dinámico del receptor de la secuencia KDEL. Las evidencias sugieren que esta modificación estaría catalizada por PKA. Así, el receptor fue fosforilado *in vitro* a nivel de serina 209 tanto por subunidades catalíticas (C $\alpha$ ) puras de PKA, como por una actividad endógena presente en el citosol e inhibida por subunidades reguladoras (RII $\alpha$ ) de la misma enzima. Los experimentos llevados a cabo con el inhibidor H89 avalan igualmente la implicación de PKA en el control del transporte retrógrado Golgi-RE. En las células expuestas a bajas concentraciones de este agente (5-10  $\mu$ M) el receptor nativo no redistribuyó al RE tras la imposición, mediante microinyección de Sar1<sup>dn</sup>, de un bloqueo en el flujo anterógrado RE-Golgi. Aparentemente, este resultado sugiere que, para ser transportado retrógradamente desde el complejo de Golgi al RE, el receptor de la secuencia KDEL debería en primer lugar ser fosforilado por PKA a nivel del residuo de serina 209. Por el contrario, el receptor no fosforilado permanecería confinado en el complejo de Golgi, incapaz de incorporarse al flujo retrógrado, de forma que las proteínas portadoras de la señal KDEL serían secretadas al medio extracelular.

En apoyo de esta idea hemos analizado el comportamiento de la forma mutada S209D. Teóricamente el residuo de ácido aspártico simularía la presencia en esta localización de un aminoácido permanentemente fosforilado. De nuevo utilizamos H89 como inhibidor. En este caso, empleamos una elevada concentración de este agente (20-30  $\mu$ M) a fin de que, con independencia de sus efectos sobre el flujo retrógrado Golgi-ER, bloquease totalmente el transporte anterógrado RE-Golgi, tal y como se ha demostrado en estudios previos (Muñiz y cols., 1996; Aridor y Balch, 2000; Lee y Linstedt, 2000). Comprobamos que en estas condiciones la forma S209D experimentó en gran medida redistribución al RE. Supuestamente, el receptor portador de esta

mutación se encontraría constitutivamente activado y listo para participar en el transporte retrógrado. El tratamiento con H89 no impediría tal flujo, en tanto que, al bloquear su salida del RE, ocasionaría la retención del receptor en este orgánulo. De todos modos, la localización predominante de esta versión del receptor en el complejo de Golgi de las células control no tratadas sugiere que, si bien se trata de una forma permanentemente activada para el transporte retrógrado, su salida del RE con destino a Golgi es igualmente rápida.

Nuestro grupo ha descrito con anterioridad los efectos inhibidores ejercidos por H89 sobre el transporte anterógrado RE-Golgi de la proteína VSV-G (Muñiz y cols., 1996). Estas observaciones han sido confirmadas y ampliadas por otros investigadores mediante el uso de diferentes agentes inhibidores de quinasas de proteínas (Aridor y Balch, 2000; Lee y Linstedt, 2000). En base a ello se ha sugerido que el tratamiento con altas concentraciones de H89 detiene el transporte RE-Golgi al inhibir una actividad fosforiladora distinta de PKA. Sin embargo, esta interpretación no explica otra de nuestras observaciones: la incubación con compuestos activadores de PKA acelera la transferencia de VSV-G desde el RE al complejo de Golgi (Muñiz y cols., 1996). La participación de PKA en el transporte anterógrado RE-Golgi es, por ello, un tema objeto de discusión. No obstante, es posible que, a tenor de los resultados obtenidos en el presente estudio, PKA intervenga fundamentalmente en la regulación del transporte retrógrado Golgi-RE. Si así fuera, los efectos descritos sobre el transporte anterógrado RE-Golgi podrían ser una consecuencia indirecta de la afectación del flujo retrógrado, dada la interdependencia funcional existente entre ambas vías.

#### **4. INTERACCIÓN DEL RECEPTOR DE LA SECUENCIA KDEL CON LOS COMPONENTES DEL COMPLEJO COPI**

Los resultados obtenidos indican que el dominio C-terminal está implicado en la interacción del receptor de la secuencia KDEL con componentes del complejo de cubierta COPI. Mediante el uso en ensayos *in vitro* de péptidos sintéticos correspondientes a esta región del receptor hemos logrado caracterizar los determinantes responsables del reclutamiento de las proteínas del coatómero y del factor ARF-GAP. Tales determinantes son dos. Por un lado, es necesaria la presencia de un motivo dilisina. No se trata de una secuencia de recuperación clásica localizada en el extremo

C, puesto que el receptor nativo carece de ella. Sin embargo, en el interior del dominio citosólico existen dos residuos de lisina consecutivos (posiciones 206 y 207 en la proteína nativa) que, según nuestros datos, son esenciales. A este nivel las sustituciones de aminoácidos invariablemente impidieron la interacción con las proteínas del coatómero, así como con ARF-GAP, reclutadas a partir de una preparación de citosol crudo. Estos resultados confirman los obtenidos recientemente por otros autores a propósito de la asociación de coatómero purificado y proteína ARF-GAP recombinante al dominio C-terminal del receptor fusionado a GST (Yang y cols., 2002).

Por otro lado, el residuo de serina 209 es requerido para la interacción del receptor con los componentes del coatómero y con ARF-GAP. La asociación de estas proteínas es máxima tras el cambio de serina 209 por ácido aspártico, en tanto que su sustitución por alanina impide la interacción. Estas observaciones suponen una prueba de la participación de PKA en la regulación de las interacciones del receptor de la secuencia KDEL con la maquinaria molecular específica del transporte retrógrado Golgi-RE.

## **5. REGULACIÓN POR PKA DEL TRANSPORTE RETRÓGRADO DEL RECEPTOR DE KDEL**

Uno de los péptidos ensayados en los experimentos anteriores carecía de los últimos tres aminoácidos y, por tanto, presentaba una señal dilisina típica en su extremo C. No obstante, las proteínas del coatómero y ARF-GAP no se unieron a él. Ello indica que, si bien la presencia de un motivo dilisina es un requerimiento estricto para que ocurra interacción con los componentes del complejo COPI, este determinante no es suficiente por sí solo para que se produzca una asociación eficaz. De acuerdo con un estudio llevado a cabo *in vivo*, la recuperación a partir del complejo de Golgi de una proteína de membrana residente en el RE depende en gran medida de la longitud y configuración de su tallo citosólico. No basta con poseer una señal dilisina C-terminal. Esta ha de localizarse alejada (distancia mínima 18 aminoácidos) del dominio transmembrana y en un contexto distante de toda región con estructura helicoidal (Vincent y cols., 1998). Evidentemente, el tallo citosólico o dominio C-terminal del receptor de la secuencia KDEL no se ajusta a estos requerimientos, puesto que se trata de una corta secuencia de unos 12-13 residuos de longitud con probable estructura

helicoidal. En este caso, por tanto, otros factores deben contribuir a hacer posible la interacción.

Uno de tales factores podría ser la fosforilación por PKA del residuo de serina 209. Esta modificación podría dar lugar a un cambio conformacional en el dominio C-terminal del receptor de la secuencia KDEL. De esta forma, el motivo dilisina, anteriormente oculto, estaría ahora expuesto para poder interactuar con los componentes del complejo COPI. De ser así, el receptor de la secuencia KDEL se caracterizaría por presentar una señal dilisina críptica en el interior de su dominio C-terminal. La exposición, mediada por fosforilación, de esa señal representaría un nuevo mecanismo, no descrito con anterioridad, de regulación de la interacción de una proteína de membrana con la maquinaria de transporte COPI.

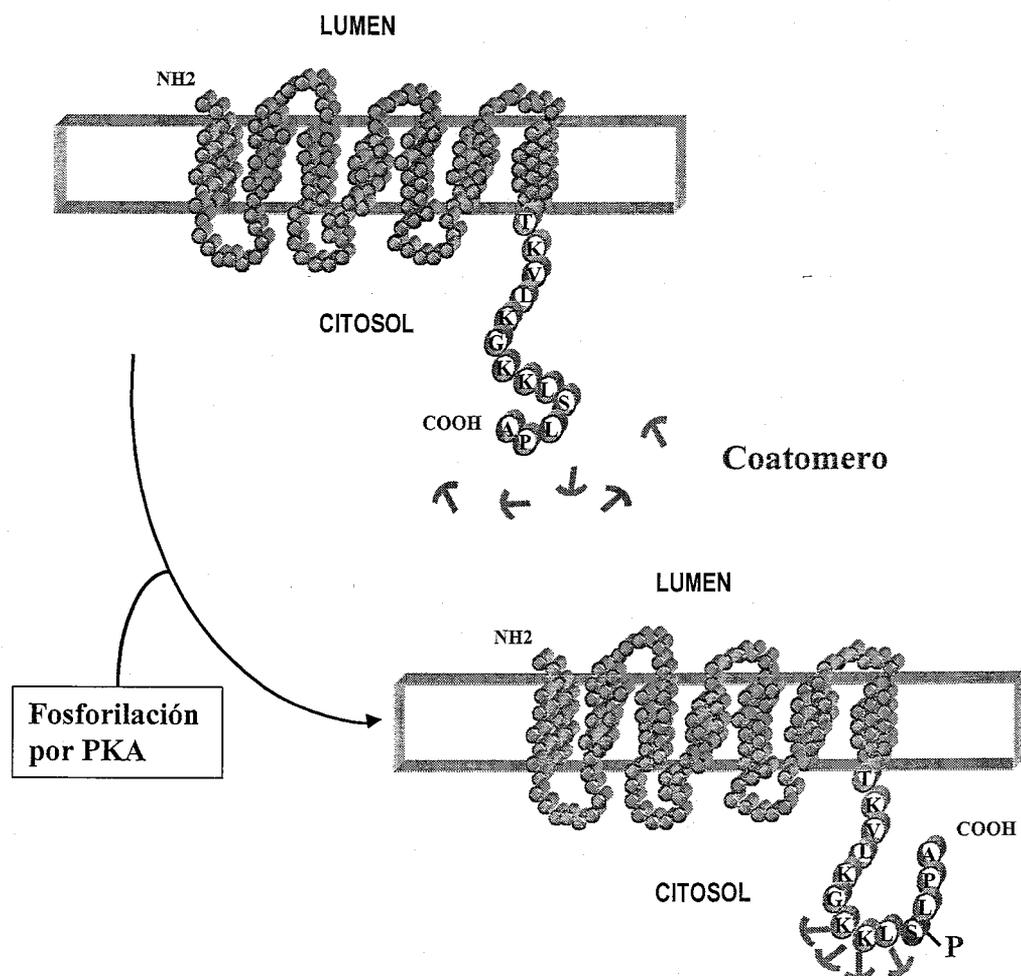
Hasta la fecha se han descrito dos estrategias en este sentido, ambas referidas al control del tráfico biosintético de receptores de la membrana plasmática. Algunas de estas moléculas son complejos heteroméricos constituidos por subunidades de diferentes tipos. A veces una de tales subunidades posee una señal dilisina clásica de recuperación en el extremo C terminal. En el receptor nativo tal señal permanece oculta debido a la asociación intermolecular de las distintas subunidades. De este modo, tras el ensamblaje del complejo, éste puede abandonar el RE y alcanzar la membrana plasmática. Por el contrario, la señal dilisina permite el reconocimiento y retención en el RE de los complejos parcialmente ensamblados (Letourneur y cols., 1995). Otro caso es el de ciertas proteínas de membrana tipo II portadoras de dos motivos funcionalmente antagónicos. Una señal dibásica de interacción con COPI permite la recuperación de la molécula y su retención en el RE. La otra es una secuencia de asociación a alguna isoforma de la familia de proteínas reguladoras 14-3-3, lo cual favorece la exportación del RE. Se produce una competencia entre ambas señales, de forma que la asociación de 14-3-3 impide la unión de COPI y viceversa (O'Kelly y cols., 2002; Yuan y cols., 2003). Las proteínas que ciclan continuamente entre el RE y el Golgi, tales como los receptores de carga de la familia p24 y ERGIC53, también presentan señales de exportación y recuperación. En este caso, sin embargo, se desconoce el mecanismo regulador responsable la actuación coordinada de ambos motivos. En lo que concierne al receptor de la secuencia KDEL, nuestros hallazgos sugieren que su interacción con los

componentes de la maquinaria COPI podría estar modulada por fosforilación, mediada por PKA, del residuo de serina 209.

Si bien el mecanismo de regulación propuesto podría tener lugar en células de mamíferos, no ocurriría de este modo en otros sistemas celulares. Desde el punto de vista evolutivo, tanto el motivo dilisina interno como la presencia de un residuo de serina en posición 209 no son características estrictamente conservadas. Por ejemplo, el receptor de la secuencia HDEL de levaduras posee un dominio C-terminal en el que sólo existe un residuo de lisina, lo cual es insuficiente para constituir una señal de recuperación. Es más, en este dominio en particular no se encuentra ningún residuo de serina o de algún otro aminoácido susceptible de experimentar fosforilación (Semenza y cols., 1990). Por el contrario, ambos determinantes están presentes en el dominio C-terminal del receptor Rer1 de levaduras. Este receptor también interviene en la vía de transporte retrógrado Golgi-RE mediada por el complejo COPI. Su actividad está relacionada con la recuperación de ciertas proteínas transmembrana tipo II (Nishikawa y Nakano, 1993; Boehm y cols., 1997). Es posible, por tanto, que la actividad PKA regule, en diferentes organismos, la interacción de receptores distintos con la maquinaria de transporte COPI.

## 6. MODELO

Postulamos la existencia de una ruta de traducción de señales químicas a nivel de las membranas del complejo de Golgi. Su activación tendría lugar cuando el receptor de la secuencia KDEL reconoce algún ligando. Apoya la existencia de esta vía el hecho de que la organización topológica de esta proteína transmembrana sea muy parecida a la de los receptores de membrana plasmática acoplados a proteínas G triméricas (Townsend y cols., 1993; Scheel y Pelham, 1998). Por otro lado, la holoenzima PKA se encuentra asociada al lado citosólico de la membrana de Golgi (Martín y cols., 1999). De algún modo, PKA también podría ser activada en respuesta a la interacción ligando-receptor. Se separarían entonces las subunidades catalíticas de las reguladoras y las primeras catalizarían la fosforilación del residuo de serina 209 situado en el dominio C-terminal del receptor. Este acontecimiento promovería la asociación de las proteínas de cubierta, incluyendo los componentes del coatómero y el factor ARF-GAP. A su vez, estas moléculas llevarían a cabo la selección de los complejos ligando-receptor y su inclusión en intermediarios de transporte COPI encargados de realizar la transferencia desde el complejo de Golgi al RE.



**CONCLUSIONES**

1. El dominio citosólico C-terminal del receptor de la secuencia KDEL es necesario para su interacción con las proteínas de cubierta COPI y, por tanto, determina su transporte retrógrado desde el complejo de Golgi al retículo endoplásmico, así como la recuperación efectiva y retención intracelular de sus ligandos proteicos.

2. Dentro del dominio C-terminal, el residuo de serina 209 desempeña un papel funcional relevante. Este aminoácido está implicado en la interacción del receptor con la maquinaria de transporte COPI, de forma que su sustitución afecta al transporte retrógrado Golgi-retículo del receptor y a la retención intracelular de ligandos KDEL.

3. El residuo de serina 209 es susceptible de fosforilación por proteína quinasa A. Tal modificación favorece la interacción del receptor con los componentes del complejo COPI y ello, a su vez, estimula su transferencia retrógrada desde el complejo de Golgi al retículo endoplásmico.

En definitiva, LA FOSFORILACIÓN POR PROTEÍNA QUINASA A REGULA EL TRANSPORTE RETRÓGRADO GOLGI-RETÍCULO ENDOPLÁSMICO MEDIADO POR EL RECEPTOR DE LA SECUENCIA KDEL.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Altan-Bonnet,N., Sougrat,R., y Lippincott-Schwartz,J. (2004). Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 364-372.
- Amara,A., Gall,S.L., Schwartz,O., Salamero,J., Montes,M., Loetscher,P., Baggiolini,M., Virelizier,J.L., y Arenzana-Seisdedos,F. (1997). HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1 alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J. Exp. Med.* 186, 139-146.
- Aoe,T., Cukierman,E., Lee,A., Cassel,D., Peters,P.J., y Hsu,V.W. (1997). The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *EMBO J.* 16, 7305-7316.
- Aoe,T., Lee,A.J., van Donselaar,E., Peters,P.J., y Hsu,V.W. (1998). Modulation of intracellular transport by transported proteins: insight from regulation of COPI-mediated transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 1624-1629.
- Appenzeller,C., Andersson,H., Kappeler,F., y Hauri,H.P. (1999). The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat. Cell Biol.* 1, 330-334.
- Aridor,M. y Balch,W.E. (1996). Principles of selective transport: coat complexes hold the key. *Trends Cell Biol.* 6, 315-320.
- Aridor,M. y Balch,W.E. (2000). Kinase signaling initiates coat complex II (COPII) recruitment and export from the mammalian endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 275, 35673-35676.
- Aridor,M., Bannykh,S.I., Rowe,T., y Balch,W.E. (1995). Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Cell Biol.* 131, 875-893.
- Aridor,M., Weissman,J., Bannykh,S., Nuoffer,C., y Balch,W.E. (1998). Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J. Cell Biol.* 141, 61-70.
- Balch,W.E., McCaffery,J.M., Plutner,H., y Farquhar,M.G. (1994). Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell* 76, 841-852.
- Bannykh,S.I., Rowe,T., y Balch,W.E. (1996). The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J. Cell Biol.* 135, 19-35.
- Bard,F., Mazelin,L., Pechoux-Longin,C., Malhotra,V., y Jurdic,P. (2003). Src regulates Golgi structure and KDEL receptor-dependent retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 278, 46601-46606.
- Barlowe,C. (2003a). Molecular recognition of cargo by the COPII complex: a most accommodating coat. *Cell* 114, 395-397.

Barlowe,C. (2003b). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* *13*, 295-300.

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

Barr,F.A. (2002). The Golgi apparatus: going round in circles? *Trends Cell Biol.* *12*, 101-104.

Bednarek,S.Y., Orci,L., y Schekman,R. (1996). Traffic COPs and the formation of vesicle coats. *Trends Cell Biol.* *6*, 468-473.

Belden,W.J. y Barlowe,C. (1996). Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Biol. Chem.* *271*, 26939-26946.

Belden,W.J. y Barlowe,C. (2001). Deletion of yeast p24 genes activates the unfolded protein response. *Mol. Biol. Cell* *12*, 957-969.

Bernards,A. y Settleman,J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* *14*, 377-385.

Bhakdi,S., Weller,U., Walev,I., Martín,E., Jonas,D., y Palmer,M. (1993). A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* *182*, 167-175.

Bigay,J., Gounon,P., Robineau,S., y Antony,B. (2003). Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* *426*, 563-566.

Block,M.R., Glick,B.S., Wilcox,C.A., Wieland,F.T., y Rothman,J.E. (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 7852-7856.

Boehm,J., Letourneur,F., Ballensiefen,W., Ossipov,D., Demolliere,C., y Schmitt,H.D. (1997). Sec12p requires Rer1p for sorting to coatomer (COPI)-coated vesicles y retrieval to the ER. *J. Cell Sci.* *110 (Pt 8)*, 991-1003.

Bonifacino,J.S. y Glick,B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* *116*, 153-166.

Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-254.

Bremser,M., Nickel,W., Schweikert,M., Ravazzola,M., Amherdt,M., Hughes,C.A., Sollner,T.H., Rothman,J.E., y Wieland,F.T. (1999). Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* *96*, 495-506.

- Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T., y Hidaka, H. (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* *265*, 5267-5272.
- Conner, S.D. y Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* *422*, 37-44.
- Cosson, P. y Letourneur, F. (1994). Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* *263*, 1629-1631.
- Davidson, H.W., McGowan, C.H., y Balch, W.E. (1992). Evidence for the regulation of exocytic transport by protein phosphorylation. *J. Cell Biol.* *116*, 1343-1355.
- De Camilli, P., Moretti, M., Donini, S.D., Walter, U., y Lohmann, S.M. (1986). Heterogeneous distribution of the cAMP receptor protein RII in the nervous system: evidence for its intracellular accumulation on microtubules, microtubule-organizing centers, and in the area of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* *103*, 189-203.
- De Matteis, M., Godi, A., y Corda, D. (2002). Phosphoinositides and the golgi complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 434-447.
- Denker, S.P., McCaffery, J.M., Palade, G.E., Insel, P.A., and Farquhar, M.G. (1996). Differential distribution of alpha subunits and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. *J. Cell Biol.* *133*, 1027-1040.
- Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J.P., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., y Nilsson, T. (1998). gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatamer. *J. Cell Biol.* *140*, 751-765.
- Donaldson, J.G. (2000). Filling in the GAPs in the ADP-ribosylation factor story. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 3792-3794.
- Donaldson, J.G., Kahn, R.A., Lippincott-Schwartz, J., y Klausner, R.D. (1991). Binding of ARF and beta-COP to Golgi membranes: possible regulation by a trimeric G protein. *Science* *254*, 1197-1199.
- Donaldson, J.G. y Lippincott-Schwartz, J. (2000). Sorting and signaling at the Golgi complex. *Cell* *101*, 693-696.
- Dorner, C., Ciossek, T., Muller, S., Moller, P.H., Ullrich, A., y Lammers, R. (1998). Characterization of KIF1C, a new kinesin-like protein involved in vesicle transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *273*, 20267-20275.
- Duran, J.M., Valderrama, F., Castel, S., Magdalena, J., Tomas, M., Hosoya, H., Renau-Piqueras, J., Malhotra, V., y Egea, G. (2003). Myosin motors and not actin comets are mediators of the actin-based Golgi-to-endoplasmic reticulum protein transport. *Mol. Biol. Cell* *14*, 445-459.

- Elrod-Erickson, M.J. y Kaiser, C.A. (1996). Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol. Biol. Cell* 7, 1043-1058.
- Farquhar, M.G. (1985). Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 447-488.
- Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M.A., y Rothman, J.E. (1996). Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* 273, 1396-1399.
- Gaynor, E.C. y Emr, S.D. (1997). COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *J. Cell Biol.* 136, 789-802.
- Gerst, J.E. (2003). SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 99-110.
- Giraud, C.G. y Maccioni, H.J. (2003). Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. *Mol. Biol. Cell* 14, 3753-3766.
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J.C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L.M., Lord, J.M., Nilsson, T., y Pepperkok, R. (1999). Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 1, 423-430.
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D., y De Matteis, M.A. (1999). ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 1, 280-287.
- Goldbaum, F.A., Cauerhff, A., Velikovsky, C.A., Llera, A.S., Riottot, M.M., y Poljak, R.J. (1999). Lack of significant differences in association rates and affinities of antibodies from short-term and long-term responses to hen egg lysozyme. *J. Immunol.* 162, 6040-6045.
- Griffiths, G., Ericsson, M., Krijnse-Locker, J., Nilsson, T., Goud, B., Soling, H.D., Tang, B.L., Wong, S.H., y Hong, W. (1994). Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 127, 1557-1574.
- Griffiths, G. y Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234, 438-443.
- Hammond, A.T. y Glick, B.S. (2000). Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Mol. Biol. Cell* 11, 3013-3030.
- Hardwick, K.G., Lewis, M.J., Semenza, J., Dean, N., y Pelham, H.R. (1990). ERD1, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *EMBO J.* 9, 623-630.
- Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehingel, S., Tschochner, H., y Wieland, F. (1996). Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatamer, binds to the

- cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1902-1906.
- Harter, C. y Wieland, F.T. (1998). A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11649-11654.
- Hauke, V. (2003). Vesicle budding: a coat for the COPs. *Trends Cell Biol.* 13, 59-60.
- Hauri, H.P., Kappeler, F., Andersson, H., y Appenzeller, C. (2000). ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 4), 587-596.
- Hauri, H.P. y Schweizer, A. (1992). The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 600-608.
- Hay, J.C. y Scheller, R.H. (1997). SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 505-512.
- Helenius, A. y Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369.
- Helms, J.B. y Rothman, J.E. (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* 360, 352-354.
- Hidalgo, J., Muñiz, M., y Velasco, A. (1995). Trimeric G proteins regulate the cytosol-induced redistribution of Golgi enzymes into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 4), 1805-1815.
- Hirschberg, K., Miller, C.M., Ellenberg, J., Presley, J.F., Siggia, E.D., Phair, R.D., y 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.
- Hong, W. (1998). Protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 19), 2831-2839.
- Horstmann, H., Ng, C.P., Tang, B.L., y Hong, W. (2002). Ultrastructural characterization of endoplasmic reticulum--Golgi transport containers (EGTC). *J. Cell Sci.* 115, 4263-4273.
- Infante, C., Ramos-Morales, F., Fedriani, C., Bornens, M., y Rios, R.M. (1999). GMAP-210, A cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein. *J. Cell Biol.* 145, 83-98.
- Iodice, L., Sarnataro, S., y Bonatti, S. (2001). The carboxyl-terminal valine is required for transport of glycoprotein CD8 alpha from the endoplasmic reticulum to the intermediate compartment. *J. Biol. Chem.* 276, 28920-28926.
- Itin, C., Roche, A.C., Monsigny, M., y Hauri, H.P. (1996). ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins. *Mol. Biol. Cell* 7, 483-493.

- Jackson, M.E., Simpson, J.C., Girod, A., Pepperkok, R., Roberts, L.M., y Lord, J.M. (1999). The KDEL retrieval system is exploited by *Pseudomonas* exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 4), 467-475.
- Jackson, M.R., Nilsson, T., y Peterson, P.A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 9, 3153-3162.
- Jackson, M.R., Nilsson, T., y Peterson, P.A. (1993). Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 121, 317-333.
- Jamora, C., Takizawa, P.A., Zaarour, R.F., Denesvre, C., Faulkner, D.J., y Malhotra, V. (1997). Regulation of Golgi structure through heterotrimeric G proteins. *Cell* 91, 617-626.
- Kamena, F. y Spang, A. (2004). Tip20p prohibits back-fusion of COPII vesicles with the endoplasmic reticulum. *Science* 304, 286-289.
- Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S., y Riezman, H. (1997). Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 488-495.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G., y Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116, 1071-1080.
- Kleizen, B. y Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 343-349.
- Klumperman, J., Schweizer, A., Clausen, H., Tang, B.L., Hong, W., Oorschot, V., y Hauri, H.P. (1998). The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 22), 3411-3425.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanoix, J., Ouwendijk, J., Stark, A., Szafer, E., Cassel, D., Dejgaard, K., Weiss, M., y Nilsson, T. (2001). Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *J. Cell Biol.* 155, 1199-1212.
- Lee, T.H. y Linstedt, A.D. (2000). Potential role for protein kinases in regulation of bidirectional endoplasmic reticulum-to-Golgi transport revealed by protein kinase inhibitor H89. *Mol. Biol. Cell* 11, 2577-2590.
- Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H., y Cosson, P. (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79, 1199-1207.
- Letourneur, F., Hennecke, S., Demolliere, C., y Cosson, P. (1995). Steric masking of a dilysine endoplasmic reticulum retention motif during assembly of the human high affinity receptor for immunoglobulin E. *J. Cell Biol.* 129, 971-978.

- Lewis, M.J. y Pelham, H.R. (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348, 162-163.
- Lewis, M.J. y Pelham, H.R. (1992). Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68, 353-364.
- Lewis, M.J., Sweet, D.J., y Pelham, H.R. (1990). The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* 61, 1359-1363.
- Lippincott-Schwartz, J. (1993). Bidirectional membrane traffic between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* 3, 81-88.
- Lippincott-Schwartz, J. (1998). Cytoskeletal proteins and Golgi dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 52-59.
- Lippincott-Schwartz, J., Cole, N.B., Marotta, A., Conrad, P.A., y Bloom, G.S. (1995). Kinesin is the motor for microtubule-mediated Golgi-to-ER membrane traffic. *J. Cell Biol.* 128, 293-306.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L.C., Bonifacino, J.S., y Klausner, R.D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56, 801-813.
- Love, H.D., Lin, C.C., Short, C.S., y Ostermann, J. (1998). Isolation of functional Golgi-derived vesicles with a possible role in retrograde transport. *J. Cell Biol.* 140, 541-551.
- Luna, A., Matas, O.B., Martínez-Menarguez, J.A., Mato, E., Duran, J.M., Ballesta, J., Way, M., y Egea, G. (2002). Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. *Mol. Biol. Cell* 13, 866-879.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y.F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N., y Jan, L.Y. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291, 316-319.
- Majoul, I., Sohn, K., Wieland, F.T., Pepperkok, R., Pizza, M., Hillemann, J., y Soling, H.D. (1998). KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *J. Cell Biol.* 143, 601-612.
- Majoul, I., Straub, M., Hell, S.W., Duden, R., y Soling, H.D. (2001). KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev. Cell* 1, 139-153.
- Martín, M.E., Hidalgo, J., Rosa, J.L., Crottet, P., y Velasco, A. (2000). Effect of protein kinase A activity on the association of ADP-ribosylation factor 1 to golgi membranes. *J. Biol. Chem.* 275, 19050-19059.
- Martín, M.E., Hidalgo, J., Vega, F.M., y Velasco, A. (1999). Trimeric G proteins modulate the dynamic interaction of PKAII with the Golgi complex. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 22), 3869-3878.

- Martínez-Menarguez, J.A., Geuze, H.J., Slot, J.W., y Klumperman, J. (1999). Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* 98, 81-90.
- Marzioch, M., Henthorn, D.C., Herrmann, J.M., Wilson, R., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., Solari, R.C., y Rowley, A. (1999). Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol. Biol. Cell* 10, 1923-1938.
- Matanis, T., Akhmanova, A., Wulf, P., Del Nery, E., Weide, T., Stepanova, T., Galjart, N., Grosveld, F., Goud, B., De Zeeuw, C.I., Barnekow, A., y Hoogenraad, C.C. (2002). Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 986-992.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S.Y., Hamamoto, S., Schekman, R., y Yeung, T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 93, 263-275.
- McMahon, H.T. y Mills, I.G. (2004). COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 379-391.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 575-625.
- Mellman, I., Fuchs, R., y Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 663-700.
- Mellman, I. y Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100, 99-112.
- Miles, S., McManus, H., Forsten, K.E., y Storrie, B. (2001). Evidence that the entire Golgi apparatus cycles in interphase HeLa cells: sensitivity of Golgi matrix proteins to an ER exit block. *J. Cell Biol.* 155, 543-555.
- Miller, E., Antonny, B., Hamamoto, S., y Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J.* 21, 6105-6113.
- Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L., y Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* 114, 497-509.
- Mizuno, M. y Singer, S.J. (1993). A soluble secretory protein is first concentrated in the endoplasmic reticulum before transfer to the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 5732-5736.
- Mossessova, E., Bickford, L.C., y Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* 114, 483-495.
- Muñiz, M., Alonso, M., Hidalgo, J., y Velasco, A. (1996). A regulatory role for cAMP-dependent protein kinase in protein traffic along the exocytic route. *J. Biol. Chem.* 271, 30935-30941.

- Muñiz, M., Martín, M.E., Hidalgo, J., y Velasco, A. (1997). Protein kinase A activity is required for the budding of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 14461-14466.
- Muñiz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P., y Riezman, H. (2000). The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J. Cell Biol.* 148, 925-930.
- Munro, S. y Pelham, H.R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.
- Nichols, B.J. y Pelham, H.R. (1998). SNAREs and membrane fusion in the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 1404, 9-31.
- Nichols, W.C., Seligsohn, U., Zivelin, A., Terry, V.H., Hertel, C.E., Wheatley, M.A., Moussalli, M.J., Hauri, H.P., Ciavarella, N., Kaufman, R.J., y Ginsburg, D. (1998). Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell* 93, 61-70.
- Nickel, W., Brugger, B., y Wieland, F.T. (2002). Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding. *J. Cell Sci.* 115, 3235-3240.
- Nigg, E.A., Schafer, G., Hilz, H., y Eppenberger, H.M. (1985). Cyclic-AMP-dependent protein kinase type II is associated with the Golgi complex and with centrosomes. *Cell* 41, 1039-1051.
- Nilsson, T., Jackson, M., y Peterson, P.A. (1989). Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 58, 707-718.
- Nishikawa, S. y Nakano, A. (1993). Identification of a gene required for membrane protein retention in the early secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 8179-8183.
- Nishimura, N. y Balch, W.E. (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277, 556-558.
- Nishimura, N., Bannykh, S., Slabough, S., Matteson, J., Altschuler, Y., Hahn, K., y Balch, W.E. (1999). A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 274, 15937-15946.
- O'Kelly, I., Butler, M.H., Zilberberg, N., y Goldstein, S.A. (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111, 577-588.
- Orci, L., Stannnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T.H., y Rothman, J.E. (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 90, 335-349.
- Otte, S. y Barlowe, C. (2002). The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER. *EMBO J.* 21, 6095-6104.

- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347-358.
- Palmer, K.J. y Stephens, D.J. (2004). Biogenesis of ER-to-Golgi transport carriers: complex roles of COPII in ER export. *Trends Cell Biol.* 14, 57-61.
- Pelham, H.R. (1991). Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum y Golgi complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 585-591.
- Pelham, H.R., Hardwick, K.G., y Lewis, M.J. (1988). Sorting of soluble ER proteins in yeast. *EMBO J.* 7, 1757-1762.
- Polishchuk, R.S., Polishchuk, E.V., Marra, P., Alberti, S., Buccione, R., Luini, A., y Mironov, A.A. (2000). Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J. Cell Biol.* 148, 45-58.
- Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J., y Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389, 81-85.
- Puri, S. y Linstedt, A.D. (2003). Capacity of the golgi apparatus for biogenesis from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 14, 5011-5018.
- Rambourg, A. y Clermont, Y. (1990). Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus. *Eur. J. Cell Biol.* 51, 189-200.
- Rios, R.M., Tassin, A.M., Celati, C., Antony, C., Boissier, M.C., Homberg, J.C., y Bornens, M. (1994). A peripheral protein associated with the cis-Golgi network redistributes in the intermediate compartment upon brefeldin A treatment. *J. Cell Biol.* 125, 997-1013.
- Roth, M.G. y Sternweis, P.C. (1997). The role of lipid signaling in constitutive membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 519-526.
- Rothman, J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- Rothman, J.E. y Orci, L. (1992). Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355, 409-415.
- Rothman, J.E. y Wieland, F.T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227-234.
- Rowe, T., Aridor, M., McCaffery, J.M., Plutner, H., Nuoffer, C., y Balch, W.E. (1996). COPII vesicles derived from mammalian endoplasmic reticulum microsomes recruit COPI. *J. Cell Biol.* 135, 895-911.
- Sato, K. y Nakano, A. (2003). Oligomerization of a cargo receptor directs protein sorting into COPII-coated transport vesicles. *Mol. Biol. Cell* 14, 3055-3063.
- Sato, K., Nishikawa, S., y Nakano, A. (1995). Membrane protein retrieval from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum (ER): characterization of the RER1 gene

product as a component involved in ER localization of Sec12p. *Mol. Biol. Cell* 6, 1459-1477.

Sato,K., Sato,M., y Nakano,A. (1997). Rer1p as common machinery for the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 9693-9698.

Sato,K., Sato,M., y Nakano,A. (2001). Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatomer. *J. Cell Biol.* 152, 935-944.

Scales,S.J., Pepperkok,R., y Kreis,T.E. (1997). Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* 90, 1137-1148.

Scheel,A.A. y Pelham,H.R. (1998). Identification of amino acids in the binding pocket of the human KDEL receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 2467-2472.

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

Schimmoller,F., Singer-Kruger,B., Schroder,S., Kruger,U., Barlowe,C., y Riezman,H. (1995). The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J.* 14, 1329-1339.

Schutze,M.P., Peterson,P.A., y Jackson,M.R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 13, 1696-1705.

Schweizer,A., Fransen,J.A., Bachi,T., Ginsel,L., y Hauri,H.P. (1988). Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 107, 1643-1653.

Schweizer,A., Fransen,J.A., Matter,K., Kreis,T.E., Ginsel,L., y Hauri,H.P. (1990). Identification of an intermediate compartment involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. *Eur. J. Cell Biol.* 53, 185-196.

Seemann,J., Jokitalo,E., Pypaert,M., y Warren,G. (2000). Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* 407, 1022-1026.

Semenza,J.C., Hardwick,K.G., Dean,N., y Pelham,H.R. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* 61, 1349-1357.

Serafini,T., Orci,L., Amherdt,M., Brunner,M., Kahn,R.A., y Rothman,J.E. (1991). ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* 67, 239-253.

Sevier,C.S., Weisz,O.A., Davis,M., y Machamer,C.E. (2000). Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs. *Mol. Biol. Cell* 11, 13-22.

- Sodeik,B., Doms,R.W., Ericsson,M., Hiller,G., Machamer,C.E., van 't,H.W., van Meer,G., Moss,B., y Griffiths,G. (1993). Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. *J. Cell Biol.* 121, 521-541.
- Sohn,K., Orci,L., Ravazzola,M., Amherdt,M., Bremser,M., Lottspeich,F., Fiedler,K., Helms,J.B., y Wieland,F.T. (1996). A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J. Cell Biol.* 135, 1239-1248.
- Sollner,T., Whiteheart,S.W., Brunner,M., Erdjument-Bromage,H., Geromanos,S., Tempst,P., y Rothman,J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.
- Springer,S., Chen,E., Duden,R., Marzioch,M., Rowley,A., Hamamoto,S., Merchant,S., y Schekman,R. (2000). The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4034-4039.
- Springer,S., Spang,A., y Schekman,R. (1999). A primer on vesicle budding. *Cell* 97, 145-148.
- Stamnes,M.A., Craighead,M.W., Hoe,M.H., Lampen,N., Geromanos,S., Tempst,P., y Rothman,J.E. (1995). An integral membrane component of coatomer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 8011-8015.
- Storrie,B., White,J., Rottger,S., Stelzer,E.H., Sugauma,T., y 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.
- Sweitzer,S.M. y Hinshaw,J.E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93, 1021-1029.
- Tang,B.L., Wong,S.H., Qi,X.L., Low,S.H., y Hong,W. (1993). Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J. Cell Biol.* 120, 325-328.
- Taylor,S.S., Buechler,J.A., y Yonemoto,W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 971-1005.
- Tooze,S.A., Tooze,J., y Warren,G. (1988). Site of addition of N-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59. *J. Cell Biol.* 106, 1475-1487.
- Towbin,H., Staehelin,T., y Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 4350-4354.
- Townsley,F.M., Wilson,D.W., y Pelham,H.R. (1993). Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J.* 12, 2821-2829.

- Valderrama,F., Duran,J.M., Babia,T., Barth,H., Renau-Piqueras,J., y 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 Lint,J., Rykx,A., Maeda,Y., Vantus,T., Sturany,S., Malhotra,V., Vandenheede,J.R., y Seufferlein,T. (2002). Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol.* 12, 193-200.
- Varlamov,O., Volchuk,A., Rahimian,V., Doege,C.A., Paumet,F., Eng,W.S., Arango,N., Parlati,F., Ravazzola,M., Orci,L., Sollner,T.H., y Rothman,J.E. (2004). i-SNAREs: inhibitory SNAREs that fine-tune the specificity of membrane fusion. *J. Cell Biol.* 164, 79-88.
- Vashist,S., Kim,W., Belden,W.J., Spear,E.D., Barlowe,C., y Ng,D.T. (2001). Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J. Cell Biol.* 155, 355-368.
- Vincent,M.J., Martín,A.S., y Companys,R.W. (1998). Function of the KKXX motif in endoplasmic reticulum retrieval of a transmembrane protein depends on the length and structure of the cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 273, 950-956.
- Vollenweider,F., Kappeler,F., Itin,C., y Hauri,H.P. (1998). Mistargeting of the lectin ERGIC-53 to the endoplasmic reticulum of HeLa cells impairs the secretion of a lysosomal enzyme. *J. Cell Biol.* 142, 377-389.
- Votsmeier,C. y Gallwitz,D. (2001). An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *EMBO J.* 20, 6742-6750.
- Ward,T.H., Polishchuk,R.S., Caplan,S., Hirschberg,K., y Lippincott-Schwartz,J. (2001). Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J. Cell Biol.* 155, 557-570.
- Waters,M.G., Serafini,T., y Rothman,J.E. (1991). 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* 349, 248-251.
- Weber,T., Parlati,F., McNew,J.A., Johnston,R.J., Westermann,B., Sollner,T.H., y Rothman,J.E. (2000). SNAREpins are functionally resistant to disruption by NSF y alphaSNAP. *J. Cell Biol.* 149, 1063-1072.
- Weber,T., Zemelman,B.V., McNew,J.A., Westermann,B., Gmachl,M., Parlati,F., Sollner,T.H., y Rothman,J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.
- White,J., Johannes,L., Mallard,F., Girod,A., Grill,S., Reinsch,S., Keller,P., Tzschaschel,B., Echard,A., Goud,B., y Stelzer,E.H. (1999). Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.* 147, 743-760.
- Whyte,J.R. y Munro,S. (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J. Cell Sci.* 115, 2627-2637.

- Wieland,F.T., Gleason,M.L., Serafini,T.A., y Rothman,J.E. (1987). The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* 50, 289-300.
- Wilson,D.W., Lewis,M.J., y Pelham,H.R. (1993). pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J. Biol. Chem.* 268, 7465-7468.
- Wu,W.J., Erickson,J.W., Lin,R., y Cerione,R.A. (2000). The gamma-subunit of the coatamer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature* 405, 800-804.
- Yamaguchi,T., Yamamoto,A., Furuno,A., Hatsuzawa,K., Tani,K., Himeno,M., y Tagaya,M. (1997). Possible involvement of heterotrimeric G proteins in the organization of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 272, 25260-25266.
- Yang,J.S., Lee,S.Y., Gao,M., Bourgoïn,S., Randazzo,P.A., Premont,R.T., y Hsu,V.W. (2002). ARFGAP1 promotes the formation of COPI vesicles, suggesting function as a component of the coat. *J. Cell Biol.* 159, 69-78.
- Yu,S. y Roth,M.G. (2002). Casein kinase I regulates membrane binding by ARF GAP1. *Mol. Biol. Cell* 13, 2559-2570.
- Yuan,H., Michelsen,K., y Schwappach,B. (2003). 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr. Biol.* 13, 638-646.
- Zerial,M. y McBride,H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107-117.

Margareta Calbuz Jole  
Reprezentantii del transportu vehiculelor  
cecep for de VDEI pos finantare guvernala  
Societatele cuu laude

17

Direcție

2004



El Presidente,



Im Calbuz

