

# PAPEL DE LOS RECEPTORES DE CARGA EN LA ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LA RUTA SECRETORA TEMPRANA



TRABAJO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR  
DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA, EN LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA;  
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA POR

**DÑA. ANA MARÍA PÉREZ LINERO**

SEVILLA, 2016

La doctoranda

El director y tutor

Ana María Pérez Linero

Manuel Muñiz Guinea

**PAPEL DE LOS RECEPTORES DE CARGA  
EN LA ORGANIZACIÓN FUNCIONAL  
DE LA RUTA SECRETORA TEMPRANA**



TRABAJO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR  
DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA, EN LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA;  
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA POR

**DÑA. ANA MARÍA PÉREZ LINERO**

SEVILLA, 2016

La doctoranda

El director y tutor

Ana María Pérez Linero

Manuel Muñiz Guinea





# Índice

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	14
1. La ruta secretora.....	16
1.1. El carácter bidireccional de la ruta secretora .....	17
1.2. El transporte vesicular .....	18
1.2.1. Formación de la vesícula de transporte .....	20
1.2.2. Desplazamiento, reconocimiento y fusión de la vesícula de transporte con el compartimento aceptor.....	22
2. La ruta secretora temprana.....	24
3. Transporte anterógrado desde el retículo endoplásmico al Golgi.....	25
3.1. Exportación desde el retículo endoplásmico.....	26
3.1.1. Estructura y ensamblaje de la cubierta COPII.....	26
3.1.2. Incorporación de la carga en la vesícula COPII .....	28
3.1.3. Formación de los sitios de salida del retículo, ERES .....	29
3.2. Reconocimiento y fusión de las vesículas COPII con el aparato de Golgi.....	30
3.2.1. Anclaje de las vesículas COPII a la membrana del Golgi .....	30
3.2.2. Fusión de las vesículas COPII con la membrana del Golgi.....	33
3.3. Modelo alternativo de transporte anterógrado.....	34
4. Transporte retrógrado desde el Golgi al retículo endoplásmico .....	35
4.1. Formación de vesículas COPI en el Golgi .....	36
4.1.1. Composición y estructura de la cubierta COPI.....	36
4.1.2. Regulación de la polimerización de la cubierta COPI.....	36
4.1.3. Reconocimiento de la carga por la cubierta COPI .....	38
4.2. Anclaje y fusión de las vesículas COPI al retículo endoplásmico.....	40
5. Modelo de maduración cisternal y biogénesis <i>de novo</i> del aparato de Golgi .....	42
6. Receptores de carga .....	45
6.1. El complejo p24 .....	48
6.2. Erv14p .....	51
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	54
1. Antecedentes.....	56
2. Objetivos.....	62

RESULTADOS.....	64
1. Papel cooperativo de los receptores de carga en la organización funcional del <i>cis</i> -Golgi.....	66
1.1. La interacción entre los receptores de carga es necesaria para el ensamblaje del <i>cis</i> -Golgi .....	66
1.2. Los receptores de carga tienen una función en el anclaje vesicular necesario para el ensamblaje del <i>cis</i> -Golgi.....	71
2. Papel de los receptores de carga en el anclaje de las vesículas COPI al retículo endoplásmico .....	79
DISCUSIÓN.....	89
1. Papel cooperativo de los receptores de carga en la organización funcional del <i>cis</i> -Golgi.....	92
2. Papel de los receptores de carga en el anclaje de las vesículas COPI al retículo endoplásmico .....	95
3. Modelo propuesto.....	97
CONCLUSIONES.....	100
MATERIAL Y MÉTODOS.....	104
1. Organismos y condiciones de cultivo .....	106
3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	106
3.1.1. Estirpes de <i>E. coli</i> .....	106
3.1.2. Cultivo de <i>E. coli</i> en medio líquido .....	106
3.1.3. Cultivo de <i>E. coli</i> en medio sólido .....	106
3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	107
3.2.1. Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> .....	107
3.2.2. Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en medio líquido .....	110
3.2.3. Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en medio sólido.....	111
4. Técnicas genéticas.....	112
4.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	112
4.2. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	113
4.3. Generación de cepas de levadura .....	114
4.3.1. Cruce, esporulación y disección de tétradas.....	114
4.3.2. Recombinación homóloga .....	114
4.4. Ensayos de crecimiento celular .....	115
5. Técnicas de manipulación de ADN .....	115
5.1. Técnicas básicas de biología molecular: PCR, restricción enzimática de ADN, geles de agarosa, purificación de fragmentos de ADN y secuenciación.....	115

5.2.	Extracción y purificación de ADN desde <i>Escherichia coli</i> .....	117
5.3.	Plásmidos.....	118
5.4.	Oligonucleótidos.....	119
6.	Técnicas bioquímicas.....	120
6.1.	Electroforesis en geles de acril-amida.....	120
6.2.	<i>Western blots</i> y anticuerpos.....	120
6.3.	Extractos celulares de levadura.....	122
6.4.	Ensayos de secreción de Kar2p.....	123
6.5.	Purificación de proteínas recombinantes.....	123
6.6.	Unión de péptidos de los tallos citosólicos de p24 a la matriz.....	125
6.7.	Aislamiento de complejos proteicos de alto peso molecular.....	126
6.8.	Análisis de interacción proteína-proteína.....	126
6.8.1.	Ensayos de <i>pull-down</i> .....	126
6.8.2.	Co-inmunoprecipitación.....	127
6.9.	Subfraccionamiento celular.....	128
7.	Técnicas de Microscopía.....	129
7.1.	Microscopía de fluorescencia.....	129

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALPS</b>	Dominio sensor de curvatura de la membrana ( <i>Amphipathic lipid-packing sensor</i> )
<b>ARNt</b>	Ácido ribonucleico de transferencia
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>COG</b>	Complejo COG ( <i>Conserved Oligomeric Golgi</i> )
<b>COPI</b>	Cubiertas COPI ( <i>COat Protein Complex I</i> )
<b>COPII</b>	Cubiertas COPII ( <i>COat Protein Complex II</i> )
<b>CPY</b>	Carboxipeptidasa Y
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dNTP</b>	Desoxiribonucleótidos trifosfato
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad óptica medida a 600nm
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilen diamino tetraacético ( <i>EthyleneDiamine Tetraacetic Acid</i> )
<b>EGTA</b>	Ácido etilen glicol tetraacético ( <i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i> )
<b>ERES</b>	Sitios de salida del RE ( <i>ER Exit Sites</i> )
<b>ERGIC</b>	Compartimento intermedio ( <i>ER-to-Golgi Intermediate Compartment</i> )
<b>GAP</b>	Proteína aceleradora de la actividad GTPasa ( <i>GTPase Accelerating Protein</i> )
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato
<b>GEF</b>	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina ( <i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i> )
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>GOLD</b>	Dominio proteico GOLD ( <i>GOLgi Dynamics</i> )
<b>Golgi</b>	Aparato de Golgi
<b>GPI</b>	Glicosil-fosfaditilinositol ( <i>Glycosylphosphatidylinositol</i> )
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)1-piperazina-etanosulfónico
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani para bacterias
<b>mCi</b>	mCitrina



<b>NSF</b>	<i>N-ethylmaleimide-Sensitive Factor</i>
<b>NTA</b>	Ácido nitrilotriacético ( <i>NitriloTriacetic Acid</i> )
<b>OST</b>	Transferasa de oligosacáridos ( <i>OligoSaccharyl Transferase</i> )
<b>p/v</b>	Peso/volumen
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo ( <i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i> )
<b>Pre-SPO</b>	Medio de pre-esporulación para levaduras ( <i>pre-SPOrulation</i> )
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>SC</b>	Medio de cultivo sintético completo para levaduras ( <i>Synthetic Complete</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS ( <i>SDS PoliAcrilamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>SM</b>	Proteínas de la familia Sec1/Munc18 ( <i>Sec1/Munc18-like proteins</i> )
<b>SNAP</b>	<i>Soluble NSF Attachment Protein</i>
<b>SNARE</b>	<i>Soluble NSF Attachment Protein REceptors</i>
<b>SOB</b>	Medio <i>Super Optimal Broth</i>
<b>SPO</b>	Medio de esporulación para levaduras ( <i>SPOrulation</i> )
<b>SRP</b>	<i>Signal Recognition Particle</i>
<b>TAP</b>	Epítipo TAP ( <i>Tandem Affinity Purification</i> )
<b>TGN</b>	Red Trans-Golgi ( <i>Trans Golgi Network</i> )
<b>TRAPPI</b>	Complejo TRAPPI ( <i>Transport Protein Particle I</i> )
<b>TRAPPII</b>	Complejo TRAPPII ( <i>Transport Protein Particle II</i> )
<b>TRIS</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>TX-100</b>	Tritón X-100
<b>UPR</b>	Respuesta a proteínas mal plegadas ( <i>Unfolded Protein Response</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>Wt</b>	Silvestre ( <i>Wild type</i> )
<b>YNB</b>	Bases nitrogenadas de levaduras ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> )
<b>YPD</b>	Medio de cultivo completo para levaduras ( <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i> )
<b>β-ME</b>	β-mercaptoetanol



# **RESUMEN**

## **Introducción**

La organización estructural y funcional de la célula eucariota depende, en gran medida, de la actividad de la ruta secretora. Los procesos selectivos de transporte vesicular que operan a lo largo de esta ruta, aseguran la llegada de las distintas proteínas y lípidos a sus destinos funcionales adecuados. De esta forma, se mantiene la compartimentación necesaria para que los diferentes procesos bioquímicos que tienen lugar en cada orgánulo se lleven a cabo eficientemente.

El tráfico vesicular en la ruta secretora está mediado por una serie de complejos proteicos citosólicos de cubierta, que se encargan de generar las vesículas de transporte mediante la deformación mecánica de la membrana del orgánulo donador, seleccionar de manera simultánea las moléculas carga que se han de incorporar en las vesículas, y finalmente, dirigir las vesículas hacia su destino intracelular interaccionando con los factores de anclaje, que actúan previamente al evento de fusión con el orgánulo aceptor. Dos tipos de cubierta operan en la ruta secretora temprana: COPII media la exportación de proteínas de secreción del retículo endoplásmico (RE), mientras que COPI (o coatómero) está implicada en el transporte retrógrado desde el aparato de Golgi al RE y entre las cisternas del Golgi.

Las proteínas de secreción que no son capaces de interaccionar con la cubierta COPII necesitan la intervención de los denominados receptores de carga. Estos receptores son proteínas muy abundantes y conservadas evolutivamente, que conectan a la carga con la cubierta para que su exportación del RE ocurra eficientemente.

En esta tesis se ha pretendido profundizar a nivel molecular en la comprensión del tráfico vesicular en la ruta secretora temprana mediante el estudio de los receptores de carga y su participación en otras funciones además de las previamente descritas, utilizando como modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El estudio comenzó a partir del análisis del complejo p24, un receptor de carga que forma un complejo heteromérico que cicla constantemente entre el RE y el Golgi. Publicaciones previas de nuestro grupo han permitido describir su función como receptor de carga de las proteínas ancladas a GPI y como estabilizador del coatómero sobre el Golgi, ayudando en la formación de vesículas COPI.

## **Antecedentes y objetivos**

Para profundizar en el conocimiento de las funciones celulares del complejo p24, se realizó un ensayo de *pulldown* de una de las subunidades del complejo etiquetada con TAP (Emp24-TAP). Sorprendentemente, se encontraron entre las proteínas que interactuaban con Emp24-TAP otros receptores de carga, y los componentes del complejo Dsl1, el factor responsable del anclaje de las vesículas COPI al RE.

Para analizar la importancia de estas interacciones, se estudió en primer lugar la relación del complejo p24 con los demás receptores de carga. De esta forma se observó que los receptores constituyen una plataforma de alto peso molecular a nivel de los sitios de salida del retículo, y que esta debe tener un significado funcional, ya que existe una fuerte interacción genética entre los distintos receptores. Los receptores que mayor interacción genética mostraron fueron p24 y Erv14p, por lo que se comenzó un estudio del doble mutante *emp24Δerv14Δ*. Los primeros resultados preliminares evidenciaron que en este doble mutante el *cis*-Golgi parecía desorganizado.

Con estos antecedentes, los objetivos planteados en esta tesis han sido:

1. Analizar el posible papel cooperativo entre los receptores de carga en la organización funcional del *cis*-Golgi.
2. Analizar el posible papel del complejo p24 en el anclaje de las vesículas COPI al retículo endoplásmico.

## **Resultados**

### **1. Papel cooperativo de los receptores de carga en la organización funcional del *cis*-Golgi.**

Los receptores de carga del RE son componentes muy abundantes de la ruta secretora temprana que ciclan continuamente entre el RE y el Golgi en vesículas anterógradas COPII y retrógradas COPI. La función individual de estos receptores es conectar a sus respectivas proteínas de secreción específicas con la cubierta COPII para promover su incorporación eficiente en las vesículas que las llevarán desde el RE hasta el Golgi. Nuestros datos proteómicos y genéticos sugieren que además de esta función individual, los receptores desarrollarían una función colectiva necesaria para el ensamblaje del *cis*-Golgi.

En el primer capítulo de esta tesis, se muestra cómo los receptores en su conjunto son necesarios para la homeostasis del *cis*-Golgi, ya que su ausencia combinada promueve la desorganización de este compartimento, hecho que no parece ser debido a un bloqueo general de la salida del RE. Este fenotipo es característico de los mutantes en los factores de anclaje de las vesículas COPII en el *cis*-Golgi. Es más, el alelo supresor de mutantes de anclaje *SLY1-20*, suprime el fenotipo de crecimiento y de *cis*-Golgi desorganizado del doble mutante *emp24Δerv14Δ*. Los resultados indican que los receptores interactúan con el factor de anclaje Uso1p una vez han abandonado el RE. Uso1p se encuentra menos asociado a las membranas del Golgi y de las vesículas en el doble mutante *emp24Δerv14Δ*, sugiriendo que los receptores de carga favorecen el proceso de anclaje vesicular mediante el reclutamiento o estabilización de los factores de anclaje a las vesículas COPII.

Agrupando todas las evidencias obtenidas, proponemos un modelo en el que los receptores de carga reclutarían o estabilizarían conjuntamente al factor de anclaje Uso1p a las vesículas recién evaginadas del RE, de forma que las mantendrían unidas entre sí favoreciendo la fusión posterior para formar un nuevo *cis*-Golgi o fusionar con el *cis*-Golgi pre-existente.

## **2. Papel de los receptores de carga en el anclaje de vesículas COPI al retículo endoplásmico**

Para devolver al RE aquellas proteínas que han escapado, y reciclar los factores de transporte requeridos para futuras rondas de tráfico anterógrado, entre el Golgi y el RE existe un transporte retrógrado mediado por vesículas COPI. Al aproximarse al RE, estas vesículas son capturadas por el complejo de anclaje Dsl1 mediante la interacción entre su subunidad Dsl1p y la cubierta COPI. De esta manera, Dsl1 facilita la interacción de la vesícula con el RE para su posterior fusión. Cuando Dsl1p contacta con el coatómero, promueve a su vez su despolimerización y la vesícula comienza a desnudarse. De esta forma, en ese momento la vesícula quedaría sin sujeción a la membrana del RE, con lo que podría escapar de las inmediaciones de este orgánulo, con la consecuente pérdida de eficiencia en la fusión. En el segundo capítulo de esta tesis se han obtenido resultados que permiten proponer que los receptores de carga tendrían un papel en que la vesícula quede cerca del RE hasta que ocurra la fusión.

Los resultados obtenidos indican que los receptores de carga p24 y Erv14p interactúan físicamente *in vivo* con el complejo de anclaje vesicular Dsl1. Además, al

menos en el caso del complejo p24, esta interacción es directa *in vitro*. Los estudios de interacción genética han mostrado que esa interacción física tiene un significado funcional en la célula, hecho que también se ha deducido por tener el doble mutante *emp24Δtip20-8* más defectos que los mutantes simples en el anclaje de las vesículas COPI al RE. Dicha interacción funcional parece basarse en una colaboración entre los receptores de carga que viajan en las vesículas COPI y Dsl1, como indica el hecho de que en un mutante del coatómero la interacción física entre los receptores y el complejo Dsl1 disminuya, o que sólo sea capaz de recuperar el crecimiento del doble mutante *erv14Δtip20-8* la versión silvestre del receptor, y no una que es incapaz de abandonar el RE. Por último, los receptores de carga parecen actuar conjuntamente en el transporte retrógrado, ya que la expresión de *ERV14* silvestre es capaz de suprimir los defectos de crecimiento dobles mutantes de alelos termosensibles de los miembros de Dsl1 y *emp24Δ*.

Con los datos obtenidos proponemos el siguiente modelo: los receptores de carga presentes en la vesícula COPI contactan con el complejo Dsl1 tras la despolimerización de la cubierta, manteniendo así a la vesícula en las cercanías del RE y evitando que esta se aleje, aumentando de esta forma la eficiencia del proceso de anclaje llevado a cabo por el complejo Dsl1.

## **Conclusiones**

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que:

- 1- Los receptores de carga presentan un papel cooperativo necesario para la biogénesis del *cis*-Golgi, mediante el reclutamiento de los factores de anclaje vesicular.
- 2- Los receptores de carga aumentan la eficiencia del anclaje de las vesículas COPI al retículo endoplásmico mediante su interacción con el complejo Dsl1.

愀

# **INTRODUCCIÓN**

---





# 1. La ruta secretora

Las células eucariotas presentan un elaborado sistema de endomembranas que constituye la ruta secretora. Dicha ruta es responsable del transporte de una enorme cantidad de proteínas y lípidos a sus destinos funcionales, y es esencial tanto para el funcionamiento de la célula como para el desarrollo pluricelular (Lee et al, 2004). De hecho, se estima que un tercio del proteoma de las células eucariotas se incorpora a la ruta secretora (Ghaemmaghami et al, 2003).

Las proteínas que se van a incorporar a la ruta son sintetizadas por los ribosomas asociados al retículo endoplásmico (RE), y se translocan, ya sea de una forma co- o post-traducciona, al lumen de este orgánulo. Allí tiene lugar el plegamiento de la proteína translocada, y en su caso, la oligomerización. Además, en el RE se producen las primeras modificaciones post-traduccionales como la N-glicosilación, la hidroxilación de residuos de prolina o la adición de glicolípidos (Lee et al, 2004). Durante estas reacciones, las moléculas son continuamente evaluadas por un sistema de control de calidad a cargo de chaperonas y enzimas de glicosilación, que determinan el momento en el que las proteínas alcanzan un estado conformacional apropiado para abandonar el retículo (Ellgaard & Helenius, 2003; Smith et al, 2011). En ese momento, las proteínas se concentran en los sitios de salida del retículo o ERES (*ER Exit Sites*), son incorporadas en vesículas de transporte y exportadas hacia el aparato de Golgi.

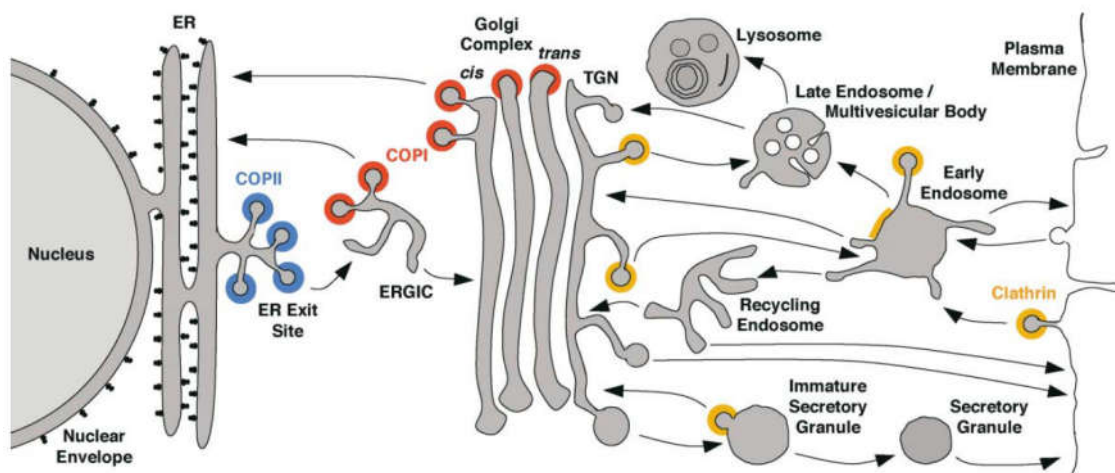
En las células de eucariotas superiores, las vesículas procedentes del RE se fusionan con el denominado compartimento intermedio o ERGIC (*ER-to-Golgi Intermediate Compartment*). Este orgánulo altamente dinámico, actúa como estación de intercambio entre la maquinaria de transporte vesicular del RE y la del aparato de Golgi, y contribuye también a la concentración, plegamiento y control de calidad de las proteínas de secreción (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006).

En el aparato de Golgi, las proteínas recorren las sucesivas cisternas *cis*, media y *trans* de este orgánulo, siendo a su vez ampliamente modificadas de manera secuencial, mediante la elaboración de estructuras carbohidratadas complejas y, en ciertos casos, fosforilación, sulfatación y proteólisis. Una vez alcanzan el subcompartimento más distal o TGN (*Trans Golgi Network*), las proteínas son seleccionadas y enviadas en intermediarios de transporte vesiculares hacia su lugar final de residencia, bien sea el espacio extracelular, la membrana plasmática, los

endosomas, la vacuola, los peroxisomas o los gránulos de secreción (Emr et al, 2009; Glick & Nakano, 2009).

## 1.1. El carácter bidireccional de la ruta secretora

La ruta secretora consiste en una serie de compartimentos membranosos especializados cuya composición molecular característica les permite desarrollar sus funciones eficientemente. El correcto funcionamiento de la célula sólo se puede conseguir si dichos orgánulos se comunican entre sí, de forma que sus distintas actividades estén coordinadas. Esta comunicación se basa, fundamentalmente, en la continua transferencia de moléculas de unos compartimentos a otros. Esto implica que los orgánulos sean estructuras altamente dinámicas, y necesiten, por tanto, de mecanismos para retener y reciclar sus moléculas propias.



**Figura 1. Carácter bidireccional de la ruta secretora.** Todos los orgánulos celulares están conectados mediante transporte vesicular. En azul se muestran las proteínas de cubierta COPII que median el transporte desde el retículo endoplásmico al compartimento intermedio (ERGIC). En rojo, las cubiertas COPI, son las responsables del transporte retrógrado intra-Golgi y Golgi-retículo. En amarillo, las vesículas con cubiertas de clatrina, responsables del transporte post-Golgi (Bonifacino & Glick, 2004).

Para preservar la identidad molecular de los orgánulos, existen diferentes mecanismos que retienen a las moléculas en sus lugares de residencia. En muchos casos, las moléculas evitan ser selectivamente incorporadas en las vesículas que median el transporte anterógrado gracias a la carencia de señales de exportación. También la asociación física entre las propias moléculas endógenas de un orgánulo puede prevenir la salida de éste. No obstante, estos mecanismos no son lo

suficientemente eficaces, por lo que muchas moléculas terminan escapándose a otros orgánulos situados más adelante en la ruta secretora, proceso conocido como *Bulk Flow* o corriente pasiva de transporte (Thor et al, 2009).

Para evitar la pérdida de componentes propios de cada orgánulo fruto de este transporte pasivo, la célula emplea un sistema de reciclaje por el cual las moléculas escapadas son incorporadas en vesículas de transporte que las devuelven a sus orgánulos de residencia. Este tipo de transporte vesicular se conoce con el nombre de transporte retrógrado.

El transporte retrógrado no sólo ayuda a devolver aquellas proteínas que han escapado de su orgánulo de residencia, sino que también recicla los factores de transporte requeridos para futuras rondas del tráfico anterógrado.

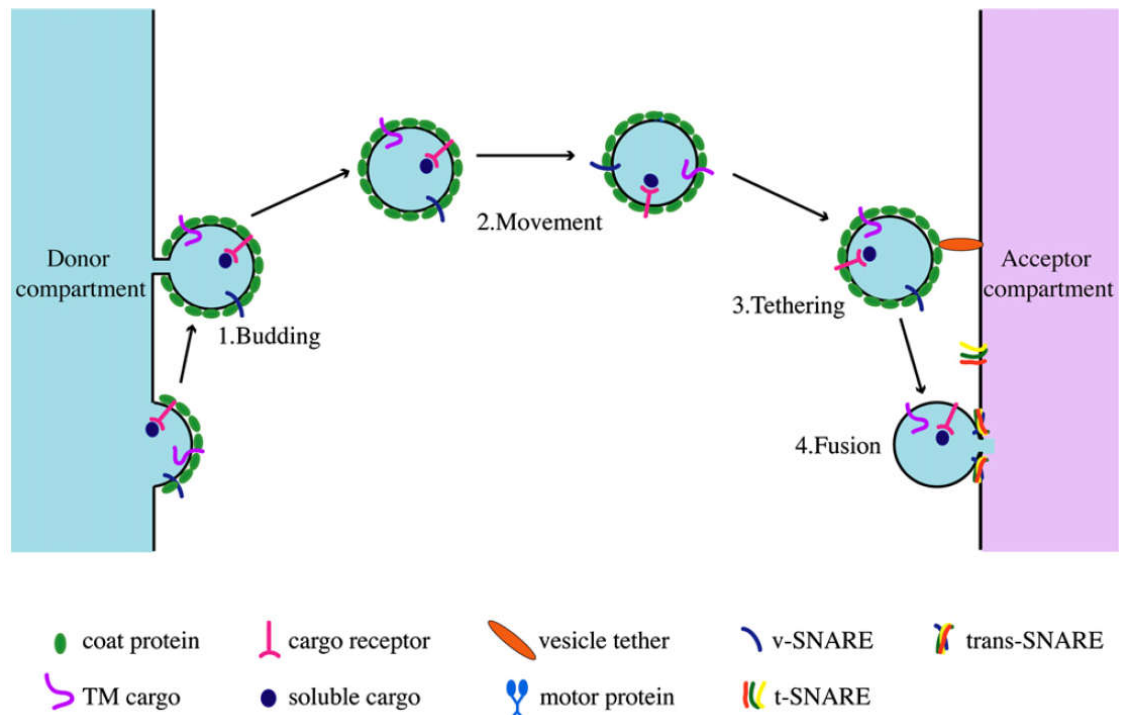
Esto hace que ambos tipos de transporte sean completamente interdependientes. Por tanto, el transporte vesicular que se establece entre los diferentes compartimentos de la ruta secretora posee una naturaleza marcadamente bidireccional, la cual es esencial para el correcto funcionamiento de la propia ruta (Lee et al, 2004) (Figura 1). De esta forma, no sólo se mantiene la identidad estructural y funcional de los orgánulos membranosos, sino que también se garantiza que actúen de forma coordinada. Con ello, se consigue mantener la homeostasis celular y asegurar la comunicación de la célula con su entorno, regulando tanto la presencia de proteínas y lípidos en la membrana plasmática, como la secreción de moléculas al espacio extracelular (Bonifacino & Glick, 2004).

## **1.2. El transporte vesicular**

A lo largo de la ruta secretora, las moléculas viajan en vesículas lipídicas, que se evaginan desde un compartimento donador, y se fusionan con un compartimento receptor o aceptor. Este tipo de transporte recibe por ello el nombre de transporte vesicular (Bonifacino & Glick, 2004). Es este un proceso extraordinariamente complejo, debido a su alto dinamismo, junto a la gran cantidad y variedad de sustratos a transportar. Actualmente, están descritas las diferentes etapas del transporte vesicular y los elementos esenciales para las mismas, quedando por esclarecer en gran medida la regulación detallada de éstas.

Los elementos moleculares necesarios para la formación y dinámica de las vesículas de transporte se conocen en su conjunto con el nombre de maquinaria de transporte. Esta maquinaria establece las diferentes etapas del ciclo de vida de una

vesícula de transporte, que se pueden dividir esencialmente en: formación, desplazamiento, reconocimiento y fusión con la membrana del orgánulo aceptor (Bonifacino & Glick, 2004) (Figura 2).



**Figura 2. Ciclo de vida de una vesícula de transporte.** La vesícula naciente se forma por la acción de las proteínas de cubierta que capturan a las proteínas carga y deforman la membrana. Tras el movimiento hasta el compartimento aceptor, la vesícula se ancla a la membrana aceptor gracias a los factores de anclaje que reconocen a la cubierta presente en la vesícula. Posteriormente, la vesícula pierde parte de su cubierta, lo que permite la activación y acción de las SNAREs que promueven la fusión al orgánulo aceptor (Adaptado de (Cai et al, 2007a)).

Las proteínas clave de todas las etapas del ciclo de vida de una vesícula de transporte son las denominadas proteínas de cubierta. Éstas son proteínas citosólicas que se asocian formando complejos de alto peso molecular que se reclutan conjuntamente a las membranas y desencadenan la formación de las vesículas de transporte. Las proteínas de cubierta son específicas de cada paso de transporte, dando identidad a las vesículas.

Esencialmente, las proteínas de cubierta son las responsables de concentrar y seleccionar a las proteínas carga, separándolas del resto de proteínas presentes en los orgánulos donadores y, posteriormente, deformar la membrana para promover la evaginación de la vesícula naciente (*budding*). Tras la escisión, en lugar de dissociarse de la membrana de la vesícula, se mantienen unidas a ella, al menos en parte. Esto

permite la interacción con los factores de transporte que dirigen la vesícula al orgánulo aceptor y, una vez alcanzado éste, también promueve la interacción con los factores de anclaje (*tethering*) necesarios para promover la fusión de la vesícula a la membrana de forma específica (Cai et al, 2007a; Lord et al, 2011).

### **1.2.1. Formación de la vesícula de transporte**

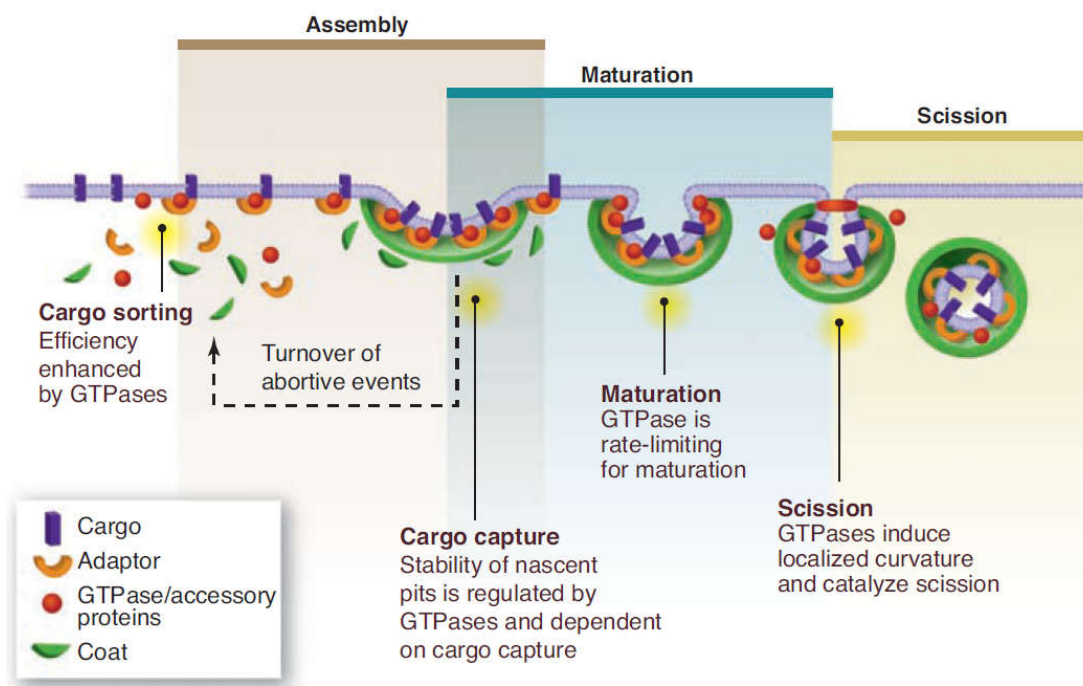
La formación o biogénesis de las vesículas de transporte implica a su vez dos procesos secuenciales: la evaginación de la vesícula mediante la deformación de la membrana del compartimento donador y la posterior escisión o liberación de dicha vesícula.

El proceso de evaginación se desencadena cuando las proteínas de cubierta se asocian a la membrana del orgánulo donador y generan mecánicamente una curvatura hacia el citoplasma formando la gema. Al mismo tiempo, las proteínas de cubierta capturan a las moléculas carga que se deben incorporar a la vesícula, interaccionando con señales específicas presentes en los dominios citosólicos de estas moléculas carga. De este modo, quedan acoplados los procesos de captura selectiva de la carga y la evaginación de la membrana (Bonifacino & Glick, 2004).

Las cubiertas proteicas se organizan en dos capas, una externa y otra interna. La capa interna es la responsable de la captura y concentración de la carga, actuando como un adaptador entre la capa externa y las membranas. Por otro lado, la capa externa es la responsable de deformar la membrana, aportando la rigidez necesaria a la vesícula naciente para su liberación. La interacción de la capa interna con la externa constituye un sistema de autorregulación del ensamblaje y el tamaño de las vesículas (Fromme et al, 2008; Stagg et al, 2008).

El modelo más aceptado actualmente que explica el proceso de evaginación de las vesículas de transporte (Figura 3) propone que una GTPasa pequeña es atraída desde el citoplasma a la membrana del orgánulo donador, donde posteriormente es activada por un factor intercambiador de nucleótidos (GEF), quedando unida a GTP. La GTPasa en su estado activo, recluta a su vez a las proteínas de cubierta (o adaptadores), las cuales, forman un complejo cebador con una proteína estimuladora de la actividad GTPásica (GAP) y una determinada proteína carga transmembrana. La propia formación del complejo cebador activa a la proteína GAP, quien a su vez estimula a la GTPasa, la cual al hidrolizar su GTP pasa a un estado inactivo. De este modo, la GTPasa se despegue de la membrana y pasa de nuevo al citosol para iniciar

un nuevo ciclo de actividad, mientras que las proteínas de cubierta continúan asociadas a la membrana a través de su unión a la proteína carga transmembrana. Por tanto, la presencia de estas proteínas carga específicas estabilizaría al complejo cebador en la membrana, lo que a su vez favorecería el reclutamiento de otras proteínas carga adicionales, garantizando así ciclos productivos de activación e inactivación de las GTPasas, promoviendo la polimerización de la cubierta. Dicha polimerización comienza cuando el número de complejos cebadores supera un determinado umbral, que posibilita que estos comiencen a asociarse lateralmente entre sí formando una cubierta proteica cada vez más extensa sobre la membrana del orgánulo donador. La polimerización progresiva de la cubierta conduce a la deformación mecánica de la membrana y consecuentemente a la generación de una vesícula de transporte (Hsu & Yang, 2009; Miller & Barlowe, 2010).



**Figura 3. Esquema general de la formación de una vesícula.** Este proceso se inicia por el ensamblaje de las subunidades de la cubierta proteica en la membrana, a través de la interacción con las proteínas carga, promoviendo la separación de éstas de las proteínas endógenas del orgánulo. A continuación, la polimerización de la cubierta rige la maduración de la vesícula curvando la membrana, hasta que finalmente se produce la escisión gracias a la actividad de las GTPasas (Pucadyil & Schmid, 2009).

El papel de las proteínas carga transmembrana es, por tanto, un elemento clave de la formación de las vesículas, ya que no son simples pasajeros de las mismas, sino

que estabilizan y preservan la asociación de las proteínas de cubierta a las membranas (Aguilera-Romero et al, 2008; Lee et al, 2004). Este modelo en el que las cargas transmembrana juegan un papel activo, implica que sólo se forman vesículas de transporte cuando hay suficiente carga para transportar y esta está preparada para ello (Manzano-Lopez et al, 2015). Del mismo modo, este modelo implica que la cubierta proteica no se libera tras la formación de la vesícula, como clásicamente se había considerado, sino que quedaría unida a la membrana debido a su interacción con las moléculas carga. Además, esta unión es necesaria debido al papel de las cubiertas en las siguientes etapas del transporte vesicular (Cai et al, 2007a; Lord et al, 2011).

Tras la curvatura de la membrana y la generación de la gema como resultado del ensamblaje o polimerización de la cubierta, tiene lugar la escisión o liberación de la vesícula naciente. Se trata de un proceso complejo y sólo descrito a grandes rasgos, en el que cada tipo de vesícula de transporte parece utilizar una maquinaria específica. No obstante, estudios recientes sugieren que las propias GTPasas pequeñas juegan un importante papel en la fisión en el cuello de la vesícula naciente (Pucadyil & Schmid, 2009), al igual que el citoesqueleto también parece cooperar en este proceso en determinados casos (Stamnes, 2002).

### **1.2.2. Desplazamiento, reconocimiento y fusión de la vesícula de transporte con el compartimento aceptor**

Tras la liberación del compartimento donador, la vesícula de transporte debe desplazarse hasta alcanzar el compartimento aceptor. Dicho desplazamiento puede tener lugar pasivamente por difusión o bien activamente mediante la actuación de proteínas motoras que usan los filamentos citoesqueléticos como guías para alcanzar el destino adecuado. Este proceso de desplazamiento varía según la etapa de transporte, así como entre los diferentes organismos, tanto en el tipo de filamentos empleados, como en las proteínas motoras que lo desarrollan (Hehnly & Stamnes, 2007; Stamnes, 2002).

Una vez alcanzado el compartimento aceptor, las vesículas experimentan un proceso gradual de reconocimiento y anclaje (*tethering*), necesario para la posterior fusión a la membrana del orgánulo. La maquinaria responsable de este proceso está formada por un grupo de proteínas citosólicas que se asocian a las membranas de los orgánulos (factores de anclaje) y una GTPasa pequeña de la familia Rab, que varían según el paso de transporte.

Por su similitud funcional y estructural, los factores de anclaje se pueden clasificar en tres grandes grupos (Sztul & Lupashin, 2009). El primer grupo está formado por complejos oligoméricos que interactúan con las SNAREs (*Soluble NSF Attachment Protein REceptors*) y son efectores de las GTPasas de la familia Rab, dentro de este grupo están los complejos Dsl1 y COG (*Conserved Oligomeric Golgi*). En segundo lugar, se agrupan los complejos proteicos que se comportan como GEF de las Rabs, incluyendo a los complejos TRAPPI y II (*Transport Protein Particle I y II*). Finalmente, el tercer grupo está compuesto por proteínas de estructura *coiled-coil*, conocidas tradicionalmente como golginas, siendo la proteína p115/Usol1p una de las más conocidas. En su conjunto, los factores de anclaje actúan como conectores y estabilizadores de las vesículas, estableciendo un puente entre las proteínas de cubierta presentes en las mismas y la membrana del orgánulo aceptor (Cai et al, 2007a; Sztul & Lupashin, 2009). De este modo, se establece un doble reconocimiento a nivel de las membranas, primero en la vesícula a través de las proteínas de cubierta; y posteriormente en la membrana del orgánulo aceptor a nivel de las SNAREs. Así se garantiza que sólo se fusionen vesículas correctas para cada paso de transporte.

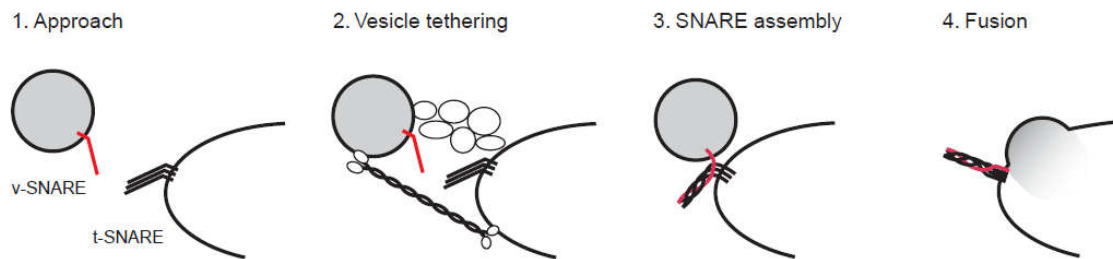
El reclutamiento y el funcionamiento de estos factores de anclaje están mediados por GTPasas pequeñas de la familia Rab (Ypt en levaduras). Cuando la Rab es activada mediante el intercambio de GDP a GTP gracias a un factor intercambiador de nucleótidos (GEF), ésta puede interactuar con sus efectores, los factores de anclaje.

Posteriormente se promoverá el desensamblaje de la cubierta, requisito previo para que la membrana de la vesícula se fusione con la membrana del orgánulo aceptor. Además, recientemente se ha descrito el papel de quinasas que son activadas tras las interacciones de los factores de anclaje, como elemento promotor del desensamblaje de las proteínas de cubierta (Lord et al, 2011).

Finalmente, el proceso de fusión de la vesícula con el compartimento aceptor está mediado por la actividad de las proteínas transmembrana conocidas como SNAREs (*Soluble NSF Attachment Protein REceptors*) que interactúan a través de sus dominios citosólicos *coiled-coil*. La base del proceso está en la combinación específica de cuatro proteínas SNAREs, una de ellas se localiza en la membrana de la vesícula (v-SNARE) y las otras tres residen en la membrana del orgánulo aceptor (t-SNAREs). Al producirse la conexión entre las cuatro proteínas, sus dominios *coiled-coil* cambian su conformación enrollándose entre ellos, generando la energía necesaria para fusionar las membranas (Bonifacino & Glick, 2004) (Figura 4). Además, es imprescindible la actuación de otros factores necesarios para la liberación de las



SNAREs tras el superenrollamiento (factores NSF y SNAP), así como para la estabilizar la asociación entre las SNAREs (proteínas de la familia SM) (Sudhof & Rothman, 2009).



**Figura 4.** Fases del anclaje y la fusión de la vesícula al orgánulo aceptor. Cuando la vesícula de transporte se aproxima al orgánulo aceptor, es capturada por los factores de anclaje (*tethering*), que facilitan el reconocimiento entre las v- y t-SNAREs que se activan y enrollan entre ellas promoviendo la fusión de la vesícula (Whyte & Munro, 2002).

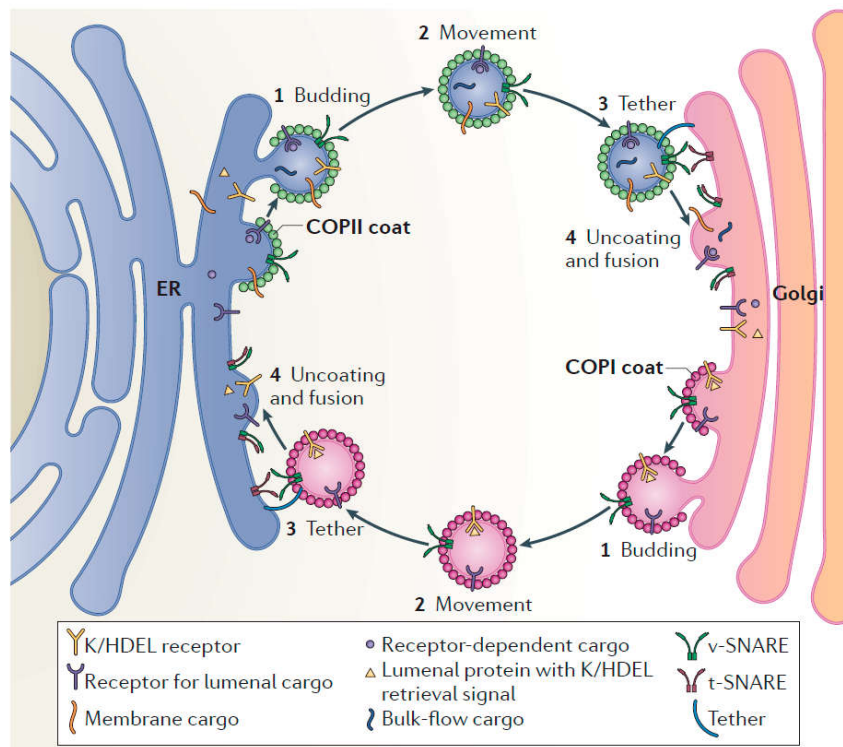
Clásicamente, se consideró que la complementariedad entre las v- y t-SNAREs era la base de la especificidad del reconocimiento en cada paso de la ruta de transporte. Sin embargo, en la actualidad se señala cada vez más la colaboración entre las proteínas de cubierta, los factores de anclaje, las Rabs y las SNAREs (Cai et al, 2007a; Lord et al, 2011; Sudhof & Rothman, 2009; Sztul & Lupashin, 2009).

## 2. La ruta secretora temprana

La ruta secretora temprana comprende el tráfico entre el RE y el aparato de Golgi. La naturaleza bidireccional del transporte vesicular en esta ruta es esencial para su correcto funcionamiento. Así, mientras que el transporte anterógrado permite la salida de las proteínas de secreción desde el RE hacia sus destinos funcionales, el transporte retrógrado desde el Golgi al RE mantiene los niveles requeridos de proteínas endógenas en el retículo, evita que proteínas mal plegadas avancen por la ruta secretora y recicla los factores necesarios para futuras rondas de transporte anterógrado (Lee et al, 2004).

El establecimiento del flujo bidireccional en la ruta secretora temprana depende de las proteínas de cubierta COPII y COPI, las cuales participan en la generación de las vesículas mediadoras del transporte anterógrado y retrógrado respectivamente (Figura 5). La incorporación eficiente de las proteínas de secreción durante su exportación del

RE en las vesículas COPII y de las proteínas que deben ser devueltas al RE desde el Golgi en las vesículas COPI, así como la propia formación coordinada de estos intermediarios de transporte, se halla regulada por mecanismos moleculares que aún no han sido completamente establecidos.



**Figura 5. Transporte bidireccional entre el RE y el Golgi mediado por las cubiertas COPII y COPI.** Las proteínas de secreción se incorporan en las vesículas COPII de forma directa, a través de un receptor de carga, o de forma pasiva (*bulk-flow*). Las vesículas COPI son esenciales para garantizar el flujo bidireccional (Brandizzi & Barlowe, 2013).

### 3. Transporte anterógrado desde el retículo endoplásmico al Golgi

Una vez que las proteínas han completado su síntesis, maduración y plegamiento en el RE, son competentes para ser exportadas hasta el Golgi en vesículas COPII. Estas se forman en unos dominios especializados de la membrana del RE denominados sitios de salida o ERES (*ER Exit Sites*) (Barlowe & Miller, 2013). Tras su evaginación de los ERES, las vesículas COPII se anclan y fusionan con la membrana del Golgi liberando allí su carga y completando, de esta forma, la primera etapa de transporte anterógrado de la ruta secretora.

### 3.1. Exportación desde el retículo endoplásmico

Las proteínas citosólicas de cubierta COPII son reclutadas selectivamente a la membrana de los ERES donde tras ensamblarse deforman la membrana para generar una vesícula lipídica a la vez que concentran a las proteínas carga en dicha vesícula haciendo efectiva su exportación del RE.

#### 3.1.1. Estructura y ensamblaje de la cubierta COPII

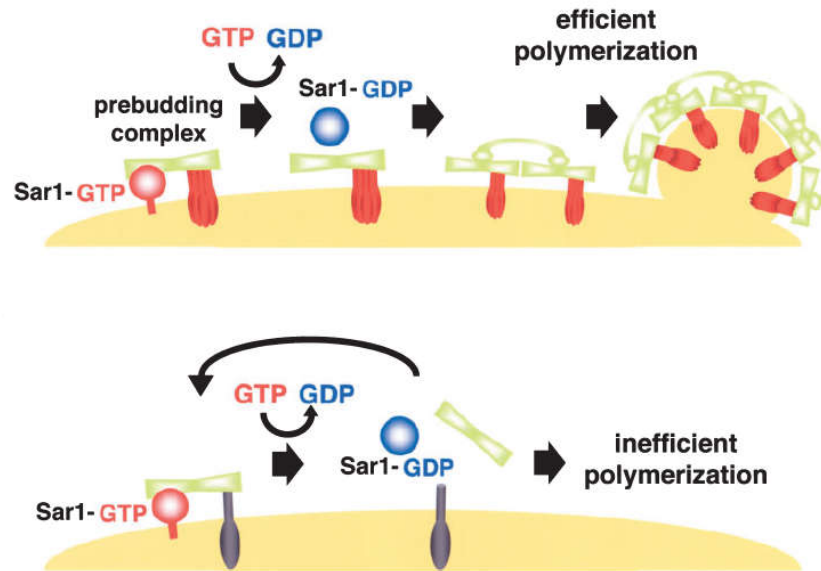
El ensamblaje de la cubierta COPII en la membrana del ERES se inicia con el reclutamiento y activación de la proteína G pequeña Sar1, a través del intercambio de GDP por GTP, catalizado por Sec12, una proteína integral de membrana del RE que actúa como GEF de Sar1. La forma activa de Sar1 despliega una  $\alpha$ -hélice anfipática N-terminal que permite su asociación estable con la membrana. Sar1-GTP recluta a la capa interna de la cubierta, formada por Sec23-24. Sec24 interacciona con las moléculas carga transmembrana separándolas de las residentes del RE y concentrándolas en la vesícula naciente, mientras que Sec23 tiene actividad GAP sobre Sar1.

Una vez formado, el complejo cebador o *prebudding complex* (Sar1-Sec23-Sec24-molécula carga transmembrana) recluta a su vez a la capa externa de la cubierta, formada por Sec13-Sec31. La proteína Sec31 estimula la actividad GAP de Sec23, de forma que Sar1 hidroliza su GTP y vuelve al citosol en su estado inactivo unido a GDP. En este momento, las proteínas de cubierta quedan asociadas a la membrana gracias a su interacción con las moléculas carga transmembrana, y Sar1-GDP puede iniciar un nuevo ciclo de actividad. Sar1 estaría por tanto continuamente asociándose y dissociándose de las membranas del RE, promoviendo la concentración de las cargas, que son clave para estabilizar los complejos cebadores, y por tanto para promover la polimerización eficiente de la cubierta y la formación de la vesícula (Sato & Nakano, 2007) (Figura 6).

Además de esta función, Sar1 contribuye a discriminar las proteínas carga relevantes de las que no (Sato & Nakano, 2005), y a promover la escisión de la vesícula naciente (Bielli et al, 2005; Hariri et al, 2014).

Aunque la incorporación de la hélice de Sar1, junto a la forma cóncava del dímero Sec23-Sec24 contribuyen a la deformación inicial de la membrana, parece ser la capa externa formada por Sec13-Sec31 la que tiene una mayor capacidad para generar la red proteica que da forma esférica a la vesícula, gracias a su mayor rigidez estructural,

que contribuiría a contrarrestar la curvatura presente en una membrana rica en proteínas carga completamente luminales (Copic et al, 2012).



**Figura 6. Modelo de formación de las vesículas COPII dependiente de la carga.** Cuando en los ERES hay suficiente número de moléculas carga, los complejos cebadores se estabilizan sobre la membrana del RE y favorecen el ensamblaje de la cubierta COPII (parte superior de la imagen). Si la cantidad de moléculas carga es demasiado escasa o éstas no están correctamente ensambladas, no se formarán ni se estabilizarán los complejos cebadores necesarios para ensamblar la cubierta COPII (parte inferior de la imagen) (Adaptado de (Sato, 2004)).

Finalmente, también se han descrito modificaciones post-traduccionales de la cubierta COPII que podrían regular su función, como la ubiquitinación y la fosforilación. Por un lado, Sec23 es diana de ubiquitinación y parece ser rescatada de la degradación gracias a Bre5/Ubp3 (Cohen et al, 2003). Además, Sec31 también es susceptible de ubiquitinación en mamíferos (Jin et al, 2012), aunque no se ha discernido aún el papel de estas modificaciones en la función de COPII. Por otra parte, la cubierta COPII también es susceptible de fosforilación. Sec31 es una fosfoproteína cuya desfosforilación afecta al transporte RE-Golgi (Salama et al, 1997), pero la función exacta de esta modificación aún requiere más investigación. Por otro lado, se sabe que la quinasa residente de Golgi Hrr25p fosforila a Sec23p/Sec24p cuando la vesícula COPII contacta con este orgánulo y no antes, promoviendo la despolimerización de la cubierta sólo cuando la vesícula haya llegado a su destino, ya que esta cubierta es necesaria para los eventos de anclaje previos a la fusión (Lord et al, 2011).

### 3.1.2. Incorporación de la carga en la vesícula COPII

A excepción de unas pocas proteínas de secreción extraordinariamente abundantes como la albúmina y la quimiotripsina que se incorporan en las vesículas COPII de forma pasiva e inespecífica mediante el proceso denominado *Bulk Flow* (Thor et al, 2009), el resto de proteínas carga se incorpora eficientemente de forma activa interaccionando directa o indirectamente con la subunidad de la cubierta COPII Sec24. Existen muchas proteínas de secreción que no pueden interaccionar directamente con la cubierta COPII, bien porque son completamente luminales o bien porque sus dominios citosólicos carecen de señales adecuadas. En este caso, es necesaria la intervención de proteínas adaptadoras que reconozcan a esas proteínas y las conecten con la cubierta COPII. Estos adaptadores reciben tradicionalmente el nombre de receptores de carga (Dancourt & Barlowe, 2010) y serán descritos en el apartado 6.

Sec24 contiene diferentes dominios o bolsillos de interacción con moléculas carga transmembrana. La señal consenso propuesta para la unión a las cubiertas COPII estaría formada por motivos di-aromáticos como la di-fenilalanina (Malkus et al, 2002), aunque Sec24 también es capaz de reconocer otras señales como por ejemplo la presencia de epítopos plegados (Mancias & Goldberg, 2007). La existencia de diferentes isoformas de Sec24 (Sec24A, B, C y D en mamíferos, y Lst1p/Sfb3p y Iss1p/Sfb2p en levaduras) aumenta aún más el repertorio de cargos distintos que la cubierta es capaz de incorporar a las vesículas. Se piensa que cada isoforma de Sec24 ayudaría a superar las dificultades topológicas y estéricas que cada tipo específico de proteína carga presenta para incorporarse eficientemente en una determinada vesícula COPII (D'Arcangelo et al, 2013; Miller et al, 2003).

Las proteínas carga han sido tradicionalmente consideradas elementos o pasajeros pasivos de las vesículas COPII. Sin embargo, en los últimos años se han obtenido evidencias de que estas pueden regular activamente la formación, tamaño y composición de la cubierta COPII. Este papel regulador de las proteínas carga es en parte consecuencia de la gran variabilidad en su tamaño, topología y propiedades físicas a las cuales debe ajustarse la propia cubierta COPII para exportarlas eficientemente del RE según las necesidades que la célula tenga en cada momento (D'Arcangelo et al, 2013). De hecho, nuestro laboratorio ha descrito recientemente un mecanismo por el cual la célula ajusta la producción de vesículas COPII especializadas a la cantidad y calidad de cargas luminales que están listas para abandonar el RE, en concreto de las proteínas ancladas a GPI (GPI-APs) (Manzano-

Lopez et al, 2015). Las GPI-APs son proteínas luminales ancladas a la membrana por el glicolípido GPI, que una vez se ancla a la parte proteica sufre una serie de modificaciones denominadas en su conjunto “remodelación”. De esta forma, se ha observado en levaduras que el receptor de carga p24 se une a las GPI-APs como una lectina, reconociendo el glicano remodelado del GPI. La unión a la carga remodelada hace que el complejo p24 reclute a una cubierta COPII específica, Lst1p, que se requiere específicamente para la exportación del RE de las GPI-APs. Así, parece que el reclutamiento de la cubierta COPII por los receptores de carga no es constitutivo, sino que está activamente regulado por la unión de los sustratos maduros. De esta manera, existe una conexión funcional entre la maduración de las cargas luminales y la formación de vesículas COPII.

### **3.1.3. Formación de los sitios de salida del retículo, ERES**

Los ERES parecen estar definidos por las proteínas Sec16 y Sec12 (Connerly et al, 2005; Rossanese et al, 1999; Watson et al, 2005), y la composición lipídica del RE también parece influir (Shindiapina & Barlowe, 2010). Sec16 es una proteína esencial de gran tamaño, que se asocia a la cara citosólica del RE, donde interacciona con todos los componentes de COPII (Gimeno et al, 1996; Shaywitz et al, 1997) y por ello se piensa que actúa como andamio u organizador de los ERES (Shindiapina & Barlowe, 2010; Supek et al, 2002) quedando posteriormente excluida de las vesículas nacientes. Sin embargo, otros autores apuntan que Sec16 no actuaría como un andamio, sino que los ERES se organizarían gracias al anclaje o *tethering* con el *cis*-Golgi y una vez formados serían regulados por Sec16 (Glick, 2014). Por otro lado, algunos estudios sugieren que la proteína Sec16 también modula la actividad de la cubierta (Kung et al, 2012; Yorimitsu & Sato, 2012). Así, se ha propuesto que Sec16 reduce el efecto potenciador de la actividad GAP que ejerce Sec31 sobre Sec23, de forma que la actividad GAP se incrementa junto con el tamaño de la vesícula a medida que Sec16 es excluido de esta (Kung et al, 2012).

Los ERES se localizan de forma dispersa a lo largo del retículo, en regiones con una alta curvatura local de membrana inducida por las proteínas de membrana Rtn1p, Rtn2p y Yop1p (Okamoto et al, 2012). Estos sitios son altamente dinámicos, pudiéndose formar *de novo*, fusionarse y dividirse (Bevis et al, 2002; Stephens, 2003). Estudios realizados en células de mamífero han puesto de manifiesto que tanto el tamaño como el número de ERES se adaptan a la cantidad de proteínas carga que deben ser exportadas, lo que le permite a la célula responder a necesidades de secreción cambiantes (Farhan et al, 2008). Sin embargo, los mecanismos precisos que

regulan la distribución *steady-state* y el tamaño de estos dominios no están bien descritos aún. Tampoco se conoce bien el papel de los ERES en el control de calidad que permite excluir activamente de estos dominios a proteínas inmaduras o mal plegadas (Castillon et al, 2009; Mezzacasa & Helenius, 2002)

Finalmente, se ha descrito la existencia de ERES especializados que concentran cargas específicas y que generan vesículas COPII diferentes a las convencionales. En levadura, las proteínas ancladas a GPI se concentran en ERES distintos a los del resto de proteínas de secreción, mientras que en mamíferos esto ocurre con proteínas carga muy grandes como las fibras de colágeno (Muniz et al, 2001; Saito et al, 2009).

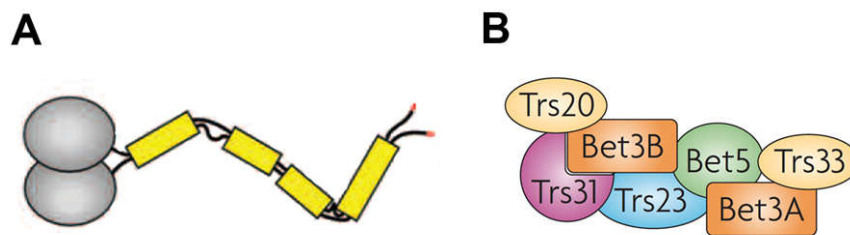
## **3.2. Reconocimiento y fusión de las vesículas COPII con el aparato de Golgi**

Tras la liberación de las vesículas COPII, éstas deben alcanzar el ERGIC en mamíferos, o bien el compartimento *cis* del Golgi en la levadura. Entonces, las vesículas son ancladas a través de sus proteínas de cubierta gracias a la acción de la GTPasa Rab1/Ypt1p, y los factores de anclaje p115/Usolp y el complejo TRAPPI. Esta estabilización de la vesícula facilita y promueve la interacción entre las SNAREs presentes en la vesícula y en la membrana del Golgi (Barlowe & Miller, 2013). Cómo se coordinan la formación, el anclaje y la fusión de las vesículas COPII ha generado un extenso debate que aún hoy prosigue. A continuación, se expondrán los mecanismos moleculares descritos hasta la fecha.

### **3.2.1. Anclaje de las vesículas COPII a la membrana del Golgi**

Inicialmente, se identificó en levadura a la Rab GTPasa Ypt1p (Rab1 en mamíferos) como una proteína implicada en dirigir a las vesículas COPII hacia el aparato de Golgi (Baker et al, 1990; Schmitt et al, 1988; Segev et al, 1988). Posteriormente, se observó que Ypt1p actuaba junto a la proteína *coiled-coil* Usolp (p115 en mamíferos) (Figura 7 A) para anclar a las vesículas COPII a las membranas del Golgi (Barlowe, 1997; Nakajima et al, 1991), siendo estas dos proteínas suficientes por sí solas para producir el anclaje en ensayos *in vitro* (Cao et al, 1998; Sapperstein et al, 1996). Aun así, la longitud de Usolp, de unos 180 nm en su conformación extendida (60 nm en mamíferos) (Sapperstein et al, 1995; Yamakawa et al, 1996), no era suficiente para explicar el anclaje de las vesículas *in vivo*. Más tarde, se describió el complejo multiproteico TRAPPI (Figura 7 B), formado por seis subunidades (Bet3p,

Bet5p, Trs20p, Trs23p, Trs31p, y Trs33p) y con unas dimensiones aproximadas de 18 nm x 6 nm x 5 nm (Kim et al, 2006). TRAPPI es necesario para el transporte RE-Golgi (Rossi et al, 1995; Sacher et al, 1998) y se ha visto que puede promover *in vitro* la unión entre vesículas COPII y las membranas del Golgi (Sacher et al, 2001). Además, se ha demostrado la interacción directa entre la subunidad Bet3p de TRAPPI y la subunidad Sec23p de la cubierta COPII (Cai et al, 2007b).

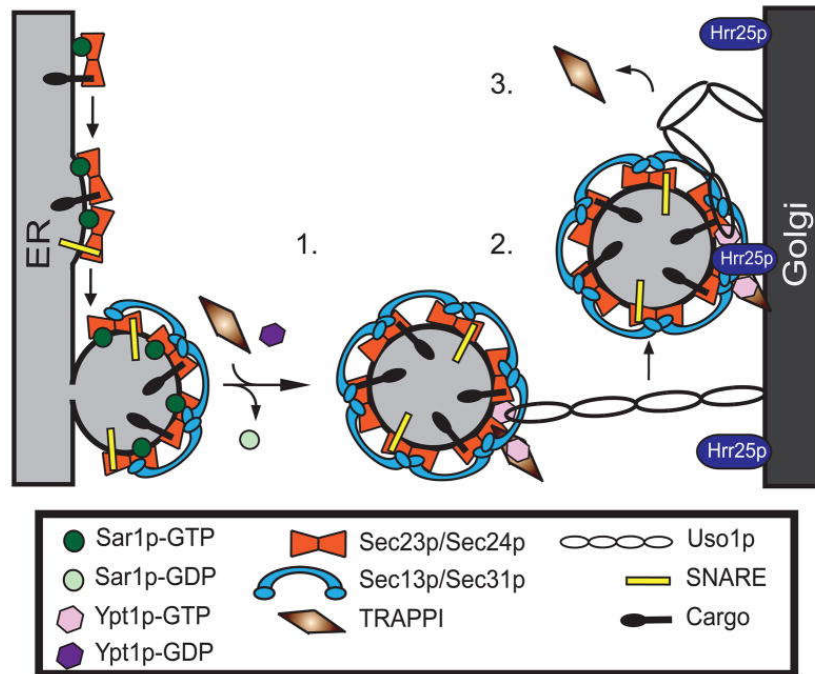


**Figura 7. Estructura de p115/Usolp y del complejo TRAPPI.** (A) p115 tiene un dominio globular N-terminal (gris) seguido de cuatro regiones *coiled-coil* (amarillo) y un dominio ácido C-terminal (rojo). *In vivo* forma un homodímero (Grabski et al, 2012). (B) El complejo TRAPPI está formado por seis subunidades (Bet3p, Bet5p, Trs20p, Trs23p, Trs31p, y Trs33p), habiendo una copia de cada una de ellas excepto de Bet3p, de la cual hay dos copias (Barrowman et al, 2010).

Actualmente, el modelo propuesto para el anclaje de las vesículas COPII al Golgi es el que se comenta a continuación (Figura 8). Una vez que la vesícula COPII se ha formado y Sar1p se ha liberado, Sec23p recluta a TRAPPI a la vesícula. Este complejo tiene actividad GEF sobre Ypt1p, con lo cual promueve su activación en las vesículas COPII. Entonces, Ypt1-GTP interacciona con su efector Uso1p, de forma que lo recluta a la vesícula. A continuación, Uso1p se une al Golgi y se dobla, acercando así la vesícula a la membrana del Golgi, promoviéndose la liberación del complejo TRAPPI de la vesícula. En este momento, Hrr25p, una quinasa residente en el Golgi, fosforila a Sec23p/Sec24p, despolimerizándose entonces la cubierta COPII, y pudiendo finalmente interactuar las SNAREs entre sí para promover la fusión. Mediante este mecanismo, la fosforilación de Sec23p/Sec24p por la quinasa de Golgi Hrr25p regula la interacción entre la cubierta y TRAPPI, de forma que Sec23p interacciona secuencialmente con Sar1p, TRAPPI y Hrr25p, controlando que este transporte ocurra en la dirección adecuada y que la vesícula no se despolimerice hasta que llegue a su compartimento aceptor (Lord et al, 2011). Finalmente, se ha propuesto a la fosfatasa



Sit4p como responsable del reciclaje de las cubiertas COPII mediante su desfosforilación (Bhandari et al, 2013).



**Figura 8. Anclaje de las vesículas COPII al aparato de Golgi.** (1) Cuando el GTP de Sar1p es hidrolizado, el complejo TRAPPI es reclutado a las vesículas COPII a través de la subunidad de COPII Sec23p. (2) TRAPPI activa a Ypt1p, que interacciona con su efector Uso1p reclutándolo a la vesícula. A continuación, Uso1p se une al Golgi. (3) Cuando Uso1p se dobla, aproxima la vesícula a la membrana del Golgi. Entonces, TRAPPI es liberado de la vesícula y la quinasa Hrr25p fosforila a Sec23p/Sec24p. De esta forma, la cubierta se despolimeriza y permite que las SNAREs interaccionen y se promueva la fusión. De esta forma la vesícula no se despolimerizaría hasta que llegara a su compartimento aceptor, asegurando que la fusión ocurra sólo en el lugar correcto (Lord et al, 2011).

TRAPPI no parece interactuar directamente con Uso1p, aunque el hecho de que active a Ypt1p implica que este complejo constituiría un elemento coordinador de este evento de transporte, promoviendo la interacción entre Uso1p y la forma activa de Ypt1p (Barlowe & Miller, 2013).

Por otro lado, estudios muy recientes han implicado a la auxilina, una chaperona que interviene en la despolimerización de las cubiertas de clatrina, en la despolimerización previa a la fusión de las cubiertas COPII y COPI. Así, la auxilina interacciona genética y físicamente con subunidades de COPII y COPI, y bloquea la fusión de las vesículas COPII (Ding et al, 2016).

No obstante, además de Uso1p se han descrito otros factores de anclaje *coiled-coil* que también actúan en este evento de transporte, como la proteína de *cis*-Golgi Grh1p (GRASP65). En mamíferos, GRASP65 recluta a la GM130 al *cis*-Golgi. En levaduras, no se ha descrito un homólogo claro de GM130, pero Grh1p forma un complejo con otra proteína *coiled-coil*, Bug1p. Aunque ninguna de ellas es esencial, su delección reduce el anclaje de vesículas COPII y los niveles de transporte *in vitro*, de hecho, Grh1p interacciona con Sec23p y Sec24p. Además, sus mutaciones nulas presentan interacciones genéticas negativas fuertes con mutantes de *YPT1* y *USO1*. En este sentido, *SLY1-20*, un mutante dominante de Sly1p (proteína SM), es incapaz de rescatar a dichos mutantes en ausencia de Grh1p o Bug1p (Behnia et al, 2007). GRASP65 y GM130 interaccionan con Rab1-GTP (Moyer et al, 2001), pero no se sabe si Grh1p y Bug1p interaccionan con Ypt1p (Angers & Merz, 2011).

Finalmente, en mamíferos se encuentran presentes otras muchas golginas (proteínas *coiled-coil* asociadas al *cis*-Golgi), al menos dos de las cuales están conservadas en levaduras, Coy1p (CASP) y Rud3p (GMAP-210), que están implicadas en la organización del aparato de Golgi y la ruta secretora temprana (Gillingham et al, 2002; Gillingham et al, 2004; Roboti et al, 2015; VanRheenen et al, 1999). En mamíferos también se ha descrito recientemente que diferentes sets de golginas reconocen específicamente a vesículas de distintos orígenes, de forma que ayudan a definir la identidad de las distintas cisternas del Golgi. Además, existe cierta redundancia entre estas proteínas, ya que subgrupos de distintas golginas parecen reconocer vesículas provenientes del mismo orgánulo (Wong & Munro, 2014).

En conjunto, estos hallazgos ponen de manifiesto una red redundante de proteínas *coiled-coil* que garantiza el anclaje de las vesículas COPII y por tanto la organización de la cara *cis* del Golgi (Barlowe & Miller, 2013), aunque el papel que desempeña cada una de ellas y su regulación aún no se ha conseguido discernir por completo.

### **3.2.2. Fusión de las vesículas COPII con la membrana del Golgi**

Tras la despolimerización de la cubierta, la v-SNARE Bet1p interacciona con las t-SNAREs Sed5p, Sec22p y Bos1p, a través del enrollamiento de sus dominios alfa-hélice entre sí, formando un complejo estable de SNAREs en *trans* que promueve la fusión de las membranas (Barlowe & Miller, 2013; Cao & Barlowe, 2000; Malsam & Sollner, 2011). Estas cuatro proteínas son suficientes para catalizar esta fusión *in vitro* (Parlati et al, 2000).

Además de las SNAREs, la proteína Sly1p/SCDF1, miembro de la familia de proteínas SM (Sec1/Munc18-1), es necesaria para la fusión de las vesículas COPII al Golgi. Esta proteína se une directamente a Sed5p/Syntaxina-5, aumentando la fidelidad del ensamblaje de las cuatro SNAREs y estabilizando el complejo *trans*-SNARE (Ferguson et al, 2009; Peng & Gallwitz, 2002). La forma de actuación exacta y la regulación de la actividad de Sly1 siguen aún sin dilucidar por completo.

Una vez que se ha completado la fusión, Bet1p, Sed5p, Sec22p y Bos1p se encuentran en la misma membrana formando un complejo estable en *cis*. Con el fin de reciclar estas SNAREs para futuras rondas de transporte, es necesaria la intervención de la proteína Sec18p/NSF junto con Sec17p/SNAP, que desensamblan el complejo SNARE. Sec17p recluta sobre el tetrámero de SNAREs a Sec18p, una chaperona con actividad ATPasa que disocia a las SNAREs (Bonifacino & Glick, 2004).

### **3.3. Modelo alternativo de transporte anterógrado**

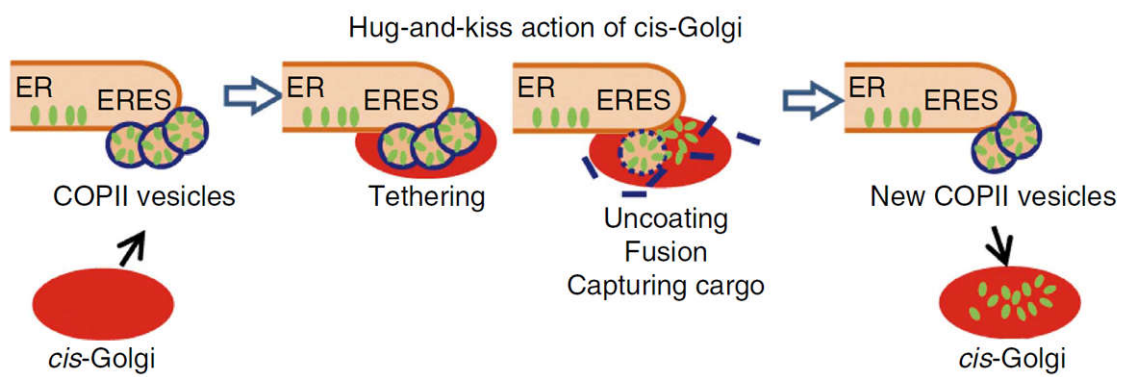
Tradicionalmente, se ha pensado que durante el transporte anterógrado RE-Golgi, las vesículas COPII que se forman en los ERES, se liberan y viajan por el citosol hasta alcanzar el *cis*-Golgi (o el ERGIC en mamíferos) con el cual se fusionan para liberar su contenido. Sin embargo, recientemente se ha propuesto en levaduras un modelo alternativo a esta visión clásica, según el cual las vesículas COPII no tendrían por qué ser liberadas al citosol necesariamente (Kurokawa et al, 2014).

Este nuevo modelo propone que en la levadura *S. cerevisiae* el *cis*-Golgi se acerca a los ERES y contacta con ellos. Durante este contacto, la cubierta COPII se despolimeriza y el *cis*-Golgi captura a las cargas de la vesícula que no ha llegado a liberarse. Entonces, este *cis*-Golgi cargado con las proteínas de secreción abandona los ERES de nuevo (Kurokawa et al, 2014). Este modelo cambia la visión tradicional del transporte anterógrado, ya que es el *cis*-Golgi el que se acerca al RE, y no las vesículas COPII las que alcanzan el *cis*-Golgi (Figura 9).

Así, este comportamiento “*hug-and-kiss*” aseguraría un transporte de la carga más eficiente y dirigido desde los ERES al *cis*-Golgi. De esta forma la función primaria de la cubierta COPII sería la de concentrar las proteínas carga en un dominio del RE. Allí podrían ser capturadas por el *cis*-Golgi antes de que la vesícula COPII se libere al citosol, lo cual parece un mecanismo mucho más seguro, y también explicaría por qué no se encuentran con facilidad vesículas COPII libres en micrografías electrónicas de células creciendo normalmente. No obstante, las evidencias presentadas no eliminan

la posibilidad de que las vesículas COPII se liberen y sean inmediatamente capturadas por el *cis*-Golgi.

Este estudio plantea algunas cuestiones que se deben estudiar en el futuro, por ejemplo, cómo el *cis*-Golgi encontraría a los ERES, proponiendo los autores como posibles candidatos a los factores de anclaje TRAPPI y Uso1p. Otra cuestión sería, teniendo en cuenta el modelo de maduración cisternal del Golgi, si el *cis*-Golgi que captura a las cargas en los ERES maduraría tras el contacto con estos, o si habría dos poblaciones distintas de compartimentos *cis* del Golgi, una que realizaría la captura de la carga, y otra que maduraría para realizar las funciones de glicosilación.



**Figura 9. Modelo de transporte RE-Golgi de la carga por la acción “hug-and-kiss” del *cis*-Golgi.** Los ERES se localizan en dominios de alta curvatura del RE, y la proteína carga (verde) que se sintetiza se va acumulando en ellos. El *cis*-Golgi (rojo) se acerca y contacta (“hug-and-kiss”) el ERES. Durante el contacto entre las vesículas COPII y el *cis*-Golgi, la cubierta COPII (azul) se despolimeriza. El *cis*-Golgi que ha recibido la carga abandona finalmente el ERES (Kurokawa et al, 2014).

#### 4. Transporte retrógrado desde el Golgi al retículo endoplásmico

Esta etapa de transporte, mediada por vesículas con cubierta COPI, es esencial para asegurar el equilibrio de la ruta secretora temprana, manteniendo el balance entre las membranas que parten y que retornan de cada orgánulo. Del mismo modo, el reciclaje para nuevas rondas de transporte de la maquinaria transmembrana que parte del RE en las vesículas COPII, y la recuperación de proteínas endógenas del RE y proteínas mal plegadas que escapan del RE por *bulk flow*, depende del transporte retrógrado mediado por las proteínas COPI. Prueba de ello es que en *S. cerevisiae*, las

mutaciones de la maquinaria COPI producen a largo plazo defectos en el transporte anterógrado mediado por COPII (Gaynor & Emr, 1997).

## **4.1. Formación de vesículas COPI en el Golgi**

Mientras el papel del transporte mediado por la cubierta COPI a través del aparato de Golgi sigue siendo objeto de debate, su función en el transporte vesicular retrógrado desde el Golgi al RE está bien establecida.

### **4.1.1. Composición y estructura de la cubierta COPI**

Las cubiertas COPI están constituidas principalmente por el coatómero, un complejo proteico formado por siete subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ -COP, que en levaduras corresponden con las proteínas Cop1p/Ret1p/Sec33p, Sec26p, Sec27p, Sec21p, Ret2p, Sec28p y Ret3p, respectivamente. Aunque, a diferencia de las proteínas COPII, el coatómero es un único complejo proteico estable, sí se diferencian dos regiones especializadas en el mismo, una capa interna que se une a las moléculas carga formada por las subunidades  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\zeta$ -COP, y una capa externa formada por  $\alpha$ ,  $\beta'$ , y  $\epsilon$ -COP (Barlowe & Miller, 2013).

Estudios recientes de cristalografía y microscopía electrónica han puesto de manifiesto que la estructura de las cubiertas COPI presenta alta homología con las proteínas COPII, aunque también rasgos mixtos con las cubiertas de clatrin (cubiertas que actúan en el transporte post-Golgi y la endocitosis). La capa interna de las COPI parece ser similar a la del adaptador de clatrin AP2 (Yu et al, 2012). Sin embargo, la capa externa es similar tanto a las cubiertas COPII como a las clatrin (Lee & Goldberg, 2010).

### **4.1.2. Regulación de la polimerización de la cubierta COPI**

Del mismo modo que para las cubiertas COPII, el ensamblaje de las cubiertas COPI se inicia gracias a una GTPasa pequeña, en este caso Arf1, la cual al activarse despliega una  $\alpha$ -hélice que también contiene un grupo miristoilo que facilita la inserción en la membrana (Antonny et al, 1997). A diferencia de Sar1, que solamente funciona en la cubierta COPII, Arf1 no sólo está implicada en la formación de vesículas COPI, sino que también actúa en la formación de las vesículas de clatrin. Esta multifuncionalidad se logra gracias a que Arf1 presenta diferentes elementos

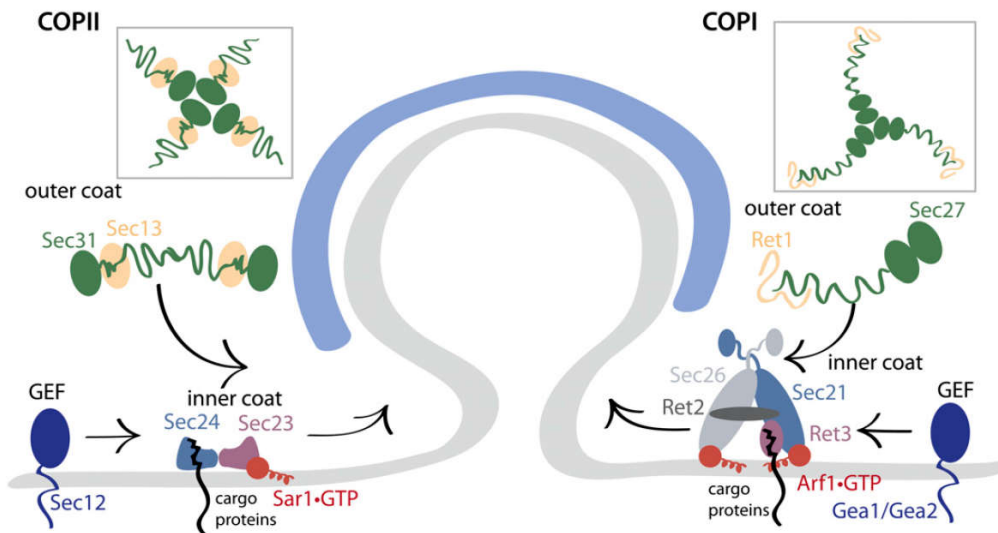
reguladores de su actividad en cada etapa de transporte, representados por diferentes tipos de proteínas GEF y GAP (Rein et al, 2002).

El intercambio de GDP por GTP es llevado a cabo por la familia de proteínas que contienen el dominio Sec7, en el que reside la actividad GEF. Estas proteínas son GBF1, BIG1 y BIG2 en mamíferos, y Gea1p, Gea2p y Sec7p en *S. cerevisiae* (Sata et al, 1999). Las GEF Sec7p/BIG1/BIG2 actúan en el *trans*-Golgi facilitando el papel de Arf1 en la formación de vesículas de clatrina, mientras que las proteínas Gea1p/Gea2p/GBF1 participan en la formación de vesículas COPI (Park et al, 2005; Peyroche et al, 1996; Spang et al, 2001). Respecto a la actividad GAP, esta no se lleva a cabo por un componente del coatómero, sino que depende de otras tres proteínas en mamíferos, ARFGAP1/2/3, y de dos en levaduras, Glo3p y Gcs1p (Poon et al, 2001).

Tanto las ARF-GEFs como Arf1 son proteínas citosólicas, y se ha propuesto que se apoyen en elementos adicionales que cooperen en su asociación a las membranas del Golgi (Chantalat et al, 2003; Monetta et al, 2007). Así, el reclutamiento de GBF1 depende de la GTPasa Rab1b (Alvarez et al, 2003; Monetta et al, 2007). Además, se han sugerido varias proteínas transmembrana como posibles receptores, por ejemplo, la proteína transmembrana GMH1/Gmh1p para GBF1 y Gea1/2p respectivamente (Chantalat et al, 2003); y el complejo p24 y la SNARE membrana para Arf1 (Gommel et al, 2001; Honda et al, 2005). No obstante, aún no se conoce el papel real de estas interacciones.

Respecto a las Arf-GAPs, Gcs1p sería el homólogo de ARFGAP1, y Glo3p se correspondería estructural y funcionalmente con ARFGAP2 y ARFGAP3 (Spang et al, 2010). ARFGAP1/Gcs1p es capaz de detectar la curvatura de la membrana gracias a la presencia de dos dominios ALPS (*Amphipathic Lipid Packing Sensor*) (Ambroggio et al, 2010). Sin embargo, esta proteína no presenta interacciones físicas con el coatómero, por lo que sería insuficiente para promover la polimerización de la cubierta por sí misma. Por eso se ha propuesto que el papel de ARFGAP1/Gcs1p se restringiría a la región donde se curva la membrana durante las etapas de maduración y la escisión de la vesícula COPI (Hsu & Yang, 2009). Por el contrario, Glo3p y sus homólogos carecen de dominios ALPS pero sí son capaces de unir al coatómero eficientemente. Es más, se ha comprobado que el coatómero induce fuertemente la actividad GAP de Glo3p, por lo que se ha postulado un mecanismo de regulación muy parecido al que tiene lugar en el sistema COPII (Figura 10). Una vez formado el complejo cebador integrado por Arf1p, el coatómero, la GAP Glo3p y las moléculas

carga, la interacción coatómero-Glo3p estimula rápidamente la actividad GAP que a su vez hace que Arf1p hidrolice su GTP y se desprege ya inactivo de la membrana. La cubierta formada en este caso por el coatómero y Glo3p se mantiene unida a la membrana a través de las proteínas carga (Aguilera-Romero et al, 2008; Hsu et al, 2009; Spang et al, 2010).



**Figura 10. Ensamblaje comparado de las cubiertas COPII y COPI.** Ambas cubiertas, COPII (izquierda) y COPI (derecha), comienzan su polimerización por la activación de una GTPasa pequeña, Sar1 y Arf1 respectivamente. A continuación, y gracias a la interacción con proteínas carga, la capa interna de la cubierta COPII es reclutada, o el coatómero COPI al completo. Después, en el caso de las COPII, la capa externa es reclutada. Ambas cubiertas polimerizan formando un entramado esférico que deforma progresivamente la membrana generando la vesícula. En el caso de las cubiertas COPII, en la cubierta externa formada por Sec13/Sec31, cuatro subunidades de Sec31 se enfrentan para formar los vértices de la “jaula”. En el caso de las cubiertas COPI las subunidades  $\alpha$  y  $\beta'$  (Ret1p y Sec27p), conforman una estructura en trísquela en los vértices (Barlowe & Miller, 2013).

Por último, la escisión o liberación de la vesícula COPI naciente de la membrana del Golgi es un proceso muy complejo y poco conocido, en el que parecen intervenir de forma coordinada una gran variedad de moléculas como el ácido fosfatídico, el diacilglicerol, el propio Arf1, unas proteínas denominadas BARS y la fosfolipasa D2 entre otras (Hsu et al, 2009; Hsu & Yang, 2009).

#### 4.1.3. Reconocimiento de la carga por la cubierta COPI

Como en otros eventos de transporte, la incorporación de las moléculas carga en las vesículas COPI ocurre a través de señales reconocidas por la cubierta, siendo las

mejor descritas la señal di-lisina K(X)KXX para las proteínas transmembrana y la señal K/HDEL para las proteínas solubles.

Las proteínas solubles emplean a la proteína Erd2p (receptor KDEL en mamíferos) como receptor/adaptador para poder unirse a la cubierta. Este receptor reconoce por su cara luminal el motivo K/HDEL y presenta en su fracción citosólica la señal di-lisina.

Las proteínas transmembrana que deben volver al RE presentan la señal K(X)KXX en su extremo carboxilo, que parece ser reconocida por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta'$ -COPI (Cosson & Letourneur, 1994; Eugster et al, 2004; Ma & Goldberg, 2013). Del mismo modo, el coatómero también puede reconocer por las subunidades  $\beta$  y  $\delta$ -COP otros motivos di-básicos como RXR (Cosson et al, 1998; Michelsen et al, 2007). Además, la subunidad  $\gamma$ -COP puede interactuar con motivos di-aromáticos como la di-fenilalanina, como sucede con el complejo p24 (Bethune et al, 2006).

El receptor de carga Rer1 también tiene un papel esencial en el transporte retrógrado Golgi-RE, al ser el encargado de la recuperación de proteínas transmembrana del RE que escapan por *bulk flow* como Sec12 o Sec63, uniéndose a sus dominios transmembrana (Sato et al, 1997).

Además, recientemente se ha descrito el papel del complejo Erv41p-Erv46p como receptor retrógrado de la enzima Glc1p (glucosidasa I) cuando esta ha escapado al Golgi (Perez-Linero & Muniz, 2015; Shibuya et al, 2015).

El transporte retrógrado Golgi-RE también desempeña un importante papel en el control de calidad de las nuevas proteínas de secreción, devolviendo al RE aquellas proteínas mal plegadas o mal ensambladas que han escapado hasta el Golgi, evitando así su avance por la ruta secretora. Así, las proteínas mal plegadas tienen unidas chaperonas que son reconocidas por Erd2 y son recuperadas. También se ha propuesto la existencia de receptores específicos como VIP36, que reconoce proteínas mal glicosiladas (Reiterer et al, 2010). Por otro lado, algunas formas monoméricas de subunidades de complejos que escapan sin oligomerizar, pueden ser devueltas al RE, gracias a que quedan expuestas señales de reciclaje (como KKXX) que sólo se enmascaran tras la oligomerización (Mallabiabarrena et al, 1992; Sacristan et al, 2013).

Finalmente, cabe destacar la importancia de las proteínas carga en la potenciación de la formación de las vesículas COPI. En la levadura, las proteínas p24 unen específicamente a Glo3p y al coatómero. De este modo, los estabilizan en la

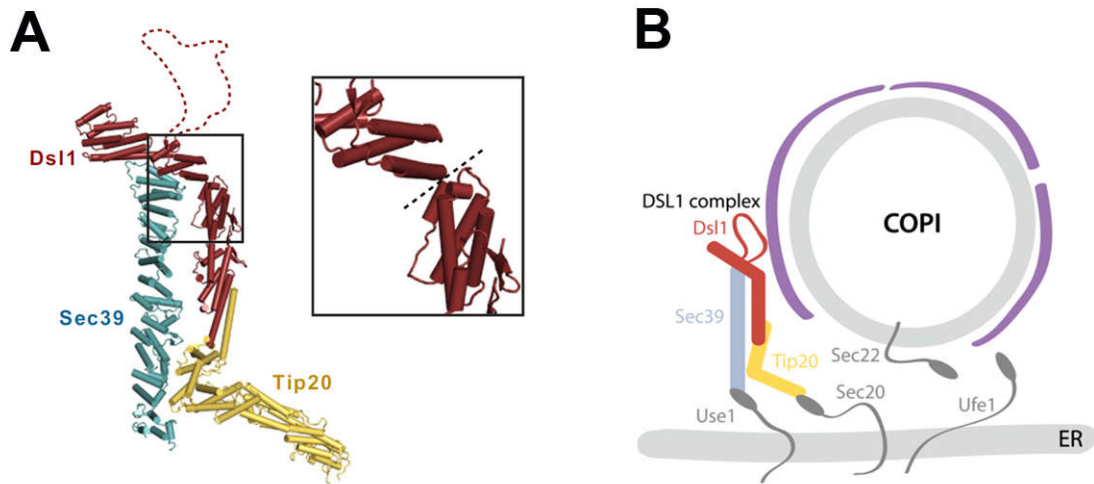


membrana del Golgi y promueven la formación de complejos cebadores que estimulan la producción de vesículas COPI. Así, la ausencia de la familia de proteínas p24 compromete la formación de las vesículas COPI en *S. cerevisiae* (Aguilera-Romero et al, 2008). También se ha visto que las señales di-lisina de las proteínas p24 son esenciales para la formación de las vesículas COPI a partir de liposomas de composición similar a las membranas del Golgi de mamíferos (Bremser et al, 1999). Además, se ha observado que las proteínas p24 de mamíferos tienen la capacidad de ralentizar la actividad GTPasa de Arf1, pudiendo estabilizar así a la cubierta sobre las membranas (Goldberg, 2000). Por otro lado, la sobreexpresión de proteínas con señales di-lisina como Mst27p es capaz de recuperar la letalidad de la mutación *sec21-1* (Sandmann et al, 2003).

## **4.2. Anclaje y fusión de las vesículas COPI al retículo endoplásmico**

Al igual que los restantes pasos de transporte descritos, el transporte retrógrado Golgi-RE emplea un factor de anclaje, que en este caso es el complejo Dsl1. Este complejo está constituido por tres subunidades: Dsl1p, Tip20p y Dsl3p (Sec39p) en levaduras. Todas son proteínas esenciales, y mutantes termosensibles de los genes que las codifican presentan defectos en la fusión de las vesículas COPI con el RE (Kamena & Spang, 2004), así como interacción genética negativa con los mutantes condicionales de las SNAREs implicadas (Kraynack et al, 2005).

El complejo Dsl1 se encuentra unido a la membrana del RE a través de la interacción física de sus subunidades Tip20p y Dsl3p con las SNAREs Sec20p y Use1p respectivamente (Ren et al, 2009; Tripathi et al, 2009). Por otro lado, la subunidad Dsl1p presenta un lazo flexible que interacciona con las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ -COPI de la cubierta (Zink et al, 2009) (Figura 11).



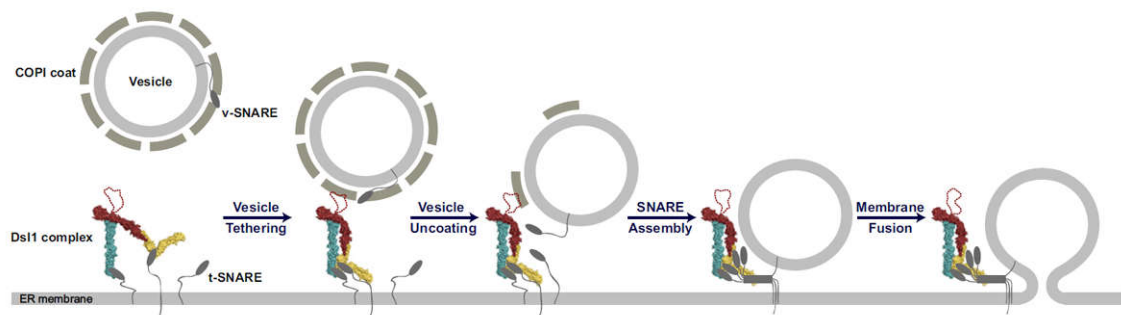
**Figura 11. Estructura del complejo Dsl1 e interacción con SNAREs y cubierta COPII.** (A) Modelo del complejo Dsl1 basado en estructuras cristalizadas. Dsl1, Sec39 (Dsl3) y Tip20 forman una especie de torre sobre la membrana del RE. Se representa con una línea punteada el lazo flexible de Dsl1, y ampliado en un recuadro aparece la bisagra flexible de la misma subunidad (Ren et al, 2009). (B) El complejo Dsl1 se ancla al RE gracias a la interacción de Sec39p y Tip20p con las t-SNAREs Use1p y Sec20p respectivamente. La subunidad Dsl1 une a la vesícula COPII a través de su interacción con el coatómero (Adaptado de (Barlowe & Miller, 2013)).

De esta forma, el complejo Dsl1 desarrolla tres funciones distintas en la intersección RE-vesícula COPII gracias a su capacidad de interactuar tanto con las cubiertas como con las SNAREs (Figura 12). La primera de ellas es la captura de las vesículas COPII provenientes del Golgi gracias a la interacción entre Dsl1p y la cubierta COPII. La segunda es promover el ensamblaje de las SNAREs, lo cual conseguiría mediante dos vías: manteniendo en estado receptivo a las SNAREs individuales, y sirviendo de plataforma para la interacción y reconocimiento de las SNAREs al aproximar Sec22p, presente en la vesícula, a las t-SNAREs que interactúan con Dsl3p y Tip20p. Finalmente, se ha propuesto una tercera función que es la de promover la despolimerización de las cubiertas, ya que Dsl1p se une a la misma región de  $\alpha$ -COP que esta subunidad usa para unirse a  $\epsilon$ -COP, por lo que la interacción con Dsl1 favorecería la desestabilización de la estructura de la cubierta. De hecho, en ausencia del complejo Dsl1 se acumulan vesículas cubiertas de proteínas COPII en las inmediaciones del RE (Ren et al, 2009; Tripathi et al, 2009; Zink et al, 2009). Esta tercera función implica que en el momento en que el complejo Dsl1 comenzase a despolimerizar la cubierta, la vesícula quedaría desprovista de sujeción al RE, pudiendo escapar de las inmediaciones de este orgánulo. A día de hoy, no se

ha resuelto aún la cuestión de cómo se mantiene la vesícula cerca del RE hasta que ocurre la fusión.

Por otro lado, más recientemente se ha descrito que el complejo Dsl1 junto con las SNAREs del RE interviene en la fusión homotípica RE-RE (Rogers et al, 2014).

Aunque no se ha descrito el papel concreto de ninguna Rab en este proceso, hay evidencias de que Ypt1p, es necesaria para el transporte retrógrado Golgi-RE (Kamena et al, 2008).



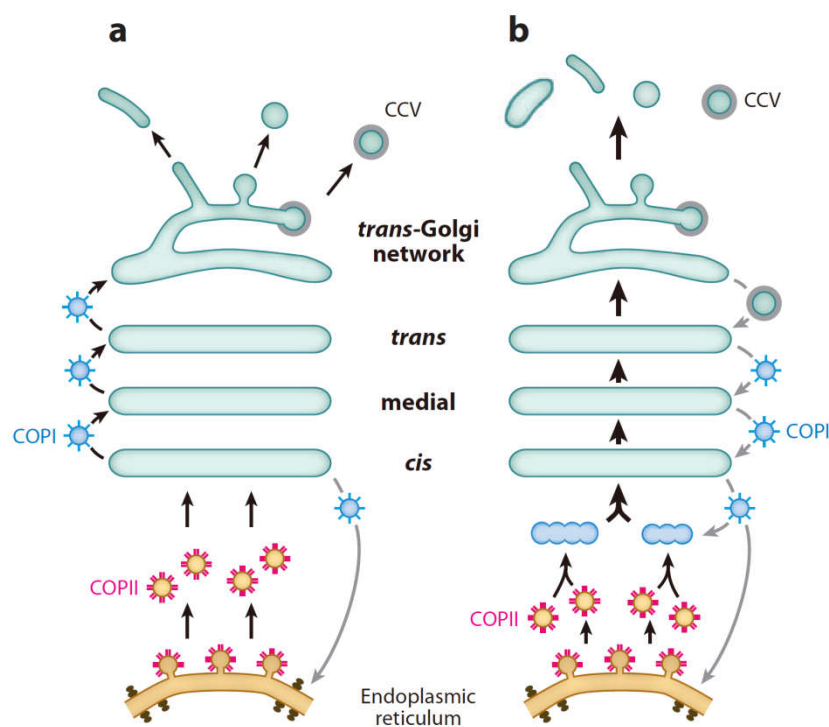
**Figura 12. Funciones del complejo Dsl1 en la intersección RE-vesícula COPI.** Primero, el complejo Dsl1 interacciona con el coatómero capturando a la vesícula COPI, y seguidamente promueve la despolimerización de esta cubierta. Por último, el complejo Dsl1 facilita la asociación de las SNAREs, de forma que facilita también la fusión (Ren et al, 2009).

## 5. Modelo de maduración cisternal y biogénesis de novo del aparato de Golgi

El aparato de Golgi es un orgánulo compuesto por diferentes compartimentos membranosos o cisternas que está estructural y funcionalmente polarizado. Las proteínas de secreción entran por el compartimento *cis* del Golgi y después de recibir secuencialmente las modificaciones apropiadas (glicosilación, procesamiento proteolítico, etc.) salen de dicho orgánulo por su compartimento *trans*. Cómo progresan las proteínas de secreción a través del Golgi ha sido objeto de un intenso debate durante los últimos cuarenta años. Tradicionalmente, se han propuesto dos modelos antagónicos de transporte intra-Golgi que también tratan de explicar el mantenimiento y la formación del propio Golgi (Figura 13).

Por un lado, el modelo de transporte vesicular se fundamenta en que cada una de las cisternas del aparato de Golgi conforma un compartimento estable, y está

conectada con las restantes a través del tráfico de vesículas COPI en sentido anterógrado para transportar las proteínas de secreción. Cada cisterna mantendría su identidad mediante la exclusión de las vesículas COPI de sus proteínas propias (Colley, 1997; Rothman & Wieland, 1996). Según este modelo el Golgi no se formaría nunca *de novo*, generándose siempre a partir de un precursor pre-existente. Sin embargo, a pesar de los avances genéticos, bioquímicos y morfológicos, todavía no se ha podido obtener una evidencia firme de transporte vesicular anterógrado entre las distintas cisternas del Golgi (Glick & Luini, 2011) aunque sí de elementos tubulares que se comentarán más adelante.



**Figura 13. Principales modelos de transporte a través del aparato de Golgi. (a)** Modelo de transporte vesicular: las cisternas constituyen compartimentos fijos conectados a través de vesículas COPI que transportan anterógradamente desde el *cis* hacia el *trans*-Golgi a las proteínas de secreción. **(b)** Modelo de maduración cisternal: la nueva cisterna *cis* se forma *de novo* por la fusión de las vesículas COPII y las vesículas retrógradas COPI procedentes de las antiguas cisternas *cis*. La maduración de esta cisterna se produce al excluir la maquinaria enzimática de *cis*-Golgi gracias a su transporte retrógrado y la recepción de los componentes del medial-Golgi, y así sucesivamente (Glick & Nakano, 2009).

Por otro lado, el modelo de maduración cisternal (Glick & Malhotra, 1998; Pelham, 1998), propone que las nuevas cisternas *cis* del Golgi se forman *de novo* por fusión homotípica de vesículas COPII provenientes del RE, que también fusionarán con

vesículas COPI provenientes de las antiguas cisternas *cis*. Las cisternas maduran progresivamente hacia el medial- y el *trans*-Golgi a medida que reciben las diferentes enzimas residentes de cisternas superiores mediante transporte retrógrado en vesículas COPI. Este modelo, donde la propia cisterna es el transportador anterógrado de las moléculas de secreción, es el más consistente con las observaciones experimentales (Bonifacino & Glick, 2004). Sin embargo, no fue hasta el año 2006, cuando dos laboratorios independientes demostraron mediante experimentos de fluorescencia *in vivo* la maduración cisternal en *S. cerevisiae*. Empleando marcadores fluorescentes diferentes para las cisternas *cis*, medial y *trans*, pudieron seguir la maduración independiente de cada cisterna mediante la transición de color de la misma (Losev et al, 2006; Matsuura-Tokita et al, 2006). Las evidencias experimentales en células de mamífero a favor del modelo de maduración cisternal se han ido acumulando, quedando ratificadas recientemente (Rizzo et al, 2013).

El transporte vesicular en sentido retrógrado es por tanto una pieza clave en la maduración de las cisternas del aparato de Golgi, ya que permite aportar los componentes enzimáticos necesarios para la transición *cis*-medial y medial-*trans*. Este transporte es desarrollado por las proteínas de cubierta COPI, las mismas que participan en el transporte entre el *cis*-Golgi y el RE (Bonifacino & Glick, 2004). El direccionamiento de estas vesículas parece depender de factores de anclaje como el complejo COG (*Conserved Oligomeric Golgi*) (Smith & Lupashin, 2008; Ungar et al, 2006). En este transporte *intra*-Golgi el complejo COG reconocería las vesículas a través de la subunidad  $\gamma$ -COP y actuaría junto a la GTPasa Ypt1p/Rab1, y las SNAREs propias del Golgi (Suvorova et al, 2002). En la cara *cis*, estas SNAREs son Sed5p, Gos1p, Sft1p y Ykt6p o Sec22p (Shestakova et al, 2007).

Recientemente se ha confirmado que la maduración cisternal en levaduras implica la vía retrógrada dependiente de la cubierta COPI de reciclaje al *cis*-Golgi desde el compartimento *trans*, y múltiples vías independientes de COPI de reciclaje al *trans*-Golgi desde compartimentos post-Golgi del sistema endocítico (Papanikou et al, 2015). No obstante, en mamíferos el proceso de transporte de la carga a través del Golgi parece ser más complejo que en levadura, ya que muestra una naturaleza bidireccional en el que la cubierta COPI, además de transportar retrógradamente las enzimas de glicosilación, forma túbulos membranosos que podrían transportar anterógradamente las cargas de una cisterna a otra. Este transporte tubular anterógrado dependiente de COPI está dirigido por la GTPasa CDC42 implicada en establecer la polaridad celular (Nakano, 2015; Park et al, 2015).

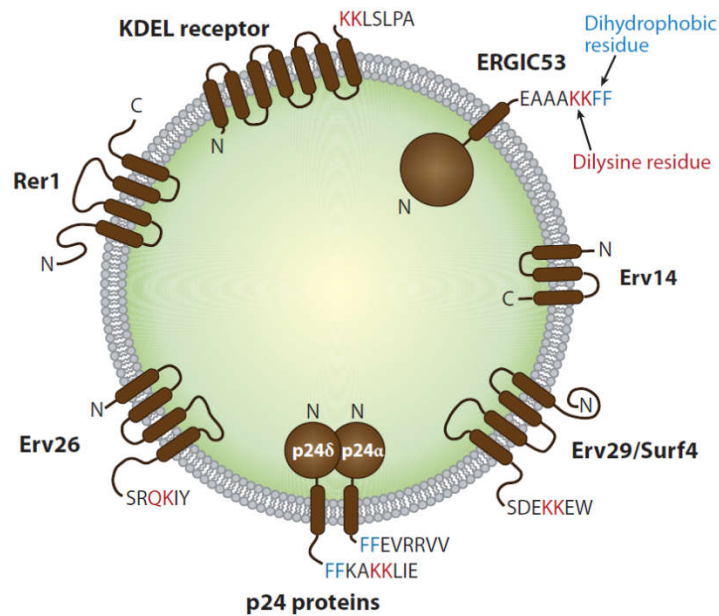
## 6. Receptores de carga

Como se ha comentado anteriormente, durante exportación del RE las proteínas de cubierta COPII reconocen señales en los dominios citosólicos de las proteínas carga para incorporarlas en las vesículas nacientes. Sin embargo, muchas de las proteínas de secreción no pueden interaccionar directamente con dicha cubierta ya que son completamente lumbinales o bien, a pesar de ser transmembrana, sus dominios citosólicos carecen de estas señales. Por ello, todas estas proteínas necesitan para incorporarse eficiente en las vesículas COPII de la acción de una proteína transmembrana que actúe como adaptadora conectándolas con la cubierta. Estas proteínas adaptadoras se denominan genéricamente receptores de carga o de transporte (Dancourt & Barlowe, 2010).

Los receptores de carga son por tanto proteínas transmembrana con al menos dos dominios claramente diferenciados: un dominio citosólico con las señales necesarias para unir a las cubiertas COPII y COPI, lo que permite que ciclen entre el RE y el Golgi, y un dominio luminal y/o transmembrana que reconoce las formas maduras o correctamente plegadas y/o ensambladas de sus cargas. De esta manera, se consigue acoplar la selección de la proteína carga con el ensamblaje de la cubierta y la posterior formación de la vesícula COPII. Hasta la fecha se han podido identificar sólo algunos de los motivos reconocidos por los diferentes receptores en los dominios lumbinales de las proteínas carga, como carbohidratos específicos (reconocidos por dominios de lectinas) y determinadas secuencias de aminoácidos (Dancourt & Barlowe, 2010; Manzano-Lopez et al, 2015).

Los receptores de carga se incorporan junto a sus ligandos en las mismas vesículas de transporte, viajando así juntos al Golgi. Allí, tras separarse, el ligando continúa avanzando por la ruta secretora mientras que el receptor vuelve al RE utilizando el transporte retrógrado para iniciar una nueva ronda de transporte anterógrado. Se ha propuesto que la diferencia de pH en el lumen del RE respecto al del Golgi sea la base del mecanismo que regula la unión del ligando a su receptor. Según este modelo, para los receptores de transporte anterógrado, el pH prácticamente neutro existente en el RE propicia la interacción ligando-receptor, mientras que el pH más bajo del Golgi induce cambios conformacionales en el receptor que conllevan la liberación del ligando (Dancourt & Barlowe, 2010). Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto que el cambio de pH no es suficiente para separar al ligando del receptor, por lo que debe haber factores

adicionales que intervengan en este proceso y que aún no se conocen (Perez-Linero & Muniz, 2015; Shibuya et al, 2015).



**Figura 14. Receptores de carga mejor caracterizados en la ruta secretora temprana.** ERGIC-53, Erv14, Erv29/Surf4, las proteínas p24 y Erv26 son receptores de transporte anterógrado, mientras que Rer1, el receptor KDEL y Erv41-Erv46 (no aparece en la figura) son receptores de transporte retrógrado. En sus dominios citosólicos presentan señales para unir las cubiertas COPII (azul) y las cubiertas COPI (rojo) (Dancourt & Barlowe, 2010).

Hasta la fecha se han identificado varios receptores de transporte (Figura 14), aunque cabría esperar que la lista aumente progresivamente. Todos ellos tienen en común que son proteínas muy abundantes, con señales tanto de exportación del RE como de reciclaje, las cuales les permiten ciclar continuamente entre el RE y el Golgi. Además, la carencia individual de cada uno de estos receptores sólo afecta al transporte específico de sus ligandos y no a otras proteínas de secreción. Otra característica importante es que están muy conservados en la escala evolutiva, aunque en algunos organismos no se hayan identificado todavía sus ligandos o sustratos. Por último, es importante destacar que todos los receptores que se han caracterizado son oligómeros, con lo que aumentan considerablemente su eficiencia de transporte (Dancourt & Barlowe, 2010).

En relación con la gran diversidad de proteínas de secreción que deben ser exportadas del RE, se han caracterizado pocos receptores hasta la fecha. En levaduras, los receptores identificados son fundamentalmente las proteínas p24, la

proteína Emp47p, así como varias proteínas Erv (ER vesicle protein): Erv29p, Erv14p, Erv26p y Erv41p-Erv46p. A continuación se describen brevemente cada uno de ellos.

- **La proteína Emp47p** (*EndoMembrane Protein*) posee un dominio lectina, por lo que ha sido propuesta como receptor de carga del RE para glicoproteínas. Inicialmente, se describió que es necesaria para el transporte al Golgi de la proteína Emp46p (Sato & Nakano, 2003), y más tarde se propuso a la proteína Ssp120p como un ligando específico (Herzig et al, 2012). En este mismo año se ha visto que Emp47p forma un complejo funcional con Ssp120p, en el cual Emp46p aparece como un componente minoritario, y proponiéndose que dicho complejo actúa en el transporte anterógrado de glicoproteínas necesarias para la integridad de la pared celular (Margulis et al, 2016). Emp47p es homóloga a ERGIC-53, el receptor de carga del RE mejor caracterizado de mamíferos. ERGIC-53 se comporta como una lectina, que cicla transportando desde el RE al ERGIC glicoproteínas lisosomales como la catepsina C y Z, y los factores de coagulación V y VIII (Appenzeller et al, 1999).

- **Erv29p** es requerido para la incorporación eficiente en vesículas COPII de algunas proteínas solubles como el pro-factor alfa, la carboxipeptidasa Y (CPY) y la proteinasa A (Belden & Barlowe, 2001b; Caldwell et al, 2001). El homólogo de Erv29p en mamíferos es Surf4, aunque aún no se conocen sus proteínas carga (Reeves & Fried, 1995).

- **Erv26p** es el receptor de carga para las proteínas transmembrana de tipo II, como la fosfatasa alcalina y las manosil-transferasas del Golgi (Bue et al, 2006; Inadome et al, 2005; Noda & Yoda, 2010). La proteína homóloga en mamíferos es TEX261, pero no ha sido caracterizada aún.

- **El complejo Erv41p-Erv46p** se había propuesto como receptor de carga (Otte & Barlowe, 2002; Otte et al, 2001) pero no se ha conseguido caracterizar algunas de las proteínas que transporta hasta hace muy poco. Erv41p-Erv46p actúa como receptor de transporte anterógrado para la manosil-transferasa de Golgi Ktr4p (proteína transmembrana tipo II) reconociendo su dominio luminal (Noda et al, 2014). Además, este complejo tiene una función como receptor retrógrado para la enzima soluble Gl1p (glucosidasa I) cuando esta escapa al Golgi (Shibuya et al, 2015).

-Al **complejo p24 y Erv14p** se les dedican los apartados 6.1 y 6.2 debido a que serán los más estudiados a lo largo de esta tesis.



Junto a los receptores de transporte, existen una serie de factores necesarios para la exportación selectiva de determinadas proteínas. A diferencia de los receptores de carga, estos factores no suelen incorporarse en la vesícula conjuntamente con su ligando o proteína carga. La proteína integral TANGO1 promueve la exportación de proteínas enormes como el colágeno interaccionando con la cubierta COPII pero sin incorporarse ella misma en la propia vesícula. En este caso Sar1p es regulado para que la vesícula aumente de tamaño permitiendo la inclusión del colágeno (Saito et al, 2009). En muchos casos estos factores son chaperonas específicas que ayudan a plegar correctamente un tipo particular de proteínas, como Chs7p con Chs3p, Shr3p con Gap1p y otras permeasas de aminoácidos, Gsf2p para varias permeasas de azúcares y Pho86p para Pho84p (Lau et al, 2000; Ljungdahl et al, 1992; Sacristan et al, 2013; Sherwood & Carlson, 1999). En otros casos, la chaperona se además se monta en la vesícula de secreción, escoltando al ligando durante su transporte, ya que lo mantiene en un estado de plegamiento óptimo durante el trayecto, como es el caso del transporte de la rodopsina Rh1 y su chaperona NinaA en *Drosophila melanogaster* (Baker et al, 1994).

## 6.1. El complejo p24

Los miembros de la familia de proteínas p24 se asocian heteroméricamente para formar el denominado complejo p24. Estas proteínas inicialmente fueron identificadas como elementos muy abundantes del RE y del Golgi, así como componentes mayoritarios de las vesículas de transporte COPII y COPI.

Debido a que la familia p24 está muy conservada evolutivamente desde levaduras hasta mamíferos, el complejo p24 debe jugar un importante papel en el flujo vesicular bidireccional que tiene lugar en la interfase RE-Golgi (Strating & Martens, 2009). Gracias a su abundancia y capacidad para ciclar entre el RE y el Golgi uniendo fuertemente ambos tipos de cubiertas, COPI y COPII, ha sido relacionado con dos funciones esencialmente. La primera de ellas es la función específica como receptor de carga, facilitando la exportación selectiva del RE de las proteínas ancladas a GPI (Castillon et al, 2011; Muniz et al, 2000). Así, recientemente se ha descrito que el complejo p24 reconoce a las proteínas ancladas a GPI actuando como una lectina, ya que se une al glicano correctamente remodelado del GPI, y atrae entonces a una cubierta COPII específica (Manzano-Lopez et al, 2015). La segunda función, de carácter general, está relacionada con el transporte retrógrado, ya que participa en la

formación de vesículas COPI derivadas del Golgi a través de la estabilización de la cubierta COPI sobre las membranas (Aguilera-Romero et al, 2008).

Los análisis filogenéticos dividen a la familia p24 en cuatro subfamilias: p24 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Carney & Bowen, 2004). El número de representantes de cada subfamilia varía entre los diferentes organismos. Así, animales y hongos poseen representantes de cada subfamilia, mientras que las plantas sólo tienen miembros de las subfamilias p24 $\beta$  y p24 $\delta$ . En la levadura, la subfamilia p24 $\alpha$  la componen Erp1p, Erp5p y Erp6p; la subfamilia p24 $\beta$ , Emp24p; la subfamilia p24 $\gamma$ , Erp2p, Erp3p y Erp4p; y la subfamilia p24 $\delta$ , Erv25p. El análisis filogenético también pone de manifiesto la existencia de dos ramas evolutivas diferentes que agrupan a las subfamilias p24 $\alpha$  y p24 $\delta$  por un lado y a las subfamilias p24 $\beta$  y p24 $\gamma$  por otro (Carney & Bowen, 2004). No obstante, existe cierta redundancia funcional entre los miembros de las subfamilias de una misma rama, como se ha demostrado en levaduras (Marzioch et al, 1999). Sin embargo, en organismos pluricelulares se han descrito patrones de expresión diferencial específicos de tejido, en los que los diferentes miembros de cada subfamilia no son intercambiables entre sí (Carney & Bowen, 2004; Strating et al, 2009).

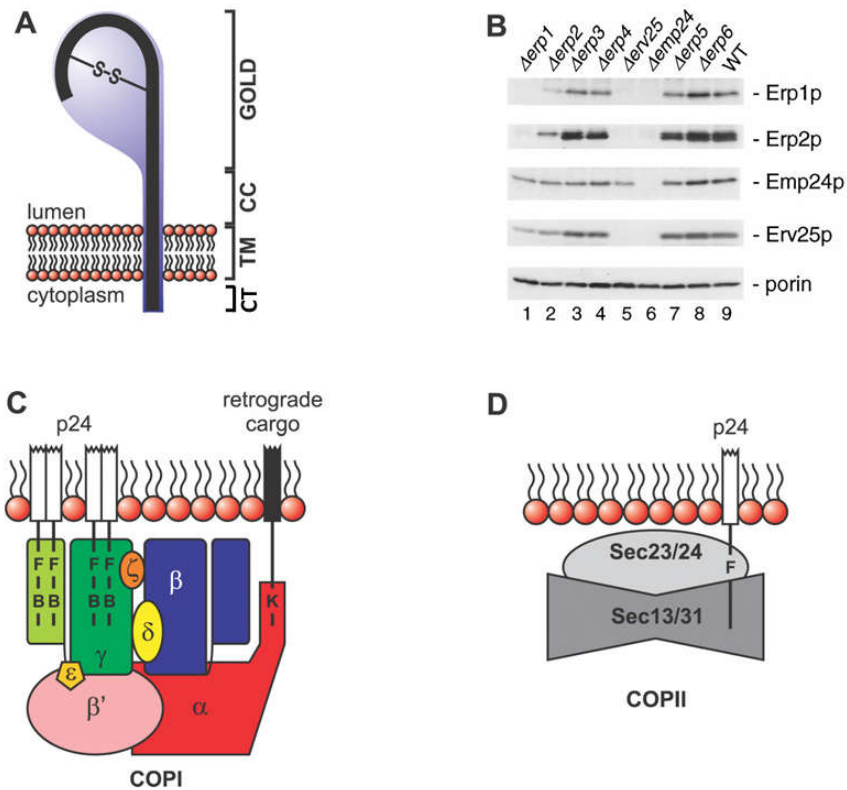
Las proteínas p24 son proteínas transmembrana tipo I de aproximadamente 24 KDa. Cada subunidad presenta un dominio luminal que contiene motivos de unión a proteínas carga y un tallo citosólico que muestra una gran afinidad para interactuar con los complejos de cubierta COPII y COPI, estando ambas regiones conectadas por un único dominio transmembrana. A pesar de que el tallo citosólico representa sólo un pequeño porcentaje de la proteína, de 12 a 20 aminoácidos, es en esta región donde se localizan las señales responsables del movimiento cíclico y de la localización del complejo p24 en la célula. En esta porción se sitúan dos tipos de motivos: los di-aromáticos/di-hidrofóbicos, involucrados en la interacción con las cubiertas COPI y COPII, y el dominio di-básico, exclusivo de la unión a cubiertas COPI. En la Tabla I se han representado las regiones C-terminales de cada subfamilia de proteínas p24 en levaduras, resaltándose los motivos implicados en los procesos de interacción.

Erp1p	Emp24p	Erp2p	Erv25p
F	F	L	Y
F	F	F	F
V	E	T	K
K	V	G	T
Q	T	R	K
K	S	Q	H
I	L	K	I
L	V	N	I

**Tabla I. Secuencias de las regiones citosólicas de los cuatro miembros principales del complejo p24 en *S. cerevisiae*.** En verde, los motivos de unión a COPII, en violeta los motivos de unión a COPI (Belden & Barlowe, 2001a).

En la fracción luminal se encuentran la secuencia señal necesaria para su translocación al RE (que es posteriormente procesada), un dominio GOLD (*Golgi dynamics*) y una región *coiled-coil* (Figura 15 A). El dominio GOLD posee dos cisteínas altamente conservadas que potencialmente generan un puente disulfuro. La región *coiled-coil*, que precede a la región transmembrana, es un dominio necesario para la formación del complejo: heterotetrámeros (p24 $\alpha$ +p24 $\beta$ +p24 $\delta$ +p24 $\delta$ ) o heterodímeros (p24 $\beta$ +p24 $\delta$ ).

La oligomerización del complejo p24 es esencial para la estabilidad de las propias proteínas p24 en la célula, así como para que el complejo pueda ciclar entre RE y Golgi (Fullekrug et al, 1999; Marzioch et al, 1999), y por tanto para el desarrollo de sus funciones. En *S. cerevisiae* el complejo está formado principalmente por las proteínas Emp24p, Erv25p, Erp1p y Erp2p. La eliminación tanto de Emp24p como de Erv25p genera complejos inestables, no funcionales, que terminan siendo degradados. De este modo, la eliminación de una de estas subunidades tiene como consecuencia la disminución de los niveles proteicos del resto de la familia (Figura 15 B) (Marzioch et al, 1999). Un proceso similar ha sido descrito en mamíferos, donde el descenso de la expresión de uno de los genes de la subfamilia p24 $\delta$  disminuye los niveles proteicos de otros miembros de la subfamilia p24 $\alpha$  (Denzel et al, 2000).



**Figura 15. La organización estructural de las proteínas de la familia p24 depende de la oligomerización de sus subunidades.** (A) Estructura de las proteínas p24, destacándose el dominio GOLD, la región *coil-coiled* (CC), el dominio transmembrana (TM) y el tallo citosólico (CT) (Strating & Martens, 2009). (B) En los mutantes nulos *erv25Δ* y *emp24Δ*, los niveles de proteínas de los otros miembros de la familia disminuyen drásticamente (Marzioch et al, 1999). (C y D) Los tallos citosólicos de las proteínas p24 unen específicamente las cubiertas COPI y COPII (Strating & Martens, 2009).

## 6.2. Erv14p

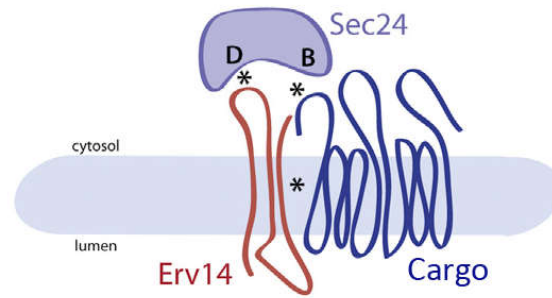
Erv14p fue identificada inicialmente como un componente mayoritario de las vesículas de transporte COPII, localizándose en RE y Golgi. Posteriormente se observó que es necesaria para el transporte de un gran número de proteínas transmembrana (Castillon et al, 2009; Herzig et al, 2012; Powers & Barlowe, 1998; Powers & Barlowe, 2002).

Pertenece a una familia muy conservada de proteínas, siendo sus homólogos en eucariotas superiores las proteínas de la familia cornicón. El miembro mejor caracterizado de esta familia es la proteína Cni de *D. melanogaster*, necesaria para la exportación desde el RE de proteínas de la familia TGF $\alpha$  (factor de crecimiento transformante  $\alpha$ ) (Castro et al, 2007). En mamíferos, las proteínas cornicón son necesarias para el transporte de receptores de glutamato del subtipo AMPA (Schwenk

et al, 2009; Shanks et al, 2014). En *S. cerevisiae*, Erv14p se describió inicialmente como receptor de carga de la proteína de membrana plasmática Axl2p; y estudios posteriores han puesto de manifiesto que es necesaria para la exportación del RE de numerosas proteínas transmembrana cuyo destino es la ruta secretora tardía o la membrana plasmática (Castillon et al, 2009; Herzig et al, 2012; Pagant et al, 2015; Powers & Barlowe, 1998; Powers & Barlowe, 2002; Sacristan et al, 2013).

Erv14p es una proteína hidrofóbica pequeña, con tres segmentos transmembrana, un dominio citosólico N-terminal y un dominio luminal C-terminal (Figura 16). En su segundo dominio citosólico se encuentra la secuencia IFRTL, por la cual une a la cubierta COPII a través del sitio D de la subunidad Sec24p. Con respecto a la unión a sus cargas, Erv14p parece emplear múltiples mecanismos: algunas cargas parecen unirse a dominios luminales del receptor, mientras que otras se unen a uno de sus dominios transmembrana (Pagant et al, 2015; Powers & Barlowe, 2002).

Siendo las cargas de Erv14p proteínas transmembrana que podrían reconocer potencialmente a la cubierta, se plantea qué significado funcional puede tener la interacción de la carga con el receptor en este caso. Uno de los modelos propuestos es que algunos de los cargos de Erv14p hayan evolucionado por eventos de fusión génica, reposicionando sus señales de exportación del RE en sus regiones luminales (Dancourt & Barlowe, 2010). Sin embargo, algunos ligandos de Erv14p sí tienen sus propias señales de unión a COPII, por lo que se hacen necesarias explicaciones adicionales. Estudios recientes parecen arrojar algo de luz sobre estas cuestiones. Por un lado, en los últimos años se ha descrito que Erv14p reconoce dominios transmembrana largos en sus proteínas carga, independientemente de su secuencia. Así, puesto que sus ligandos son proteínas destinadas a la ruta secretora tardía o a la membrana plasmática, donde la bicapa lipídica posee un mayor grosor que en el RE, Erv14p podría estar actuando como chaperona de estos dominios transmembrana al inicio de la ruta secretora, además de como adaptador de la cubierta COPII (Herzig et al, 2012). Por otro lado, recientemente se ha observado que algunas de sus cargas se unen a dos sitios en Sec24 de forma simultánea: indirectamente a través de Erv14p, y directamente gracias a sus propias señales (Figura 16). De esta forma, se incrementaría la eficiencia de unión a la cubierta, y por tanto la eficiencia de salida del RE (Pagant et al, 2015).



**Figura 16. Reconocimiento de la carga y la cubierta por Erv14p.** Erv14p reconoce al sitio D de Sec24p a través de la secuencia IFRTL presente en su segundo dominio citosólico, y a sus cargas transmembrana a través de uno de su segundo dominio transmembrana. Algunos de los ligandos de este receptor reconocen además directamente al sitio B de Sec24p (Adaptado de (Pagant et al, 2015)).

# **ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

---

---



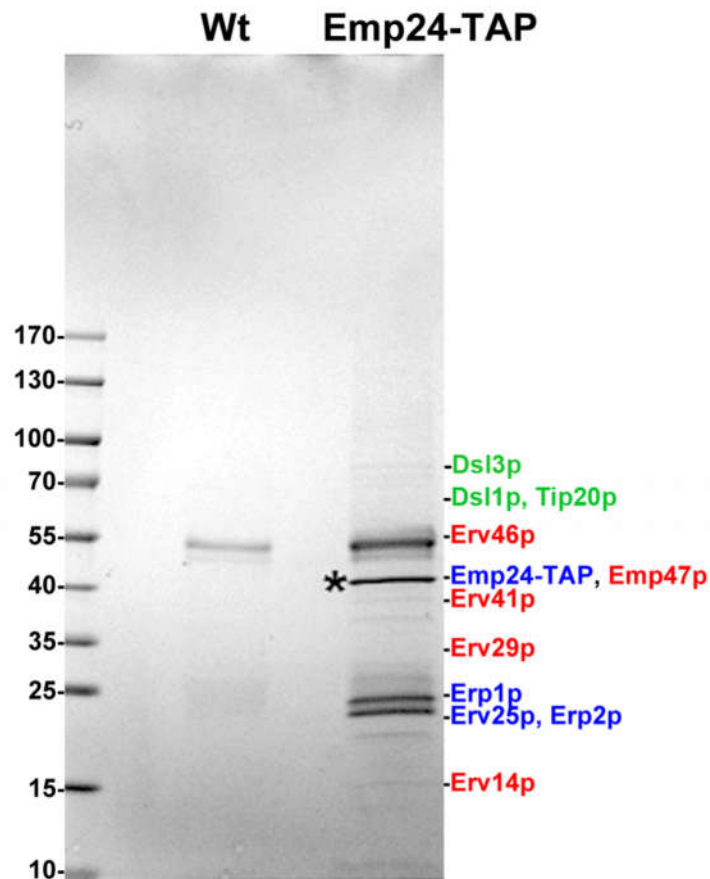


# 1. Antecedentes

Nuestro grupo de investigación ha estado investigado durante los últimos años la función del complejo p24 durante su transporte bidireccional entre el RE y el Golgi al comienzo de la ruta secretora. Gracias a ello, se han obtenido evidencias de que dicho complejo interviene en varios procesos. Por un lado, presenta una función específica como receptor de carga, facilitando la exportación selectiva del RE de las proteínas ancladas a GPI (Castillon et al, 2011; Manzano-Lopez et al, 2015; Muniz et al, 2000). Por otro lado, tiene una función general en la formación de las vesículas COPI, mediante la estabilización de la cubierta COPI sobre las membranas del Golgi (Aguilera-Romero et al, 2008). Con objeto de profundizar más en el conocimiento de las distintas funciones celulares del complejo p24 en la ruta secretora temprana, se identificaron las proteínas que interactúan físicamente con la subunidad Emp24p del complejo, mediante un ensayo de *pull down* (en colaboración con el Dr. Veit Goder, Universidad de Sevilla). Emp24p etiquetada con TAP (*Tandem Affinity Purification*), fue purificada a partir de extractos enriquecidos en membranas del RE solubilizados con 1% de digitonina. Las proteínas unidas a Emp24-TAP fueron co-precipitadas, separadas por electroforesis y finalmente analizadas por espectrometría de masas.

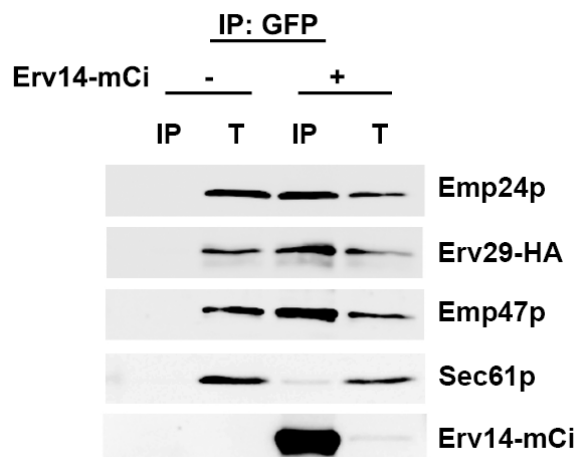
En la Figura 17 se muestran algunas de las proteínas que se unen con mayor afinidad a Emp24-TAP. Este experimento fue validado por la presencia mayoritaria del resto de componentes del complejo p24 en el eluido (Erp1p, Erp2p, Erv25p). También fueron co-precipitadas proteínas de las maquinarias COPII (Sec23p, Lst1p, Sar1p y Sec12p) y COPI ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ -COP y Arf1p), como se esperaba, dadas las potentes señales de unión a las cubiertas COPII y COPI que poseen las proteínas p24.

Entre otras proteínas, se detectaron sorprendentemente en el co-precipitado otros receptores de carga del RE como Erv14p, Erv29p, Emp47p y Erv41p/Erv46p, indicando que estos podrían asociarse entre sí a nivel de este compartimento. También co-precipitaron, inesperadamente, las tres subunidades del complejo Dsl1 (Dsl1p, Tip20p, Dsl3p), el factor de anclaje al RE de las vesículas COPI provenientes del Golgi.



**Figura 17. Estudio proteómico de Emp24-TAP.** La proteína Emp24p etiquetada con TAP fue inmunoprecipitada a partir de extractos enriquecidos en membranas del RE solubilizados con 1% de digitonina. Las proteínas co-precipitadas fueron separadas por electroforesis y analizadas por espectrometría de masas. Se indican los componentes del complejo p24 (azul), otros receptores de carga (rojo) y los componentes del complejo Dsl1 (verde). Datos obtenidos por el Dr. Veit Goder, Universidad de Sevilla.

En primer lugar, se procedió a estudiar en más profundidad la interacción física entre el complejo p24 y otros receptores de carga. Para confirmar los datos proteómicos, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación entre los diferentes receptores de carga identificados. Al inmunoprecipitar Erv14p etiquetado con mCitrina (Erv14-mCi), se co-precipitaron otros receptores de carga como Emp24p, Erv29p y Emp47p, mientras que proteínas muy abundantes en el RE, como la subunidad del translocón Sec61p, prácticamente no se detectaron en el co-precipitado (Figura 18).



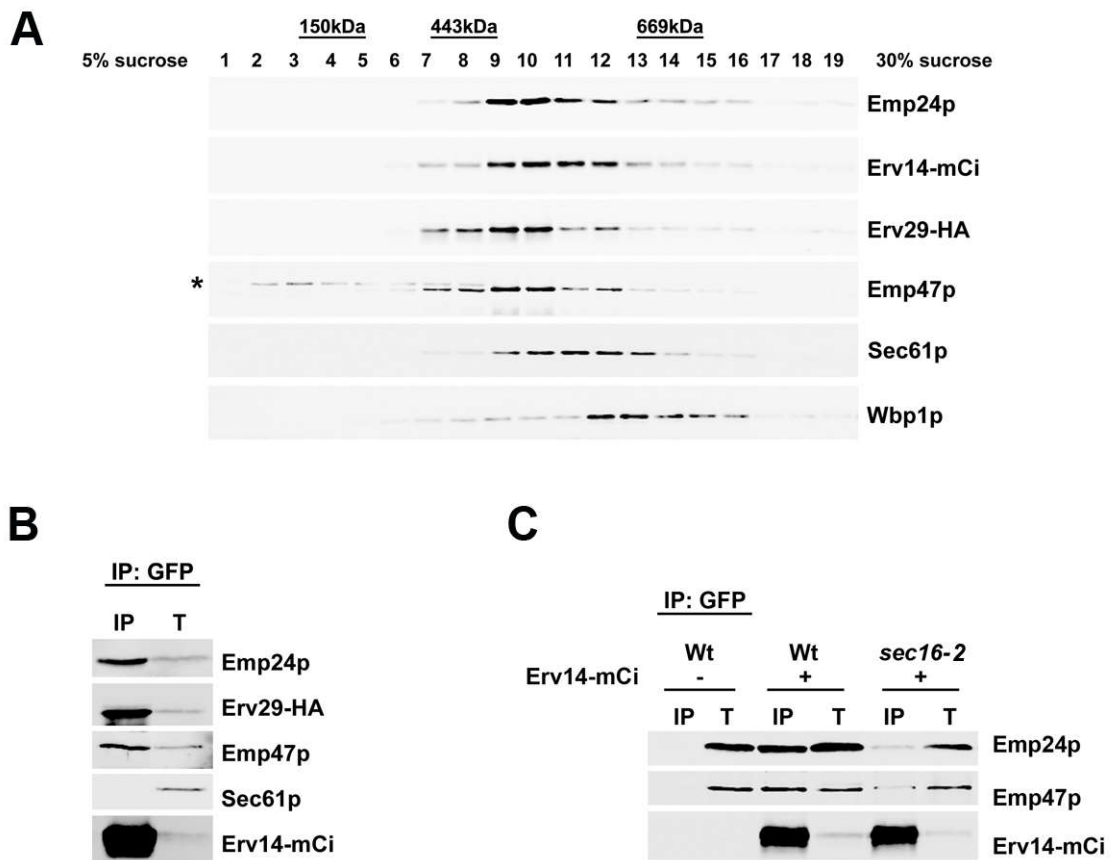
**Figura 18. Los receptores de carga interactúan físicamente entre sí.** Se inmunoprecipitó Erv14-mCi a partir de un extracto de proteínas enriquecido en membranas del RE, disuelto con 1% digitonina. Posteriormente, se analizó la presencia de las proteínas co-precipitadas mediante electroforesis y *Western Blot*. T representa el 1% del extracto antes de la inmunoprecipitación.

Los datos de co-inmunoprecipitación indicaron que los receptores interactúan físicamente entre ellos. Para determinar si formaban parte de un mismo complejo, se realizó una centrifugación en gradiente de densidad a partir de un extracto enriquecido en membranas del RE solubilizado con 1% digitonina. Las fracciones recogidas fueron examinadas por electroforesis y *Western Blot* (WB). Como se observa en la Figura 19 A, los diferentes receptores de carga analizados presentan un patrón de distribución similar, con un pico de enriquecimiento en las fracciones 9 y 10 del gradiente. Cabe destacar que el complejo p24 (representado por Emp24p) y Erv14p fueron los dos receptores que presentaron un patrón de distribución más parecido entre sí. En cambio, otras proteínas residentes del RE como Sec61p o la subunidad de la transferasa de oligosacáridos (OST) Wbp1p, mostraron un patrón de distribución diferente, indicando que probablemente no forman parte de los mismos complejos de alto peso molecular que los receptores.

A continuación, se confirmó que todos los receptores analizados formaban parte del mismo complejo de alto peso molecular, ya que estos fueron conjuntamente co-inmunoprecipitados a partir de las fracciones 9 y 10, las de mayor enriquecimiento (Figura 19 B).

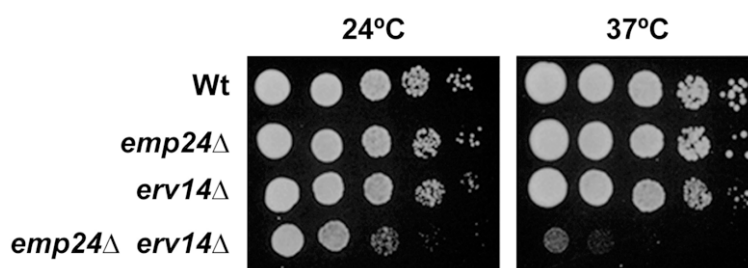
Finalmente, se analizó si la formación del complejo ocurría en los sitios de salida del retículo (ERES). Para ello, se evaluó si la interacción existente entre los receptores

depende de Sec16p, la proteína responsable de la organización y formación de los ERES (Connerly et al, 2005; Watson et al, 2006). Como se aprecia en la Figura 19 C, la co-inmunoprecipitación entre los distintos receptores se reduce drásticamente en la estirpe mutante termosensible *sec16-2* incubada a temperatura restrictiva. Este resultado permitió concluir que la asociación de receptores de carga en un gran complejo o plataforma proteica tiene lugar durante su exportación del RE, concretamente a nivel de los ERES.



**Figura 19. Los receptores de carga forman una plataforma en el RE a nivel de los ERES.** (A) Extractos celulares enriquecidos en membranas del RE, disueltos con 1% digitonina, fueron sometidos a centrifugación en un gradiente discontinuo de 5-30% de sacarosa. Tras recoger las fracciones, se analizó la presencia de los diferentes receptores de carga. Todos los receptores aparecen mayoritariamente en las fracciones 9 y 10. Los pesos moleculares de los complejos proteicos de cada fracción se estimaron al comparar con la migración en los gradientes de las proteínas alcohol-deshidrogenasa de levadura (150kDa), apoferritina equina (443kDa) y tiroglobulina bovina (669kDa) (Sigma MWGF1000). (B) Las proteínas presentes en las fracciones 9 y 10 fueron analizadas por co-inmunoprecipitación. Los receptores de carga co-precipitan mientras que otras proteínas de RE no lo hacen. (C) Se analizó la interacción física por co-inmunoprecipitación de los receptores de carga tras someter a las células a una incubación de una hora a 37°C. La interacción se reduce drásticamente en el mutante *sec16-2*. El ensayo se realizó como se indica en la Figura 18.

Ante estos resultados, se planteó si la interacción física entre los receptores de carga tenía una repercusión funcional en la célula. Para ello se estudió la posible interacción genética entre los distintos receptores de carga. Todos los dobles mutantes estudiados (*emp24Δerv14Δ*, *emp24Δerv29Δ*, *emp24Δerv41Δ* y *emp24Δemp47Δ*) presentaron una fuerte interacción genética, viéndose su crecimiento muy retrasado con respecto a los mutantes simples. Las mutaciones nulas *emp24Δ* y *erv14Δ* mostraron el mayor grado de interacción genética entre sí (Figura 20), dato que se correlaciona con el hecho de que en el gradiente de densidad los receptores p24 y Erv14p sean los que presentaron un patrón de distribución más similar.



**Figura 20. Los receptores de carga interactúan funcionalmente entre sí.** La combinación de dos alelos nulos de receptores de carga reduce fuertemente el crecimiento del doble mutante. Las estirpes en crecimiento exponencial en medio SC fueron diluidas de forma seriada a partir de  $DO_{600}=0,5$ . Gotas de 4  $\mu$ l de cada dilución fueron sembradas en placas de medio SC y cultivadas durante 48 horas a las temperaturas indicadas.

El hecho de que el complejo p24 establezca una fuerte relación funcional con el resto de receptores apoya la idea de que los receptores de carga, además de ejercer su función individual promoviendo la exportación del RE de sus cargas específicas, poseen una función colectiva relevante para la fisiología celular. Para estudiar esta posibilidad, se decidió caracterizar fenotípicamente los dobles mutantes, eligiéndose *emp24Δerv14Δ*, ya que los alelos *emp24Δ* y *erv14Δ* son los que muestran mayor grado de interacción genética, y además los receptores p24 y Erv14p son los que mostraron un patrón de distribución más parecido en el gradiente de densidad. Para ello, se comenzó un estudio morfológico de los orgánulos de la ruta secretora temprana en el doble mutante *emp24Δerv14Δ*. Los primeros estudios realizados mediante microscopía de fluorescencia *in vivo* mostraron que en el doble mutante el *cis*-Golgi parecía estar muy afectado. En esta tesis se planteó confirmar estos resultados preliminares previos, y continuar con el estudio de una función cooperativa entre los receptores de carga.

Por otro lado, en el estudio proteómico inicial, también se observó una interacción física entre Emp24-TAP y el complejo Dsl1, que media el anclaje de las vesículas COPI provenientes del Golgi con la membrana del RE. Profundizar en el carácter y significado funcional de esta interacción ha sido otro de los objetivos de esta tesis.

## 2. Objetivos

A la vista de estos resultados previos, en esta tesis se planteó como propósito general el estudio de los mecanismos moleculares por los que el complejo p24 y otros receptores de carga operan conjuntamente para mantener la organización funcional de la ruta secretora temprana, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo.

Para abordar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

- 1. Analizar el posible papel cooperativo entre los receptores de carga en la organización funcional del *cis*-Golgi.**
- 2. Analizar el posible papel del complejo p24 en el anclaje de las vesículas COPI al retículo endoplásmico.**





# RESULTADOS

---



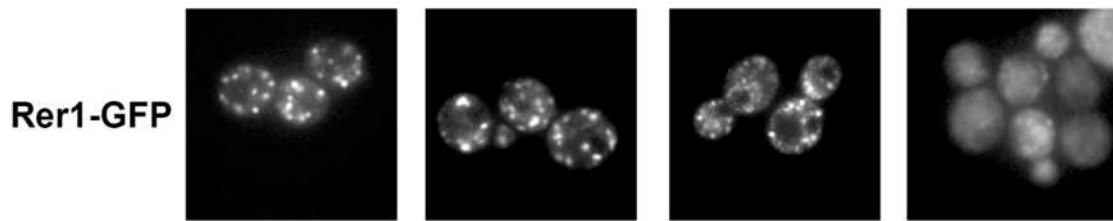
# 1. Papel cooperativo de los receptores de carga en la organización funcional del *cis*-Golgi

En este capítulo se aborda el primero de los objetivos planteados en esta tesis. Con el objeto de profundizar en el significado de la interacción física y genética observada entre los distintos receptores de carga (Figuras 18 a 20), se procedió a caracterizar el doble mutante *emp24Δerv14Δ*.

## 1.1. La interacción entre los receptores de carga es necesaria para el ensamblaje del *cis*-Golgi

La función principal de los receptores de carga es la de conectar a sus cargas con la cubierta COPII para promover su salida eficiente del RE. Por ello, se analizó si la ausencia conjunta de varios receptores estaba provocando un defecto general de salida del RE y esta fuera la causa de la interacción genética observada, hipótesis que se quiso comprobar mediante microscopía de fluorescencia.

Para ello, se observó la localización de una proteína que no es carga de ninguno de estos receptores, pero que cicla entre el RE y el Golgi. Así, se utilizó Rer1p etiquetada con GFP, proteína que cicla entre el Golgi y el RE, aunque se observa en su *steady state* acumulada en el *cis*-Golgi en condiciones normales. Si hubiera un bloqueo en la salida del RE, Rer1-GFP no sería capaz de seguir ciclando y quedaría retenida en este orgánulo. Como se observa en la figura 21, Rer1-GFP mostró su localización característica en puntos bien definidos, correspondientes a las distintas cisternas *cis* del Golgi, tanto en la cepa silvestre como en los mutantes simples *emp24Δ* y *erv14Δ*, siendo el patrón levemente más difuso en este último. Sin embargo, el patrón punteado se alteró completamente en el doble mutante, observándose un patrón difuso con algunos puntos muy pequeños y poco brillantes. Este fenotipo no corresponde con el de un defecto general en la exportación de proteínas desde el RE ya que no se observa Rer1-GFP acumulada en dicho orgánulo, de modo que se podría descartar que este fuera el caso del doble mutante. El patrón difuso de Rer1-GFP podría corresponderse más bien a cisternas de *cis*-Golgi fragmentadas o vesicularizadas.

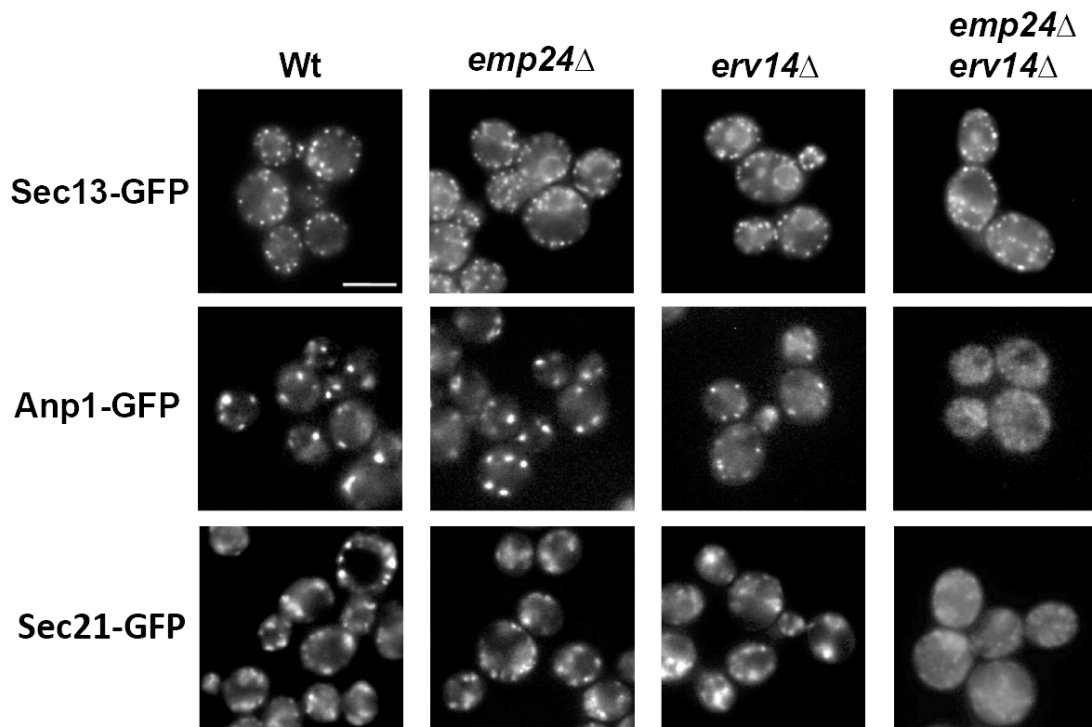


**Figura 21. El doble mutante *emp24Δerv14Δ* no presenta un defecto general de salida del RE, mientras que sí presenta un *cis*-Golgi desorganizado.** Células que expresaban Rer1-GFP creciendo en fase exponencial fueron analizadas *in vivo*, en tres ensayos independientes. Al menos el 95% de las células analizadas ( $n \geq 100$ ) presentaban el mismo patrón. La barra de escala equivale a 5 $\mu$ m.

Los resultados anteriores indican que la ausencia conjunta de los receptores no está afectando a la salida general del RE, pero sí parecen estar implicados en el mantenimiento del *cis*-Golgi.

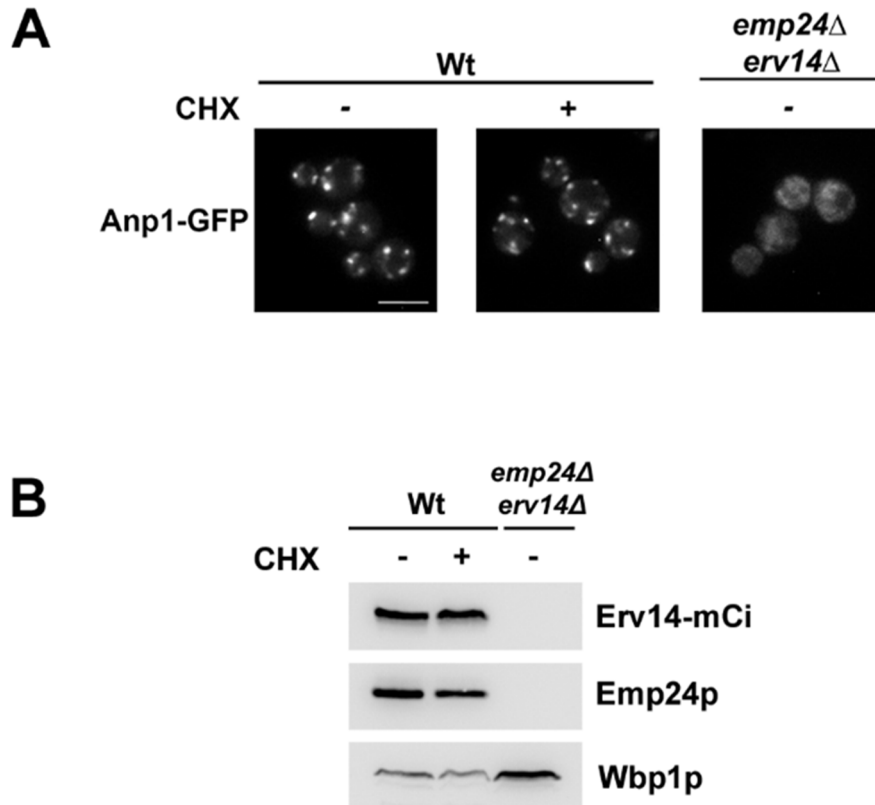
Para confirmar que en el doble mutante no se afecta de forma general la exportación desde el RE, se analizaron los sitios de salida del RE (ERES). Para ello, se usó la proteína de cubierta COPII Sec13p etiquetada con GFP (Shindiapina & Barlowe, 2010). El patrón de puntos típico de Sec13p no parece verse afectado en *emp24Δerv14Δ* con respecto a los mutantes simples y el silvestre, indicando que los ERES se organizan de forma normal en el doble mutante (Figura 22). Este resultado está en consonancia con el resultado anterior de que Rer1-GFP no se queda retenido en el RE (Figura 18), con lo que parece que tanto la organización de los ERES como la propia salida del RE no se ven afectadas de forma general en el doble mutante.

En segundo lugar, para confirmar que la ausencia conjunta de los receptores afecta al *cis*-Golgi, se analizó morfológicamente este orgánulo. Para marcar las cisternas *cis* del Golgi se utilizaron dos proteínas etiquetadas con GFP: Anp1p, una enzima glicosiltransferasa del compartimento *cis* del Golgi, y Sec21p, componente de la cubierta COPI. Como se puede ver en la figura 22, ambos marcadores mostraron su localización característica en puntos correspondiente a las cisternas *cis* del Golgi tanto en la cepa silvestre como en el mutante simple *emp24Δ*. El patrón se vuelve levemente más difuso en el mutante simple *erv14Δ*. Esta localización punteada se alteró completamente en el doble mutante, como se observó anteriormente para Rer1-GFP, apareciendo un patrón difuso con puntos muy pequeños y poco brillantes, que podría corresponderse a una fragmentación o vesicularización del *cis*-Golgi.



**Figura 22. El *cis*-Golgi está afectado en el doble mutante *emp24* $\Delta$ *erv14* $\Delta$ .** Células que expresaban Sec13-GFP, Anp1-GFP o Sec21-GFP creciendo en fase exponencial fueron analizadas *in vivo*, en tres ensayos independientes. Al menos el 95% de las células analizadas ( $n \geq 100$ ) presentaban el mismo patrón. La barra de escala equivale a 5 $\mu$ m.

Los datos mostrados hasta este punto indican que la ausencia combinada de los receptores Erv14p y el complejo p24 provocan una desorganización del *cis*-Golgi. Sin embargo, no se puede discernir si este defecto es provocado directamente porque los propios receptores no salen del RE, o indirectamente porque las cargas de dichos receptores no son exportadas eficientemente del RE en el doble mutante *emp24* $\Delta$ *erv14* $\Delta$ . Para distinguir entre estas dos posibilidades, se analizó la morfología del *cis*-Golgi empleando el marcador Anp1-GFP en una cepa silvestre en presencia de cicloheximida, un inhibidor general de la síntesis de proteínas. Con ello, se pretende recrear una situación en la que el RE no albergue proteínas carga. Como se observa en la figura 20, el patrón de puntos de Anp1-GFP no se vio afectado en la cepa silvestre bajo el tratamiento con cicloheximida (Figura 23 A). Como control, se comprobó mediante *Western Blot* que los receptores de carga seguían presentes en la célula tras el tratamiento con la droga (Figura 23 B).

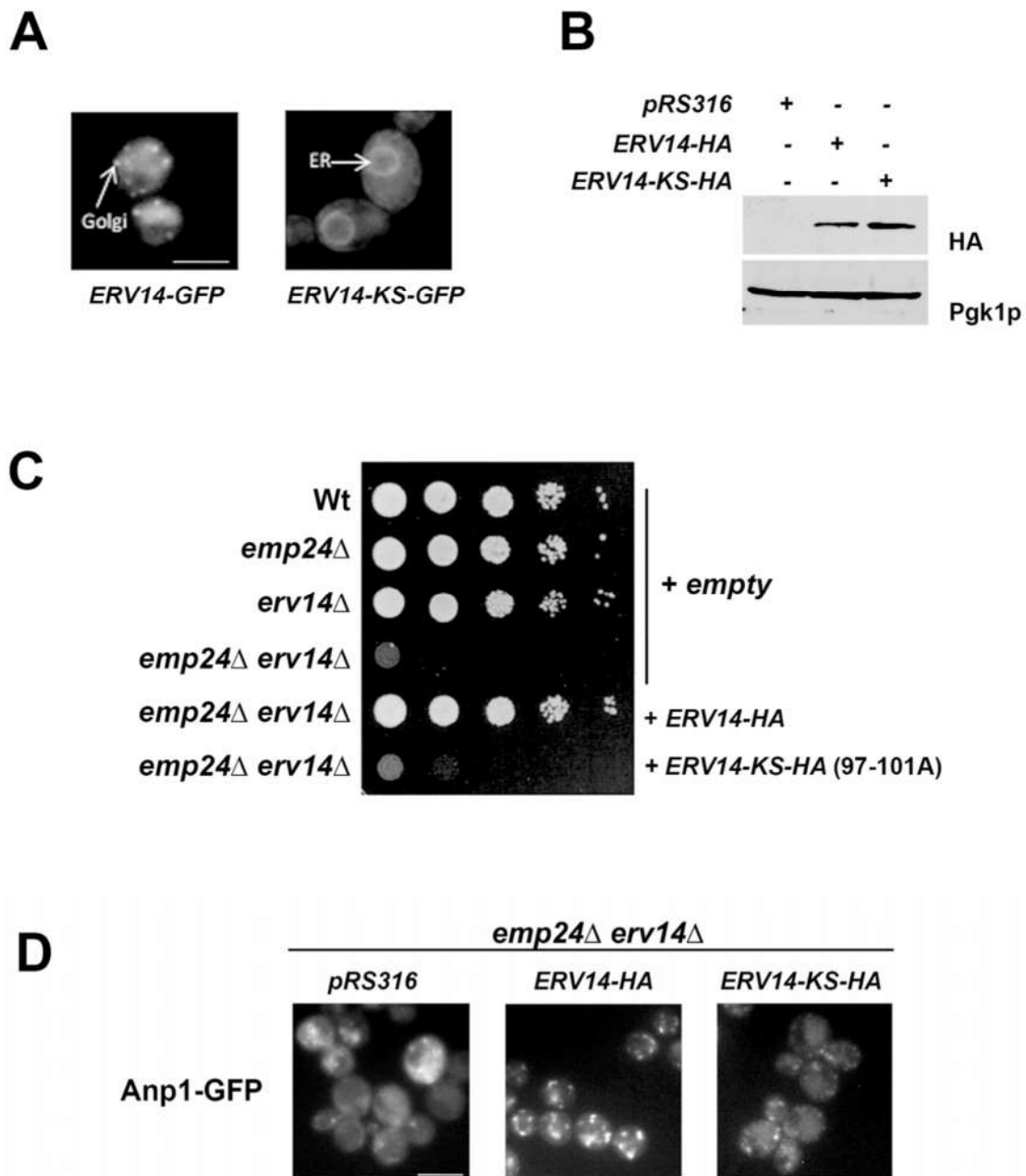


**Figura 23. La desorganización del cis-Golgi en *emp24Δerv14Δ* no se debe a la falta de transporte de las cargas. (A)** Células que expresaban Anp1-GFP, creciendo en fase exponencial fueron tratadas con cicloheximida 200  $\mu\text{g/ml}$  durante una hora, y analizadas *in vivo*, en tres ensayos independientes. Al menos el 95% de las células analizadas ( $n \geq 100$ ) presentaban el mismo patrón. La barra de escala equivale a 5 $\mu\text{m}$ . **(B)** Se realizaron extractos celulares de las cepas analizadas en (A), y se analizaron mediante electroforesis y *Western Blot*.

Este resultado sugiere que para que se forme el *cis*-Golgi es necesario que los receptores de carga salgan del RE, ya que la sola ausencia de sus cargas no es suficiente para provocar el defecto observado en el doble mutante. Para investigar más sobre esta hipótesis, se hizo uso de una versión de Erv14p que tiene mutados los residuos de unión a COPII, Erv14-KS (Powers & Barlowe, 2002), de modo que es incapaz de incorporarse en vesículas COPII y por tanto permanece retenida en el RE (Figura 24 A). Como se aprecia en la figura 24 B, tanto la versión silvestre como la versión mutante de Erv14p etiquetadas con HA se expresan a los mismos niveles en las células.

La expresión de Erv14-KS-HA no pudo revertir el defecto de crecimiento del doble mutante *emp24Δerv14Δ*, ni el fenotipo de desorganización del *cis*-Golgi, mientras que sí lo hizo la versión silvestre (Figura 24 C y D), indicando que es necesario que los

receptores abandonen el RE para realizar su función de organización del *cis*-Golgi. De estos datos, se deduce además que el motivo del defecto de crecimiento del doble mutante es la desorganización de su *cis*-Golgi, ya que al recuperar la estructura de este orgánulo se recupera el crecimiento. Dicho de otro modo, es necesario que los receptores de carga salgan del RE para que se forme bien el *cis*-Golgi y la célula sea viable.



**Figura 24.** Los receptores de carga necesitan salir del RE para realizar su función conjunta con respecto a la organización del *cis*-Golgi. **(A)** Células que expresaban *Erv14*-GFP o *Erv14*-KS-GFP creciendo en fase exponencial fueron analizadas *in vivo*. **(B)** Se realizaron extractos de células que expresaban el vector vacío, *Erv14*-HA o *Erv14*-KS-HA creciendo en fase exponencial, y se analizaron mediante electroforesis y *Western Blot*. **(C)** Las

estirpes en crecimiento exponencial expresando el vector vacío, Erv14-HA o Erv14-KS-HA en medio SC-ura fueron diluidas de forma seriada a partir de  $DO_{600}=0,5$ . Gotas de 4  $\mu$ l de cada dilución fueron sembradas en placas de medio SC-ura y cultivadas durante 48 horas. **(D)** Células que expresaban Anp1-GFP y el vector vacío, Erv14-HA o Erv14-KS-HA, creciendo en fase exponencial, fueron analizadas *in vivo*, en tres ensayos independientes. Al menos el 95% de las células analizadas ( $n \geq 100$ ) presentaban el mismo patrón. La barra de escala equivale a 5  $\mu$ m.

Los resultados mostrados hasta ahora parecen indicar que en el doble mutante *emp24 $\Delta$ erv14 $\Delta$*  no existe un problema general de salida del RE, aunque las cargas específicas de estos dos receptores sí se vean retenidas en dicho orgánulo. No obstante, en el doble mutante sí se observa una clara desorganización del *cis*-Golgi. Este defecto no parece estar provocado por la retención de las cargas de estos receptores en el RE, sino por la retención de los propios receptores. De este modo, el proceso que se esté viendo afectado en el doble mutante, y que da lugar al fenotipo de *cis*-Golgi desorganizado, debe estar ocurriendo en un paso posterior a la salida del RE.

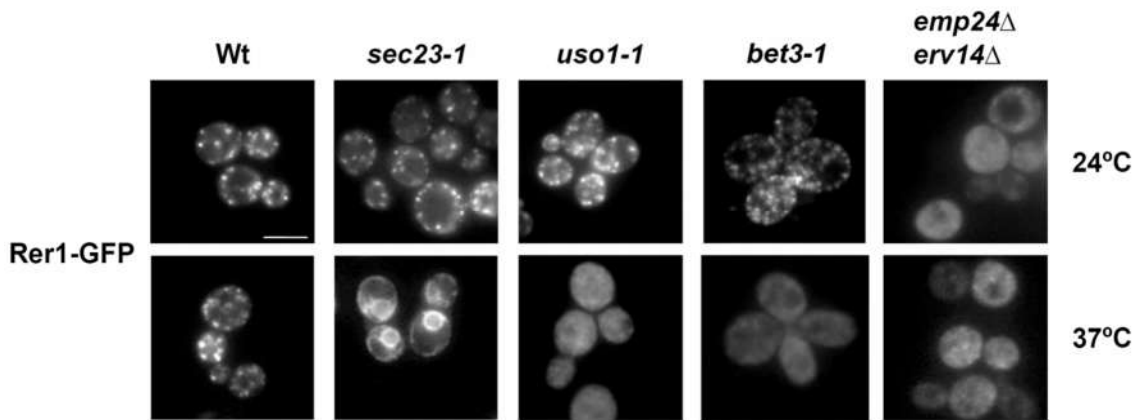
## **1.2. Los receptores de carga tienen una función en el anclaje vesicular necesario para el ensamblaje del *cis*-Golgi**

Según el modelo de maduración cisternal del Golgi (Glick & Malhotra, 1998; Pelham, 1998), la formación del *cis*-Golgi ocurre mediante fusión homotípica de vesículas COPII producidas en el RE, proceso que depende de eventos de anclaje que promuevan la fusión de estas vesículas entre sí.

En dichos eventos de anclaje vesicular del *cis*-Golgi intervienen distintos factores, siendo los mejor descritos el complejo TRAPPI, la GTPasa Ypt1p (Rab1) y el factor de anclaje *coiled-coil* Uso1p (p115), todos esenciales para la viabilidad celular (véase Introducción, 3.2.1). Para valorar la posibilidad de que la desorganización del *cis*-Golgi en el doble mutante se debiera a un defecto en el anclaje de vesículas, se comparó su fenotipo con el de mutantes de estos factores de anclaje vesicular, *uso1-1* y *bet3-1*. Como control se utilizó el mutante de cubierta COPII *sec23-1*, que bloquea la salida del RE al inhibir la formación de vesículas COPII, por lo que se observó Rer1-GFP retenida en el RE. En *uso1-1* y *bet3-1*, Rer1-GFP se deslocalizó completamente, dando lugar a un patrón difuso, con puntos muy pequeños y poco brillantes, fenotipo muy parecido al observado en el doble mutante *emp24 $\Delta$ erv14 $\Delta$*  (Figura 25). Por tanto,

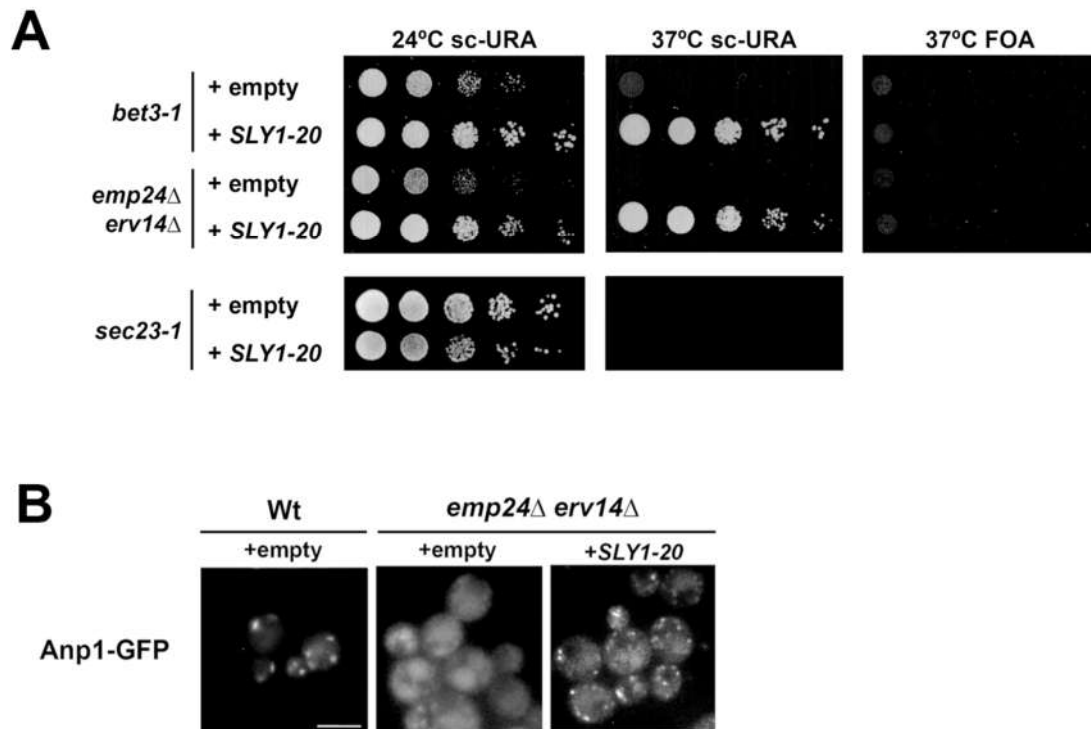


el desensamblaje del compartimento *cis* del Golgi observado en el doble mutante podría estar originado por el anclaje ineficiente de las vesículas COPII para dar lugar a dicho compartimento.



**Figura 25. Mutaciones en los factores de anclaje vesicular generan defectos similares a los provocados por la ausencia combinada de los receptores de carga.** Células que expresaban Rer1-GFP, creciendo en fase exponencial, fueron analizadas in vivo a temperatura permisiva o tras 15 minutos de incubación a 37 °C. Al menos el 95% de las células analizadas de cada estirpe a cada temperatura ( $n \geq 100$ ) presentaban el mismo patrón en tres repeticiones independientes. La barra de escala equivale a 5 $\mu$ m.

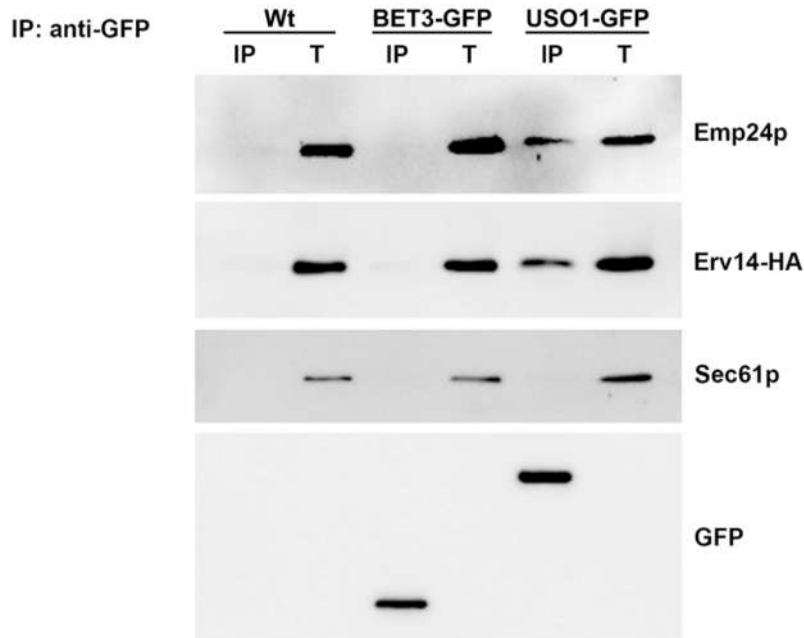
Para corroborar este aparente defecto de anclaje vesicular, se utilizó *SLY1-20*, un mutante dominante de Sly1p, proteína SM que actúa aguas abajo de los factores de anclaje vesicular, de forma que se une a Sed5p aumentando la fidelidad del ensamblaje de las cuatro SNAREs y estabilizando el complejo *trans*-SNARE (Ferguson et al, 2009; Peng & Gallwitz, 2002). El alelo *SLY1-20* se identificó inicialmente como un supresor de la ausencia de Ypt1p (*Supresor os Loss of Ypt1*; (Dascher et al, 1991)), y se ha visto que también suprime la termosensibilidad de otros mutantes de anclaje del *cis*-Golgi como *uso1-1* y *bet3-1* (Sacher et al, 1998; Sapperstein et al, 1996). Como se aprecia en la figura 26 A, *SLY1-20* fue capaz de suprimir el defecto de crecimiento del doble mutante, al igual que el de *bet3-1*, que se llevó como control positivo. En cambio, *SLY1-20* fue incapaz de suprimir defectos de formación de vesículas COPII, como es el caso de *sec23-1*, con lo cual se volvió a comprobar que *emp24Δerv14Δ* no presenta defectos en la producción de vesículas COPII desde el RE. Además, al expresar *SLY1-20* en el doble mutante y examinar la morfología del *cis*-Golgi con el marcador Anp1-GFP, se observó que este alelo recuperaba, casi totalmente, la estructura de dicho orgánulo (Figura 26 B).



**Figura 26. El doble mutante *emp24Δerv14Δ* presenta un defecto de anclaje. (A)** Las estirpes en crecimiento exponencial en medio SC fueron diluidas de forma seriada a partir de  $DO_{600}=0,5$ . Gotas de 4  $\mu$ l de cada dilución fueron sembradas en placas de medio SC y cultivadas durante 48 horas a las temperaturas indicadas. **(B)** Células que expresaban Anp1-GFP creciendo en fase exponencial fueron analizadas *in vivo*, en tres ensayos independientes. Al menos el 95% de las células analizadas ( $n \geq 100$ ) presentaban el mismo patrón. La barra de escala equivale a 5  $\mu$ m.

De estos resultados se deduce que el doble mutante *emp24Δerv14Δ* presenta un defecto en el anclaje entre las vesículas COPII que se producen desde el RE y que darán lugar al *cis*-Golgi. Ahora bien, los datos obtenidos hasta ahora no son suficientes para saber cómo los receptores de carga en conjunto podrían estar favoreciendo estos eventos de anclaje vesicular. Por ello, se planteó la posibilidad de que los receptores interaccionaran físicamente con los factores de anclaje involucrados en estos procesos. Para resolver esta incógnita, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación entre los factores de anclaje Uso1p y TRAPPI y los receptores de carga, que se muestran en la figura 27. Al inmunoprecipitar Uso1p etiquetado con GFP se co-precipitaron receptores de carga como Emp24p, Erv14p y Erv29p, mientras que Sec61p, proteína muy abundante en el RE, no se detectó en el co-precipitado. En cambio, al inmunoprecipitar Bet3 (subunidad del complejo TRAPPI) etiquetada con GFP, no se detectaron los receptores de carga en el co-precipitado. Curiosamente, Uso1p no fue una de las proteínas detectadas en la proteómica inicial,

hecho que podría deberse a que se partió de un extracto enriquecido en RE, o al gran peso molecular de Uso1p (206 KDa).



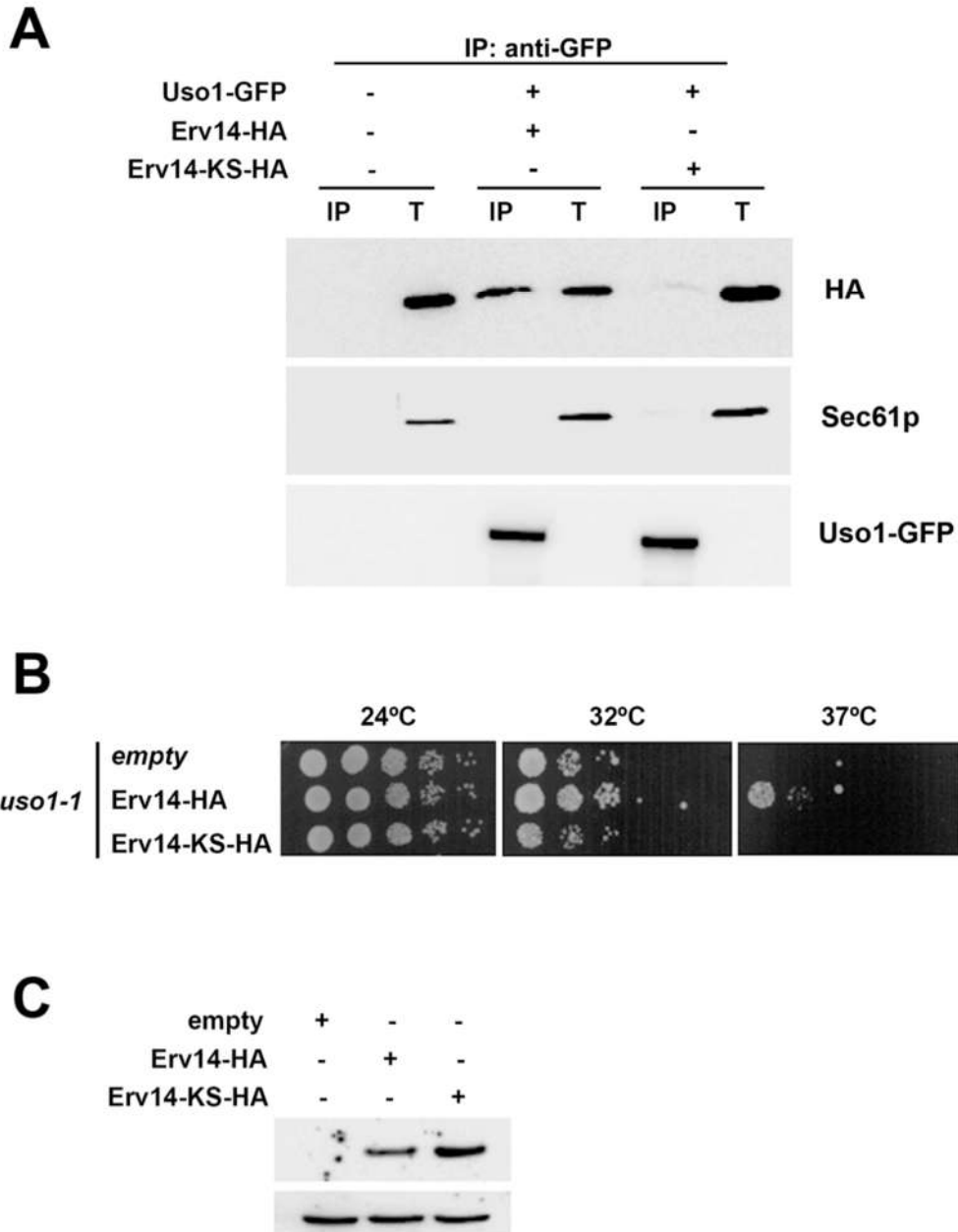
**Figura 27. Los receptores de carga interactúan físicamente con el factor de anclaje Uso1.** Se inmunoprecipitó Bet3-GFP o Uso1-GFP a partir de extractos de proteínas disueltos con 1% digitonina. Posteriormente, se analizó la presencia de las proteínas mostradas mediante electroforesis y *Western Blot*. T representa el 1% del extracto antes de la inmunoprecipitación.

Anteriormente en este capítulo, se ha descrito que es necesario que los receptores de carga salgan del RE para que el *cis*-Golgi mantenga su estructura, y esto parece ser debido a que los receptores son necesarios para el anclaje vesicular a ese nivel, existiendo una interacción física entre estos y los factores de anclaje vesicular.

Siguiendo este razonamiento, se recurrió a la versión mutante de Erv14 que no abandona el RE (Erv14-KS-HA), para comprobar si sigue siendo capaz de unirse a Uso1p. Para ello, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación de Uso1-GFP, y se valoró la interacción entre este factor de anclaje y la forma silvestre y mutada de Erv14-HA. Como se puede observar en la figura 28 A, solamente la versión silvestre de Erv14-HA es capaz de interactuar físicamente con Uso1p, es decir, que la interacción física entre los receptores de carga y Uso1p ocurre cuando los RE ya han abandonado el RE y viajan en vesículas COPII.

Esta interacción física a nivel de vesículas parece tener un significado funcional, ya que la versión silvestre de Erv14-HA recuperó el crecimiento del mutante *uso1-1*, mientras que la versión mutante Erv14-KS-HA no lo hizo (Figura 28 B). Se comprobó en paralelo que la expresión de ambas formas de la proteína era similar (Figura 28 C).

Parece por tanto que la plataforma de receptores está contribuyendo a la función de Uso1p en el anclaje de las vesículas COPII, y que para que ocurra esa contribución es necesario que los receptores salgan del RE.

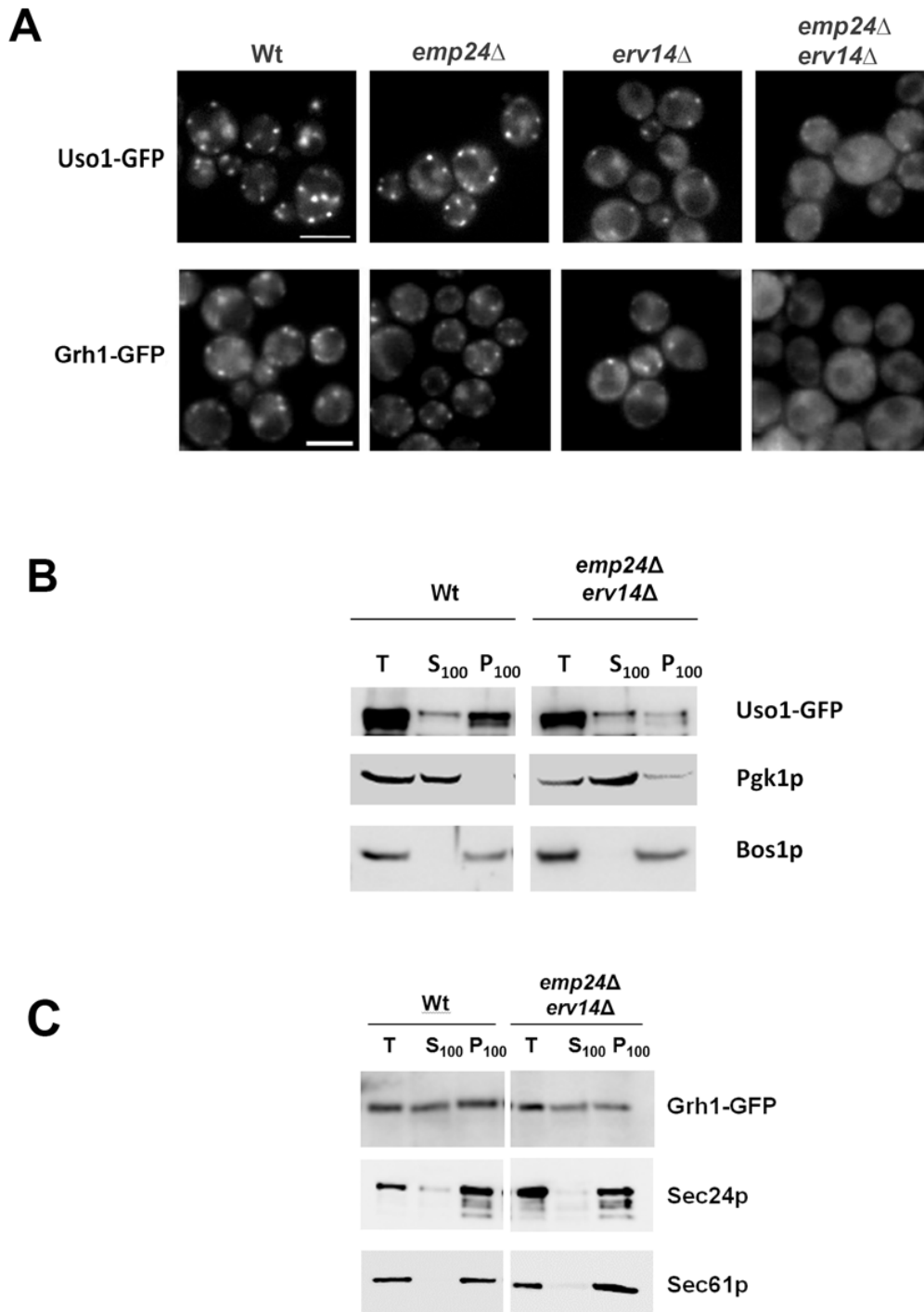


**Figura 28. Los receptores de carga deben salir del RE para realizar su función con respecto a Uso1p. (A)** Se inmunoprecipitó Uso1-GFP a partir de extractos de proteínas disueltos con 1% digitonina. Posteriormente, se analizó la presencia de Erv14-HA y Erv14-KS-HA en el co-precipitado mediante electroforesis y *Western Blot*. T representa el 1%

del extracto antes de la inmunoprecipitación. **(B)** Las estirpes en crecimiento exponencial expresando el vector vacío, Erv14-HA o Erv14-KS-HA en medio SC-ura fueron diluidas de forma seriada a partir de  $DO_{600}=0,5$ . Gotas de 4  $\mu$ l de cada dilución fueron sembradas en placas de medio SC-ura y cultivadas durante 48 horas. **(C)** Se analizó la expresión de las construcciones en las estirpes usadas en (B) mediante electroforesis y *Western Blot* de extractos totales.

Ante este escenario, la hipótesis que surgió fue que quizás los receptores estén reclutando a Uso1p a las vesículas COPII para que allí pueda ejercer su función de anclaje vesicular. Para estudiar esta posibilidad, se analizó en primer lugar si la ausencia conjunta de varios receptores afectaba a la localización de Uso1-GFP. En el silvestre y el mutante simple *emp24 $\Delta$* , Uso1-GFP presentó su patrón de puntos correspondientes al Golgi. En el mutante simple *erv14 $\Delta$*  se observó un patrón más difuso, aunque siguen apareciendo puntos. Sin embargo, en el doble mutante *emp24 $\Delta$ erv14 $\Delta$*  el patrón se volvió completamente difuso. Como control, se vio el factor de anclaje vesicular de *cis*-Golgi Grh1p etiquetado con GFP, obteniéndose el mismo patrón que para Uso1-GFP (Figura 29 A). Es decir, los factores de anclaje del *cis*-Golgi están deslocalizados en el doble mutante.

Dado que el doble mutante presenta un *cis*-Golgi desorganizado, de estos datos no es posible concluir si, efectivamente, la falta de ambos receptores provoca un peor reclutamiento de Uso1p y Grh1p a las membranas, o si estos factores de anclaje se siguen reclutando correctamente en *emp24 $\Delta$ erv14 $\Delta$* , pero al estar el *cis*-Golgi desorganizado se observa también un patrón difuso para Uso1-GFP y Grh1-GFP. Se valoraron estas posibilidades utilizando la técnica de subfraccionamiento, mediante la centrifugación diferencial de extractos celulares a 100.000  $xg$  para separar las membranas (P100) del citosol (S100). A continuación, se comparó la presencia de los factores de anclaje etiquetados con GFP en dicho precipitado (P100) respecto a su sobrenadante (S100) en la cepa silvestre y *emp24 $\Delta$ erv14 $\Delta$* . Como se puede ver en la figura 29 B, en el doble mutante la presencia de Uso1-GFP en las membranas del Golgi y de las vesículas (P100) disminuyó significativamente con respecto al silvestre. En cambio, el factor de anclaje vesicular Grh1p no cambió su localización en membranas en el doble mutante (Figura 29 C), con lo cual el defecto de reclutamiento parece específico de Uso1p. Estos resultados sugieren que Uso1p requiere la presencia de los receptores para asociarse eficientemente a la membrana del Golgi.



**Figura 29. Los receptores de carga actúan reclutando a Uso1p específicamente a las membranas. (A)** Células que expresaban Uso1-GFP o Grh1-GFP creciendo en fase exponencial fueron analizadas *in vivo*, en tres ensayos independientes. Al menos el 95% de las células analizadas ( $n \geq 100$ ) presentaban el mismo patrón. La barra de escala equivale a 5 $\mu$ m. **(B y C)** A partir de esferoplastos, se realizó un subfraccionamiento por centrifugación diferencial, a partir del S<sub>13</sub>. En P<sub>100</sub> aparecen las proteínas presentes en membranas del Golgi y las vesículas. En S<sub>100</sub> aparecen las proteínas presentes en el citosol. Las proteínas presentes en cada fracción se analizaron mediante electroforesis y *Western Blot*.

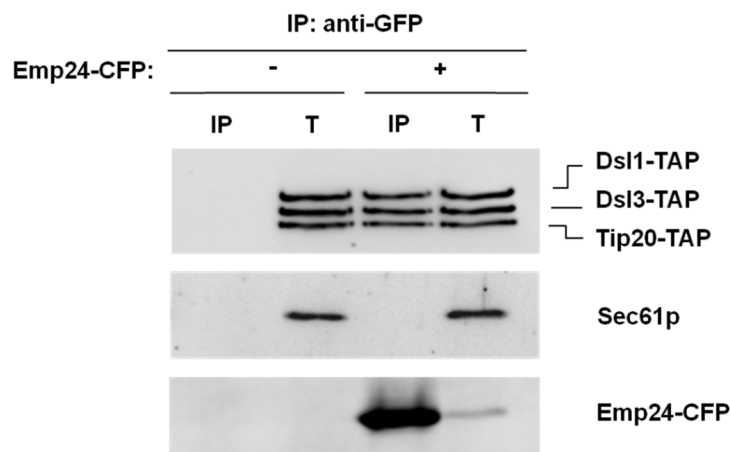
Los receptores de carga interactúan con la cubierta COPII, de forma que el menor reclutamiento a membranas de Uso1p podría ser un efecto indirecto producido por la presencia de menos receptores en las vesículas, que hagan que la cubierta se mantenga peor sobre estas, haciendo que se reclute menos TRAPPI, de forma que se active menos Ypt1p y por tanto se atraiga a menos Uso1p a las membranas como resultado final. Esta posibilidad se descartó, ya que se observó que en el subfraccionamiento de la subunidad de COPII Sec24p, esta proteína no disminuyó su asociación a las membranas en el doble mutante (Figura 29 B y C).

Por lo tanto, estos datos apoyan la idea de que los receptores están reclutando directamente a Uso1p a las membranas, favoreciendo así los eventos posteriores de anclaje y fusión necesarios para la formación del *cis*-Golgi.

## 2. Papel de los receptores de carga en el anclaje de las vesículas COPI al retículo endoplásmico

En este capítulo se aborda el segundo de los objetivos planteados en esta tesis. A tenor de los resultados del *pull down* de Emp24-TAP (Figura 17), en el que se observa la presencia en el co-precipitado de los componentes del complejo Dsl1, el factor de anclaje que une las vesículas COPI al RE, se planteó profundizar en el carácter de esta interacción y su posible significado funcional.

En primer lugar, se procedió a estudiar en más profundidad la interacción física entre los complejos p24 y Dsl1. Para confirmar los datos proteómicos, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación entre ambos complejos proteicos. Al inmunoprecipitar Emp24-GFP, se co-precipitaron las tres subunidades del complejo Dsl1, mientras que proteínas muy abundantes en el RE, como la subunidad del translocón Sec61p, prácticamente no se detectaron en el co-precipitado (Figura 30).

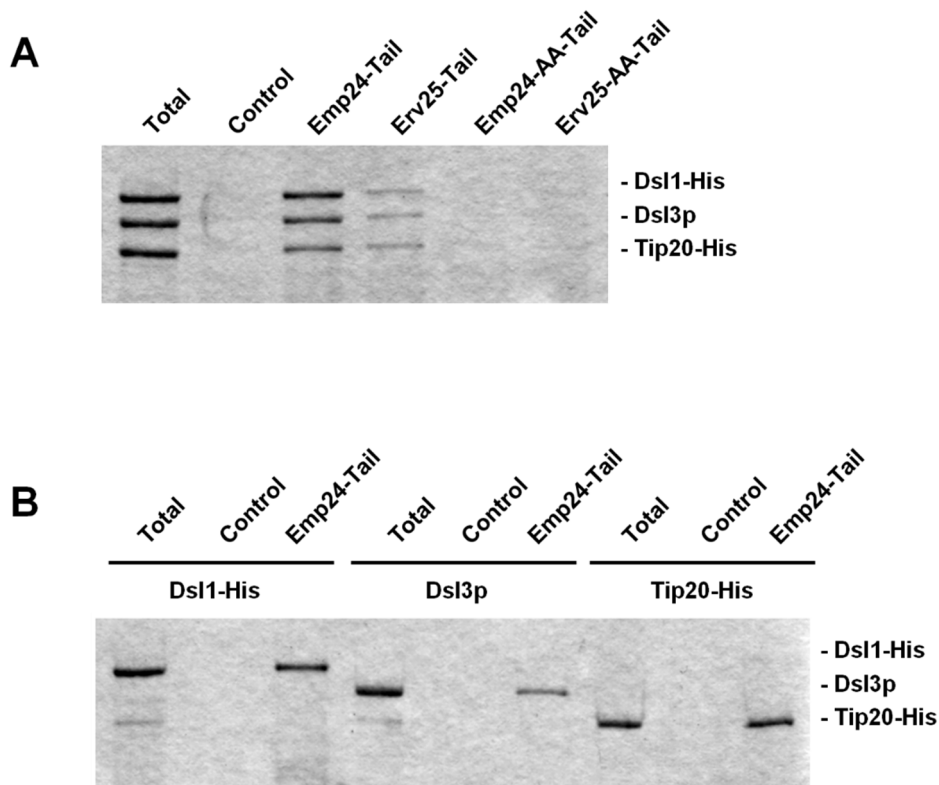


**Figura 30. Los complejos p24 y Dsl1 interactúan físicamente *in vivo*.** Se inmunoprecipitó Emp24-GFP a partir de un extracto de proteínas enriquecido en RE, disuelto con 1% digitonina. Posteriormente, se analizó la presencia de proteínas en el co-precipitado mediante electroforesis y *Western Blot*. T representa el 1% del extracto antes de la inmunoprecipitación.

Los datos de co-inmunoprecipitación indicaron que el receptor de carga p24 y el factor de anclaje Dsl1 interactúan físicamente entre ellos. El complejo p24 interactúa con la cubierta COPI y la estabiliza sobre la membrana del Golgi, contribuyendo a la producción eficiente de vesículas COPI (Aguilera-Romero et al, 2008). De esta forma, es posible que las proteínas p24 sigan ejerciendo esta función



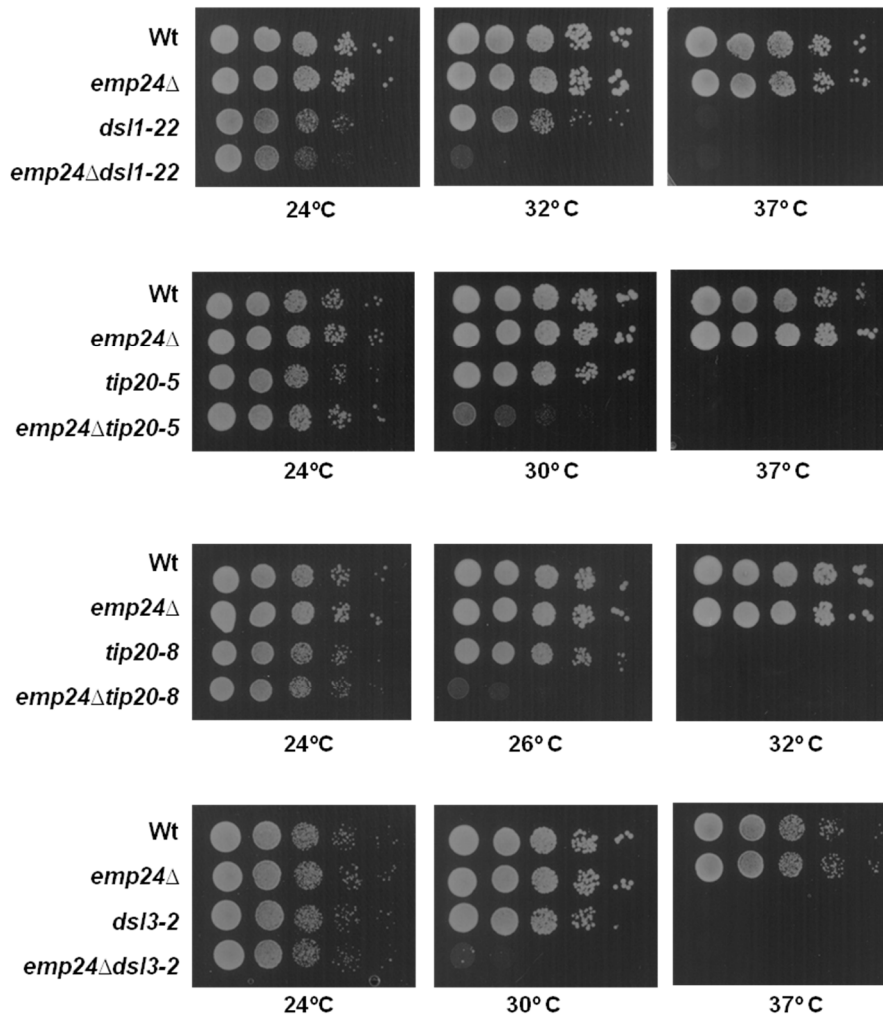
de sostén de la cubierta tras la producción de la vesícula, para facilitar el reconocimiento de dicha vesícula por parte del complejo Dsl1, que también interacciona con COPI a través de su subunidad Dsl1p (Andag & Schmitt, 2003). En ese caso, la interacción observada en los experimentos de co-inmunoprecipitación sería indirecta a través del coatómero. Por tanto, para determinar si esta interacción física es directa, se analizó la interacción *in vitro*, para lo que se utilizaron péptidos sintéticos correspondientes a los tallos citosólicos de las subunidades más relevantes del complejo p24, Emp24p y Erv25p, acoplados a una matriz de tiopropil-sefarosa (Belden & Barlowe, 2001a). Esta matriz se incubó con el complejo Dsl1 purificado recombinantemente. Como se observa en la figura 31 A, el tallo citosólico de la subunidad Emp24p interacciona directamente con el complejo Dsl1, mientras que el tallo de Erv25p no lo hace. Además, cuando se utilizaron tallos citosólicos que tenían mutadas las señales di-fenilalanina de unión a COPI, se observó que no ocurría tal interacción. Por otro lado, cuando se incubó el tallo citosólico de Emp24p con las subunidades del complejo Dsl1 por separado, no se observó una preferencia clara de unión a ninguna de ellas en concreto por parte de Emp24p (Figura 31 B).



**Figura 31. El complejo p24 y Dsl1 interaccionan directamente *in vitro*.** (A) Péptidos sintéticos correspondientes a los dominios citosólicos de Emp24p (RRFFEVTSLV) y Erv25p (KNYFKFKHII) y sus mutantes de unión a COPI Emp24-AA (RRAAEVTSLV) y Erv25p-AA (KNYAKAKHII) se acoplaron a bolas de tiopropil-sefarosa y se incubaron con el complejo Dsl1

purificado. El material unido se resolvió por electroforesis y se analizó por tinción de Coomasie. (B) Los componentes purificados del complejo Dsl1 se incubaron individualmente con los péptidos del tallo citosólico de Emp24p unido a tiopropil-sefarosa. El material unido se resolvió por electroforesis y se analizó por tinción de Coomasie.

Los datos anteriores indican que el complejo p24 y el factor de anclaje vesicular Dsl1 interaccionan físicamente de forma directa. Para determinar si dicha interacción tiene un significado funcional en la célula, se estudió la posible interacción genética entre ambos complejos. Las tres subunidades del complejo Dsl1 son esenciales, por lo que se combinaron alelos termosensibles de estos genes con *emp24Δ* para obtener dobles mutantes, realizándose a continuación ensayos de crecimiento en gotas. Todos los dobles mutantes que se estudiaron presentaron una fuerte interacción genética, viéndose su crecimiento muy retrasado con respecto a los mutantes simples (Figura 32).

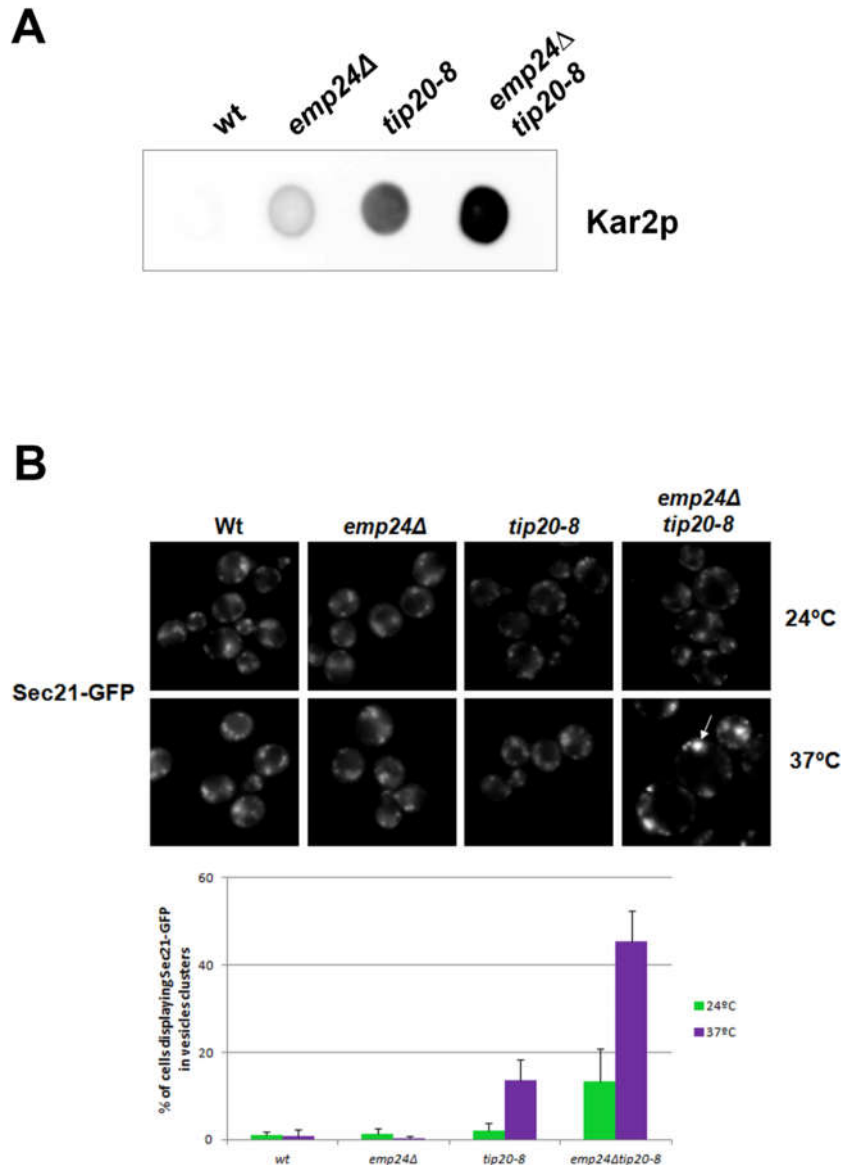


**Figura 32. Los complejos p24 y Dsl1 interaccionan funcionalmente entre sí.** Las estirpes en crecimiento exponencial en medio SC fueron diluidas de forma seriada a partir de

DO600=0,5. Gotas de 4  $\mu$ l de cada dilución fueron sembradas en placas de medio SC y cultivadas durante 48 horas a las temperaturas indicadas.

Estos resultados indican que ambos complejos están interaccionando funcionalmente en la célula. Puesto que el complejo Dsl1 está implicado en los eventos de anclaje vesicular en el transporte retrógrado desde el Golgi al RE, la siguiente cuestión fue por tanto, si el complejo p24 estaba de alguna manera colaborando con Dsl1 en este evento de transporte, y por ello se observaban estas interacciones físicas y genéticas. Para abordar este punto, se recurrió en primer lugar a un ensayo de secreción de Kar2p (Schuldiner et al, 2005). En condiciones normales, la chaperona Kar2p que escapa por *bulk flow* al Golgi es devuelta al RE por el receptor retrógrado Erd2p. Cuando existen defectos en el transporte retrógrado Golgi-RE, Kar2p avanza por la ruta secretora hasta ser secretada al medio extracelular, pudiéndose detectar por *Western Blot*. Así, se analizó la secreción de Kar2p en *emp24 $\Delta$ tip20-8*, observándose que el nivel de Kar2p secretada era mucho mayor en el mutante doble que en los mutantes simples (Figura 33 A). Este dato apoya la idea de que el complejo p24 esté ayudando de algún modo al complejo Dsl1 en sus funciones de anclaje vesicular. Sin embargo, el defecto observado no tiene por qué corresponder a un defecto de anclaje, sino que indica únicamente que el doble mutante presenta un defecto mayor en el transporte retrógrado Golgi-RE, sin discernir en qué paso concreto de este transporte.

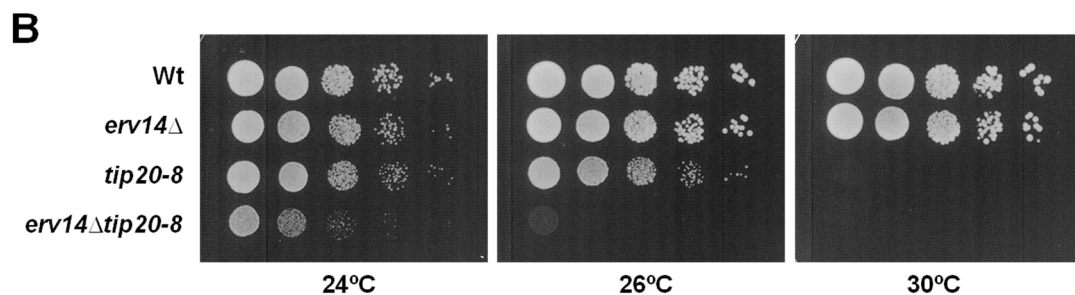
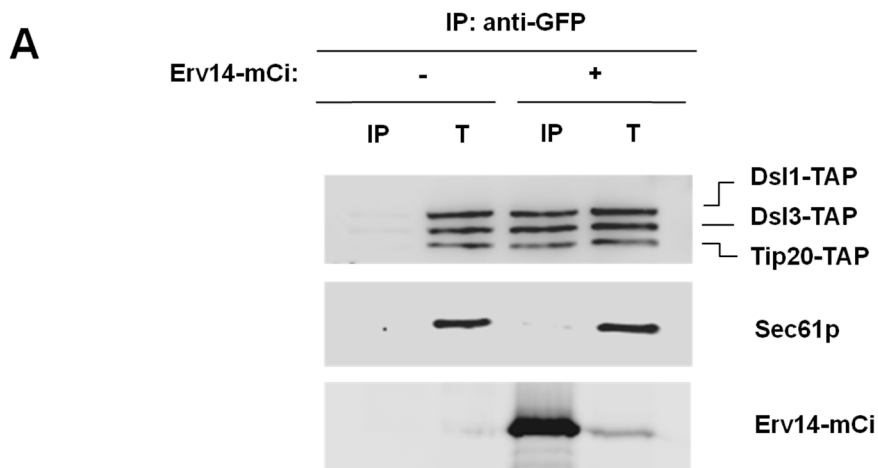
Por tanto, fue necesario utilizar un ensayo que distinguiera de forma específica fallos en el anclaje mediado por Dsl1. Anteriormente se ha descrito que los mutantes del complejo Dsl1 presentan una acumulación de vesículas COPI en las inmediaciones del RE pues no se pueden fusionar a él, y esta acumulación se puede detectar mediante fluorescencia *in vivo* (Zink et al, 2009). De este modo, se empleó la subunidad de la cubierta COPI Sec21p etiquetada con GFP como marcador de las vesículas COPI. Como se ve en la figura 33 B, el doble mutante presentó una mayor acumulación de vesículas COPI tras el mismo periodo de incubación a temperatura restrictiva que *tip20-8*, con lo cual parece que la mutación nula *emp24 $\Delta$*  está exacerbando el defecto de anclaje vesicular de *tip20-8*.



**Figura 33. El complejo p24 colabora con el complejo Dsl1 en su función de anclaje de vesículas COPI al RE. (A)** Las estirpes en crecimiento exponencial en medio SC fueron llevadas a una  $DO_{600}=0,5$  y se sembraron gotas de 4  $\mu$ l en placas de medio SC. Una vez secas, se cubrieron con una membrana de nitrocelulosa húmeda y se cultivaron durante 24 horas a 24 °C. Posteriormente las proteínas en la membrana se analizaron por Western Blot. **(B)** Células que expresaban Sec21-GFP creciendo en fase exponencial fueron analizadas *in vivo*, en tres ensayos independientes. Al menos el 95% de las células analizadas ( $n \geq 100$ ) presentaban el mismo patrón. La barra de escala equivale a 5  $\mu$ m.

Los resultados obtenidos hasta ahora indican que el receptor de carga p24 y el factor de anclaje Dsl1 presentan una relación física y funcional, que podría basarse en una cooperación entre ambos complejos para el anclaje de las vesículas COPI al RE.

Previamente se ha descrito que la expresión de un plásmido de bajo número de copias de *ERV14* es capaz de recuperar el crecimiento de ciertos mutantes termosensibles de *DSL1* (Vanrheenen et al, 2001). Además, en el capítulo anterior de esta tesis, se ha mostrado que los receptores de carga tienen un papel cooperativo en el transporte anterógrado RE-Golgi, necesario para la organización funcional del *cis*-Golgi. Por todo ello, en este punto surgió la idea de que quizás los receptores de carga también estén realizando una función conjunta en el transporte retrógrado Golgi-RE, planteando la cuestión de si Erv14p también estaría interactuando con Dsl1. Para testar esta posibilidad, se analizó en primer lugar si el receptor de carga Erv14p interactuaba físicamente con el complejo Dsl1, para lo cual se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación entre dichas proteínas.



**Figura 34. El receptor de carga Erv14p y el complejo Dsl1 interactúan física y funcionalmente.** (A) Se inmunoprecipitó Erv14-mCi a partir de un extracto de proteínas enriquecido en RE, disuelto con 1% digitonina. Posteriormente, se analizó la presencia de proteínas en el co-precipitado mediante electroforesis y *Western Blot*. T representa el 1% del extracto antes de la inmunoprecipitación. (B) Las estirpes en crecimiento exponencial en medio SC fueron diluidas de forma seriada a partir de  $DO_{600}=0,5$ . Gotas de 4  $\mu$ l de cada dilución fueron sembradas en placas de medio SC y cultivadas durante 48 horas a las temperaturas indicadas.

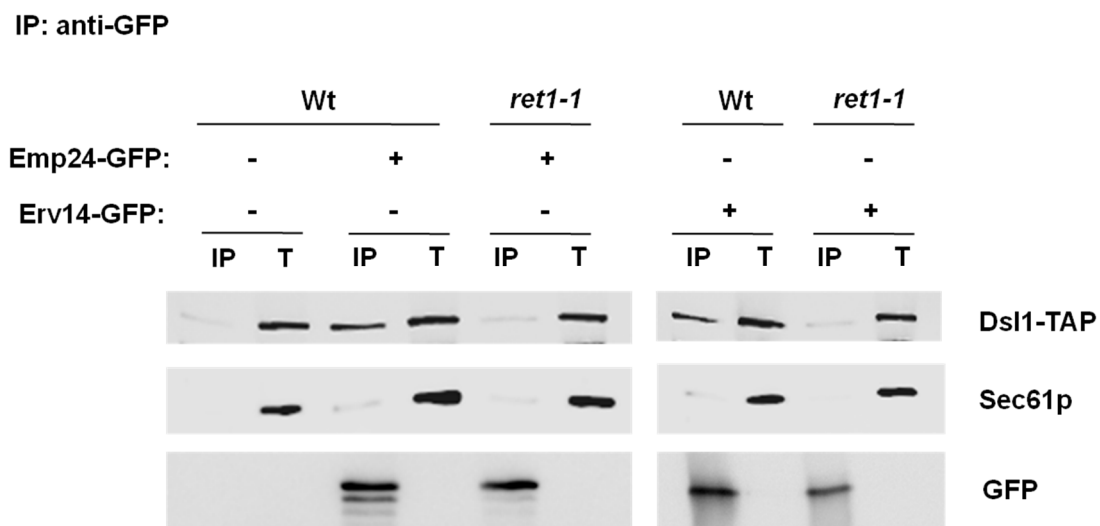
Al inmunoprecipitar Erv14-mCi, se co-precipitaron las tres subunidades del complejo Dsl1, mientras que Sec61p prácticamente no se detectó en el co-precipitado (Figura 34 A). La eficiencia de unión entre Erv14p y el complejo Dsl1 fue muy similar a la que se obtuvo anteriormente entre los complejos p24 y Dsl1. La siguiente pregunta fue, por tanto, si esta interacción física observada tenía un significado funcional en la célula, para lo cual se analizó la posible interacción genética. Se combinó el alelo termosensible *tip20-8* con el mutante nulo *erv14Δ* para obtener el doble mutante *erv14Δtip20-8*, realizándose a continuación un ensayo de crecimiento en gotas. Las mutaciones *erv14Δ* y *tip20-8* mostraron una fuerte interacción genética, viéndose el crecimiento del doble mutante muy retrasado con respecto a los mutantes simples (Figura 34 B). Estos resultados indican que el complejo Dsl1 presenta una interacción funcional con el receptor Erv14p.

El complejo Dsl1 captura las vesículas COPI provenientes del Golgi mediante la interacción entre la subunidad Dsl1p y la cubierta COPI. Cuando Dsl1p interacciona con la cubierta, promueve a su vez la despolimerización de esta (Zink et al, 2009) y la vesícula comienza a desnudarse. De esta forma, en ese momento la vesícula quedaría sin sujeción a la membrana del RE, con lo que podría escapar de las inmediaciones de este orgánulo, con la consecuente pérdida de eficiencia en la fusión. Por ello, y teniendo en cuenta los datos obtenidos hasta ahora, se propuso la siguiente hipótesis: los receptores de carga presentes en la vesícula COPI contactarían con el complejo Dsl1 tras la despolimerización de la cubierta, manteniendo así a la vesícula en las cercanías del RE y evitando que esta se aleje, aumentando de esta manera la eficiencia del proceso de anclaje llevado a cabo por el complejo Dsl1.

Para comprobar esta hipótesis, hay que tener en cuenta una de las características fundamentales de los receptores de carga, su capacidad para ciclar entre el RE y el Golgi. Como se ha comentado anteriormente, los receptores de transporte llevan a sus proteínas carga desde el RE al Golgi en vesículas COPII, allí las liberan, y vuelven al RE en vesículas COPI. Por ello, los receptores se encuentran de forma abundante tanto en la membrana del RE como en la de las vesículas. De esta manera, si la hipótesis propuesta es cierta, la interacción física observada debería estar ocurriendo entre complejo Dsl1 residente en el RE y aquellos receptores que están volviendo al RE en las vesículas COPI. Con el fin de esclarecer este punto, se abordaron distintas estrategias.

En primer lugar, se quiso comprobar si cuando el transporte retrógrado Golgi-RE se ve afectado, sigue ocurriendo la interacción receptor-Dsl1. Con este fin se recurrió

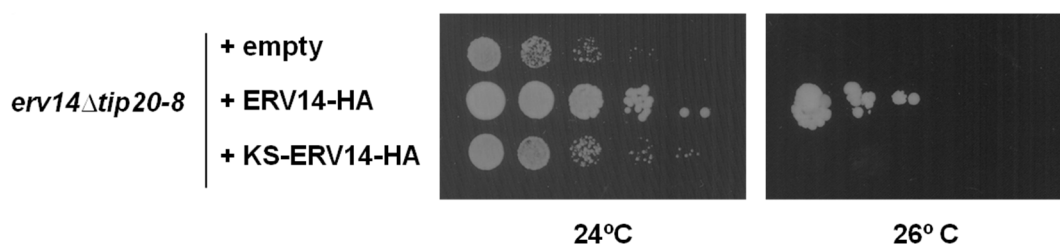
al mutante *ret1-1*, en el cual la subunidad de COPI Ret1p no es capaz de unir a los motivos di-lisina, de manera que las cargas no se pueden transportar hacia el RE, viéndose afectado el transporte retrógrado Golgi-RE, aunque no así el transporte RE-Golgi (Letourneur et al, 1994). Se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación entre los receptores y Dsl1, en la cepa silvestre y *ret1-1*. Tal como se observa en la figura 35, al inmunoprecipitar Emp24-GFP o Erv14-mCi, la cantidad de Dsl1-TAP observada en el co-precipitado se redujo notablemente en una estirpe *ret1-1*. En todos los casos, Sec61p prácticamente no se detectó en el co-precipitado. Es decir, cuando se ve afectado el transporte Golgi-RE, la interacción entre los receptores de carga estudiados y el complejo Dsl1 disminuye, apoyando la idea de que los receptores están contactando con este factor de anclaje desde las vesículas COPI.



**Figura 35. Los receptores de carga interaccionan con el complejo Dsl1 desde las vesículas COPI.** Las estirpes se incubaron a 37 °C durante una hora. Se inmunoprecipitó Emp24-GFP o Erv14-mCi a partir de un extracto de proteínas enriquecido en RE, disuelto con 1% digitonina. Posteriormente, se analizó la presencia de proteínas en el co-precipitado mediante electroforesis y *Western Blot*. T representa el 1% del extracto antes de la inmunoprecipitación.

Tras estos resultados, se abordó una segunda aproximación experimental para corroborar la hipótesis anteriormente planteada. Así, se hizo uso de la versión mutante de Erv14p que no une a COPII, de modo que no puede salir del RE, quedando retenida en este orgánulo. Por tanto, en una cepa cuya única versión de Erv14p sea la mutante, este receptor sólo se va a encontrar en el RE.

De esta forma, se realizaron ensayos de gotas, para comparar el crecimiento de *erv14Δtip20-8* expresando *ERV14* silvestre o su forma mutante incapaz de unir COPII (*ERV14-KS*). Como se aprecia en la figura 36, solamente la versión silvestre de Erv14-HA fue capaz de recuperar el defecto de crecimiento de *erv14Δtip20-8*. Este resultado apoya el modelo propuesto, ya que si Erv14p no sale del RE, no va a volver en vesículas COPI, por lo que no podría colaborar con el complejo Dsl1 en su función, y de ahí que no recupere el crecimiento de este doble mutante.

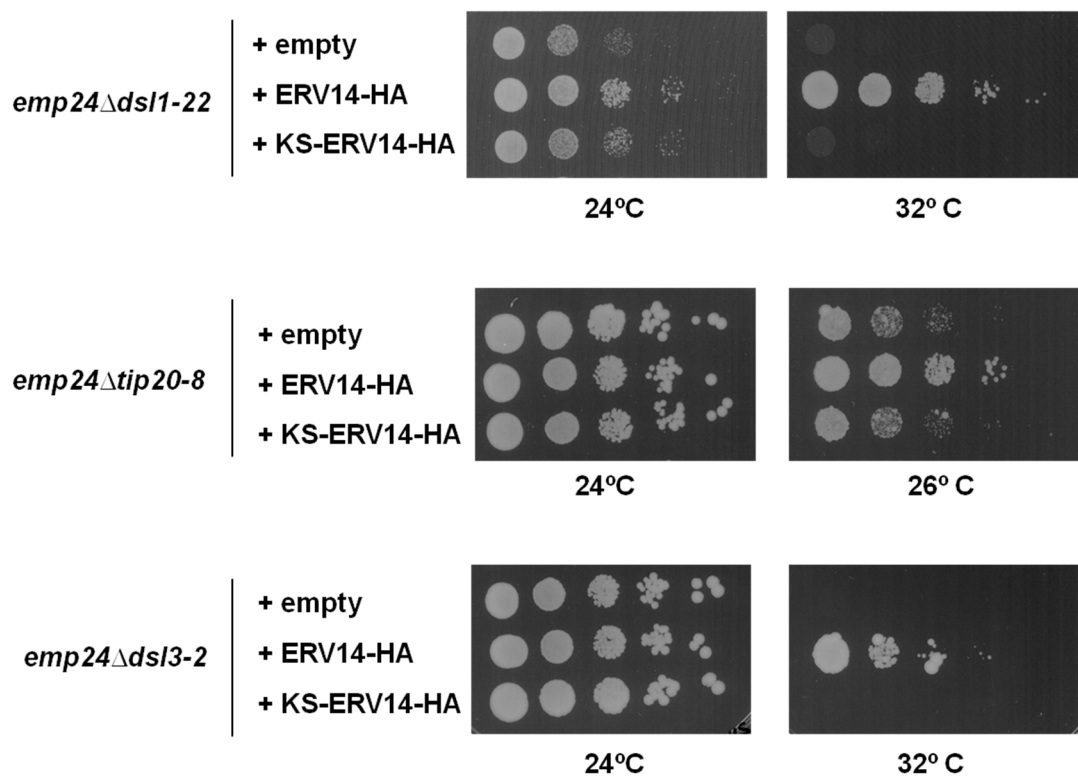


**Figura 36. Los receptores de carga que no salen del RE no ayudan Dsl1 en su función.** Las estirpes en crecimiento exponencial expresando el vector vacío, Erv14-HA o Erv14-KS-HA en medio SC-ura fueron diluidas de forma seriada a partir de  $DO_{600}=0,5$ . Gotas de 4  $\mu$ l de cada dilución fueron sembradas en placas de medio SC-ura y cultivadas durante 48 horas.

Con los datos obtenidos a lo largo de este capítulo, se deduce que tanto el complejo p24 como Erv14p interactúan física y funcionalmente con el complejo Dsl1, aumentando la eficiencia del anclaje mediado por este último.

Para comprobar si el complejo p24 y Erv14p están actuando cooperativamente en el transporte retrógrado con respecto a su función en el anclaje mediado por el complejo Dsl1, se realizó el siguiente ensayo. Los dobles mutantes *emp24Δdsl1-22*, *emp24Δtip20-8* y *emp24Δdsl3-2* fueron transformados con el plásmido ERV14-HA. En todos los casos, la expresión de Erv14-HA fue capaz de recuperar el defecto de crecimiento de los dobles mutantes estudiados (Figura 37). Sin embargo, no se observó tal recuperación cuando se transformaron las mismas estirpes con la versión mutante de Erv14p incapaz de unir COPII (*ERV14-KS-HA*; Figura 37). Este resultado es muy interesante, ya que implica, por un lado, que ambos receptores de carga están realizando la misma función en el transporte retrógrado en relación con Dsl1, puesto que la expresión de ERV14 recupera la ausencia de EMP24, y por otro lado, que para que exista esa cooperación los receptores deben salir del RE, ya que la versión mutante Erv14-KS-HA no puede recuperar el fenotipo termosensible de los dobles mutantes analizados.





**Figura 37. Los receptores de carga actúan cooperativamente para colaborar con el complejo Dsl1.** Las estirpes en crecimiento exponencial expresando el vector vacío, Erv14-HA o Erv14-KS-HA en medio SC-ura fueron diluidas de forma seriada a partir de  $DO_{600}=0,5$ . Gotas de 4  $\mu$ l de cada dilución fueron sembradas en placas de medio SC-ura y cultivadas durante 48 horas.



## **DISCUSIÓN**

---



Los receptores de carga son proteínas muy abundantes y conservadas evolutivamente, que ciclan continuamente entre el RE y el Golgi. La función principal que se les atribuye es la de conectar con la cubierta COPII a aquellas proteínas carga que no son capaces de interactuar con dicha cubierta para ser incorporadas en las vesículas y exportadas eficientemente del RE. En este trabajo se han aportado evidencias que indican que, en *S. cerevisiae*, los receptores de carga en su conjunto tienen un papel organizador en la ruta secretora temprana, además de su función principal previamente descrita como adaptadores de carga. Esta función organizadora la realizan mediante su intervención en los eventos de anclaje vesicular tanto del transporte anterógrado como retrógrado en la ruta secretora temprana. Por un lado, los receptores de carga intervienen en el anclaje de las vesículas COPII producidas en el RE con el compartimento *cis* del Golgi, y/o en el anclaje de estas vesículas COPII entre sí para la fusión homotípica que dará lugar al *cis*-Golgi. Por otro lado, estos receptores están implicados en el anclaje de las vesículas COPI derivadas del Golgi con la membrana del RE.

## **1. Papel cooperativo de los receptores de carga en la organización funcional del *cis*-Golgi**

Las evidencias presentadas en este trabajo indican que, en *S. cerevisiae*, distintos receptores de carga se asocian entre sí a nivel de los ERES, para formar un complejo o plataforma proteica de alto peso molecular. En el primer capítulo de esta tesis, se muestra que esta plataforma de receptores juega un importante papel colectivo en la biogénesis del compartimento *cis* del Golgi, favoreciendo el proceso de anclaje de las vesículas COPII con el propio *cis*-Golgi o con otras vesículas COPII, mediante la interacción física de los receptores con el factor de anclaje Uso1p. Precisamente, el hecho de que Uso1p se encuentre menos asociado a las membranas del Golgi y de las vesículas en el doble mutante *emp24Δerv14Δ*, sugiere que los receptores de carga favorecen el proceso de anclaje vesicular mediante el reclutamiento o estabilización de los factores de anclaje a las vesículas COPII.

Tanto el complejo p24 como Erv14p presentan señales de unión a COPII, por lo que la función cooperativa de los receptores en la organización del *cis*-Golgi podría explicarse si la cubierta COPII no se reclutara bien a los ERES cuando no hay un número suficiente de receptores, provocando un defecto en la formación de las vesículas COPII. Sin embargo, los datos presentados demuestran que la

desorganización que se produce en el *cis*-Golgi no se corresponde a un fallo en la formación de las vesículas COPII, ya que la localización en ERES del marcador de cubierta COPII Sec13-GFP muestra un patrón normal en el doble mutante. Además, proteínas que deben salir del RE como Rer1p o Anp1p no quedan retenidas en este orgánulo en el doble mutante, como sí sucede en el mutante de cubierta COPII *sec23-1*. Por tanto, aunque no es posible descartar una disminución de la eficiencia de la exportación desde el RE, sí se puede afirmar que no existe un bloqueo en la salida del RE en ausencia de dos receptores de transporte.

Así, este papel conjunto de los receptores se realizaría tras la formación de la vesícula COPII, concretamente a nivel de los eventos de anclaje. De hecho, el defecto de *cis*-Golgi generado por la ausencia simultánea de varios receptores es fenotípicamente muy similar al que producen los mutantes de los factores de anclaje de las vesículas COPII al *cis*-Golgi según nuestros resultados. Apoyando la hipótesis del anclaje vesicular, se observó que el supresor de mutantes de anclaje *SLY1-20* (Dascher et al, 1991; Sacher et al, 1998; Sapperstein et al, 1996) recuperaba los defectos de crecimiento y de *cis*-Golgi desorganizado del doble mutante. Además, los resultados obtenidos en los ensayos de co-inmunoprecipitación indican que los receptores interactúan con el factor de anclaje vesicular Uso1p (p115 en mamíferos). Curiosamente, Uso1p no fue una de las proteínas detectadas entre las proteínas que interactúan físicamente con Emp24-TAP en el estudio proteómico inicial, aunque esto podría deberse a que se partió de un extracto enriquecido en RE, o al gran peso molecular de Uso1p (206 KDa). En esta misma línea, se ha observado que las proteínas p24 de mamífero forman un complejo *in vivo* con los factores de anclaje vesicular GRASP65 (Grh1p en levaduras), GRASP55 y GM130 (Bug1p), y que las dos primeras proteínas purificadas se unen directamente a los tallos citosólicos de las proteínas p24 *in vitro* (Barr et al, 2001). Por otro lado, se ha descrito también que Rud3p (GMAP-210) se deslocaliza en ausencia del receptor Erv14p, aunque no hay interacción directa entre ellos (Gillingham et al, 2004).

Según los resultados mostrados, esta interacción entre los receptores de carga y Uso1p ocurre una vez que los receptores han salido del RE. Los datos obtenidos indican que una versión mutante de Erv14p, que no tiene señales de unión a COPII y por tanto no abandona el RE (Powers & Barlowe, 2002), es incapaz de interactuar con Uso1p, y su expresión no recupera el defecto de crecimiento de un mutante *uso1-1*, mientras que la versión silvestre sí lo hace. Actualmente se sabe que la cubierta COPII, en contra de lo que se pensaba no hace mucho tiempo, permanece asociada a la vesícula tras la evaginación para poder estabilizar sobre la membrana de

ésta a los factores de anclaje, y así promover el subsecuente proceso de anclaje vesicular con el *cis*-Golgi (Hsu & Yang, 2009). Tanto el complejo TRAPPI (a través de su subunidad Bet3p), como Grh1p, interactúan específicamente con la subunidad de la capa interna de la cubierta COPII Sec23p (Behnia et al, 2007; Lord et al, 2011). Por otro lado, los receptores se unen eficientemente, a través de potentes señales existentes en sus dominios citosólicos, a Sec24p, la otra subunidad de la capa interna de la cubierta COPII, responsable de unir a las proteínas carga (Miller et al, 2003). Teniendo en cuenta esto, se podría pensar que los receptores ayudan a mantener a las proteínas COPII sobre la membrana de las vesículas, favoreciendo de esta manera su anclaje. Sin embargo, de los ensayos de subfraccionamiento se deduce que Uso1p disminuye su asociación a las membranas de Golgi y vesículas ante la doble ausencia de Erv14p y del complejo p24, mientras que la subunidad de COPII Sec24p se sigue asociando con la misma eficiencia a estas membranas. Por tanto, los datos obtenidos sugieren que la función colectiva de los receptores de carga con respecto a los factores de anclaje no ocurre gracias a una estabilización de la cubierta COPII sobre las vesículas, sino a un reclutamiento de los factores de anclaje a las vesículas por parte de los receptores que podría ocurrir mediante una interacción directa.

Dado que el ensamblaje del *cis*-Golgi también necesitaría del aporte de vesículas COPI procedentes de cisternas más maduras (Glick & Malhotra, 1998; Papanikou et al, 2015), no se puede descartar que la estabilización de la cubierta COPI llevada a cabo por determinados receptores de carga, como el complejo p24 (Aguilera-Romero et al, 2008), contribuya a este proceso. En este sentido, un estudio previo realizado en células de mamíferos ya había propuesto que la alteración de la estructura del ERGIC y Golgi observada durante el doble silenciamiento de los receptores de carga Surf4 (Erv29p) y ERGIC-53 (Emp47p) y durante el silenciamiento simple de p25 se debería a la disociación de la cubierta COPI de las membranas de Golgi (Mitrovic et al, 2008). A diferencia de en mamíferos, en el presente trabajo se observa la participación del receptor Erv14p. Por último, en células de mamíferos los factores de anclaje mantienen su asociación con las cisternas dispersas del Golgi (Mitrovic et al, 2008), mientras que nuestros datos muestran que Uso1p se disocia parcialmente de las membranas en el doble mutante.

Agrupando todas las evidencias obtenidas, proponemos un modelo en el que los receptores de carga reclutarían conjuntamente al factor de anclaje Uso1p a las vesículas recién evaginadas del RE, de forma que las mantendrían unidas entre sí favoreciendo la fusión posterior para formar un nuevo *cis*-Golgi o fusionar con el *cis*-Golgi pre-existente. En consonancia con este modelo, recientemente se ha descrito

en células de mamíferos que el factor TFG concentra a las vesículas COPII en las cercanías de los ERES para facilitar su rápida fusión con el ERGIC (Johnson et al, 2015).

## **2. Papel de los receptores de carga en el anclaje de las vesículas COPI al retículo endoplásmico**

Para devolver al RE aquellas proteínas que han escapado, y reciclar los factores de transporte requeridos para futuras rondas del tráfico anterógrado, entre el Golgi y el RE existe un transporte retrógrado mediado por vesículas COPI. Al aproximarse al RE, estas vesículas son capturadas por el complejo Dsl1, el factor de anclaje que reside en el RE y facilita la interacción de la vesícula con dicho orgánulo para su posterior fusión. El complejo Dsl1 captura las vesículas COPI provenientes del Golgi mediante la interacción entre su subunidad Dsl1p y la cubierta COPI (Andag & Schmitt, 2003). Cuando Dsl1p interacciona con el coatómero, promueve a su vez su despolimerización (Zink et al, 2009) y la vesícula comienza a desnudarse. De esta forma, en ese momento la vesícula quedaría sin sujeción a la membrana del RE, con lo que podría escapar de las inmediaciones de este orgánulo, con la consecuente pérdida de eficiencia en la fusión. Con los datos obtenidos en este trabajo proponemos el siguiente modelo: los receptores de carga presentes en la vesícula COPI contactan con el complejo Dsl1 tras la despolimerización de la cubierta, manteniendo así a la vesícula en las cercanías del RE y evitando que esta se aleje, aumentando de esta forma la eficiencia del proceso de anclaje llevado a cabo por el complejo Dsl1.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que tanto el complejo p24 como Erv14p interactúan físicamente *in vivo* con el complejo Dsl1. Esta conclusión se basa en el estudio proteómico inicial de Emp24-TAP y en los datos de co-inmunoprecipitación. Atendiendo a las evidencias anteriormente publicadas, es posible que esta interacción ocurra indirectamente a través del coatómero. Los receptores de carga presentan señales de unión a COPI para su inclusión en las vesículas retrógradas de forma que se reciclen y estén disponibles para nuevas rondas de transporte anterógrado (Dancourt & Barlowe, 2010). Además, se sabe que el complejo p24 participa en la formación de vesículas COPI derivadas del Golgi a través de la estabilización de la cubierta COPI sobre las membranas de este orgánulo (Aguilera-Romero et al, 2008). De esta forma, es posible que los receptores de carga ejerzan una función de sostén de la cubierta tras la producción de la vesícula, para facilitar el



reconocimiento de dicha vesícula por parte del complejo Dsl1, que también interacciona con COPI a través de su subunidad Dsl1p (Andag & Schmitt, 2003). No obstante, los resultados de los ensayos *in vitro* han permitido concluir que, al menos el complejo p24, interacciona directamente con el complejo Dsl1, aunque no se puede descartar que a la vez esté ocurriendo una interacción indirecta a través del coatómero. La topología del receptor Erv14p, con tres dominios transmembrana y dos regiones citosólicas (Powers & Barlowe, 2002), ha hecho imposible comprobar si en este caso la interacción observada *in vivo* es también directa.

La interacción física observada corresponde con una interacción funcional en la célula entre los receptores de carga y el complejo de anclaje vesicular Dsl1, como se desprende de los resultados de interacción genética en todos los dobles mutantes estudiados. Además, apoyando que esta interacción funcional sea debida a un defecto en el transporte retrógrado Golgi-RE y concretamente a nivel del anclaje, se ha observado en el doble mutante *emp24Δtip20-8* una mayor secreción de Kar2p al medio y una mayor acumulación de vesículas COPI incapaces de fusionar con el RE.

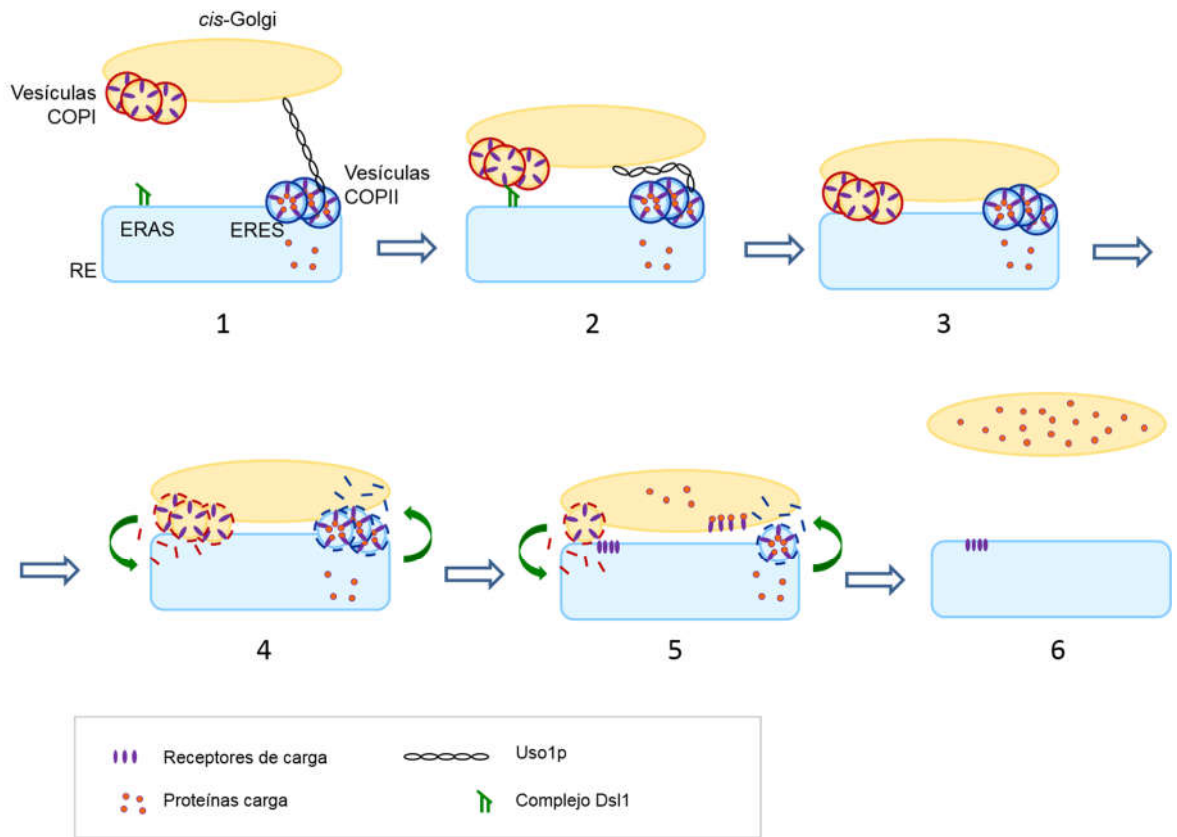
Los receptores de transporte llevan a sus proteínas carga desde el RE al Golgi en vesículas COPII, allí las liberan, y vuelven al RE en vesículas COPI para iniciar un nuevo ciclo. Es por ello que los receptores se encuentran de forma abundante tanto en la membrana del RE como en la de las vesículas. De esta manera, la interacción física que se observa podría estar ocurriendo exclusivamente a nivel del RE, con lo cual el modelo propuesto se podría descartar. Además, recientemente un estudio ha demostrado que el complejo Dsl1 participa en la fusión homotípica RE-RE junto a las SNAREs de este orgánulo (Rogers et al, 2014), con lo que la interacción funcional que observamos podría deberse a una participación de los receptores de carga en esta función del complejo Dsl1. Sin embargo, en este trabajo se han obtenido varios resultados que parecen indicar que los receptores sí participan junto con el complejo Dsl1 en su función de anclaje de las vesículas COPI al RE, aunque no se puede descartar completamente una posible participación en las funciones de fusión homotípica RE-RE. En primer lugar, la interacción física receptores-Dsl1 disminuye notablemente cuando el transporte retrógrado Golgi-RE se ve afectado, como es el caso del mutante de coatómero *ret1-1*. En segundo lugar, los resultados genéticos indican que la colaboración funcional entre los receptores de carga y el complejo Dsl1 ocurre cuando los receptores viajan en vesículas COPI de vuelta al RE, ya que la versión mutante de Erv14p incapaz de salir del RE (Powers & Barlowe, 2002) no recupera el defecto de crecimiento de *erv14Δtip20-8*, mientras que sí lo hace la versión silvestre.

Finalmente, se han obtenido evidencias que sugieren que ambos receptores de carga están realizando la misma función en el transporte retrógrado en relación con Dsl1, puesto que la expresión de *ERV14* recupera la ausencia de *EMP24* en los mutantes termosensibles *emp24Δdsl1-22*, *emp24Δtip20-8* y *emp24Δdsl3-2*. Además, y corroborando la hipótesis de que los receptores colaboran con Dsl1 una vez que han abandonado el RE, la versión mutante de Erv14p que no sale del RE no recupera la ausencia de *EMP24* en dichos mutantes. Así, en este capítulo se ha mostrado que, al igual que los receptores de carga están actuando cooperativamente en el transporte anterógrado RE-Golgi, esa cooperación podría extenderse a sus funciones en el transporte retrógrado con respecto al factor de anclaje vesicular Dsl1.

La interacción funcional entre Erv14p y Dsl1 se había observado anteriormente, cuando se mostró que la expresión de *ERV14* en plásmidos de baja o alta copia recuperaba el crecimiento de algunos mutantes termosensibles de la subunidad Dsl1p (Vanrheenen et al, 2001), pero no se le había dado explicación alguna. Es muy interesante el hecho de que en ese estudio, *ERV14* no fue capaz de suprimir la inviabilidad del mutante nulo *dsl1Δ*. Esto podría indicar que la recuperación por parte de *ERV14* de los mutantes termosensibles de *DSL1* sea debida a una mejora de la interacción física Erv14p-Dsl1p, y al no encontrarse la proteína Dsl1p presente, no pueda darse dicha mejora. Estos datos previos apoyan por tanto el modelo propuesto en el presente trabajo.

### 3. Modelo propuesto

Con los resultados obtenidos a lo largo de los dos capítulos de esta tesis, proponemos el modelo que se muestra en la figura 38. Los receptores de carga ayudarían a estabilizar sobre las membranas al factor de anclaje Uso1p (1), y éste al doblarse atraería al *cis*-Golgi hacia el RE (2). Entonces, los receptores de carga presentes en las vesículas COPI que salen del *cis*-Golgi, contactarían con el factor de anclaje Dsl1 que se encuentra en las membranas del RE (2), de forma que el *cis*-Golgi estaría ahora contactando tanto con los ERES como con los ERAS (3). Es en este momento cuando las cubiertas empezarían a despolimerizarse (4), conllevando esto el transporte desde las vesículas COPII al Golgi, y desde las vesículas COPI al RE (5). Finalmente, el *cis*-Golgi se alejaría de nuevo del RE, empezando así un nuevo ciclo (6).



**Figura 38. Modelo propuesto de actuación de los receptores de carga en los eventos de anclaje vesicular de la ruta secretora temprana.**



# **CONCLUSIONES**

---

---



Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que:

- 1- Los receptores de carga presentan un papel cooperativo necesario para la biogénesis del *cis*-Golgi, mediante el reclutamiento de los factores de anclaje vesicular.
- 2- Los receptores de carga aumentan la eficiencia del anclaje de las vesículas COPI al retículo endoplásmico mediante su interacción con el complejo Dsl1.





## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



# 1. Organismos y condiciones de cultivo

## 3.1. *Escherichia coli*

### 3.1.1. Estirpes de *E. coli*

Los distintos plásmidos utilizados en este trabajo se amplificaron en la estirpe DH5- $\alpha$  (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*). Para la producción de proteínas recombinantes se empleó la estirpe BL21 (*dcm ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal*), en algunos casos transformada con el plásmido pRARE, que permite la expresión de los ARNt propios de eucariotas.

### 3.1.2. Cultivo de *E. coli* en medio líquido

Los cultivos en medio líquido se realizaron usando medio Luria-Bertani (extracto de levadura 0,5%, bacto-triptona 1%, NaCl 0,5%). El material y los medios empleados fueron previamente esterilizados mediante un ciclo en autoclave (20 min, 121 °C).

Las células se incubaron en agitadores orbitales a 37 °C y 250 rpm. Los antibióticos se incorporaron al medio a partir de una disolución concentrada, esterilizada por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m de diámetro de poro, y teniendo en cuenta que la temperatura del medio no fuera superior a 50 °C. Para el cultivo y selección de bacterias portadoras de plásmidos, el medio LB se suplementó con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina (Amp) y/o 34  $\mu$ g/ml de cloranfenicol (Cam).

Para la conservación de las estirpes bacterianas a largo plazo, se congelaron a -80 °C en una mezcla 1:1 de medio LB y glicerol 50%.

### 3.1.3. Cultivo de *E. coli* en medio sólido

Para cultivo en medio sólido se utilizó medio LB complementado con agar bacteriológico (AppliChem) al 2% (p/v). Al igual que en los medios líquidos, para la esterilización se empleó el autoclave. Para el cultivo y selección de bacterias portadoras de plásmidos, los medios se suplementaron con el antibiótico correspondiente a las concentraciones antes indicadas, a 55 °C aproximadamente, justo antes de extender el medio en placas de Petri.

## 3.2. *Saccharomyces cerevisiae*

### 3.2.1. Estirpes de *S. cerevisiae*

Las estirpes de levaduras utilizadas son derivadas de dos fondos genéticos principalmente: BY4742 y W303-1b y se muestran en la tabla II.

**Tabla II.** Estirpes de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
BY4742	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3</i>	EUROSCARF
Y14567	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 emp24 ::KanMx</i>	EUROSCARF
Y14421	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 erv14 ::KanMx</i>	EUROSCARF
MMY1009	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 emp24 ::hph erv14 ::KanMx</i>	Este estudio
MMY1251	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 SEC13-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1252	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24 ::hph SEC13-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1253	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 erv14 ::KanMx SEC13-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1254	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24 ::hph erv14 ::KanMx SEC13-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1039	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 ANP1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1040	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 emp24 ::hph ANP1-GFP::HIS3</i>	Este estudio

MMY1041	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 erv14 ::KanMx ANP1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1042	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 emp24 ::hph erv14 ::KanMx ANP1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1152	<i>MATα his3 leu2 ura3 SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1153	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 emp24 ::hph SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1154	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 erv14 ::KanMx SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1155	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 emp24 ::hph erv14 ::KanMx SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
RH1433	<i>MATα leu2 ura3 sec23-1</i>	H. Riezman
RH4904	<i>MATα ura3 trp1 uso1-1</i>	H. Riezman
MSY1097	<i>MATα leu2 ura3 bet3-1</i>	N. Segev
YKR068C	<i>MATα his3 leu2 met15 ura3 BET3-GFP::HIS3</i>	INVITROGEN
YDL058W	<i>MATα his3 leu2 met15 ura3 USO1-GFP::HIS3</i>	INVITROGEN
MMY1062	<i>MATα leu2 ura3 trp1 lys2 uso1-1</i>	Este estudio
MMY1118	<i>MATα his3 leu2 ura3 lys2 USO1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1119	<i>MATα his3 leu2 ura3 lys2 trp1 emp24 ::hph USO1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1120	<i>MATα his3 leu2 ura3 lys2 erv14 ::hph USO1-GFP::HIS3</i>	Este estudio

MMY1121	<i>MATα his3 leu2 ura3 lys2 emp24 ::hph erv14 ::hph USO1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1027	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 GRH1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1028	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 emp24 ::hph GRH1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1029	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 erv14 ::KanMx GRH1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1030	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 emp24 ::hph erv14 ::KanMx GRH1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
CUY3027	<i>MATα his3 leu2 met15 ura3 TIP20-TAP::HIS3MX DSL1-TAP::KanMX4 DSL3-TAP::URA3</i>	C. Ungermann
RSY1818	<i>MATα his3 leu2 ura3 lys2 ade2</i>	R. Schekman
YUA1-9c	<i>MATα his3 leu2 ura3 lys2 ade2 dsl1-22</i>	H.D. Schmitt
MMY1083	<i>MATα his3 leu2 ura3 lys2 ade2 dsl1-22 emp24 ::hph</i>	Este estudio
PC137	<i>MATα ura3 leu2 his4 trp1 lys2 suc2- 9 tip20-5</i>	P.Cosson
MMY1135	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 lys2 tip20-5 emp24 ::KanMX4</i>	Este estudio
<i>tip20-8</i>	<i>MATα ura3 leu2 his4 trp1 lys2 suc2- 9 tip20-8</i>	P.Cosson
MMY1137	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 lys2 tip20-8 emp24 ::KanMX4</i>	Este estudio

<i>dsl3-2</i>	<i>MATa ura3 leu2</i> <i>dsl3-2</i>	C. Ungermann
MMY1142	<i>MATa ura3 leu2</i> <i>dsl3-2 emp24 ::hph</i>	Este estudio
YSC95700	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3</i> <i>SEC21-GFP::HIS3</i>	INVITROGEN
MMY1020	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 trp1</i> <i>emp24 ::hph SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1158	<i>MATa his3 leu2 ura3</i> <i>tip20-8 SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1159	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 ade2</i> <i>emp24 ::hph tip20-8 SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1379	<i>MATa his3 leu2 ura3 met15 trp1</i> <i>ERV14-mCitrine::HIS5Sp TIP20-TAP::HIS3MX</i> <i>DSL1-TAP::KanMX4 DSL3-TAP::URA3</i>	Este estudio
MMY1372	<i>MATa his3 leu2 ura3</i> <i>tip20-8 erv14 ::KanMX4</i>	Este estudio
MMY1401	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3</i> <i>TIP20-TAP::HIS3MX DSL1-TAP::KanMX4</i>	Este estudio
MMY1400	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3</i> <i>ret1-1 TIP20-TAP::HIS3MX DSL1-TAP::KanMX4</i>	Este estudio

### 3.2.2. Cultivo de *S. cerevisiae* en medio líquido

Las levaduras se cultivaron en medio completo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) o en medio sintético completo, SC (glucosa 2%, Base Nitrogenada de levadura (YNB; Difco) 0,67%, como fuente de fósforo, potasio, sulfato, magnesio, calcio, vitaminas y oligoelementos).

Las levaduras se inocularon desde placas de medio sólido en tubos de 12 ml con 4 ml de medio. Se dejaron crecer a 24 °C en agitación (250 rpm) hasta fase estacionaria. Tras esto, se inocularon en tubos nuevos o en matraces Erlenmeyer de volumen variable, y se dejaron crecer en las mismas condiciones sin sobrepasar una DO<sub>600</sub> igual a 1 durante el tiempo necesario para obtener el número total de células necesario para cada experimento.

Cuando se requirió crecer las células en medios selectivos, se usó medio SC suplementado con 40 mg/l de aminoácidos y bases nitrogenadas (uracilo, adenina, L-triptófano, L-histidina, L-leucina, L-lisina y/o L-metionina), dependiendo de las auxotrofías de las estirpes a cultivar. La esterilización se llevó a cabo mediante un ciclo en autoclave (20 min, 121 °C), excepto las soluciones concentradas de YNB y de L-triptófano que se filtraron y añadieron posteriormente al medio.

Para la conservación de las estirpes a largo plazo, se congelaron a -80°C en una mezcla 1:1 de medio YPD y 50% glicerol.

### **3.2.3. Cultivo de *S. cerevisiae* en medio sólido**

Las placas de medio completo, YPD, se obtuvieron suplementado con 2% de agar bacteriológico el medio líquido, y su posterior esterilización en autoclave.

Para la obtención de placas de medio selectivo, se autoclavó la solución de glucosa, aminoácidos (excepto el L-triptófano), nucleótidos y agar. Tras dejar enfriar hasta 55 °C el medio, se suplementó con una solución concentrada de YNB (y triptófano si lo requería el medio) y se extendió en placas de Petri. Cuando fue necesario se añadieron antibióticos al medio sólido a 55°C, antes de la polimerización: 200 µg/ml G-418 (Sigma) o 150 µg/ml Higromicina B (Amresco).

Para la esporulación, los diploides crecieron durante 24 horas en medio de pre-esporulación, Pre-SPO (glucosa 10%, extracto de levadura 0,8%, peptona 0,3%, agar 2%) y posteriormente se transfirieron a medio de esporulación, SPO (acetato potásico 1%, glucosa 0,05%, extracto de levadura 0,1%, agar 2%).

Para la determinación del sexo de las cepas tras la micromanipulación, se recurrió a placas de halo. Se empleó medio YPD acidificado hasta pH 5,5 con HCl (Panreac), para la base de las placas. Para el medio de cobertera se redujo la concentración de agar bacteriológico hasta 0,8%. Las células hipersensibles al factor alfa (RH123) se añadieron cuando el medio de cobertera esterilizado se enfrió hasta 45°C.



Posteriormente, se mezcló por agitación para homogeneizar la suspensión celular y se añadieron 5 ml de dicha suspensión celular sobre las placas de YPD pH 5,5.

## 4. Técnicas genéticas

### 4.1. Transformación de *Escherichia coli*

Las células de *E.coli* de la estirpe DH5 $\alpha$  se hicieron aptas para transformación (competentes) químicamente, atendiendo al siguiente método. Partiendo de un cultivo en fase exponencial, se inocularon 500 ml de medio SOB (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, cloruro sódico 0,05%, 1,25 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7), dejándose crecer toda la noche a 22 °C. Una vez alcanzada una DO<sub>600</sub> entre 0,4 y 0,7, se transfirieron las células a tubos y se dejaron enfriar en hielo. A continuación, se concentraron las células mediante centrifugación a 3.000 g durante 10 minutos a 4 °C, y se lavaron con tampón TB (10 mM Pipes, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7,2). Tras el lavado, por cada 100 ml de medio SOB inoculado, se resuspendieron las células en 20 ml de TB y se incubó a 4 °C durante 10 minutos. Después, se unificaron todas las células en 20 ml de TB fresco, se complementó con 1,5 ml de DMSO estéril, y se incubó 10 minutos más a 4 °C. Estas células ya competentes, se congelaron en nitrógeno líquido en alícuotas de 100 a 500  $\mu$ l y se almacenaron a -80 °C.

La transformación de células competentes se realizó añadiendo a la suspensión celular, previamente descongelada en hielo, el ADN en un volumen máximo de 10  $\mu$ l. Tras 30 minutos de incubación en hielo, se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 40 segundos. Posteriormente se incubaron en hielo durante 5 minutos adicionales. A continuación, se añadió 1 ml de medio LB y se incubaron 1 h a 37 °C. Finalmente, se sembraron 100  $\mu$ l de cultivo en placas de medio LB con el antibiótico para la selección y se dejaron crecer en una estufa a 37 °C durante 12-15 h. El resto de la suspensión celular se mantuvo a 4 °C durante ese tiempo, y en caso de no obtenerse colonias transformantes positivas se sembró en placas todo el remanente.

Para la transformación de células de la estirpe productora de proteínas BL21, en lugar de emplearse células competentes, se utilizó el método TSS. Se cultivaron las células durante toda la noche y se diluyó a la mañana siguiente el cultivo. Cuando éste estuvo en fase exponencial temprana, se tomó 1 ml y se enfrió en hielo durante 5 minutos. Tras esto, se cambió el medio de cultivo y se mantuvo en hielo otros 5

minutos. A continuación, se añadió el mismo volumen de medio 2XTSS (triptona 0,8%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%, PEG-4000 2%, DMSO 1%, 100 mM MgSO<sub>4</sub> pH 6,5). Tras incubar en hielo otros 5 minutos, se añadieron 5-10 µg del ADN a transformar. Tras mezclar con suavidad, se incubó 30 minutos en hielo. A continuación, se sometió a un choque térmico de 40 segundos a 42 °C. Finalmente, tras incubar en hielo 5 minutos, se añadió 1 ml de LB y se dejó recuperar durante 2-3 horas a 37 °C. Por último, las células se sembraron en medio selectivo con la droga adecuada para el plásmido de interés y se incubó durante toda la noche a 37 °C.

## **4.2. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae***

Para la transformación de levaduras con plásmidos, se usó el método *One-step* (Chen et al, 1992). Se partió de 5x10<sup>7</sup> células viables en suspensión. Se substituyó, mediante dos lavados, el medio de cultivo por agua destilada estéril. A continuación, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 100 µl de tampón *One-Step* (0,2 M acetato de litio, PEG-4000 40%, 100 mM DTT) por transformación. Después se añadió 1 µl del plásmido de interés y 2 µl de ADN monocatenario desnaturalizado procedente de esperma de salmón (Sigma). Se mezcló usando un *vórtex* a máxima revolución durante 10 segundos. Posteriormente, se incubó a 45 °C durante 30-40 minutos. Para terminar, se sembró en el medio selectivo directamente la suspensión de transformación y se incubó a temperatura óptima durante tres días.

Para la transformación con ADN linearizado o fragmentos de PCR se usó el siguiente protocolo. Se recogieron entre 100 y 200x10<sup>6</sup> células en fase exponencial de crecimiento, y se lavaron dos veces en LiAc-TE (100 mM acetato de litio, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA). A continuación, se resuspendió el cultivo en LiAc-TE 40% PEG-4000 y se añadió 1 µg de ADN plasmídico o 2-5 µg de ADN linearizado para integración genómica; y 25 µg de ADN monocatenario desnaturalizado procedente de esperma de salmón (Sigma). Se incubó, tras mezclar con pipeta, 30 minutos a temperatura ambiente, después se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 15 minutos. Finalmente, se eliminó el PEG-4000 mediante centrifugación suave y se sembró en el medio selectivo correspondiente. En el caso de que el plásmido o el fragmento de ADN aportaran resistencia a antibióticos, antes de sembrar las células en presencia de éste, se incubó el cultivo durante dos horas en YPD.

### **4.3. Generación de cepas de levadura**

#### **4.3.1. Cruce, esporulación y disección de tétradas**

Con el objetivo de obtener levaduras diploides, se mezclaron estirpes de sexo (*MAT*) complementarios,  $\alpha$  y *a*, en placas de YPD y se incubó 12 horas. A continuación, para seleccionar los diploides se transfirieron las células a una placa de SC en ausencia de dos requerimientos, de modo que el diploide pudiera crecer, pero las estirpes parentales haploides no pudieran. En algunos casos fue necesaria la presencia de algún antibiótico o la incubación a temperaturas restrictivas para ciertos alelos. Tras 1 o 2 días para enriquecer los diploides, estos se transfirieron a placas de Pre-SPO (pre-esporulación) para potenciar el gasto de las reservas de nitrógeno, y finalmente se transfirieron a medio SPO (esporulación). Tras una semana aproximadamente, las tétradas se separaron empleando un microscopio para disección (Singer Instrument), y se promovió la germinación cultivando en YPD a 24 °C.

Finalmente, se comprobaron los diferentes marcadores (auxotrofías, termosensibilidad, resistencia a antibióticos, etc.) mediante réplicas en placa. Las tétradas diseccionadas en una placa madre se transfirieron a un terciopelo estéril. Una copia de esta "impresión" fue transferida a placas de los medios selectivos de interés que se incubaron a 24 °C durante 24-48 horas para la posterior comprobación del crecimiento. Para el análisis de mutantes termosensibles, se replicó en placas YPD que se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas. En algunos casos, fue necesaria una comprobación adicional mediante inmunoblot (véase Material y Métodos, 4.2) y/o microscopía de fluorescencia (véase Material y Métodos, 5.1).

La comprobación del sexo de las esporas generadas se realizó replicando en placas de halo. Tras la incubación a 24 °C durante 24-48 horas, las cepas *MAT*  $\alpha$  generaron un halo de inhibición de crecimiento en la cepa RH123 (hipersensible a factor alfa) presente en el agar de cobertera, mientras que las *MAT* *a* no lo hicieron.

#### **4.3.2. Recombinación homóloga**

Para la eliminación de genes se generaron fragmentos de ADN flanqueados por secuencias homólogas al gen de interés (aproximadamente 40 bases a ambos lados del gen diana) mediante PCR. Estos se integraron mediante el protocolo de transformación explicado en Material y Métodos, 2.2. Estos fragmentos contienen

marcadores como prototrofia o resistencia a un antibiótico, pero carecen de origen de replicación, de modo que sólo se puedan expresar si se integran en el genoma, sustituyendo al gen de interés. El reemplazamiento del gen de interés se comprobó tras obtener las colonias por PCR de colonias (véase Material y Métodos, 3.1) y en algunos casos por inmunoblot adicionalmente (véase Material y Métodos, 4.2).

En el caso de no querer eliminar el gen, sino etiquetarlo con epítomos como GFP o TAP, el fragmento de PCR presenta homología con las secuencias próximas al codón de parada del gen de interés. Por último, además de comprobar la inserción por PCR de colonias, se realizó un inmunoblot y/o se comprobó por microscopía de fluorescencia la presencia del epítopo (véase Material y Métodos, 4.2 y 5.1).

#### **4.4. Ensayos de crecimiento celular**

Se emplearon cultivos de células en fase exponencial temprana de crecimiento ( $DO_{600} < 1$ ) para realizar 5 diluciones seriadas desde  $1 \times 10^7$  o  $5 \times 10^6$  hasta  $1 \times 10^3$  o  $5 \times 10^2$ , respectivamente. De cada dilución se sembraron gotas de 4  $\mu$ l en medio SC o YPD, y se dejó secar. A continuación, las placas se sellaron con papel de parafina y se incubaron entre 2-3 días a las temperaturas de interés. Por último, las placas fueron digitalizadas empleando un escáner HP Scanjet 3770.

### **5. Técnicas de manipulación de ADN**

#### **5.1. Técnicas básicas de biología molecular: PCR, restricción enzimática de ADN, geles de agarosa, purificación de fragmentos de ADN y secuenciación.**

Las técnicas comunes de manipulación de ADN como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), geles de electroforesis, digestión enzimática y ligación de ADN, se realizaron como se describe en Sambrook & Russell, 2006.

Las PCRs fueron realizadas con polimerasas de ADN con prueba de lectura (Expand High Fidelity (Roche)) para la clonación, y con polimerasas estándar para las comprobaciones (GoTaq – Promega). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa StabVida. Se empleó el termociclador MJ Mini (BioRad). Las reacciones se

realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ l que contenía tampón comercial de la enzima (1x), 0,25 mM de cada desoxirribonucleótido (dNTPs), 20 pmol de cada oligonucleótido, 0,1-1  $\mu$ g de ADN y 1 U de Taq polimerasa. Esta mezcla, una vez desnaturizado el ADN (95  $^{\circ}$ C, 5 min), se sometió a varios ciclos sucesivos con los siguientes pasos: desnaturización del ADN molde (95  $^{\circ}$ C, 30-60 s), reasociación de los cebadores (50-65  $^{\circ}$ C, 60 s), y polimerización (72  $^{\circ}$ C, tiempo requerido a razón de 1 min/kb). Por último, se incubó a 72  $^{\circ}$ C durante 10 min para la elongación final. Los resultados de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de agarosa 0,8-2%.

Para la clonación de genes de levadura, así como para la comprobación de las estirpes generadas por recombinación homóloga, se utilizó el método de PCR de colonias. Se partió de una colonia, que fue resuspendida en 10  $\mu$ l de tampón SPZ (50  $\mu$ l fosfato sódico 1 M pH 7,5, 300  $\mu$ l sorbitol 2 M, 87  $\mu$ l zimoliasa 20T (USBiological), 67  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>). Se incubó a 37  $^{\circ}$ C durante 30 minutos, y posteriormente se incubó a 100  $^{\circ}$ C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 12100 g durante 10 min a 4  $^{\circ}$ C. Finalmente, se añadió 1  $\mu$ l de este sobrenadante a la mezcla de PCR.

Las enzimas de restricción y ligasas de ADN requeridas fueron adquiridas de las compañías New England Biolabs, Roche o Takara. Las reacciones se llevaron a cabo, en su mayor parte, en un volumen de 20  $\mu$ l, según las recomendaciones del fabricante y en el tampón suministrado con cada enzima. Las digestiones simultáneas, con dos o más enzimas de restricción, se realizaban en un tampón compatible de las mismas casas comerciales. En caso de que las enzimas no fuesen compatibles en ninguno de los sistemas de tampones, la restricción se realizó de forma sucesiva. Las restricciones de ADN plasmídico se incubaron durante tiempos variables entre 1 hora (para comprobaciones) y toda la noche (para asegurar la digestión completa en el caso de la obtención de fragmentos de ADN para posterior subclonado).

Para realizar ligaciones de fragmentos de ADN linearizados por ambos extremos con la misma enzima, con el fin de prevenir la religación del vector, fue conveniente desfosforilar los extremos del mismo. Para ello, tras la linearización con la endonucleasa, se sometió a un tratamiento con fosfatasa alcalina (Roche) durante 1 h a 37  $^{\circ}$ C. Posteriormente se inactivó ésta añadiendo 5  $\mu$ l de EDTA 200 mM e incubando durante 10 minutos a 65  $^{\circ}$ C.

La ligación de fragmentos de ADN se realizó mezclando preparaciones de los fragmentos e incubando la mezcla en presencia de 1-3 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche). Las ligaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10

µl del tampón comercial de la enzima (40 mM Tris-HCl pH7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT y 0,5 mM ATP). La solución de ligación se incubó a 14 °C durante al menos 2 h o a 4 °C durante 16-24 h.

La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon en tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA). La concentración de agarosa (p/v) en los geles era variable entre el 0,8% (para la separación de bandas de tamaños mayores o iguales a 1 kb) y el 2% (para bandas de peso molecular inferior a 40 pb). Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se suplementaron con tampón de carga de ADN (1 mM EDTA pH 8, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 50%). Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas horizontales de BioRad, aplicando diferencias de potencial de 120 V.

Para la detección del ADN en los geles y su visualización, éstos se sumergieron, tras la electroforesis, en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 10-20 minutos. La visualización de los geles y el almacenamiento de las imágenes se llevaron a cabo con un transiluminador de luz ultravioleta. Los kits de purificación de ADN empleados para extraer los fragmentos de ADN de los geles de agarosa provinieron de la empresa Bioline.

Para la estimación de la pureza de las diluciones de ADN, 2,5 µl de las mismas se diluyeron hasta 0,5 ml con agua didestilada y se midió su absorbancia UV en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, tanto a 260 nm como a 280 nm. Como criterio de pureza se usó la relación de absorbancias (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>), que para una preparación de alta pureza se encontraba entre 1,7 y 1,9. Para mayor precisión se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

## **5.2. Extracción y purificación de ADN desde *Escherichia coli***

La purificación rutinaria de plásmidos a partir de estirpes de *E.coli* se realizó por el método de lisis alcalina. A partir de cultivos de *E. coli*, habiendo crecido toda la noche a 37 °C en agitación, se recogió por centrifugación (5 min a 3.000 g) en tubos de 1,5 ml y el precipitado celular se resuspendió en 100 µl de solución I (25 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM glucosa, 10 mM EDTA pH 8). A continuación, se añadieron 200 µl de solución II (0,2 N NaOH, SDS 1% (p/v)) y se mezclaron las muestras invirtiendo brevemente hasta diez veces. Para neutralizar, se añadieron 150 µl de solución III (5

M acetato potásico pH 4,8) y se volvió a mezclar invirtiendo los tubos diez veces. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 15 min a 13.000 g, tras lo que se retiró el sobrenadante a un nuevo tubo. El ADN se precipitó a partir de los sobrenadantes de la fase acuosa mediante la adición de 1 ml de etanol absoluto y precipitación a -20 °C durante 30 minutos. Se concentró el ADN mediante centrifugación a 13.000 g durante 15 min, el precipitado se lavó con 1 ml de disolución de etanol al 70% (v/v) en agua y se centrifugó como se ha descrito. Tras eliminar el sobrenadante, se dejó secar al aire. Finalmente, los ácidos nucleicos se resuspendieron en 40 µl de agua didestilada. Para obtener mayores concentraciones de ADN o pureza más alta se empleó el kit de MIDIPrep suministrado por la empresa Sigma-Aldrich.

### 5.3. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran detallados en las Tablas III y IV.

**Tabla III.** Plásmidos de expresión en levaduras empleados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pSKY5	CEN; <i>URA3</i> ; <i>RER1-GFP</i>	K. Sato
pPLA8	CEN; <i>URA3</i> ; <i>ERV14-yEGFP</i>	Este estudio
pPLA9	CEN; <i>URA3</i> ; <i>ERV14-KS-yEGFP (97-101A)</i>	Este estudio
pRS416	CEN; <i>URA3</i>	R. Wellinger
pERV14	CEN; <i>URA3</i> ; <i>ERV14-HA</i>	C. Barlowe
pERV14-KS	CEN; <i>URA3</i> ; <i>ERV14-KS-HA (97-101A)</i>	C. Barlowe
YEplac111	2µ; <i>URA3</i>	J. de la Cruz
SLY1-20	2µ; <i>URA3</i> ; <i>SLY1-20</i>	A. Spang

pRS3125	CEN; <i>LEU2</i> ; <i>EMP24-CFP</i>	H. Riezman
pRS415	CEN; <i>LEU2</i>	S. Chávez
pRS3127	CEN; <i>URA3</i> ; <i>EMP24-CFP</i>	H. Riezman

**Tabla IV.** Plásmidos de expresión en bacteria empleados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pRARE	ARNt característicos de eucariotas	J. De la Cruz
1170	6xHis-Dsl1p	A. Spang
1172	6xHis-Use1 (1-217) / Sec39 (1-709)	A. Spang
1182	6xHis-Tip20p	A. Spang

## 5.4. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos usados en este estudio se emplearon como cebadores en reacciones de PCR. En la Tabla V, que se muestra a continuación se presentan en sentido 5'-3'. Se muestran en negrita las zonas de recombinación.

**Tabla V.** Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia
F_emp24KO	ATAGTATCCCTCCGCACAAAATACACACGCATAAGGATG <b>CGGAT</b> <b>CCCCGGGTTAATTA</b>
R_emp24KO	GCAAAAGTAAATAGATATGAACTACATTTTCCTGCTTTAC <b>GAATTC</b> <b>GAGCTCGTTTAAAC</b>
KO_emp24	GGCTCAATCGTAGTGTCTTC



## 6. Técnicas bioquímicas

### 6.1. Electroforesis en geles de acril-amida

Los geles de electroforesis de acril-amida se resolvieron usando el sistema Mini-Protean (Bio-Rad). Como patrón de peso molecular de proteínas se empleó Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad).

Antes de cargar las muestras en el gel, éstas se suplementaron con 0,2 volúmenes de tampón de carga 4x (SDS 10% (p/v), 0,3 M Tris-HCl pH 6,8, azul de bromofenol 0,05% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 25% (v/v), glicerol 50%). Las muestras, una vez suplementadas, se calentaron a 65 °C durante 10 min o a 95 °C durante 5 minutos dependiendo de la muestra.

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizaron en geles de poli(acrilamida) que contenían SDS (en adelante SDS/PAGE). El gel separador se preparó en tampón (375 mM Tris-HCl pH 8,8, SDS 0,1%), al 7,5, 10 ó 12,5% (p/v) de poli(acrilamida) a partir de acrilamida:bis(acrilamida) 37,5:1 40% (Amresco). El gel de empaquetamiento de las muestras se preparó al 5,25% (p/v) de poli(acrilamida) tampón (125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,1%). Los geles se polimerizaron con APS 0,1% (p/v), usando como agente catalizador TEMED a una concentración final de 6 mM. La electroforesis se llevó a cabo a 200 V, voltaje constante. Para el desarrollo de la electroforesis, se utilizó como tampón de electroforesis 25 mM Tris-HCl, 0,32 M glicina (pH 8,3) y SDS 0,1% (p/v).

Una vez finalizada la electroforesis, cuando fue necesario, las proteínas se tñieron sumergiendo los geles durante 5 minutos en tampón Coomassie (metanol 50%, ácido acético 7,5%, coomassie 0,25%). Los geles se lavaron varias veces con tampón fijador (metanol 45%, ácido acético 1%) para eliminar el exceso de colorante y promover su deshidratación. Para su posterior mantenimiento, se secaron sobre papel *Whatman* y se sometieron a aspiración a 100 °C durante 45 minutos. En otros casos tras la electroforesis se realizó un *Western Blot* (véase Material y Métodos, 4.2).

### 6.2. *Western blots* y anticuerpos

Los *Western blots* (WB) o inmunoblots se realizaron como se describe en (Aguilera-Romero *et al*, 2008). La transferencia se realizó en tampón Towbin (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glicina, metanol 20% (v/v)) a 70 V durante 60 minutos a 4°C. El

gel de acrilamida con las proteínas de interés se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm diámetro de poro previamente mojada en tampón Towbin. La pareja gel-membrana se cubrió a ambos lados con 2 láminas de papel Wathman mojados en tampón Tobwin y se insertó en la cubeta. Tras la transferencia, ésta se comprobó mediante la tinción reversible con Rojo *Ponceau*. Tras incubar 5 minutos con el colorante, éste se lavó varias veces con agua destilada hasta observar las bandas de proteínas.

A continuación, se empleó como solución de bloqueo TBS-Tween 20 (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, Tween 20 1%) complementado con 5% (p/v) de leche desnatada en polvo. Las membranas fueron incubadas 30 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó en solución de bloqueo conteniendo los anticuerpos a concentración comprendida entre 1:10000 a 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se almacenaron a -20 °C para su reutilización, añadiendo previamente 2 mM Na<sub>3</sub>N (azida). Posteriormente se lavó con solución de bloqueo 6 veces durante 5 minutos para eliminar los restos de azida así como de anticuerpo primario. A continuación, se añadió la solución con anticuerpo secundario (conjugados a peroxidasa de rábano (Pierce)) a una concentración de 1:3000 o 1:1500. Tras 1 hora de incubación se eliminaron los restos de anticuerpo, así como de leche, lavando al menos 6 veces con TBS-Tween 20 durante 3-5 minutos. Para la detección de la quimioluminiscencia de los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa se empleó el kit de detección West Pico Signal (Pierce). Cuando fue necesario detectar cantidades menores de proteína se empleó el sustrato Femto (Pierce). Las membranas fueron sumergidas en dicha solución y expuestas en el dispositivo LAS3000mini (Fujifilm) durante el tiempo necesario para la detección. La cuantificación de la quimioluminiscencia se realizó con el programa Multigauge (Fujifilm). Los anticuerpos usados se detallan en la Tabla VI a continuación.

**Tabla VI.** Anticuerpos usados en este trabajo.

<b>Antígeno</b>	<b>Origen</b>	<b>Tipo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Referencia</b>
GFP	Conejo	Primario - policlonal	1:3000	H. Riezman
Emp24p	Conejo	Primario - policlonal	1:500	H. Riezman
Wbp1p	Conejo	Primario - policlonal	1:1000	H. Riezman

HA	Ratón	Primario-monoclonal	1:1000	Roche
Pgk1p	Ratón	Primario – monoclonal	1:5000	J. De la Cruz
Sec61p	Conejo	Primario - policlonal	1:1000	H. Riezman
Bos1p	Conejo	Primario- policlonal	1:1000	H. Riezman
Sec24p	Conejo	Primario- policlonal	1:1000	A.Spang
TAP	Conejo	Primario - policlonal	1:500	Bionova
6xHis	Ratón	Primario- monoclonal	1:1000	Invitrogen
IgG de conejo	Cabra	Secundario + HRP	1:3000	Pierce
IgG de ratón	Cabra	Secundario + HRP	1:3000	Pierce
IgG de rata	Cabra	Secundario + HRP	1:3000	Pierce

### 6.3. Extractos celulares de levadura

Para la obtención de extractos celulares de levadura se siguieron dos métodos diferentes, el primero de ellos, basado en lisis alcalina (Horvath & Riezman, 1994), para la obtención de extractos totales proteicos. Básicamente, entre  $2-4 \times 10^7$  células fueron recogidas, lavadas dos veces con agua destilada y sometidas a un tratamiento de 5 minutos en hielo con 0,15 M NaOH. A continuación, se centrifugaron a baja revolución, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en Tampón de carga Laemli 2X (SDS 2%, 200 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol 20%, 120 mM Tris-HCl pH 6,8, azul de bromofenol 0,002%). Posteriormente, se calentó a 65°C durante 10 minutos. Finalmente, para eliminar los restos celulares insolubles se centrifugó a máxima revolución y se eliminó el pellet. Las muestras se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE e inmunoblot.

Cuando fue necesario obtener extractos más conservativos para ensayos posteriores, o el método de lisis alcalina no era compatible con la correcta detección por inmunoblot de las proteínas de interés, se utilizó el siguiente método. Partiendo de  $20-100 \times 10^7$  células, se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en 250  $\mu$ l de TE (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA) complementado con 0,5 mM PMSF y 1

$\mu\text{g/ml}$  de cóctel de inhibidores de proteasas (antipapaína, leupeptina y pepstatina (Amresco)) y un volumen similar a 200  $\mu\text{l}$  de bolas de vidrio libres de materia orgánica (Sigma). Se sometieron a 15 minutos de rotura mecánica en *vórtex* a 4 °C o bien a 3 pulsos en FastPrep-24 (MPBio) a 50 m/s durante 30 segundos, dejando reposar en hielo 3 minutos entre pulso y pulso. El extracto se pasó a un tubo nuevo, y sobre los restos de bolas de vidrio se añadió el mismo volumen de tampón fresco, para recuperar así el material. El volumen final se sometió a dos centrifugaciones sucesivas de 5 minutos a 1.000 g a 4 °C para precipitar los restos celulares de gran tamaño y las células no rotas. Estos extractos se analizaron por inmunoblot o bien se emplearon para ensayos posteriores que se detallan más adelante.

#### **6.4. Ensayos de secreción de Kar2p**

Se emplearon cultivos de células en fase exponencial temprana de crecimiento ( $\text{DO}_{600} < 1$ ) para realizar una dilución de  $\text{DO}_{600}$  igual a 10. De cada cepa se sembró una gota de 4  $\mu\text{l}$  en medio SC o YPD, y se dejó secar. A continuación, se colocó encima una membrana de nitrocelulosa previamente humedecida en agua destilada estéril. Se incubaron las placas durante 24 horas a las temperaturas de interés, tras lo cual se retiró la membrana de nitrocelulosa, que se lavó al menos cinco veces con agua destilada, antes de proceder a su análisis por inmunoblot.

#### **6.5. Purificación de proteínas recombinantes**

Las proteínas recombinantes del complejo Dsl1 etiquetadas con 6xHis se purificaron a partir de células de la estirpe BL21 de *E. coli*, que contenían el plásmido pRARE en el caso de Tip20p y de las proteínas correspondientes a dominios de Dsl1p.

Las bacterias que contenían los plásmidos crecieron en medio selectivo (LB + ampicilina + cloranfenicol) durante toda la noche. Se diluyeron en medio 2 x YT (1,6 % bacto-triptona, 1 % extracto de bacto-levadura, 0,5 % NaCl) hasta que alcanzaron una  $\text{DO}_{600} = 0.5-0.8$ , para inducir la expresión de las proteínas añadiendo 0,4 mM de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 23°C durante 4 horas o 18 °C toda la noche. Tras la inducción, las células fueron recogidas por centrifugación a 3.000 g durante 30 minutos a 4 °C. El pellet se congeló a -80°C durante al menos 20 minutos. Se resuspendió el pellet en 40 ml de tampón de resuspensión frío (50 mM Tris-Cl, pH

8.0, 200 mM NaCl, 20 mM imidazol, 2 mM  $\beta$ -ME, inhibidores de proteasas, PMSF) por cada 3 litros iniciales de cultivo.

Las células se lisaron por sonicación (3 pulsos de 1 minuto a intervalos de 30 segundos, con una constancia del 50%, en el nivel 3 del sonicador SONIFER 250 (Branson)) tras un tratamiento con 1 mg/ml lisozima y 40 U/ml DNaseI durante 30 minutos en hielo. El lisado celular se centrifugó a 28.000 x g (14.000 rpm en Beckman Avanti J-E, rotor JA-17) durante 30 minutos a 4 °C para eliminar los restos celulares no rotos. El sobrenadante obtenido se incubó en rotación a 4 °C durante 1 hora con 625  $\mu$ l de una matriz de bolas de Ni-nitriloacetic (NTA) –agarose (Qiagen) equilibradas al 50% en el tampón de resuspensión. Las bolas se equilibraron mediante centrifugaciones y lavados sucesivos del mismo tampón.

Las bolas se lavaron tres veces con 20 ml de tampón de lavado 1 (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM imidazol, 2 mM  $\beta$ -ME), y una vez más con tampón de lavado 2 (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM imidazol, 2 mM  $\beta$ -ME, 1 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) en el caso de His6-Use1p/Dsl3p.

Las proteínas se eluyeron con tampón de elución (270 mM imidazol, 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl, 10% glicerol, 2 mM  $\beta$ -ME, inhibidores de proteasas) mediante tres pases en dos litros de tampón. Finalmente se dializó contra PBS, 5% glicerol en el caso de His6-Dsl1p y His6-Use1p/Dsl3p, y contra 20mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -ME, 5% glicerol en el caso de His6-Tip20p.

Finalmente, el contenido en proteína se determinó siguiendo el método de Bradford. Para ello, las muestras se suplementaron con agua didestilada hasta un volumen de 0,2 ml y se añadió 1 ml de reactivo de determinación de proteínas (BioRad) diluido 1:5 con agua didestilada, incubándose las mezclas 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se midió la absorbancia de las mismas a 595 nm. Como patrón, se utilizaron cantidades conocidas de ovoalbúmina. Por último, las proteínas recombinantes purificadas se alicuotaron y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior conservación a -80 °C. Las proteínas purificadas se usaron para ensayos de *pull-down*.

## 6.6. Unión de péptidos de los tallos citosólicos de p24 a la matriz

Para los ensayos de *pull-down*, se generaron péptidos sintéticos correspondientes a los 11 residuos C-terminales de Emp24p y Erv25p con un residuo cisteína N-terminal para permitir su unión a la matriz.

Los péptidos usados en este estudio se muestran en la tabla VII. Los residuos mutados se muestran en negrita. La cisteína C-terminal se muestra subrayada.

**Tabla VII.** Péptidos sintéticos usados en este trabajo.

Péptido	Secuencia de aminoácidos
Emp24 wt	<u>CLRRFFEVTSLV</u>
Emp24-FFAA	<u>CLRR<b>AA</b>EVTSLV</u>
Erv25	<u>CLKNYFKTKHII</u>
Erv25-YFAA	<u>CLKN<b>AA</b>KTKHII</u>
Subrayado: Cisteína C-terminal.	
Negrita: Mutaciones.	

Los péptidos sintéticos se conjugaron a una matriz de tiopropil-sefarosa 6B como se describió previamente (Belden & Barlowe, 2001a). Para los péptidos correspondientes a los tallos de Emp24p, la tiopropil-sefarosa se incubó con 50% *coupling buffer* (CB) (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl) y 50% DMF (CB-DMF) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las bolas se lavaron dos veces con 10 ml de CB-DMF. Para la unión de los péptidos a las bolas, se incubaron 500 µl de bolas al 80% con 2 mg de péptido durante toda la noche a temperatura ambiente con rotación. En este momento se midió la eficiencia de unión como se detalla abajo. Posteriormente se lavó la matriz dos veces con CB-DMF.

Para el bloqueo de las bolas, se lavó una vez con tampón de bloqueo (BB, *Blocking Buffer*: 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 5 mM 2-mercaptoetanol, 50% DMF). Se incubó con BB durante 30 minutos con rotación a temperatura ambiente. Finalmente, las bolas se lavaron cuatro veces con CB-DMF y se llevaron al 15%. En el

caso de los péptidos sintéticos correspondientes a tallos de Erv25p, se siguió el mismo protocolo excepto que no se usó DMF.

Para cuantificar la eficiencia de la unión de los péptidos a las bolas, se midió la absorbancia a 343 nm del sobrenadante de las bolas tras la incubación con los péptidos. Esta medida corresponde a la cantidad de 2-tiopiridona, que es equivalente a la cantidad de péptido unido a las bolas, ya que la unión péptido-bola implica la liberación de este grupo.

## **6.7. Aislamiento de complejos proteicos de alto peso molecular**

Para el aislamiento de complejos proteicos de alto peso molecular se partió de cultivos de levaduras en fase exponencial y se lisaron en FastPrep.

Con el fin de enriquecer en interacciones presentes en el retículo endoplasmático, el extracto se sometió a centrifugación diferencial para RE (13000 g 15 min 4 °C). Tras este enriquecimiento en membranas del retículo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el tampón TNE 1% Digitonina (50mM Tris pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA complementado con 1%(p/v) digitonina (AppliChem)), o en el tampón TNE 1% TX-100. Se incubó 1 hora a 4 °C en rotación, y a continuación, se eliminaron los contenidos insolubles por centrifugación a 17000 g durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante se cargó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa del 5 al 30% con 0,2 % digitonina (o 0.2% TX-100) y se centrifugó a 50.000 rpm (rotor TLS-55 (Beckman Coulter)) durante 4 horas a 4 °C. A continuación, se recogieron muestras de 105 µl, a las que se añadió tampón de carga Laemli dejando una concentración final 1X y se desnaturalizó el inmunoprecipitado durante 10 minutos a 65°C. Las fracciones se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE e inmunoblot.

## **6.8. Análisis de interacción proteína-proteína**

### **6.8.1. Ensayos de *pull-down***

Se incubaron 100 µl de bolas (tiopropil-sefarosa con los péptidos unidos) al 15% con proteínas recombinantes purificadas. Las bolas se equilibraron previamente con el tampón RB (Reaction Buffer) (150 mM KOAc, 10 mM HEPES pH 7, 0,1% TX-100). La incubación se llevó a cabo con rotación en tubos *ultra-clear* (Axygen) durante 30

minutos a 4 °C. Tras esto, se lavaron las bolas seis veces con RB cambiando de tubo la primera y la última vez. Finalmente, empleando puntas de diámetro menor al de las bolas, se secó la matriz mediante aspiración, se añadió tampón de carga Laemli 2X y se desnaturizó el inmunoprecipitado durante 10 minutos a 65 °C. Por último, las muestras se analizaron por SDS-PAGE y tinción con Coomassie.

### **6.8.2. Co-inmunoprecipitación**

Para estudiar la interacción entre proteínas *in vivo* se usaron dos aproximaciones diferentes mediante co-inmunoprecipitación. En ambos casos, se partió de cultivos de levaduras en fase exponencial y se lisaron en FastPrep.

Para estudiar la interacción física entre proteínas transmembrana se empleó el tampón TNE 1% Digitonina. Todos los pasos se realizaron en hielo. Tras incubar 1 hora el extracto celular en presencia del detergente, se eliminaron los contenidos insolubles centrifugando a 17.000 g durante 1 hora a 4 °C. A continuación, se realizó la inmunoprecipitación. Se incubó durante 1 hora en TNE 1% Digitonina con la matriz de bolas vacías (sin anticuerpos) para eliminar uniones inespecíficas (bloqueo). Tras el bloqueo, se sacó una fracción del extracto como control de la carga total de proteínas. El volumen varió entre 0,2%-2%, según el experimento. Después, se incubó durante 3 horas en presencia de los anticuerpos. Para la inmunoprecipitación de proteínas etiquetadas con GFP o mCi se empleó la matriz GFP-Trap (Chromotek). Una vez terminada la inmunoprecipitación, se lavó la matriz 6 veces consecutivas, cambiando de tubo al menos dos veces. Durante los lavados, la concentración de digitonina en el tampón se sustituyó progresivamente desde el 1% hasta el 0,2%(p/v). Finalmente, empleando puntas de diámetro menor al de las bolas, se secó la matriz mediante aspiración y se añadió tampón de carga Laemli 2X y se desnaturizó el inmunoprecipitado durante 10 minutos a 65°C. En algunos casos se empleó PBS en lugar de TNE.

Para analizar la interacción entre proteínas solubles o entre proteínas transmembranas con proteínas solubles se empleó tampón HEPES (20 mM HEPES pH7,2, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) complementado con Tritón X-100 1%. El protocolo fue esencialmente el mismo que el detallado anteriormente, salvo que la concentración del 1% se mantuvo durante los lavados.



Cuando se quiso enriquecer en interacciones presentes en el retículo endoplasmático, antes de tratar con los detergentes, el extracto se sometió a centrifugación diferencial para RE (13.000 g, 15 min, 4 °C). Tras el enriquecimiento en membranas del retículo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el tampón de interés. Por último, en todos los casos las muestras se analizaron por SDS-PAGE e inmunoblot.

## 6.9. Subfraccionamiento celular

Las células se cultivaron durante dos días en el medio de cultivo de interés sin rebasar  $DO_{600}=1$ . Se recogieron  $20 \times 10^7$  células. Para el subfraccionamiento se adaptó el protocolo previamente descrito (Chen et al, 2011).

Las células fueron convertidas en esferoplastos mediante digestión de la pared celular con enzima zimoliasa 20T (USBiological). Para ello, las células recogidas por centrifugación se lavaron dos veces tampón fosfato y se resuspendieron en 1 ml de 50 mM tampón fosfato complementado con 1,4 M de sorbitol. Después, se añadió 3,5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol y 33  $\mu$ l de zimoliasa 20T (15mg/ml). Se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Todos los pasos siguientes se realizaron a 4 °C. A continuación, se lavaron los esferoplastos centrifugando sobre una cama de 1 ml de tampón de lavado (100 mM HEPES pH 7,2, 1,7 M de sorbitol).

El precipitado de esferoplastos se rompió mecánicamente en 250  $\mu$ l de tampón de lisis (100 mM HEPES Ph 7,2, 1 mM EGTA) complementado con 2 mM DTT, 1X inhibidores de proteasas y 1X PMSF). Se añadieron 100  $\mu$ l de bolas de vidrio y se sometió a agitación en *vórtex* durante 3 minutos. El extracto fue diluido en 750  $\mu$ l de tampón fresco y se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a 1.000 g durante 5 minutos. Se tomaron 150  $\mu$ l de total.

El extracto aclarado fue sometido a centrifugación diferencial, 13.000 g 15 minutos para enriquecer en retículo endoplasmático, o bien 100.000 g para precipitar también el aparato de Golgi y las vesículas. Tras esta se tomaron 150  $\mu$ l de pellet y sobrenadante y se desnaturalizaron añadiendo 50  $\mu$ l tampón de carga Laemli, al igual que los totales, que se conservaron a -80 °C durante el transcurso del ensayo. Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos y se analizaron por SDS-PAGE e inmunoblot.

## 7. Técnicas de Microscopía

Todas las células analizadas mediante microscopía se obtuvieron de cultivos que habían crecido durante dos días sin sobrepasar  $DO_{600}=1$ , preservando así la fase exponencial de crecimiento de los cultivos. Antes de la observación por microscopía, las células fueron recogidas por centrifugación a bajas revoluciones y lavadas dos veces en medio de cultivo fresco, para eliminar así los restos celulares.

### 7.1. Microscopía de fluorescencia

Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron tomadas empleando el microscopio OLYMPUS BX61 equipado con la cámara DP60, el objetivo *PlanApo 100X/1.40 aceite* y los siguientes filtros:

Nombre comercial	Etiqueta	Filtro de excitación	Espejo dicroico	Filtro de emisión
U-MNU2	DAPI	BP360-370	DM400	BA420
U-MNB2	FITC	BP470-490	DM500	BA520IF
U-DM-CY3	Cy3	BP530-560	DM565	BA575-646

Todas las preparaciones para captar las imágenes de fluorescencia *in vivo* fueron realizadas en el momento, poniendo 2,5  $\mu$ l del cultivo sobre el portaobjetos, previamente limpio con etanol 70 %, cubiertos con un cubreobjetos de 20x20 mm y presionadas uniformemente para retirar el exceso de líquido.

En el caso de mutantes termosensibles, estos se incubaron previamente a la visualización durante un tiempo determinado a temperatura restrictiva.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

Aguilera-Romero A, Kaminska J, Spang A, Riezman H, Muniz M (2008) The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus. *The Journal of cell biology* **180**: 713-720

Alvarez C, Garcia-Mata R, Brandon E, Sztul E (2003) COPI recruitment is modulated by a Rab1b-dependent mechanism. *Molecular biology of the cell* **14**: 2116-2127

Ambroggio E, Sorre B, Bassereau P, Goud B, Manneville JB, Antonny B (2010) ArfGAP1 generates an Arf1 gradient on continuous lipid membranes displaying flat and curved regions. *The EMBO journal* **29**: 292-303

Andag U, Schmitt HD (2003) Dsl1p, an essential component of the Golgi-endoplasmic reticulum retrieval system in yeast, uses the same sequence motif to interact with different subunits of the COPI vesicle coat. *The Journal of biological chemistry* **278**: 51722-51734

Angers CG, Merz AJ (2011) New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting. *Seminars in cell & developmental biology* **22**: 18-26

Antonny B, Beraud-Dufour S, Chardin P, Chabre M (1997) N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **36**: 4675-4684

Appenzeller-Herzog C, Hauri HP (2006) The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *Journal of cell science* **119**: 2173-2183

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

Baker D, Wuestehube L, Schekman R, Botstein D, Segev N (1990) GTP-binding Ypt1 protein and Ca<sup>2+</sup> function independently in a cell-free protein transport reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 355-359

Baker EK, Colley NJ, Zuker CS (1994) The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *The EMBO journal* **13**: 4886-4895

Barlowe C (1997) Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins. *The Journal of cell biology* **139**: 1097-1108

Barlowe CK, Miller EA (2013) Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* **193**: 383-410

Barr FA, Preisinger C, Kopajtich R, Korner R (2001) Golgi matrix proteins interact with p24 cargo receptors and aid their efficient retention in the Golgi apparatus. *The Journal of cell biology* **155**: 885-891

Barrowman J, Bhandari D, Reinisch K, Ferro-Novick S (2010) TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 759-763

Behnia R, Barr FA, Flanagan JJ, Barlowe C, Munro S (2007) The yeast orthologue of GRASP65 forms a complex with a coiled-coil protein that contributes to ER to Golgi traffic. *The Journal of cell biology* **176**: 255-261

Belden WJ, Barlowe C (2001a) Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *The Journal of biological chemistry* **276**: 43040-43048

Belden WJ, Barlowe C (2001b) Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science* **294**: 1528-1531

Bethune J, Wieland F, Moelleken J (2006) COPI-mediated transport. *J Membr Biol* **211**: 65-79

Bevis BJ, Hammond AT, Reinke CA, Glick BS (2002) De novo formation of transitional ER sites and Golgi structures in *Pichia pastoris*. *Nat Cell Biol* **4**: 750-756

Bhandari D, Zhang J, Menon S, Lord C, Chen S, Helm JR, Thorsen K, Corbett KD, Hay JC, Ferro-Novick S (2013) Sit4p/PP6 regulates ER-to-Golgi traffic by controlling the dephosphorylation of COPII coat subunits. *Molecular biology of the cell* **24**: 2727-2738

Bielli A, Haney CJ, Gabreski G, Watkins SC, Bannykh SI, Aridor M (2005) Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *The Journal of cell biology* **171**: 919-924

Bonifacino JS, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**: 153-166

Brandizzi F, Barlowe C (2013) Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**: 382-392

Bremser M, Nickel W, Schweikert M, Ravazzola M, Amherdt M, Hughes CA, Sollner TH, Rothman JE, Wieland FT (1999) Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* **96**: 495-506

Bue CA, Bentivoglio CM, Barlowe C (2006) Erv26p directs pro-alkaline phosphatase into endoplasmic reticulum-derived coat protein complex II transport vesicles. *Molecular biology of the cell* **17**: 4780-4789

Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S (2007a) Coats, tethers, Rab, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* **12**: 671-682

Cai H, Yu S, Menon S, Cai Y, Lazarova D, Fu C, Reinisch K, Hay JC, Ferro-Novick S (2007b) TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Nature* **445**: 941-944

Caldwell SR, Hill KJ, Cooper AA (2001) Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *The Journal of biological chemistry* **276**: 23296-23303

Cao X, Ballew N, Barlowe C (1998) Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *The EMBO journal* **17**: 2156-2165

Cao X, Barlowe C (2000) Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes. *The Journal of cell biology* **149**: 55-66

Carney GE, Bowen NJ (2004) p24 proteins, intracellular trafficking, and behavior: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities. *Biol Cell* **96**: 271-278

Castillon GA, Aguilera-Romero A, Manzano-Lopez J, Epstein S, Kajiwara K, Funato K, Watanabe R, Riezman H, Muniz M (2011) The yeast p24 complex regulates GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring anchor remodeling. *Molecular biology of the cell* **22**: 2924-2936

Castillon GA, Watanabe R, Taylor M, Schwabe TM, Riezman H (2009) Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic* **10**: 186-200

Castro CP, Piscopo D, Nakagawa T, Derynck R (2007) Cornichon regulates transport and secretion of TGF $\alpha$ -related proteins in metazoan cells. *Journal of cell science* **120**: 2454-2466

Cohen M, Stutz F, Belgareh N, Haguenaer-Tsapis R, Dargemont C (2003) Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat Cell Biol* **5**: 661-667

Colley KJ (1997) Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* **7**: 1-13

Connerly PL, Esaki M, Montegna EA, Strongin DE, Levi S, Soderholm J, Glick BS (2005) Sec16 is a determinant of transitional ER organization. *Current biology : CB* **15**: 1439-1447

Copic A, Latham CF, Horlbeck MA, D'Arcangelo JG, Miller EA (2012) ER cargo properties specify a requirement for COPII coat rigidity mediated by Sec13p. *Science* **335**: 1359-1362

Cosson P, Lefkir Y, Demolliere C, Letourneur F (1998) New COP1-binding motifs involved in ER retrieval. *The EMBO journal* **17**: 6863-6870

Cosson P, Letourneur F (1994) Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**: 1629-1631

Chantalat S, Courbeyrette R, Senic-Matuglia F, Jackson CL, Goud B, Peyroche A (2003) A novel Golgi membrane protein is a partner of the ARF exchange factors Gea1p and Gea2p. *Molecular biology of the cell* **14**: 2357-2371

Chen DC, Yang BC, Kuo TT (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current genetics* **21**: 83-84

Chen S, Cai H, Park SK, Menon S, Jackson CL, Ferro-Novick S (2011) Trs65p, a subunit of the Ypt1p GEF TRAPP II, interacts with the Arf1p exchange factor Gea2p to facilitate COPI-mediated vesicle traffic. *Molecular biology of the cell* **22**: 3634-3644

D'Arcangelo JG, Stahmer KR, Miller EA (2013) Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 2464-2472

Dancourt J, Barlowe C (2010) Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem* **79**: 777-802

Dascher C, Ossig R, Gallwitz D, Schmitt HD (1991) Identification and structure of four yeast genes (SLY) that are able to suppress the functional loss of YPT1, a member of the RAS superfamily. *Molecular and cellular biology* **11**: 872-885

Denzel A, Otto F, Girod A, Pepperkok R, Watson R, Rosewell I, Bergeron JJ, Solari RC, Owen MJ (2000) The p24 family member p23 is required for early embryonic development. *Current biology : CB* **10**: 55-58

Ding J, Segarra VA, Chen S, Cai H, Lemmon SK, Ferro-Novick S (2016) Auxilin facilitates membrane traffic in the early secretory pathway. *Molecular biology of the cell* **27**: 127-136

Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**: 181-191

Emr S, Glick BS, Linstedt AD, Lippincott-Schwartz J, Luini A, Malhotra V, Marsh BJ, Nakano A, Pfeffer SR, Rabouille C, Rothman JE, Warren G, Wieland FT (2009) Journeys through the Golgi--taking stock in a new era. *The Journal of cell biology* **187**: 449-453

Eugster A, Frigerio G, Dale M, Duden R (2004) The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Molecular biology of the cell* **15**: 1011-1023

Farhan H, Weiss M, Tani K, Kaufman RJ, Hauri HP (2008) Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load. *The EMBO journal* **27**: 2043-2054

Fromme JC, Orci L, Schekman R (2008) Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends Cell Biol* **18**: 330-336

Fullekrug J, Sukanuma T, Tang BL, Hong W, Storrie B, Nilsson T (1999) Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members. *Molecular biology of the cell* **10**: 1939-1955

Furgason ML, MacDonald C, Shanks SG, Ryder SP, Bryant NJ, Munson M (2009) The N-terminal peptide of the syntaxin Tlg2p modulates binding of its closed conformation to Vps45p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 14303-14308

Gaynor EC, Emr SD (1997) COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *The Journal of cell biology* **136**: 789-802

Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737-741

Gillingham AK, Pfeifer AC, Munro S (2002) CASP, the alternatively spliced product of the gene encoding the CCAAT-displacement protein transcription factor, is a Golgi membrane protein related to giantin. *Molecular biology of the cell* **13**: 3761-3774

Gillingham AK, Tong AH, Boone C, Munro S (2004) The GTPase Arf1p and the ER to Golgi cargo receptor Erv14p cooperate to recruit the golgin Rud3p to the cis-Golgi. *The Journal of cell biology* **167**: 281-292

Gimeno RE, Espenshade P, Kaiser CA (1996) COPII coat subunit interactions: Sec24p and Sec23p bind to adjacent regions of Sec16p. *Molecular biology of the cell* **7**: 1815-1823

Glick BS (2014) Integrated self-organization of transitional ER and early Golgi compartments. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **36**: 129-133



Glick BS, Luini A (2011) Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**: a005215

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

Glick BS, Nakano A (2009) Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 113-132

Goldberg J (2000) Decoding of sorting signals by coatamer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell* **100**: 671-679

Gommel DU, Memon AR, Heiss A, Lottspeich F, Pfannstiel J, Lechner J, Reinhard C, Helms JB, Nickel W, Wieland FT (2001) Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *The EMBO journal* **20**: 6751-6760

Grabski R, Hay J, Sztul E (2012) Tethering factor P115: a new model for tether-SNARE interactions. *Bioarchitecture* **2**: 175-180

Hariri H, Bhattacharya N, Johnson K, Noble AJ, Stagg SM (2014) Insights into the mechanisms of membrane curvature and vesicle scission by the small GTPase Sar1 in the early secretory pathway. *J Mol Biol* **426**: 3811-3826

Hehnly H, Stamnes M (2007) Regulating cytoskeleton-based vesicle motility. *FEBS Lett* **581**: 2112-2118

Herzig Y, Sharpe HJ, Elbaz Y, Munro S, Schuldiner M (2012) A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. *PLoS Biol* **10**: e1001329

Honda A, Al-Awar OS, Hay JC, Donaldson JG (2005) Targeting of Arf-1 to the early Golgi by membrin, an ER-Golgi SNARE. *The Journal of cell biology* **168**: 1039-1051

Horvath A, Riezman H (1994) Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1305-1310

Hsu VW, Lee SY, Yang JS (2009) The evolving understanding of COPI vesicle formation. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 360-364

Hsu VW, Yang JS (2009) Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett* **583**: 3758-3763

Inadome H, Noda Y, Adachi H, Yoda K (2005) Immunoprecipitation of the yeast Golgi subcompartments and characterization of a novel membrane protein, Svp26, discovered in the Sed5-containing compartments. *Molecular and cellular biology* **25**: 7696-7710

Jin L, Pahuja KB, Wickliffe KE, Gorur A, Baumgartel C, Schekman R, Rape M (2012) Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature* **482**: 495-500

Johnson A, Bhattacharya N, Hanna M, Pennington JG, Schuh AL, Wang L, Otegui MS, Stagg SM, Audhya A (2015) TFG clusters COPII-coated transport carriers and promotes early secretory pathway organization. *The EMBO journal* **34**: 811-827

Kamena F, Diefenbacher M, Kilchert C, Schwarz H, Spang A (2008) Ypt1p is essential for retrograde Golgi-ER transport and for Golgi maintenance in *S. cerevisiae*. *Journal of cell science* **121**: 1293-1302

Kamena F, Spang A (2004) Tip20p prohibits back-fusion of COPII vesicles with the endoplasmic reticulum. *Science* **304**: 286-289

Kim YG, Raunser S, Munger C, Wagner J, Song YL, Cygler M, Walz T, Oh BH, Sacher M (2006) The architecture of the multisubunit TRAPP I complex suggests a model for vesicle tethering. *Cell* **127**: 817-830

Kraynack BA, Chan A, Rosenthal E, Essid M, Umansky B, Waters MG, Schmitt HD (2005) Dsl1p, Tip20p, and the novel Dsl3(Sec39) protein are required for the stability of the Q/t-SNARE complex at the endoplasmic reticulum in yeast. *Molecular biology of the cell* **16**: 3963-3977

Kung LF, Pagant S, Futai E, D'Arcangelo JG, Buchanan R, Dittmar JC, Reid RJ, Rothstein R, Hamamoto S, Snapp EL, Schekman R, Miller EA (2012) Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *The EMBO journal* **31**: 1014-1027

Kurokawa K, Okamoto M, Nakano A (2014) Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nature communications* **5**: 3653

Lau WT, Howson RW, Malkus P, Schekman R, O'Shea EK (2000) Pho86p, an endoplasmic reticulum (ER) resident protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ER exit of the high-affinity phosphate transporter Pho84p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1107-1112

Lee C, Goldberg J (2010) Structure of coatamer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats. *Cell* **142**: 123-132

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

Letourneur F, Gaynor EC, Hennecke S, Demolliere C, Duden R, Emr SD, Riezman H, Cosson P (1994) Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**: 1199-1207

Ljungdahl PO, Gimeno CJ, Styles CA, Fink GR (1992) SHR3: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell* **71**: 463-478

Lord C, Bhandari D, Menon S, Ghassemian M, Nycz D, Hay J, Ghosh P, Ferro-Novick S (2011) Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature* **473**: 181-186

Losev E, Reinke CA, Jellen J, Strongin DE, Bevis BJ, Glick BS (2006) Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* **441**: 1002-1006

Ma W, Goldberg J (2013) Rules for the recognition of dilysine retrieval motifs by coatamer. *The EMBO journal* **32**: 926-937

Malkus P, Jiang F, Schekman R (2002) Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *The Journal of cell biology* **159**: 915-921

Malsam J, Sollner TH (2011) Organization of SNAREs within the Golgi stack. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**: a005249

Mallabiabarrena A, Fresno M, Alarcon B (1992) An endoplasmic reticulum retention signal in the CD3 epsilon chain of the T-cell receptor. *Nature* **357**: 593-596

Mancias JD, Goldberg J (2007) The transport signal on Sec22 for packaging into COPII-coated vesicles is a conformational epitope. *Molecular cell* **26**: 403-414

Manzano-Lopez J, Perez-Linero AM, Aguilera-Romero A, Martin ME, Okano T, Silva DV, Seeberger PH, Riezman H, Funato K, Goder V, Wellinger RE, Muniz M (2015) COPII coat composition is actively regulated by luminal cargo maturation. *Current biology : CB* **25**: 152-162

Margulis NG, Wilson JD, Bentivoglio CM, Dhungel N, Gitler AD, Barlowe C (2016) Analysis of COPII Vesicles Indicates a Role for the Emp47-Ssp120 Complex in Transport of Cell Surface Glycoproteins. *Traffic* **17**: 191-210

Marzioch M, Henthorn DC, Herrmann JM, Wilson R, Thomas DY, Bergeron JJ, Solari RC, Rowley A (1999) Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Molecular biology of the cell* **10**: 1923-1938

Matsuura-Tokita K, Takeuchi M, Ichihara A, Mikuriya K, Nakano A (2006) Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* **441**: 1007-1010

Mezzacasa A, Helenius A (2002) The transitional ER defines a boundary for quality control in the secretion of tsO45 VSV glycoprotein. *Traffic* **3**: 833-849

Michelsen K, Schmid V, Metz J, Heusser K, Liebel U, Schwede T, Spang A, Schwappach B (2007) Novel cargo-binding site in the beta and delta subunits of coatamer. *The Journal of cell biology* **179**: 209-217

Miller EA, Barlowe C (2010) Regulation of coat assembly--sorting things out at the ER. *Current opinion in cell biology* **22**: 447-453

Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, Lee MC, Hamamoto S, Orci L, 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

Mitrovic S, Ben-Tekaya H, Koegler E, Gruenberg J, Hauri HP (2008) The cargo receptors Surf4, endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC)-53, and p25 are required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi. *Molecular biology of the cell* **19**: 1976-1990

Monetta P, Slavin I, Romero N, Alvarez C (2007) Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Molecular biology of the cell* **18**: 2400-2410

Moyer BD, Allan BB, Balch WE (2001) Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic* **2**: 268-276

Muniz M, Morsomme P, Riezman H (2001) Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* **104**: 313-320

Muniz M, Nuoffer C, Hauri HP, Riezman H (2000) The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *The Journal of cell biology* **148**: 925-930

Nakajima H, Hirata A, Ogawa Y, Yonehara T, Yoda K, Yamasaki M (1991) A cytoskeleton-related gene, *uso1*, is required for intracellular protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **113**: 245-260

Nakano A (2015) Cell biology: Polarized transport in the Golgi apparatus. *Nature* **521**: 427-428

Noda Y, Hara T, Ishii M, Yoda K (2014) Distinct adaptor proteins assist exit of Kre2-family proteins from the yeast ER. *Biology open* **3**: 209-224

Noda Y, Yoda K (2010) Svp26 facilitates endoplasmic reticulum to golgi transport of a set of mannosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **285**: 15420-15429

Okamoto M, Kurokawa K, Matsuura-Tokita K, Saito C, Hirata R, Nakano A (2012) High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science* **125**: 3412-3420

Otte S, Barlowe C (2002) The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER. *The EMBO journal* **21**: 6095-6104

Otte S, Belden WJ, Heidtman M, Liu J, Jensen ON, Barlowe C (2001) Erv41p and Erv46p: new components of COPII vesicles involved in transport between the ER and Golgi complex. *The Journal of cell biology* **152**: 503-518

Pagant S, Wu A, Edwards S, Diehl F, Miller EA (2015) Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Current biology : CB* **25**: 403-412

Papanikou E, Day KJ, Austin J, Glick BS (2015) COPI selectively drives maturation of the early Golgi. *eLife* **4**

Park SK, Hartnell LM, Jackson CL (2005) Mutations in a highly conserved region of the Arf1p activator GEA2 block anterograde Golgi transport but not COPI recruitment to membranes. *Molecular biology of the cell* **16**: 3786-3799

Park SY, Yang JS, Schmider AB, Soberman RJ, Hsu VW (2015) Coordinated regulation of bidirectional COPI transport at the Golgi by CDC42. *Nature* **521**: 529-532

Parlati F, McNew JA, Fukuda R, Miller R, Sollner TH, Rothman JE (2000) Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* **407**: 194-198

Pelham HR (1998) Getting through the Golgi complex. *Trends Cell Biol* **8**: 45-49

Peng R, Gallwitz D (2002) Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes. *The Journal of cell biology* **157**: 645-655

Perez-Linero AM, Muniz M (2015) Membrane trafficking: returning to the fold(ER). *Current biology : CB* **25**: R288-290

Peyroche A, Paris S, Jackson CL (1996) Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* **384**: 479-481

Poon PP, Nothwehr SF, Singer RA, Johnston GC (2001) The Gcs1 and Age2 ArfGAP proteins provide overlapping essential function for transport from the yeast trans-Golgi network. *The Journal of cell biology* **155**: 1239-1250

Powers J, Barlowe C (1998) Transport of axl2p depends on erv14p, an ER-vesicle protein related to the Drosophila cornichon gene product. *The Journal of cell biology* **142**: 1209-1222

Powers J, Barlowe C (2002) Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Molecular biology of the cell* **13**: 880-891

Pucadyil TJ, Schmid SL (2009) Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science* **325**: 1217-1220

Reeves JE, Fried M (1995) The surf-4 gene encodes a novel 30 kDa integral membrane protein. *Mol Membr Biol* **12**: 201-208

Rein U, Andag U, Duden R, Schmitt HD, Spang A (2002) ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat. *The Journal of cell biology* **157**: 395-404

Reiterer V, Nyfeler B, Hauri HP (2010) Role of the lectin VIP36 in post-ER quality control of human alpha1-antitrypsin. *Traffic* **11**: 1044-1055

Ren Y, Yip CK, Tripathi A, Huie D, Jeffrey PD, Walz T, Hughson FM (2009) A structure-based mechanism for vesicle capture by the multisubunit tethering complex Dsl1. *Cell* **139**: 1119-1129

Rizzo R, Parashuraman S, Mirabelli P, Puri C, Lucocq J, Luini A (2013) The dynamics of engineered resident proteins in the mammalian Golgi complex relies on cisternal maturation. *The Journal of cell biology* **201**: 1027-1036

Roboti P, Sato K, Lowe M (2015) The golgin GMAP-210 is required for efficient membrane trafficking in the early secretory pathway. *Journal of cell science* **128**: 1595-1606

Rogers JV, McMahon C, Baryshnikova A, Hughson FM, Rose MD (2014) ER-associated retrograde SNAREs and the Dsl1 complex mediate an alternative, Sey1p-independent homotypic ER fusion pathway. *Molecular biology of the cell* **25**: 3401-3412

Rossanese OW, Soderholm J, Bevis BJ, Sears IB, O'Connor J, Williamson EK, Glick BS (1999) Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **145**: 69-81

Rossi G, Kolstad K, Stone S, Palluault F, Ferro-Novick S (1995) BET3 encodes a novel hydrophilic protein that acts in conjunction with yeast SNAREs. *Molecular biology of the cell* **6**: 1769-1780

Rothman JE, Wieland FT (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**: 227-234

Sacristan C, Manzano-Lopez J, Reyes A, Spang A, Muniz M, Roncero C (2013) Oligomerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *Molecular microbiology*

Sacher M, Barrowman J, Wang W, Horecka J, Zhang Y, Pypaert M, Ferro-Novick S (2001) TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Molecular cell* **7**: 433-442

Sacher M, Jiang Y, Barrowman J, Scarpa A, Burston J, Zhang L, Schieltz D, Yates JR, 3rd, Abeliovich H, Ferro-Novick S (1998) TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *The EMBO journal* **17**: 2494-2503

Saito K, Chen M, Bard F, Chen S, Zhou H, Woodley D, Polischuk R, Schekman R, Malhotra V (2009) TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell* **136**: 891-902

Salama NR, Chuang JS, Schekman RW (1997) Sec31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell* **8**: 205-217

Sandmann T, Herrmann JM, Dengjel J, Schwarz H, Spang A (2003) Suppression of coatomer mutants by a new protein family with COPI and COPII binding motifs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **14**: 3097-3113

Sapperstein SK, Lupashin VV, Schmitt HD, Waters MG (1996) Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires Uso1p. *The Journal of cell biology* **132**: 755-767

Sapperstein SK, Walter DM, Grosvenor AR, Heuser JE, Waters MG (1995) p115 is a general vesicular transport factor related to the yeast endoplasmic reticulum to Golgi transport factor Uso1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 522-526

Sata M, Moss J, Vaughan M (1999) Structural basis for the inhibitory effect of brefeldin A on guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 2752-2757

Sato K (2004) COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum. *Journal of biochemistry* **136**: 755-760

Sato K, Nakano A (2003) Oligomerization of a cargo receptor directs protein sorting into COPII-coated transport vesicles. *Molecular biology of the cell* **14**: 3055-3063

Sato K, Nakano A (2005) Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis. *Nature structural & molecular biology* **12**: 167-174

Sato K, Nakano A (2007) Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett* **581**: 2076-2082

Sato K, Sato M, Nakano A (1997) Rer1p as common machinery for the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 9693-9698

Schmitt HD, Puzicha M, Gallwitz D (1988) Study of a temperature-sensitive mutant of the ras-related YPT1 gene product in yeast suggests a role in the regulation of intracellular calcium. *Cell* **53**: 635-647

Schuldiner M, Collins SR, Thompson NJ, Denic V, Bhamidipati A, Punna T, Ihmels J, Andrews B, Boone C, Greenblatt JF, Weissman JS, Krogan NJ (2005) Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* **123**: 507-519

Schwenk J, Harmel N, Zolles G, Bildl W, Kulik A, Heimrich B, Chisaka O, Jonas P, Schulte U, Fakler B, Klockner N (2009) Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science* **323**: 1313-1319

Segev N, Mulholland J, Botstein D (1988) The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell* **52**: 915-924

Shanks NF, Cais O, Maruo T, Savas JN, Zaika EI, Azumaya CM, Yates JR, 3rd, Greger I, Nakagawa T (2014) Molecular dissection of the interaction between the AMPA receptor and cornichon homolog-3. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**: 12104-12120

Shaywitz DA, Espenshade PJ, Gimeno RE, Kaiser CA (1997) COPII subunit interactions in the assembly of the vesicle coat. *The Journal of biological chemistry* **272**: 25413-25416

Sherwood PW, Carlson M (1999) Efficient export of the glucose transporter Hxt1p from the endoplasmic reticulum requires Gsf2p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 7415-7420

Shestakova A, Suvorova E, Pavliv O, Khaidakova G, Lupashin V (2007) Interaction of the conserved oligomeric Golgi complex with t-SNARE Syntaxin5a/Sed5 enhances intra-Golgi SNARE complex stability. *The Journal of cell biology* **179**: 1179-1192



Shibuya A, Margulis N, Christiano R, Walther TC, Barlowe C (2015) The Erv41-Erv46 complex serves as a retrograde receptor to retrieve escaped ER proteins. *The Journal of cell biology* **208**: 197-209

Shindiapina P, Barlowe C (2010) Requirements for transitional endoplasmic reticulum site structure and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **21**: 1530-1545

Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS (2011) Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* **334**: 1086-1090

Smith RD, Lupashin VV (2008) Role of the conserved oligomeric Golgi (COG) complex in protein glycosylation. *Carbohydrate research* **343**: 2024-2031

Spang A, Herrmann JM, Hamamoto S, Schekman R (2001) The ADP ribosylation factor-nucleotide exchange factors Gea1p and Gea2p have overlapping, but not redundant functions in retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell* **12**: 1035-1045

Spang A, Shiba Y, Randazzo PA (2010) Arf GAPs: gatekeepers of vesicle generation. *FEBS Lett* **584**: 2646-2651

Stagg SM, LaPointe P, Razvi A, Gurkan C, Potter CS, Carragher B, Balch WE (2008) Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell* **134**: 474-484

Stamnes M (2002) Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport. *Current opinion in cell biology* **14**: 428-433

Stephens DJ (2003) De novo formation, fusion and fission of mammalian COPII-coated endoplasmic reticulum exit sites. *EMBO reports* **4**: 210-217

Strating JR, Martens GJ (2009) The p24 family and selective transport processes at the ER-Golgi interface. *Biol Cell* **101**: 495-509

Strating JR, van Bakel NH, Leunissen JA, Martens GJ (2009) A comprehensive overview of the vertebrate p24 family: identification of a novel tissue-specifically expressed member. *Mol Biol Evol* **26**: 1707-1714

Sudhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* **323**: 474-477

Supek F, Madden DT, Hamamoto S, Orci L, Schekman R (2002) Sec16p potentiates the action of COPII proteins to bud transport vesicles. *The Journal of cell biology* **158**: 1029-1038

Suvorova ES, Duden R, Lupashin VV (2002) The Sec34/Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra-Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins. *The Journal of cell biology* **157**: 631-643

Sztul E, Lupashin V (2009) Role of vesicle tethering factors in the ER-Golgi membrane traffic. *FEBS Lett* **583**: 3770-3783

Thor F, Gautschi M, Geiger R, Helenius A (2009) Bulk flow revisited: transport of a soluble protein in the secretory pathway. *Traffic* **10**: 1819-1830

Tripathi A, Ren Y, Jeffrey PD, Hughson FM (2009) Structural characterization of Tip20p and Dsl1p, subunits of the Dsl1p vesicle tethering complex. *Nature structural & molecular biology* **16**: 114-123

Ungar D, Oka T, Krieger M, Hughson FM (2006) Retrograde transport on the COG railway. *Trends Cell Biol* **16**: 113-120

VanRheenen SM, Cao X, Sapperstein SK, Chiang EC, Lupashin VV, Barlowe C, Waters MG (1999) Sec34p, a protein required for vesicle tethering to the yeast Golgi apparatus, is in a complex with Sec35p. *The Journal of cell biology* **147**: 729-742

Vanrheenen SM, Reilly BA, Chamberlain SJ, Waters MG (2001) Dsl1p, an essential protein required for membrane traffic at the endoplasmic reticulum/Golgi interface in yeast. *Traffic* **2**: 212-231

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

Watson P, Townley AK, Koka P, Palmer KJ, Stephens DJ (2006) Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic* **7**: 1678-1687

Whyte JR, Munro S (2002) Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *Journal of cell science* **115**: 2627-2637

Wong M, Munro S (2014) Membrane trafficking. The specificity of vesicle traffic to the Golgi is encoded in the golgin coiled-coil proteins. *Science* **346**: 1256898

Yamakawa H, Seog DH, Yoda K, Yamasaki M, Wakabayashi T (1996) Uso1 protein is a dimer with two globular heads and a long coiled-coil tail. *J Struct Biol* **116**: 356-365

Yorimitsu T, Sato K (2012) Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Molecular biology of the cell* **23**: 2930-2942

Yu X, Breitman M, Goldberg J (2012) A structure-based mechanism for Arf1-dependent recruitment of coatamer to membranes. *Cell* **148**: 530-542

Zink S, Wenzel D, Wurm CA, Schmitt HD (2009) A link between ER tethering and COP-I vesicle uncoating. *Dev Cell* **17**: 403-416