



**ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS
MECANISMOS DE SELECCIÓN
MOLECULAR QUE OPERAN EN LA
RUTA SECRETORA TEMPRANA**

JAVIER MANZANO LÓPEZ

**TESIS DOCTORAL
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
2013**

ÁNALISIS FUNCIONAL DE LOS MECANISMOS DE SELECCIÓN MOLECULAR QUE OPERAN EN 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 DOCTOR EN BIOLOGÍA POR

D. JAVIER MANZANO LÓPEZ

SEVILLA, 2013

El doctorando

El director

El tutor

Javier Manzano López

Manuel Muñiz Guinea

Sebastián Chávez de Diego



“He crecido
de esa forma que no se mide
en la talla del zapato,
sino en la forma intangible
que ensancha a la persona por dentro”

S. Ayala Soriano

AGRADECIMIENTOS

En la recta final, con el cartel de meta a la vista, respiro hondo y miro a atrás, todo lo que ha pasado, todo lo que he recorrido... más aún, miro a los lados y no estoy solo, me rodean todas las personas que me han acompañado, que se han encargado de asentar las bases, que me han guiado, que han empujado por mí cuando las fuerzas faltaron, que me han animado; todas esas personas que han sido esenciales para alcanzar este momento. A todos, GRACIAS.

Esta tesis ha sido un gran viaje, un viaje que va más allá de los cinco años, uno que comenzó mucho antes. No puedo pasar sin agradecer en un momento como éste a mis maestros y profesores, ellos han sido guía y ejemplo. En estos agradecimientos, tengo muy presente a Mari Carmen García, que me plantó mi primer cero, la primera vez que aprendí que de los errores se aprende tanto o más que de los éxitos, esta moraleja es clave en una tesis. Pero no es esa la única razón por la que estás presente en estos agradecimientos, siempre has sido un ejemplo de cómo ser riguroso, exigente y profesional es totalmente compatible con ser afectivo y cercano. Por todo el cariño y por todo lo que me has enseñado, GRACIAS. Años después, se cruzó en mi camino una filóloga, Mamen Campos, contigo descubrí cómo se disfruta estudiando y que un trabajo puede ser también una pasión, hoy para mí la investigación es eso; una vez más GRACIAS. El transcurso del tiempo me trajo a Sevilla, a la Facultad de Biología, aquí he encontrado a excelentes profesores y para mí grandes referentes, todos vosotros sois el ejemplo que intento seguir cada día. Ángel Velasco, Mari Cruz Muñoz, Pepe Casadesús y Enrique Figueroa, vuestros consejos, vuestra profesionalidad y vuestro saber hacer los tendré siempre presentes. Especialmente, tú debes estar aquí, Josefina (seguro que ahora frunces el ceño si lo estás leyendo). Para mí no hay maestro más grande que el que sin querer y sin proponérselo siempre enseña, cada minuto que he compartido contigo he tratado de exprimirlo al máximo, la pasión con la que hablas es contagiosa y cala hasta dentro, me encantaría poder llegar a ser tan grande como tú.

Esencial ha sido mi director de tesis. Manolo, no se me olvidará el día que me propusiste reunirnos. He aprendido mucho gracias a ti. Valoraré siempre que corriges sin sancionar, que consideras siempre todas las opiniones aunque sean diferentes a la tuya, que confiaste en mí y me diste la oportunidad de hacer esta tesis.

Igualmente, tengo muy presente que otra piedra angular de esta tesis ha sido mi Departamento, en el que siempre me he sentido como en casa, donde me han hecho sentir así. Me habéis enseñado mucho, probablemente, la lección más grande: no es la titulación la que importa, la clave está en hacer todo lo que está en nuestras manos. Muchas gracias Inma porque me diste acceso a la microscopía electrónica y a José Manuel por su inestimable ayuda. El departamento no sería el mismo sin ti Paula. Luis, eres un gran ejemplo de esfuerzo y tesón. María, tu ayuda ha sido fundamental en este *sprint* final, ojalá hubiéramos compartido más tiempo para seguir aprendiendo de ti. Charo, eres el vivo ejemplo de la profesionalidad, gracias por mostrármelo. Reme, todo lo que escriba va a ser poco, no sólo me has enseñado mucho, has cuidado de mí, me has hecho sentir arropado y nunca solo, mis recuerdos de la tesis no serían así sin ti. A todos vosotros, GRACIAS.

Tampoco quiero olvidarme del grupo 103, es un auténtico lujo haber contado con vuestra ayuda y consejos. Gracias a Gloria, Ralf y César, por abrir nuevos horizontes y darme la oportunidad de participar en vuestro trabajo. A las *fisiólogas* de la cuarta planta, por los ratitos de charla, por la confianza y por vuestra amistad, mil gracias.

Mis compañeros de laboratorio, si ya mil batallas cuento, mil más contaré con vosotros como protagonistas. Os llevaría conmigo a cualquier lugar, sois garantía de éxito. Junior, Laura, una de las grandes oportunidades de la tesis ha sido enseñaros, aunque la realidad es que gracias a vosotros quien ha aprendido y crecido más he sido yo. Pedro, aunque hemos compartido poco tiempo, ha cundido mucho. Laura, ¡¡mamiferinaaaa!!, aunque “reguñamos” todos los días, tú sabes que te aprecio mucho, eres más fuerte de lo que hasta tú misma crees, no te rindas nunca. Ana Mari, mi llaverito, el cielo tienes ganado, y aunque he perdido la cuenta de cuantas veces te he dicho “toda la vida tengo que durarte”, espero que tengas claro que en realidad es al revés. ¡Con el miedito que te tenía al principio y todo lo que te quiero ahora Fabi! Eres increíble, admiro mucho de tí pero sobre todo tu forma de afrontar cada día, la sonrisa con la que respondes a todo y la fuerza que irradas. ¡Qué hace esa albóndiga en la campana! ¡Mi Auxi! Me acogiste con los brazos abiertos, me enseñaste todo. Si ahora pudiera rellenar la carta de los Reyes Magos como hicimos en 2009, sería tenerte aquí conmigo. Eres la *Dama Rover* a la que elegiría hoy y siempre como *madrina*; no es decirte gracias, es gritar a los cuatro vientos que este trabajo sin ti, no sería nada.

Ahora quiero mirar un poco atrás, me he saltado el orden cronológico, mucho antes de la tesis, justo cuando aterricé en la vida universitaria, me encontré con mis compañeros, personas que ahora tengo alrededor como grandes amigos, tirando de mí hacia la meta. A *Los del Rojo* decirlos gracias es

poco. Pincogónido, la Biblia, Bofrost, los minipuntos... los cinco años de la carrera fueron un suspiro, mis mejores cinco años, y sin vosotros no lo habrían sido. Macarena, María Luisa, Jaime, Adahir y Emi, teneros al lado ha sido esencial para llegar hasta aquí.

A mis dos mosqueteras, Marta y M^a Eugenia, no sé cómo sería no teneros a mi lado. Siempre había escuchado que los grandes amigos no son los que necesitan verse cada día, sino los que a pesar del tiempo que pase, siempre que se encuentran es como toda la vida; vosotras sois la prueba de que es cierto. A vosotras os he conocido en el 208, que para muchos será sólo un número, para mí es mucho más que eso... no entiendo ni puedo imaginar cómo habría sido crecer fuera de mi *grupo scout*. En él he aprendido a compartir, a esforzarme, a convivir, a responsabilizarme, a disfrutar dando sin recibir nada a cambio. Junto a él, he conocido medio mundo, he derribado fronteras y he visto que no hay límites, sólo metas a superar con esfuerzo y tesón. A los miembros del 208, desde los más peques a los más grandes, daros las gracias por hacerme crecer tanto como persona.

Para terminar, pero no porque ellos sean el final, sino lo contrario, son el principio, a mi familia, GRACIAS. Disfruto imaginando como sería compartir un momento tan dulce como éste con mis abuelos, no os olvido. Félix, María, Yen, Toto, mi vida está llena de recuerdos preciosos, vosotros sois parte de ellos.

Papá, Mamá, cada día que pasa os admiro más, no concibo nada más difícil que educar a un hijo. Por todas las veces que me habéis dicho que no, cuando lo que os pedía el cuerpo era decir sí; por los momentos en los que, acompañado de un abrazo, me habéis dicho la verdad y no lo que quería escuchar; por vuestro apoyo incondicional, porque os siento tan dentro de mí, OS ADMIRO, OS QUIERO. Habéis sido el cimiento, sois la guía, sois mi aliento cuando no queda aire, porque sin vosotros no sería nada, porque os lo debo todo, ESTA TESIS ES PARA VOSOTROS. GRACIAS.

*“Amiga risa, hermana nostalgia
madre alegría, dulce esperanza
ahora que el viaje termina me invade la calma”*
M-Clan, La Calma.

ÍNDICES

Índice General

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN	I
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. La ruta secretora	5
1.1.1. El carácter bidireccional de la ruta secretora	6
1.2. El transporte vesicular.....	8
1.2.1. Clases de cubiertas proteicas	9
1.2.2. Formación de la vesícula de transporte	10
1.2.3. Desplazamiento, recepción y fusión de la vesícula de transporte con el compartimento aceptor específico	13
1. 3. La ruta secretora temprana	18
1.3.1. Biogénesis y translocación de las proteínas de secreción	19
1.3.1.1. Maduración de las proteínas de secreción	20
1.3.1.1.1. Anclaje a Glicosil-fosfatidilinositol.....	23
1.3.1.2. Plegamiento y ensamblaje.....	25
1.3.1.3. Control de calidad y respuesta a proteína mal plegadas	26
1.3.2. Transporte desde el Retículo Endoplásmico.....	27
1.3.2.1. Estructura y ensamblaje de la cubierta COPII	29
1.3.2.2. Captura de las moléculas carga.....	29
1.3.2.3. Regulación de las cubiertas COPII	30
1.3.2.4. Concentración en los sitios de salida del RE, ERES.	31
1.3.3. Llegada de las vesículas COPII al Aparato de Golgi	31
1.3.3.1. Anclaje de las vesículas COPII.....	32
1.3.3.2. Fusión de las membranas.....	34
1.3.4. Transporte a través del Aparato de Golgi	34
1.3.5. Transporte retrógrado desde el Golgi al Retículo Endoplásmico	37
1.3.5.1. Composición y estructura de la cubierta COPI	37
1.3.5.2. Regulación de la polimerización de la cubierta COPI	38

1.3.5.3. Reconocimiento por la cubierta COPI de la carga	40
1.3.5.4. Anclaje y fusión de las vesículas COPI al retículo endoplásmico .	41
1.4. Adaptadores de cubierta – receptores de cargo	43
1.4.1. El complejo p24.....	47
1.4.1.1. Estructura del complejo p24	48
1.4.1.2. Funciones del complejo p24	51
2. OBJETIVOS.....	57
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
3.1. Papel del complejo p24 en la exportación selectiva desde el RE de las proteínas ancladas a GPI.....	61
3.1.1. Antecedentes	62
3.1.2. Resultados	66
3.1.2.1. Ted1p y no Cdc1p es el ortólogo de PGAP5	66
3.1.2.2. La actividad de Ted1p está regulada por Bst1p y es independiente de la remodelación de los ácidos grasos del GPI	71
3.1.2.3. El complejo p24 reconoce a las proteínas ancladas a GPI como una lectina gracias a la actividad de Ted1p	74
3.1.2.4. Ted1p regula la conexión mediada por el complejo p24 entre las proteínas ancladas a GPI y la subunidad COPII especializada Lst1p	77
3.1.3. Discusión	82
3.2. Resultados - Cooperación del complejo p24 con otros receptores de carga en el ensamblaje del <i>cis</i>-Golgi.....	87
3.2.1. Antecedentes	87
3.2.2. Resultados	90
3.2.2.1. Los receptores de carga forman una plataforma en los ERES	90
3.2.2.2. La plataforma proteica formada en los ERES por los receptores de carga favorece su salida eficiente del RE	95
3.2.2.3. La interacción entre los receptores de carga es necesaria para el ensamblaje del <i>cis</i> -Golgi.....	97
3.2.3. Discusión	108
3.3. Resultados - Regulación por el complejo p24 de la activación de la GTPasa Arf1p en el Golgi	113
3.3.1. Antecedentes	113
3.3.2. Resultados	116

3.3.2.1. El complejo p24 interacciona física y funcionalmente con las proteínas Gea1/2p	116
3.3.2.2. El complejo p24 interacciona física y funcionalmente con Arf1p.	121
3.3.2.3. El complejo p24 promueve la activación de Arf1p mediada por Gea1/2p	123
3.2.2.4. La interacción entre Gea1/2p y los factores de anclaje es favorecida por el complejo p24	126
3.3.3. Discusión	127
4. CONCLUSIONES	133
5. MATERIAL Y MÉTODOS	137
5.1. Organismos y condiciones de cultivo	137
5.1.1. <i>Escherichia coli</i>	137
5.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	138
5.2. Técnicas genéticas	145
5.2.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	145
5.2.2. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	146
5.2.3. Generación de cepas de levadura	147
5.3. Técnicas de manipulación de ADN	148
5.3.1. Técnicas básicas de biología molecular: PCR, restricción enzimática de ADN, geles de agarosa, purificación de fragmentos de ADN y secuenciación.	148
5.3.2. Extracción y purificación de ADN desde <i>Escherichia coli</i>	150
5.3.3. Plásmidos.....	151
5.3.4. Oligonucleótidos.....	153
5.4. Técnicas bioquímicas	154
5.4.1. Geles de acril-amida, inmunoblots y anticuerpos.....	154
5.4.2. <i>Westernblots</i> y anticuerpos	154
5.4.3. Extractos celulares de levadura	156
5.4.4. Purificación de proteínas recombinantes de fusión con GST	157
5.4.5. Aislamiento de complejos proteicos de alto peso molecular	158
5.4.6. Análisis de interacción proteína-proteína	159
5.4.6.1. Ensayos de <i>pull-down</i>	159
5.4.6.2. Co-inmunoprecipitación	159
5.4.6.3. <i>Crosslinking</i>	160

5.5. Subfraccionamiento celular	161
5.6. Ensayos de transporte de proteínas in vivo – pulso y caza	162
5.7. Técnicas de Microscopía	163
5.7.1. Microscopía de fluorescencia.....	163
5.7.2. Microscopía electrónica	164
6. BIBLIOGRAFÍA	166

Índice de Figuras

Figura 1. Carácter bidireccional del transporte vesicular entre los diferentes orgánulos exocíticos y endocíticos.....	7
Figura 2. Ciclo de vida de una vesícula de transporte.....	8
Figura 3. Clases de cubiertas proteicas.....	10
Figura 4. Esquema general de la formación de una vesícula.....	11
Figura 5. Fases del anclaje y la fusión de la vesícula al orgánulo aceptor.....	16
Figura 6. Transporte bidireccional entre el RE y el Golgi mediado por las cubiertas COPII y COPI	18
Figura 7. Translocación al lumen del RE de las proteínas de secreción...	20
Figura 8. Plegamiento y maduración de las proteínas de secreción.....	21
Figura 9. Estructura del GPI y su remodelación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
Figura 10. Ruta de activación de la UPR mediada por IRE1.....	27
Figura 11. Formación de la vesícula COPII.....	28
Figura 12. Anclaje de las vesículas COPII al aparato de Golgi.....	33
Figura 13. Principales modelos de maduración del Aparato de Golgi.....	35
Figura 14. Ensamblaje comparado de las cubiertas COPII y COPI.....	39
Figura 15. Anclaje comparado de las vesículas COPII y COPI.....	42
Figura 16. Modelo de actuación de un receptor de transporte en el RE...	43
Figura 17. Receptores de carga mejor caracterizados en la ruta secretora temprana.....	44
Figura 18. La organización estructural de las proteínas de la familia p24 depende de la oligomerización de sus subunidades.....	49

Figura 19. Separación y concentración en ERES específicos de las proteínas ancladas a GPI tras su remodelación lipídica.....	63
Figura 20. Remodelación del GPI tras el anclaje y transporte de las proteínas ancladas a GPI.....	65
Figura 21. Cdc1p no es el ortólogo en levaduras de PGAP5.....	67
Figura 22. Ted1p es el ortólogo en <i>S. cerevisiae</i> de la GPI-remodelasa PGAP5 de mamíferos.....	69
Figura 23. Ted1p une a las proteínas ancladas a GPI a través de la EtNP presente en la segunda manosa del GPI.....	71
Figura 24. Ted1p es regulado por la GPI-deacilasa Bst1p pero es independiente de la remodelación del ácido graso.....	73
Figura 25. Ted1p no afecta a la concentración en los ERES de las proteínas ancladas a GPI.....	74
Figura 26. El complejo p24 reconoce a las proteínas ancladas a GPI que han terminado de remodelar el glicano del GPI.....	75
Figura 27. La interacción entre la subunidad COPII Lst1p y el complejo p24 es necesaria para el transporte de las proteínas ancladas a GPI (Castillon <i>et al</i> , 2011).....	78
Figura 28. Ted1p regula la función de receptor de carga del complejo p24 que conecta a las proteínas ancladas a GPI con la subunidad de COPII Lst1p.....	79
Figura 29. Modelo de actuación del complejo p24 en la exportación de las proteínas ancladas a GPI.....	82
Figura 30. Estudio proteómico de Emp24p-TAP.....	91
Figura 31. Los receptores de carga interactúan físicamente.....	92
Figura 32. Los receptores de carga forman una plataforma en el RE.....	93
Figura 33. La interacción física entre los receptores de carga depende de Sec16p.....	94

Figura 34. Los receptores de carga favorecen mutuamente su exportación del RE.....	95
Figura 35. La ausencia combinada de dos receptores de carga afecta al transporte de otras proteínas de secreción diferentes a sus cargas específicas.....	96
Figura 36. Los receptores de carga interaccionan funcionalmente entre sí.....	98
Figura 37. El RE y el <i>cis</i> -Golgi aparecen afectados en el doble mutante <i>emp24Δ erv14Δ</i>	99
Figura 38. El RE y el <i>cis</i> -Golgi aparecen afectados en el doble mutante <i>emp24Δ erv14Δ</i>	100
Figura 39. Mutaciones en los factores de anclaje genera defectos similares a la ausencia combinada de varios receptores de carga.....	102
Figura 40. El análisis ultraestructural de <i>emp24Δ erv14Δ</i> permite observar vesículas y un engrosamiento del RE.....	103
Figura 41. Los receptores de carga son necesarios en su conjunto para la localización de los factores de anclaje de las vesículas COPII al <i>cis</i> -Golgi.....	105
Figura 42. Los receptores de carga son necesarios para la estabilización en RE de los factores de anclaje y las cubiertas COPII.....	106
Figura 43. La interacción génica entre los receptores parece estar debida a la deficiencia de unión de las proteínas COPII.....	107
Figura 44. Modelo de la interacción entre la cubierta COPI con las Arf GEFs antes de la activación de Arf1 (Deng <i>et al</i> , 2009).....	115
Figura 45. La mutación <i>emp24Δ</i> incrementa la sensibilidad a BFA.....	116
Figura 46. Gea1/2p interaccionan funcionalmente con el complejo p24....	117
Figura 47. En ausencia del complejo p24 se incrementan los defectos morfológicos del Golgi generados por la mutación <i>gea1-6</i>	118
Figura 48. El complejo p24 coopera con Gea1p en el transporte <i>intra</i> -Golgi.....	119

Figura 49. El complejo p24 interacciona físicamente con la ArfGEF Gea1p.....	120
Figura 50. La mutación <i>emp24Δ</i> no puede ser revertida por la sobreexpresión de otras proteínas con señales di-lisina.....	121
Figura 51. Arf1p y el complejo p24 interacciona física y funcionalmente...	122
Figura 52. El complejo p24 no puede ser sustituido por la sobreexpresión de otras proteínas que unen activamente cubiertas COPI.....	123
Figura 53. El reconocimiento entre las proteínas de cubierta COPI y la Arf GEF Gea1p está regulado por el complejo p24.....	124
Figura 54. El complejo p24 facilita el reconocimiento entre Arf1p y Gea1p, mientras que no parece intervenir en el reconocimiento con Sec7p.....	125
Figura 55. El complejo p24 interacciona genéticamente con los complejos TRAPPII y COG.....	126
Figura 56. La interacción entre Gea1p y los factores de anclaje se reduce en ausencia del complejo p24.....	127
Figura 57. El complejo p24 participa en la activación de Arf1 y coopera en la estabilización de las cubiertas a la membrana del Golgi.....	128
Figura 58. La disminución progresiva de COPI asociadas a las membranas del Golgi permite que Arf1 forme los diferentes tipos de vesículas.....	129

Índice de Tablas

Tabla I. Principales componentes de la maquinaria de transporte vesicular implicados en la formación de vesículas de la ruta secretora temprana en humanos y en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	13
Tabla II. Principales factores de anclaje que actúan en el transporte entre el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi conservados en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y en humanos.....	14
Tabla III. Receptores de carga que actúan en la interfase RE-Golgi y sus ligandos.....	45
Tabla IV. Proteínas p24 diferentes organismos modelo.....	48
Tabla V. Secuencias de las regiones citosólicas de cuatro miembros de la familia p24 en ratón y en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	50
Tabla VI. Proteínas que co-precipitan junto a Emp24p-TAP.....	91
Tabla VII. Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> empleadas en este trabajo.....	138
Tabla VIII. Plásmidos usados en este trabajo.....	151
Tabla IX. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	153
Tabla X. Anticuerpos usados en este trabajo.....	155

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosín difosfato
ALP	Dominio sensor de curvatura de la membrana (<i>amphipathic lipid-packing sensor</i>)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
COG	Complejo COG (<i>conserved Oligomeric Golgi</i>)
COPI	Cubiertas COPI (<i>coat protein complex I</i>)
COPII	Cubiertas COPII (<i>coat protein complex II</i>)
CPY	Carboxipeptidasa Y
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO₆₀₀	Densidad óptica medida a 600nm
ERES	Sitios de salida del RE (<i>ER exit sites</i>)
ERGIC	Compartimento intermedio (<i>ER-to-Golgi intermediate compartment</i>)
GAP	Proteína aceleradora de la actividad GTPasa
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	Proteína fluorescente verde
GOLD	Dominio proteico GOLD (<i>Golgi dynamics</i>)
Golgi	Aparato de Golgi
GPI	Glicosil-fosfaditilinositol
GTP	Guanosín trifosfato
HA	Hemaglutinina
HEPES	4-(2-hidroxietil)1-piperazina-etanosulfónico
mRFP	Proteína fluorescente roja monomérica
NSF	<i>N-Ethylmaleimide-sensitive Factor</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RE	Retículo endoplásmico
SNAP	<i>Soluble NSF Attachment Protein</i>
SNARE	<i>Soluble NSF Attachment Protein REceptors</i>
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i>
TAP	Epítipo TAP (<i>Tandem affinity purification</i>)
TMED	<i>Transmembrane emp24 protein transport domain containing</i>
TRAPPI	<i>Transport Protein Particle I</i>

TRAPPII	<i>Transport Protein Particle II</i>
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded Protein Response</i>)
Ura	Uracilo
WB	<i>Western Blot</i>
Wt	Silvestre (<i>wild type</i>)

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 la 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. Así, alteraciones en el funcionamiento correcto de la maquinaria del transporte vesicular acarrearán importantes problemas para la fisiología celular dando lugar a numerosas enfermedades humanas. Por tanto, comprender los mecanismos moleculares que rigen al transporte de vesículas supone un importante reto para la Biología Celular y la Biomedicina.

El tráfico vesicular está mediado por una serie de complejos proteicos citosólicos de cubierta, los cuales se encargan de generar las vesículas de transporte deformando mecánicamente 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 interactuando con los factores de acoplamiento. Dos tipos de cubierta operan al comienzo de la ruta secretora: COPII media la exportación de proteínas de secreción del retículo endoplásmico (RE), mientras que COPI está implicada en el transporte retrógrado desde el aparato de Golgi al RE y entre las cisternas del Golgi. Aunque en los últimos años se ha progresado bastante en el conocimiento de la arquitectura molecular de los complejos COPII y COPI, todavía no han sido determinados los mecanismos que coordinan espacio-temporalmente la actividad de estas cubiertas y que son, en gran medida, los responsables de mantener la integridad estructural y la homeostasis funcional de los orgánulos secretores.

En esta tesis se ha pretendido profundizar a nivel molecular la comprensión del tráfico vesicular en la ruta secretora temprana, analizando el modo de acción de unas proteínas transmembrana conocidas como proteínas p24, las cuales han sido implicadas en el flujo bidireccional de vesículas que conecta al RE con el Golgi. La familia p24 está conservada evolutivamente y son proteínas extremadamente abundantes, constituyendo casi el 30% de las

proteínas presentes en el Golgi. Sus miembros disponen de un tallo citosólico que muestra una gran afinidad para interactuar con las proteínas de cubierta COPII y COPI. Forman un complejo heteromérico que cicla constantemente entre el RE y el Golgi. Utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo, este grupo de investigación ha demostrado previamente que el complejo p24 participa activamente en la formación de vesículas COPI de transporte retrógrado y que es específicamente requerido como receptor de carga para la exportación selectiva del RE conectando proteínas de secreción luminales, como las proteínas ancladas a GPI, con la cubierta citosólica COPII. Además, el análisis de los estudios proteómicos realizados por nuestro grupo y genéticos a gran escala publicados han sugerido que las proteínas p24 también estarían involucradas conjuntamente con otros receptores de carga del RE, en el ensamblaje tanto de los sitios de salida del RE, como en la cara *cis* del Aparato de Golgi.

Objetivos

De este modo, el propósito general de esta tesis ha sido es descifrar los mecanismos moleculares por los que el complejo p24 regula el tráfico vesicular que tiene lugar en la ruta secretora temprana, utilizando la levadura *S. cerevisiae* como organismo modelo. Específicamente se ha pretendido:

- Analizar la regulación de la función del complejo p24 como receptor de carga de las proteínas ancladas a GPI.
- Caracterizar la función cooperativa del complejo p24 y otros receptores de carga del RE en la ruta secretora temprana.
- Describir molecularmente el papel del complejo p24 en la formación de las vesículas COPI.

Resultados

1. Papel del complejo p24 en la exportación de las proteínas ancladas a GPI.

Se estima que un 15% de las proteínas de secreción pueden ser ancladas al glicolípido glicosil-fosfatidilinositol (GPI) para ser exportadas desde el RE y

alcanzar la superficie celular. Estas proteínas son completamente luminales y requieren del complejo p24 como receptor de carga o adaptador de cubierta, para ser conectadas con las proteínas COPII y así ser eficientemente transportadas hasta el Golgi. No obstante, la salida de las proteínas ancladas a GPI depende también de un proceso de maduración, conocido como remodelación del GPI. La remodelación del GPI a su vez comprende tres etapas diferentes. Inicialmente se describieron las etapas de deacilación del inositol del fosfatidilinositol, y la de sustitución de los ácidos grasos saturados y baja longitud de carbonos (C:18), por otros insaturados y de mayor longitud de tipo diacilglicerol o ceramida (C:26). Estas dos etapas de remodelación son las responsables de la concentración en los sitios de salida del RE de las proteínas ancladas a GPI. Más recientemente se ha descrito una tercera etapa de remodelación en células de mamífero, ésta consiste en la eliminación de la etanolamina-fosfato presente en la segunda manosa del esqueleto de glicano del GPI (EtNP-2), ésta es desarrollada por la fosfoesterasa PGAP5. A pesar de que esta tercera etapa es necesaria para la exportación de las proteínas ancladas a GPI y para el reconocimiento de las proteínas ancladas a GPI por el complejo p24, actualmente no se conoce cómo la remodelación del glicano se integra dentro del proceso de maduración y exportación de estas proteínas. Tras la remodelación del GPI, las proteínas ancladas a GPI pueden concentrarse en los sitios de salida del RE, pero presentan un requerimiento adicional más, ya que se necesita la participación de una isoforma específica de la subunidad de unión a la carga de la cubierta COPII. Curiosamente, esta isoforma conocida como Lst1p en levaduras y SEC24C/D en mamíferos, presenta la capacidad de unir al complejo p24, al menos en levaduras.

En esta tesis se ha demostrado que la etapa de remodelación del GPI desarrollada por PGAP5 en mamíferos también se produce en levaduras, concretamente, gracias a la proteína Ted1p. Además, se ha puesto de manifiesto que la actividad de Ted1p está regulada por la deacilación del GPI desarrollada por la enzima Bst1p/PGAP1, pero es independiente de la etapa de remodelación de los ácidos grasos. Igual a mamíferos, en levaduras la remodelación del glicano del GPI es necesaria para el reconocimiento y unión de las proteínas ancladas a GPI por el complejo p24. En este trabajo se demuestra que es la simple presencia de la EtNP-2 en la estructura del GPI, la responsable de bloquear dicha unión. Empleando GPIs sintéticos carentes de EtNP-2 se ha mostrado, por primera vez, que el complejo p24 ejerce su función de receptor de carga comportándose como una lectina que reconoce al GPI maduro.

Del mismo modo, se aportan las primeras evidencias directas de la conexión entre las proteínas ancladas a GPI con las cubiertas COPII específicas que contienen Lst1p. En ensayos de *crosslinking* se muestra cómo las proteínas ancladas a GPI pueden ser unidas a Lst1p y no a la isoforma general Sec24p, estando esta interacción mediada por el complejo p24. Además, se demuestra que la remodelación del glicano ejercida por Ted1p regula la conexión entre las proteínas ancladas a GPI y la cubierta COPII. Es más, la capacidad de unir a la isoforma Lst1p del complejo p24 también es regulada por este proceso de maduración de sus proteínas carga.

Estos datos en conjunto permiten proponer un modelo donde la remodelación del GPI la capacidad del complejo p24 para exportar a las proteínas ancladas a GPI. En primer lugar, la deacilasa Bst1p retiene a los GPI hasta que las proteínas se anclan a ellos. Tras el anclaje, el GPI es deacilado y se inician en paralelo los procesos de remodelación de los ácidos grasos que promueven la concentración de las proteínas en los sitios de salida del RE; y la eliminación de la EtNP-2 que permite el reclutamiento del complejo p24 a los sitios de salida del RE donde se han concentrado las proteínas ancladas a GPI. Una vez unidos a las proteínas ancladas a GPI, y no antes, el complejo p24 recluta a la cubierta COPII específica que contiene las subunidades Lst1p, promoviendo así la exportación eficiente de las proteínas ancladas a GPI.

2. Cooperación entre los receptores de carga en el ensamblaje 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. Los 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 este trabajo se ha querido estudiar esta función colectiva.

En primer lugar, se aportan evidencias de que el complejo p24 se asocia físicamente con otros receptores de carga del RE constituyendo una plataforma que promueve el transporte eficiente de todos los receptores en su conjunto y

consecuentemente de sus cargas. A continuación se muestra como los receptores en su conjunto son necesarios para la homeostasis de los orgánulos tempranos de la ruta secretora, ya que su ausencia combinada promueve la desorganización del *cis*-Golgi y la hipertrofia del RE. Este fenotipo es característico de los mutantes en los factores de anclaje de las vesículas COPII en el *cis*-Golgi. Es más, estos factores de anclaje pierden su localización en ausencia de dos o más receptores de carga, mientras que los factores de anclaje de vesículas COPI no ven afectada su localización. Esta deslocalización podría deberse a fallos en el reclutamiento de los factores de anclaje a las vesículas COPII nacientes, ya que se observa una mayor presencia de estos en el citosol tanto por microscopía como por subfraccionamiento. Como estos factores de anclaje necesitan a la cubierta COPII para asociarse a las membranas, el origen de su menor reclutamiento sería la menor estabilización de la propia cubierta a estas membranas, originada por el déficit de señales de unión propiciado por la ausencia de la plataforma de receptores.

Por tanto, los datos presentados sugieren que además de ejercer su función individual exportando del RE sus cargas específicas, los receptores de carga podrían cooperar activamente en el mantenimiento de la estructura funcional de la ruta secretora temprana mediante la creación de una supraestructura que establezca la cubierta COPII en la membrana de las vesículas promoviendo la incorporación de los factores de anclaje.

3. Regulación por el complejo p24 de la activación de la GTPasa Arf1p en el Golgi.

El transporte vesicular retrógrado que tiene lugar al comienzo de la ruta secretora, desde las cisternas tardías del aparato de Golgi hasta las cisternas tempranas y desde éstas hasta el RE, depende de las proteínas de cubierta COPI. La formación de las vesículas comienza gracias a la actividad de la GTPasa Arf1p, que tras intercambiar GDP por GTP, gracias a las GEFs Gea1/2p; recluta a las proteínas de cubierta promoviendo su polimerización. No obstante, es necesaria la presencia de proteínas transmembrana que estabilicen a las cubiertas permitiendo su polimerización. En este sentido, el complejo p24 tiene un papel clave, siendo necesario para la formación de las vesículas.

La regulación precisa del proceso de formación de las vesículas COPI no está bien descrita. Los estudios más recientes ponen de manifiesto que las Arf GEFs interactúan con la cubierta antes de promover la activación de Arf1. Cómo se produce la interacción entre las GEFs y las cubiertas, está aun sin describir. En este estudio se muestra como el complejo p24 es capaz de estabilizar la cubierta COPI en la membrana del Golgi, de interactuar físicamente con Gea1p a través de dicha cubierta y además de favorecer el reconocimiento de Arf1p por parte de Gea1/2p. Estas evidencias indican que el complejo p24 promueve la activación de Arf1p por Gea1/2p estabilizando la cubierta COPI en la membrana del Golgi.

Además, se ha propuesto que las Arf GEFs son también necesarias para el reclutamiento a las membranas de los factores de anclaje de las vesículas COPI. En este trabajo se muestran evidencias de que el complejo p24, no sólo favorece el reclutamiento de Gea1p para su interacción con las cubiertas COPI y promueve la activación de Arf1p, sino que también facilita la interacción entre esta GEF y los complejos de anclaje COG.

Por tanto, los datos obtenidos sugieren que las proteínas carga transmembrana, especialmente el complejo p24, son elementos reguladores y localizadores de los eventos de transporte mediado por la cubierta COPI en el transporte retrógrado entre las cisternas del Golgi y entre éste el RE.

Conclusiones

El complejo p24 participa activamente en los procesos de transporte mediados por las cubiertas COPII y COPI, gracias a su capacidad de unir a ambos tipos de cubierta y de asociarse con otros receptores de carga. Así:

- El complejo p24 se comporta como una lectina al reconocer a las proteínas ancladas a GPI tras su remodelación. Posteriormente promueve la exportación de éstas gracias al reclutamiento de la subunidad específica de la cubierta COPII, Lst1p. La unión con las cubiertas se produce mayoritariamente sólo tras la interacción con las propias moléculas carga.
- En el transporte RE-Golgi, los receptores de carga cooperan entre ellos para promover el transporte eficiente de sus cargas y más importante

aún, para estabilizar a la cubierta COPII a las membranas favoreciendo así el anclaje de las vesículas procedentes del RE al Golgi.

- Finalmente, el complejo p24 en el Golgi recluta a las membranas de este orgánulo a las cubiertas COPI, lo que promueve y localiza los eventos de formación de las vesículas de transporte retrógrado. La estabilización de las cubiertas permite el reclutamiento de las Arf GEFs, que una vez en las membranas promueven la activación de Arf1p, desencadenando la formación de las vesículas.

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Las células eucariotas se caracterizan por presentar un intrincado sistema de endomembranas lipídicas que delimitan los compartimentos conocidos como orgánulos. Dichos orgánulos poseen una dotación propia y característica de moléculas que les permite desarrollar sus diferentes funciones con la máxima eficiencia. No obstante, es esencial que estos compartimentos estén conectados entre sí para poder integrar y coordinar sus diferentes actividades, garantizando así el correcto funcionamiento de la célula. Esta comunicación se basa, fundamentalmente, en la transferencia continua de moléculas desde un compartimento a otro. Esto implica que los orgánulos sean estructuras altamente dinámicas que requieren de mecanismos de retención y reciclaje de sus componentes propios para mantener su identidad molecular.

Las diferentes rutas de transferencia de moléculas entre orgánulos constituyen el tráfico intracelular, dentro del cual destaca el transporte vesicular, objeto del presente estudio. Este tipo de transporte está mediado por la formación de estructuras membranosas vesiculares o túbulo-vesiculares de carácter transitorio, que concentran y transfieren de manera selectiva, a una serie de moléculas denominadas “carga” desde un compartimento donador hasta otro aceptor (Bonifacino & Glick, 2004).

El transporte vesicular define dos grandes rutas de tráfico intracelular cuyas actividades funcionales son esenciales para la fisiología celular: la vía endocítica y la vía exocítica o secretora. Ambas rutas son complementarias, ya que median la internalización y la secreción de moléculas respectivamente. El transporte vesicular no sólo mantiene la identidad estructural y funcional de los orgánulos membranosos de cada ruta, sino que también garantiza su actuación conjunta. Con ello, posibilita el mantenimiento de la homeostasis celular y asegura 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).

El tráfico intracelular no sólo es esencial para la célula sino también para la fisiología del propio organismo. De hecho, mutaciones en los componentes de la maquinaria que lleva a cabo el transporte vesicular dan lugar a numerosas enfermedades humanas (Aridor & Hannan, 2000) (Aridor & Hannan, 2002). Esto implica que la comprensión de los mecanismos moleculares que sustentan el transporte vesicular es un tema central en el campo de la Biología

1. Introducción

Celular. De este modo, uno de los desafíos actuales es identificar las moléculas clave que rigen los numerosos eventos de transporte vesicular, y entender como éstas se regulan e integran sus actividades para generar y mantener la arquitectura funcional del sistema de endomembranas de la célula.

1.1. La ruta secretora

La ruta secretora o exocítica es en sentido estricto la vía biosintética que parte del retículo endoplásmico (RE) y, a través del aparato de Golgi (Golgi), alcanza la membrana plasmática. Como su nombre indica, es el itinerario seguido mayoritariamente por las proteínas de secreción. Sin embargo, se estima que un tercio del proteoma de las células eucariotas es incorporado a la ruta secretora (Ghaemmaghami *et al*, 2003). Esto se debe a que además de transportarse las proteínas de secreción, la mayor parte de las proteínas y lípidos integrantes de los diferentes orgánulos utilizan la ruta secretora para alcanzar sus diferentes destinos funcionales (Lee *et al*, 2004).

Las proteínas que se incorporan a la ruta secretora son sintetizadas por los ribosomas asociados al RE, y su translocación tiene lugar simultáneamente a su síntesis. Una vez terminado este proceso, ya en el lumen de este orgánulo, tiene lugar el plegamiento de la proteína y el establecimiento de las diferentes asociaciones oligoméricas que cada proteína requiera (Johnson & van Waes, 1999). 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. Durante estas reacciones las moléculas son continuamente supervisadas y evaluadas por un sistema de control de calidad a cargo de chaperonas y enzimas de glicosilación, que determinan el momento en que aquellas que alcanzan un estado conformacional apropiado parten del retículo y comienzan su secreción (Ellgaard & Helenius, 2003). Superado el control de calidad, las proteínas se concentran en los sitios de salida del RE denominados ERES (ER Exit Sites), son incorporadas en vesículas de transporte y exportadas hacia el Golgi (Tang *et al*, 2005).

En las células de eucariotas superiores, las vesículas procedentes del RE, fusionan con el denominado compartimento intermedio o ERGIC (ER-to-Golgi Intermediate Compartmento) también llamado compartimento tubulo-vesicular (VTC). Este orgánulo de naturaleza altamente dinámica, constituye una estación de intercambio entre la maquinaria de transporte vesicular del RE y la del aparato de Golgi. Tras su paso por el mismo, las moléculas incorporadas a la ruta secretora progresan hacia el Golgi incorporándose de nuevo en estructuras túbulo-vesiculares (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006).

En el aparato de Golgi, las proteínas recorren las sucesivas cisternas *cis*, *medial* 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 las proteínas son seleccionadas y enviadas en intermediarios de transporte vesiculares hacia su lugar final de residencia, bien sea el espacio extracelular, membrana plasmática, endosomas, vacuola, peroxisomas o los gránulos de secreción (Emr *et al*, 2009; Glick & Nakano, 2009).

1.1.1. El carácter bidireccional de la ruta secretora

La ruta secretora es, por tanto, un sistema altamente compartimentalizado de orgánulos membranosos con funciones especializadas, que actúan de forma secuencial para realizar en distintas etapas la síntesis, maduración y transporte. Sin embargo, el intenso flujo exocítico al que se ven sometidos estos orgánulos dificulta enormemente el mantenimiento de su propia composición molecular, la cual es, obviamente, de vital importancia para el correcto funcionamiento no sólo de la ruta secretora sino de la propia célula.

Para preservar la identidad molecular de los orgánulos existen diferentes mecanismos que retienen a las moléculas en sus orgánulos 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 suficientemente eficaces por lo que las 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 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 (Figura 1) (Lee *et al*, 2004).

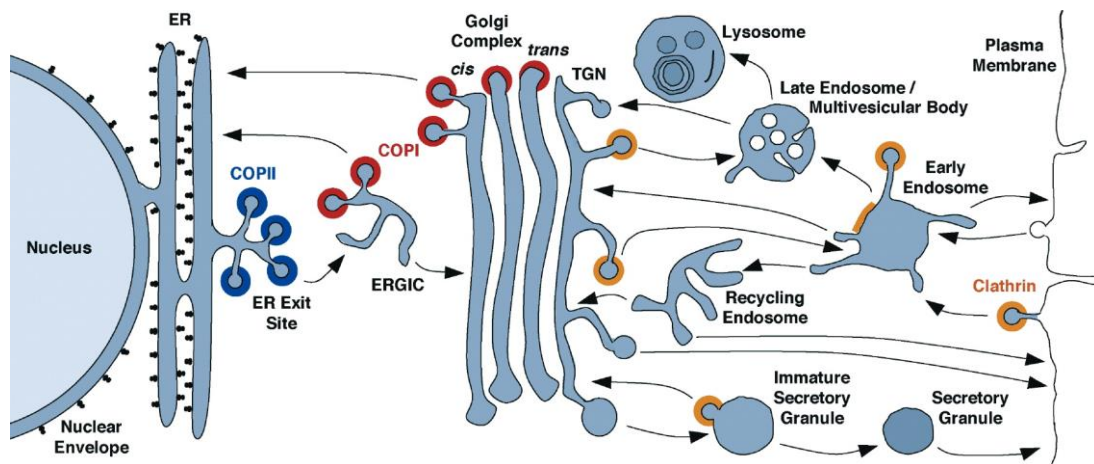


Figura 1. Carácter bidireccional del transporte vesicular entre los diferentes orgánulos exocíticos y endocíticos.

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. Las vesículas de clatrina son las responsables del transporte *post*-Golgi (amarillo) (Bonifacino & Glick, 2004).

1.2. El transporte vesicular

El transporte mediado por vesículas lipídicas entre los diferentes orgánulos que conforman la ruta secretora es un proceso extraordinariamente complejo debido a su alto dinamismo y a la gran cantidad, así como variedad, de sustratos a transportar. Actualmente se han descrito las diferentes etapas del transporte vesicular y los elementos esenciales para las mismas, quedando por esclarecer en gran medida la regulación detallada de éstas.

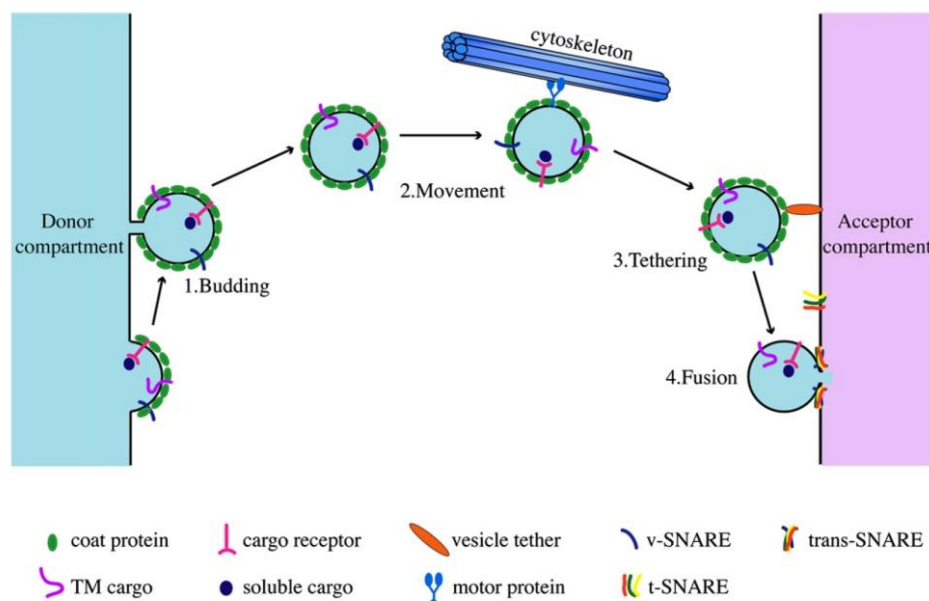


Figura 2. Ciclo de vida de una vesícula de transporte.

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 gracias a los factores de anclaje que reconocen a la cubierta presente en la vesícula. Esta estabilización en la membrana de la vesícula permite la activación y acción de las SNAREs que promueven la fusión al orgánulo aceptor (Cai *et al*, 2007).

Los elementos celulares 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).

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 a las membranas desencadenando la formación de las vesículas de transporte. Las proteínas de cubierta son específicas de cada paso de transporte, dando identidad a las vesículas (Figura 3).

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, consecutivamente, deformar la membrana para promover la evaginación de la vesícula naciente (*budding*). Tras la escisión, en lugar de disociarse de la membrana de la vesícula naciente, se mantienen unidas y permiten la interacción, primero, con los factores de transporte para alcanzar el orgánulo aceptor, y finalmente dirigen el anclaje (*tethering*) de la vesícula a la membrana del compartimento aceptor adecuado de forma específica (Cai *et al*, 2007; Lord *et al*, 2011).

1.2.1. Clases de cubiertas proteicas

Las bases mecánicas del transporte vesicular están conservadas en todos los pasos de transporte, siendo las diferentes proteínas que actúan en estos, las que generan las diferencias y dotan de especificidad a los mismos. De este modo, existen tres grupos de proteínas de cubierta que funcionan en cada etapa de la ruta secretora (Figura 3):

- Las **clatrin**as y diferentes combinaciones de sus adaptadores actúan en el transporte anterógrado en las etapas comprendidas entre el *trans*-Golgi o TGN, los endosomas, lisosomas/vacuolas y la membrana plasmática; así como en la endocitosis.

- El complejo **COPI** funciona en el transporte retrógrado entre el Golgi y el retículo endoplásmico, así como en el transporte *intra*-Golgi. Véase Tabla I.

- La cubierta **COPII** media el envío anterógrado de las proteínas carga desde el RE hasta el Golgi. Véase Tabla I.

A su vez, cada tipo de cubierta define al resto de componentes de la maquinaria de transporte asociada a cada paso de transporte concreto, siendo por tanto estas proteínas la fuente de especificidad del transporte.

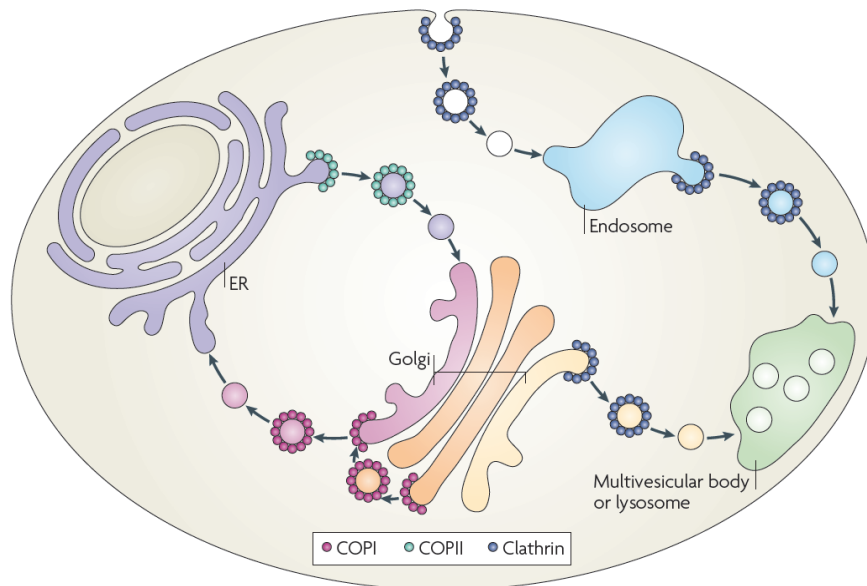


Figura 3. Clases de cubiertas proteicas.

Se han definido tres familias de cubiertas protéicas: COPII en el transporte RE-Golgi, COPI en el transporte *intra*-Golgi y Golgi-RE; y clatrin para el transporte post-Golgi (Hsu *et al*, 2009).

1.2.2. Formación de la vesícula de transporte

La formación o biogénesis de las vesículas de transporte comprende a su vez dos procesos secuenciales: la evaginación de la vesícula mediante la deformación de la membrana del compartimento donador y la subsecuente escisión o liberación de la 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. En paralelo, las proteínas de cubierta interaccionan con las moléculas carga que se debe incorporar 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 con 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. Por otro lado, la capa externa es la responsable de esculpir la membrana y dar forma y solidez a la vesícula naciente. 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).

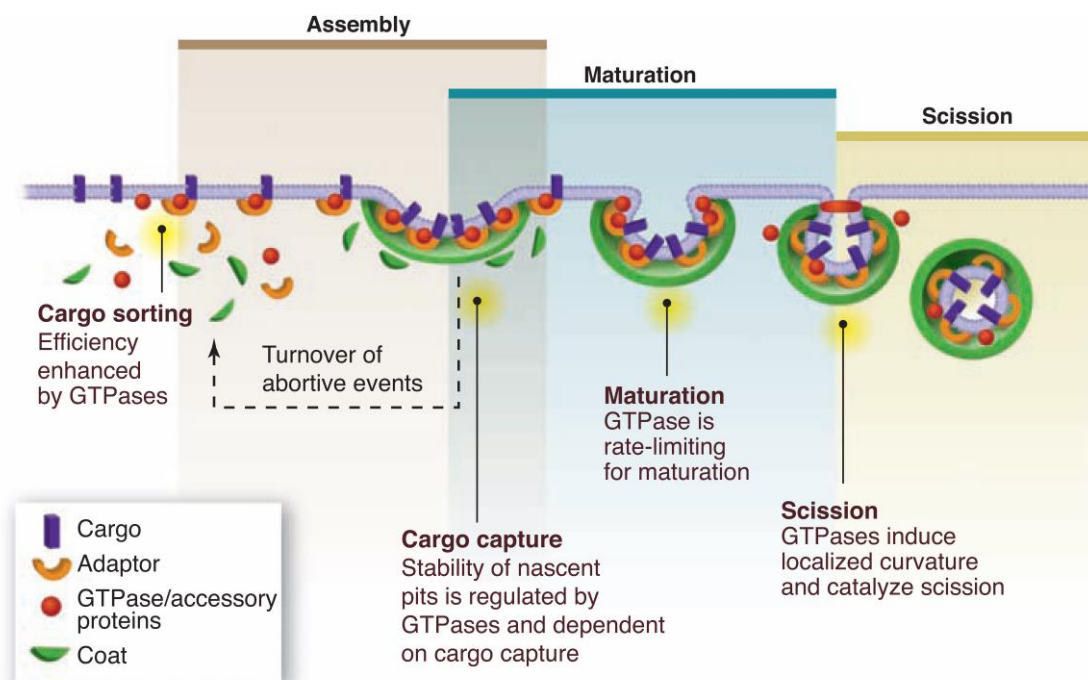


Figura 4. Esquema general de la formación de una vesícula.

Este proceso se activa 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. Finalmente la escisión tiene lugar gracias a la actividad de las GTPasas y las dinaminas (Pucadyil & Schmid, 2009).

El modelo más aceptado actualmente que explica el proceso de evaginación de las vesículas de transporte 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) (Figura 4). La GTPasa en su estado activo de unión a GTP 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. Ello conlleva que la GTPasa se desprenda de la membrana y pase de nuevo al citosol. En cambio, las proteínas de cubierta y la proteína GAP 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). En la Tabla I se enumeran los elementos necesarios para la formación de las vesículas de transporte entre el RE y el aparato de Golgi.

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 (Lee *et al*, 2004). Este modelo implica que sólo se forman vesículas de transporte cuando hay suficiente carga para transportar. Del mismo modo, que la cubierta proteica no se libera tras la formación de la vesícula, como clásicamente se había considerado, ya que ésta quedaría unida a la membrana debido a su interacción con las moléculas carga, lo cual es necesario, debido al papel de las cubiertas en las siguientes etapas del transporte vesicular (Cai *et al*, 2007; Lord *et al*, 2011).

Tras la curvatura de la membrana y la generación de la gema como resultado del ensamblaje 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 para ello. 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 (Stamnes, 2002).

Tabla I. Principales componentes de la maquinaria de transporte vesicular implicados en la formación de vesículas de la ruta secretora temprana en humanos y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Bethune *et al*, 2006; Langer *et al*, 2007).

Tipo de vesícula	COPI		COPII	
	Humano	Levadura	Humano	Levadura
GTPasa	ARF1	Arf1p/Arf2p	hSar1p	Sar1p
GEF	GBF1 BIG1/BIG2	Gea1p/Gea2p Sec7p	hSec12p	Sec12p
GAP	ARFGAP1 ARFGAP2/3	Gcs1p Glo3p	hSec23	Sec23p
Complejos de cubierta	Coatómero:	Coatómero:	Capa interna	Capa interna
	α -COP	Ret1p	hSec23	Sec23p
	β -COP	Sec26p	hSec24	Sec24p
	β' -COP	Sec27p		
	γ -COP	Sec21p	Capa externa	Capa externa
	δ -COP	Ret2p	hSec13	Sec13p
	ε -COP	Sec28p	hSec31	Sec31p
	ζ -COP	Ret3p		

1.2.3. Desplazamiento, recepción y fusión de la vesícula de transporte con el compartimento aceptor específico

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 (Hehnlly & Stamnes, 2007; Stamnes, 2002).

Una vez alcanzado el compartimento aceptor, las vesículas experimentan un proceso gradual de reconocimiento y anclaje (*tethering*), necesario para la consecutiva 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 y una GTPasa pequeña de la familia Rab, específica de cada etapa de transporte. Por su similitud funcional y estructural, los factores de anclaje se pueden clasificar en tres grandes grupos (Sztul & Lupashin, 2009). En 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, como los complejos TRAPPI y II (*Transport Protein Particle*). Finalmente, el tercer grupo está compuesto por proteínas de estructura *coiled-coil*, conocidas tradicionalmente como golginas, siendo una de las más conocidas la proteína p115. En la Tabla II se muestran los factores de anclaje, que actúan en la interfase RE-Golgi, descritos y conservados evolutivamente de levadura a humanos.

Tabla II. Principales factores de anclaje que actúan en el transporte entre el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi conservados en *Saccharomyces cerevisiae* y en humanos (Sztul & Lupashin, 2009).

Factor	Componentes		Interacciones
	Humano	Levadura	
CASP	CASP	Coy1p	Unión a la cubierta COPII a través de Sec23.
GM130	GM130	Bug1p	Interacción con Rab1, Rab2, Rab33, p115, COG, GRASP65 y Syntaxina-5.
GRASP65	GRASP65	Grh1p	Unión a la cubierta COPII, e interacción con GM130 y el complejo p24.
GMA120	GMA120	Rud3p	Interacción con Arf1, GM130, GRASP65 y p115.

Tabla II. Continuación.

Complejo	Componentes		Interacciones
	Humano	Levadura	
p115	p115	Uso1p	Interacción con Rab1p/Ypt1p, Sintaxina-5, GM130, COG, GBF1 y β -COP.
COG	LdIB LdIC hSec34 hCod1 GTC-90 hCod2 hCod5 hDor1	Cog1p Cog2p Cog3p Cog4p Cog5p Cog6p Cog7p Cog8p	Unión a la cubierta COPI a través de las subunidades β -COP y γ -COP. Interacción con las Rab1/6/30 y 41 (Ypt1p y Ypt6p). Interacción con p115 y diversas SNAREs como Gos1, Sed5 y Sintaxina-5.
TRAPPI	TRAPPC3 TRAPPC1 TRAPPC2 TRAPPC4 TRAPPC5 TRAPPC6	Bet3p Bet5p Trs20p Trs30p Trs31p Trs33p	Unión a la cubierta COPII a través de la subunidad Sec23. GEF para Rab1/Ypt1p.
TRAPPII	Miembros de TRAPPI ? TRAPPC9 TRAPPC10	Miembros de TRAPPI Trs65p Trs120p Trs130p	Unión a la cubierta COPI a través de la subunidad γ -COP (Sec21). GEF para Rab1/Ypt1p y Ypt31/32.
DSL1	ZW10 RINT-1 NAG	Dsl1p Tip20p Dsl3p	Unión a la cubierta COPI a través de las subunidades α -COP y δ -COP. Interacción con las SNAREs Sec20, Use1, Ufe1 y Sintaxina-18.

En su conjunto los factores de anclaje actúan como puente y estabilizadores de las vesículas; estableciendo una conexión entre las proteínas de cubierta presentes en la misma y la membrana del orgánulo

aceptor (Cai *et al*, 2007; Sztul & Lupashin, 2009). El reclutamiento a la membrana de estos factores de anclaje está regulado por las GTPasas de la familia Rab. De este modo, se establece un doble reconocimiento a nivel de las membranas de la vesícula a través de las proteínas de cubierta; y posteriormente con la membrana del orgánulo aceptor a nivel de las SNAREs. Así se garantiza que sólo se fusionen vesículas correctas para cada paso de transporte. Tras establecerse las correspondientes uniones, los propios factores de anclaje al ser efectores de la Rab, promueven el desensamblaje de la cubierta, requisito previo para que la membrana de la vesícula se fusione a 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).

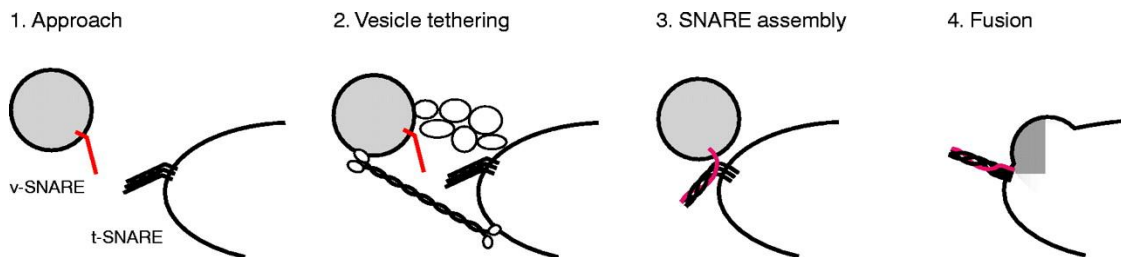


Figura 5. Fases del anclaje y la fusión de la vesícula al orgánulo aceptor. Cuando la vesícula de transporte se aproxima al orgánulo aceptor es capturada por los factores de anclaje (*tethering*), que facilitan el reconocimiento entre las v- y t-SNAREs que se activan y enrollan entre ellas promoviendo la fusión de la vesícula (Whyte & Munro, 2002).

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 interaccionan a través de sus dominios citosólicos *coiled-coil*. La base del proceso está en la combinación específica de cuatro proteínas SNAREs, una de ellas localizada 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). Además, es imprescindible la actuación de otros factores necesarios para la liberación de las SNAREs (factores NSF y SNAP), así como para la estabilizar la unión entre las SNAREs (proteínas de la familia SM) (Sudhof & Rothman, 2009).

Clásicamente, se consideró que la complementariedad entre v- y t-SNAREs era la base de la especificidad del reconocimiento en cada paso de la ruta de transporte, sin embargo, actualmente el papel central en este proceso recae en las proteínas de cubierta, ya que de éstas dependen los factores de anclaje y las SNAREs (Cai *et al*, 2007; Lord *et al*, 2011; Sudhof & Rothman, 2009; Sztul & Lupashin, 2009).

1. 3. La ruta secretora temprana

La ruta secretora temprana comprende los diferentes eventos de transporte que tienen lugar entre el RE y el aparato de Golgi. Es la naturaleza bidireccional del transporte vesicular la que preserva el correcto funcionamiento y la continuidad de la misma. Mientras el transporte anterógrado permite la salida de las proteínas de secreción desde el RE hacia sus destinos funcionales, el transporte retrógrado 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).

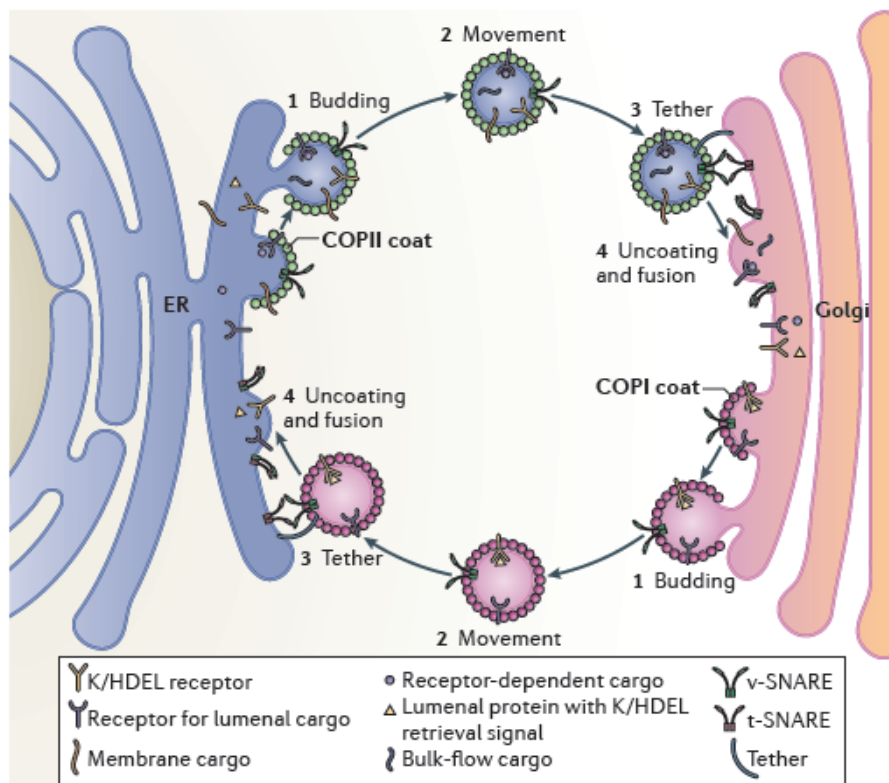


Figura 6. Transporte bidireccional entre el RE y el Golgi mediado por las cubiertas COPII y COPI.

Las proteínas de secreción se incorporan en las vesículas formadas por las proteínas de cubierta bien de forma directa, a través de un receptor, o de forma pasiva (*bulk flow*). Un papel esencial de las proteínas COPI es el reconocimiento del motivo K/HDEL, gracias al cual las proteínas endógenas del RE vuelven al mismo garantizando el flujo bidireccional (Brandizzi & Barlowe, 2013).

Como se ha expuesto anteriormente, 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. 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 de estos intermediarios de transporte, se halla regulada por mecanismos que aún no han sido completamente establecidos.

1.3.1. Biogénesis y translocación de las proteínas de secreción

La incorporación de las proteínas a la ruta secretora comienza con la biogénesis de las mismas, ya que la traducción de los ARNm se encuentra acoplada a la translocación desde el citosol al lumen del RE. Dicha translocación está dirigida por la presencia de una secuencia señal presente en el péptido nascente. Dicha señal es reconocida por la maquinaria de translocación de modo co-traducciona l o post-traducciona l. En ambos casos, el complejo del translocón, formado por la oligomerización de la proteína Sec61, es el responsable final de la translocación al lumen del RE, al formar un poro en la membrana del RE que permite que las proteínas atraviesen la membrana (Rapoport, 2007) (Figura 7A y B). La secuencia señal conforma un motivo hidrofóbico que es reconocido bien por el sistema SRP (*Signal Receptor Particle*), o bien por chaperonas citosólicas. Una vez reconocida la secuencia señal, la proteína nascente es conectada con la maquinaria de translocación.

Más recientemente, se ha descrito un tercer sistema de translocación independiente del complejo Sec61 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Éste está constituido por los productos de un conjunto de genes no esenciales, cuya ausencia produce defectos en el transporte RE-Golgi. Estos genes se conocen como GET (Schuldiner *et al*, 2005). Las proteínas que emplean este sistema se caracterizan por presentar un extremo C terminal corto que se inserta en la membrana del retículo atravesándola, quedando éste en la cara luminal y el resto de la proteína en la cara citosólica. El sistema de translocación se basa en el reconocimiento del extremo C terminal de la proteína nascente por la maquinaria GET, para su posterior inserción en la membrana (Figura 7C) (Schuldiner *et al*, 2008; Stefanovic & Hegde, 2007). De hecho, todo un grupo de proteínas de secreción, la familia de proteínas

ancladas a GPI (**Apartado 1.3.1.1.1.**), se translocan empleando el sistema GET y de un modo independiente de SRP (Ast *et al*, 2013).

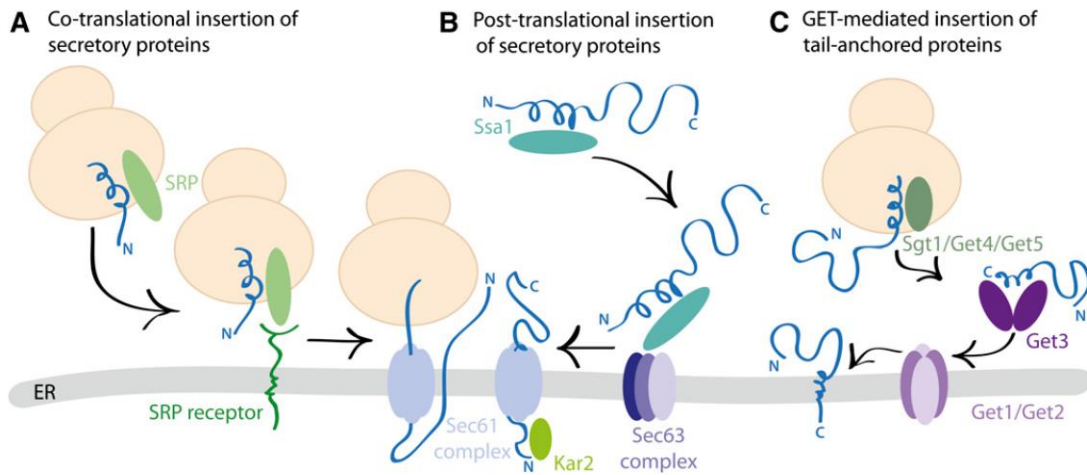


Figura 7. Translocación al lumen del RE de las proteínas de secreción.

(A) Sistema co-traduccional de inserción de las proteínas de secreción. La proteína SRP reconoce la secuencia hidrofóbica presente en el péptido nascente y media la interacción con el receptor de SRP. Éste promueve la inserción en el canal formado por el complejo Sec61. **(B)** Translocación post-traduccional. Chaperonas citosólicas como Ssa1p, reconocen las secuencias señal de las proteínas nascentes y promueven su interacción con el complejo Sec63. Posteriormente éste hace que se transloquen a través del complejo Sec61. **(C)** Las proteínas que se insertan en la membrana del RE a través de su extremo C terminal interactúan con el complejo Get3 a través de otras proteínas del sistema GET. Get3 media la interacción con el complejo Get1/2 que promueve la inserción en la membrana (Barlowe & Miller, 2013).

1.3.1.1. Maduración de las proteínas de secreción

Tras la translocación de las proteínas, es en el retículo donde éstas adquieren su conformación madura. Por tanto, promover y garantizar la maduración, plegamiento y oligomerización es una de las funciones principales del RE. Del mismo modo, éste es el motivo por el que existe un férreo control de calidad en el RE que selecciona y discrimina entre las proteínas maduras correctamente y las que no, asegurando que sólo las primeras avancen por la ruta secretora. Para ello, existe un amplio conjunto de enzimas y chaperonas que promueven la maduración, y monitorizan el estado de plegamiento de la proteína mediante el reconocimiento de secuencias aminoacídicas, normalmente ocultas en las cadenas polipeptídicas que están correctamente

plegadas o ensambladas, grupos tiol activos, o bien el nivel de glicosilación de las proteínas (Anelli & Sitia, 2008; Ellgaard & Helenius, 2003).

Las diferentes modificaciones y procesos de maduración que experimentan las proteínas recién translocadas se pueden clasificar en los siguientes procesos: procesamiento de la secuencia señal, glicosilación, adición de grupos glicosil-fosfatidilinositol (GPI) y formación de puentes disulfuro (Figura 8).

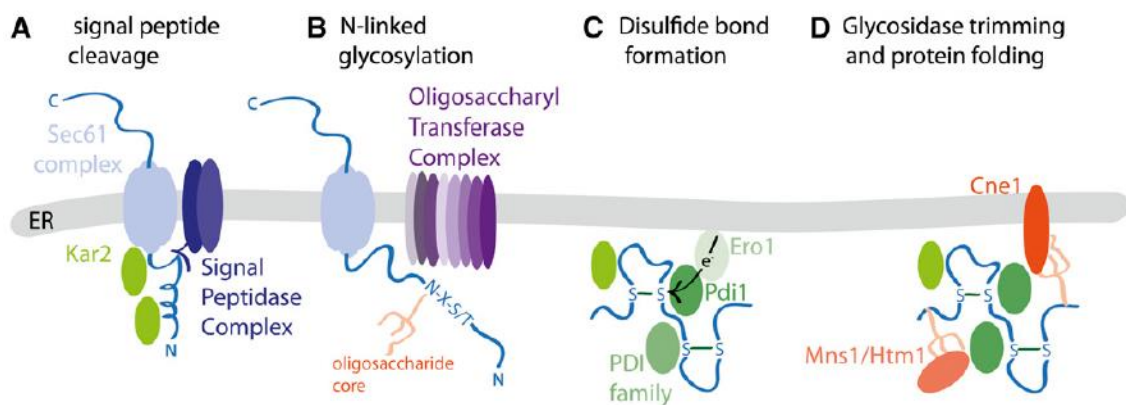


Figura 8. Plegamiento y maduración de las proteínas de secreción.

(A) Eliminación de la secuencia señal. El complejo SPC actúa de forma coordinada con el translocón Sec61 para cortar la secuencia señal. **(B)** N-glicosilación. Tras la eliminación de la secuencia señal, el complejo OST transfiere cores de oligosacáridos en los motivos N-X-S/T de la proteína translocada. **(C)** Formación de puentes disulfuro. Gracias al aporte de electrones de la flavoproteína Ero1p la disulfuroisomerasa Pdi1p promueve la formación de puentes disulfuro en la proteína de secreción. **(D)** Los oligosacáridos maduran siendo procesados por Gls1/2, entrando en ciclos de plegamiento supervisados por la calnexina (Cne1p) y si no completan su plegamiento, las manosidasas Msn1p y Htm1p degradan parcialmente los oligosacáridos para dirigir a las proteínas a la ruta de degradación. En todos los casos, la presencia de chaperonas como Kar2p supervisa el proceso de plegamiento (Barlowe & Miller, 2013).

El procesamiento de la secuencia señal es llevado a cabo por el complejo SPC (*S*ignal *P*eptidase *C*omplex). Este complejo está formado por cuatro proteínas transmembrana que identifican y proteolizan la secuencia señal (Fang *et al*, 1997). Dicho complejo aparece asociado al complejo Sec61, quedando así acoplada la translocación con el procesamiento de la secuencia señal (Antonin *et al*, 2000) (Figura 8A).

Concomitantemente a la translocación tiene lugar la glicosilación de los residuos asparagina de la proteína naciente. Los oligosacáridos se añaden a las secuencias Asn-X-Ser/Thr por la acción del complejo oligosacaril-transferasa (OST) (Kelleher & Gilmore, 2006). El proceso de N-glicosilación comienza después del procesamiento de la secuencia señal (Chen *et al*, 2001). El oligosacárido se transfiere en bloque a partir de un dolicol-pirofosfato que se comporta como donador (Burda & Aebi, 1999) (Figura 8B). El papel de esta glicosilación no está completamente descrito, pero es importante para combatir la hidrofobicidad de ciertas regiones de las proteínas de secreción, estabilizándolas termodinámicamente y promoviendo su solubilidad. Por tanto, la N-glicosilación favorece el plegamiento y forma parte del control de calidad de las proteínas mal plegadas (Schwarz & Aebi, 2011). Además de la N-glicosilación, muchas proteínas de secreción experimentan un proceso de O-glicosilación sobre sus residuos de serina o treonina. Las proteínas responsables de esto se conocen en *S. cerevisiae* como Pmts (*Protein O-mannosyltransferases*). Todas ellas unen covalentemente manosas a los motivos Ser/Thr usando dolicol-fosfato como donador de éstas. Del mismo modo, se ha visto que las Pmts colaboran con el sistema de control de calidad (Goder & Melero, 2011; Hirayama *et al*, 2008). Ambos procesos de glicosilación se continúan aguas arriba en el aparato de Golgi por acción de las manosil-transferasas de la familia KRE2/MNT1, que emplean GDP-manosa como sustrato (Lussier *et al*, 1997a; Lussier *et al*, 1997b) (Figura 8B).

La mayoría de las proteínas de secreción contienen puentes di-sulfuro en sus dominios luminales que se forman tras la translocación al lumen del RE de carácter oxidativo. Estos puentes están catalizados por disulfuro-isomerasas. La formación de estos es esencial para el plegamiento de las proteínas. En levaduras, Pdi1p es la principal enzima responsable de esta modificación post-translocacional, que actúa junto a la flavoenzima Ero1p, transportando electrones entre las proteínas sustrato y ellas mismas (Tu & Weissman, 2002) (Gross *et al*, 2006). Además, en los últimos años se han descrito interacciones funcionales entre Pdi1p y la maquinaria de plegamiento, a nivel de la calnexina (Cne1p) y la chaperona Kar2p (Kimura *et al*, 2005); y con la maquinaria de control de calidad a nivel de la manosidasa Htm1p (Gauss *et al*, 2011) (Figura 8C).

1.3.1.1.1. Anclaje a Glicosil-fosfatidilinositol

Se estima que un 15% de todas las proteínas que entran en la ruta secretora son modificadas post-translocacionalmente mediante la adición a su extremo C-terminal de un glicolípido de tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Orlean & Menon, 2007). La familia de proteínas ancladas a GPI presentan una gran variabilidad funcional, no obstante, tienen el común que el anclaje al GPI permite su localización en la superficie celular. Una vez en la membrana plasmática, algunas proteínas son escindidas del GPI y se localizan en la pared celular. Las propiedades físico-químicas que otorga a esta familia de proteínas el glicolípido, las diferencia del resto de proteínas de secreción. Este proceso de maduración post-traduccional es esencial para todos los eucariotas, ya que las proteínas ancladas a GPI ejercen funciones estructurales y morfológicas esenciales para la supervivencia celular (Pittet & Conzelmann, 2007).

La biosíntesis y el anclaje a GPI depende de más de veinte genes, cuyos productos participan en un proceso muy complejo que tiene lugar en el RE (Orlean & Menon, 2007). El GPI se sintetiza completamente como un precursor lipídico, al que se transfiere la proteína en bloque por acción del complejo GPI-transamidasa. Este complejo reconoce el extremo C-terminal de las proteínas y tras cortar a la proteína a través del residuo terminal (sitio ω), la une covalentemente al glicolípido. Este anclaje es esencial para la exportación de las proteínas, y si no se produce, actúa la maquinaria de control de calidad degradándolas (Eisenhaber *et al*, 2004; Fraering *et al*, 2001; Nuoffer *et al*, 1993).

Tras la transamidación de la proteína, el glicolípido experimenta un proceso de maduración que posibilita la exportación del RE. Esta remodelación comienza con la eliminación del grupo acilo y continúa con la sustitución de los ácidos grasos iniciales por otros más largos y saturados, lo que permite a las proteínas ancladas a GPI asociarse a microdominios lipídicos. Según el organismo estudiado, la remodelación del lípido tiene lugar completamente en el RE, como sucede en *S. cerevisiae*, o bien comienza en el RE con la deacilación, y termina en el Golgi, como sucede en vertebrados. Independientemente, la remodelación es un mecanismo que prepara a las proteínas para su salida del RE y si no se produce, se bloquea la exportación. Este proceso que inicialmente fue descrito para la fracción lipídica, en los

últimos años también se ha puesto de manifiesto que afecta al esqueleto de azúcares del GPI (Fujita *et al*, 2009).

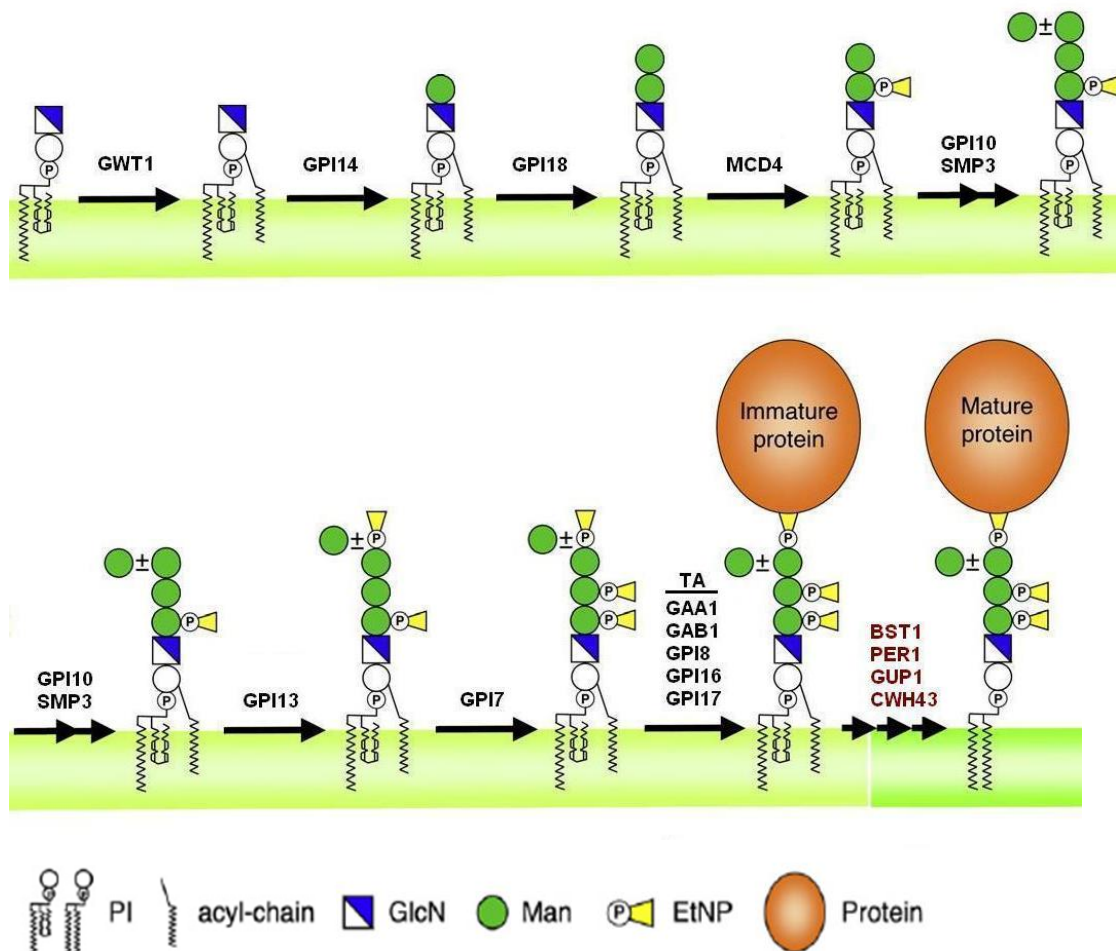


Figura 9. Estructura del GPI y su remodelación en *S. cerevisiae*.

El GPI se sintetiza mediante la adición sucesiva de azúcares sobre el inositol tras la acilación por GWT1. Además se añaden fosfo-etanolaminas a las manos. Tras completar su biosíntesis el complejo transamidasa (TA), une covalentemente a la proteína a través de la fosfo-etanolamina presente en la manosa en posición 3. Una vez anclada la proteína, el glicolípido es sometido a un proceso de maduración que elimina el grupo acilo y cambia la fracción lipídica aumentando la longitud de los ácidos grasos. Esto permite la exportación eficiente de las proteínas ancladas a GPI. (Modificado de (Fujita & Kinoshita, 2010)).

Los requerimientos de transporte específicos y diferenciales de las proteínas ancladas a GPI respecto al resto de proteínas de secreción, han sido objeto de estudio en este trabajo y se exponen en el Capítulo 2.

1.3.1.2. Plegamiento y ensamblaje

La adición de oligosacáridos previene el plegamiento erróneo de las proteínas de secreción y consecuentemente evita su agregación e insolubilización. Sobre los oligosacáridos añadidos por el complejo OST, actúan diferentes hidrolasas y glicosiltransferasas, que modifican la composición del oligosacárido. Estos cambios son detectados por la maquinaria de control de calidad, como la calnexina (Cne1p). Cuando los ciclos de plegamiento se alargan, el juego de hidrolasas participantes cambia a manosidasas, que procesan diferencialmente los oligosacáridos, derivándolos a la maquinaria de degradación del RE (Carvalho *et al*, 2006; Helenius & Aebi, 2004) (Figura 8D).

Finalmente, cabe destacar el papel de las chaperonas integrantes del sistema de ATPasas Hsp70, del que forma parte la proteína Kar2p de *S.cerevisiae* (BiP1 y 2 de *A. thaliana* o BiP/HSPA5 de *H. sapiens*). Estas chaperonas se unen a las regiones hidrofóbicas de las proteínas de secreción en proceso de plegamiento a través de la hidrólisis de ATP, permaneciendo unidas hasta que proteínas de la familia DnaJ-like estimulan el intercambio de ADP por ATP (Hartl, 1996). En levaduras, se han descrito varias proteínas DnaJ-like, entre las que destacan Sec63p, miembro de la maquinaria de translocación, lo que pone de manifiesto una vez más, la alta coordinación entre estos procesos (Schlenstedt *et al*, 1995). Del mismo modo, la actividad de las chaperonas como Kar2p está unida a la de los sistemas de maduración y plegamiento.

También cabe destacar la actividad de chaperonas de membrana particulares que permiten que proteínas con múltiples dominios transmembrana puedan plegarse adecuadamente y alcanzar la correcta oligomerización que posibilita alcanzar su estructura cuaternaria. En *S. cerevisiae* los ejemplos mejor descritos son los de las chaperonas Shr3p y Chs7p para la permeasa general de aminoácidos, Gap1p, y la quinta-sintetasa III, Chs3p, respectivamente (Kota *et al*, 2007; Trilla *et al*, 1999).

1.3.1.3. Control de calidad y respuesta a proteínas mal plegadas

Cuando las proteínas de secreción tras repetidos intentos son incapaces de plegarse o ensamblarse correctamente, se pone en marcha el mecanismo conocido como degradación asociada al RE denominado ERAD (*ER associated degradation*). La proteína mal plegada es entonces de nuevo desplegada para ser retrotranslocada al citoplasma donde es desglucosilada, ubiquitinizada y degradada finalmente por el proteasoma (Meusser *et al*, 2005; Vembar & Brodsky, 2008). Una de las señales mejor caracterizadas que dirigen a las proteínas hacia la ruta degradativa son los oligosacáridos generados por la actividad de las manosidasas Mns1p y Htm1p (Carvalho *et al*, 2006). Este proceso es clave para la homeostasis del RE y la fisiología celular.

Cuando la maquinaria de degradación se satura, se produce una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, y se desencadena una respuesta integrada de la célula que combina diversas estrategias con el fin de disminuir la proteotoxicidad generada, que se denomina respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (Travers *et al*, 2000).

La activación de la UPR conduce a las siguientes acciones: incremento de la expresión de genes relacionados con proteínas que intervienen en el plegamiento, en la degradación y en el transporte RE-Golgi, atenuación de la traducción, eliminación mediante la autofagia de las regiones del RE donde se acumulan las proteínas mal plegadas, y, si el estrés no remite, el desencadenamiento final de la apoptosis (Ma & Hendershot, 2004; Walter & Ron, 2011).

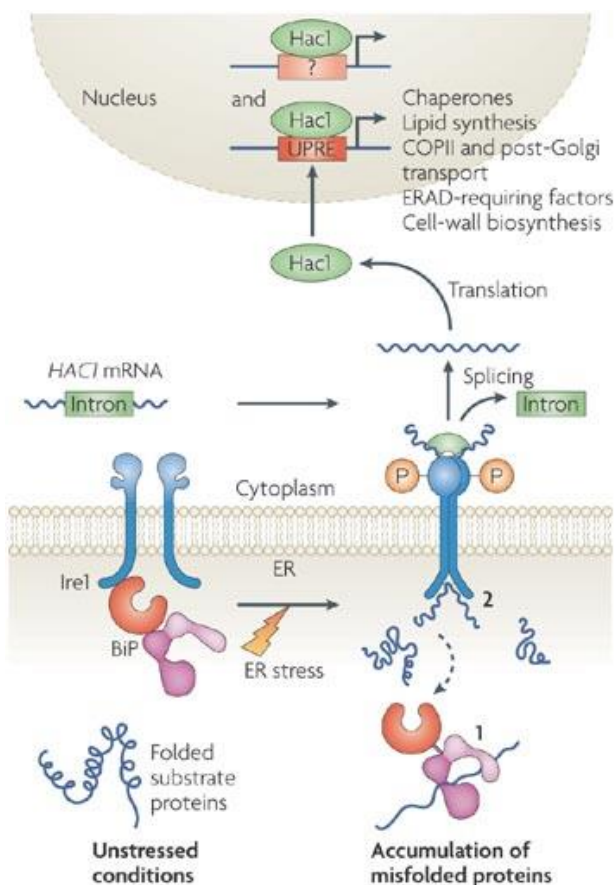
Actualmente se han descrito tres vías diferentes para activar la UPR: la vía ATF6, la vía PERK y la vía IRE1 (Walter & Ron, 2011). Probablemente, de todas ellas, la más estudiada y de mayor interés para este trabajo, pues es la descrita inicialmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es la vía de IRE1. Esta vía consiste en la activación de una proteína transmembrana del RE con actividad quinasa (Ire1p) cuando hay un exceso de proteínas mal plegadas. En su estado inactivo, Ire1p se encuentra en forma monomérica unida a chaperonas. La presencia de proteínas mal plegadas hace que las chaperonas liberen el dominio luminal de Ire1p, debido a la mayor afinidad por las proteínas mal plegadas. Entonces, Ire1p dimeriza y se autofosforila, estimulándose la actividad endorribonucleasa de su dominio citosólico, la cual se encarga de eliminar el intrón del gen *HAC1*. El ARNm procesado se traduce

en una proteína Hac1p funcional que migra al núcleo donde actúa como un factor estimulador de la transcripción de numerosos y diversos genes cuyos productos ayudarán a paliar el estrés nocivo generado en el RE por la acumulación de las proteínas mal plegadas (Hetz & Glimcher, 2009).

Figura 10. Ruta de activación de la UPR mediada por IRE1.

En levaduras, el único inductor de la UPR es la proteína Ire1p (Inositol requiring protein 1). Se trata de una proteína transmembrana integral del RE con actividad Ser/Thr quinasa y endorribonucleasa.

En condiciones basales, las chaperonas como Kar2p (BiP), unen los dominios luminales de Ire1p previniendo su dimerización. Cuando existe estrés en el retículo, las proteínas mal plegadas, con mayor afinidad por Ire1p, liberan a las chaperonas. Esto promueve la dimerización de Ire1p, lo que le permite su autofosforilación. La activación de Ire1p promueve la actividad endorribonucleasa, que media el procesamiento del ARNm de Hac1p, permitiendo su traducción. Finalmente Hac1p migra al núcleo y desencadena la sobreexpresión de los genes con los elementos UPRE (Vembar & Brodsky, 2008).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

1.3.2. Transporte desde el Retículo Endoplásmico

Una vez que las proteínas han completado su síntesis, maduración y plegamiento, son competentes para incorporarse a la ruta secretora a través de su inclusión en vesículas de secreción. Las vesículas derivadas del retículo son formadas por las proteínas de cubierta COPII, las cuales son capaces de deformar las membranas creando estructuras esféricas en las que se han incorporado las moléculas carga apropiadas. La caracterización de las

proteínas COPII empezó con ensayos *in vitro* (Barlowe *et al*, 1994) a partir de microsomas, se completó empleando ensayos con liposomas sintéticos (Matsuoka *et al*, 1998) y se caracterizó estructuralmente gracias a criomicroscopía electrónica (Stagg *et al*, 2008) y cristalografía de rayos X (Bi *et al*, 2002; Fath *et al*, 2007). Todos estos estudios han permitido definir que la maquinaria mínima necesaria incluye cinco proteínas, la GTPasa Sar1p, y las cuatro proteínas de cubierta Sec23, Sec24, Sec13 y Sec31. Dado que se estima que un tercio del proteoma eucariota entra en la ruta secretora, uno de los desafíos actuales es comprender cómo la maquinaria de cubierta acomoda esta enorme cantidad y variedad de cargas. Del mismo modo, aún quedan por describirse los mecanismos que regulan procesos como la escisión, el desensamblaje de la cubierta y la formación de vesículas de mayor tamaño, necesarias para transportar algunas proteínas carga de mayor tamaño.

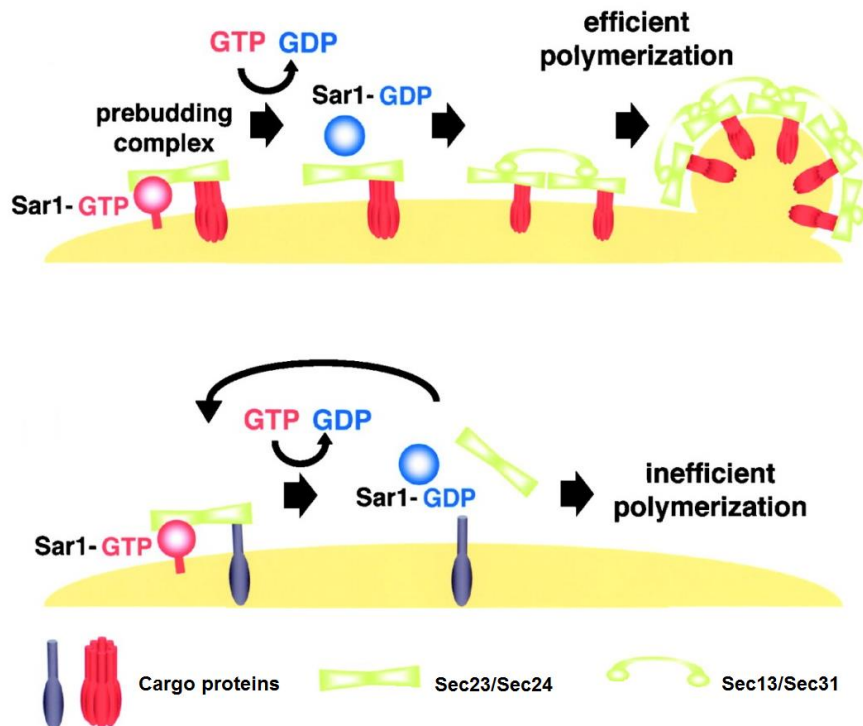


Figura 11. Formación de la vesícula COPII.

Parte superior de la imagen: Fase productiva. Cuando hay suficiente número de moléculas carga correctamente ensambladas los complejos cebadores se estabilizan sobre la membrana del RE y favorecen el ensamblaje de la cubierta COPII. **Parte inferior** de la imagen: Fase improductiva. 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 (Sato, 2004).

1.3.2.1. Estructura y ensamblaje de la cubierta COPII

El ensamblaje de la cubierta COPII empieza con el reclutamiento y activación de la proteína G pequeña Sar1, a través del intercambio de GDP por GTP catalizado por la proteína integral de membrana del RE, Sec12. La forma activa de Sar1 despliega una α -hélice anfipática que permite la asociación estable con la membrana. GTP-Sar1 recluta a la capa interna de la cubierta formada por Sec23-24. Sec23 tiene actividad GAP (promueve la hidrólisis de GTP por Sar1), lo que permite los ciclos de activación e inactivación que se necesitan para que Sar1 desencadene la polimerización de la cubierta. Sec24 contiene diferentes dominios o bolsillos de interacción con las moléculas carga, lo que permite la separación de estas moléculas de las integrales del retículo y promueve su concentración en la vesícula naciente. El trímero Sar1-Sec23-Sec24 recluta a su vez a la capa externa de la cubierta formada por Sec13-31. Sec31 estimula la actividad GAP de Sec23, lo que garantiza ciclos productivos de activación de Sar1 (Barlowe & Miller, 2013). Por último, cabe destacar la importancia de la carga, ya que sólo en presencia de suficiente moléculas carga que unan y estabilicen a la membrana el dímero Sec23-Sec24 tras la disociación de Sar1 tendría lugar una polimerización eficiente (Sato & Nakano, 2007) (Figura 11).

La incorporación de la hélice de Sar1, junto a la forma cóncava del dímero Sec23-24 contribuyen a la deformación inicial de la membrana, pero es la capa externa formada por Sec13-31 la que tiene la mayor capacidad para generar la forma esférica de la vesícula gracias al aporte de rigidez de su estructura (Copic *et al*, 2012).

1.3.2.2. Captura de las moléculas carga

La principal función de las vesículas es garantizar el transporte eficiente en la dirección adecuada de las moléculas carga. Esto lo hace a través de la interacción con las mismas. No obstante, muchas moléculas carga, gracias a su abundancia, pueden ser transportadas eficientemente de forma pasiva o inespecífica, este proceso se conoce como *bulk flow*. Sin embargo, la gran eficiencia que presenta la exportación desde el RE de proteínas no enriquecidas no puede explicarse por la simple incorporación pasiva a las vesículas nacientes (Thor *et al*, 2009).

El enriquecimiento selectivo de moléculas carga se explica gracias a la presencia de señales reconocidas por las proteínas de cubierta, en este caso, por la subunidad Sec24. Además, se han descrito isoformas de esta subunidad (SEC24B, C y D en mamíferos, así como Iss1p y Lst1p en levaduras) que permiten acomodar la ingente cantidad y variedad de cargas (Miller *et al*, 2003). La señales consenso propuesta para la unión a las cubiertas COPII son motivos di-aromáticos como la di-fenilalanina (Malkus *et al*, 2002).

Por último, cabe destacar que muchas moléculas carga carecen de las señales adecuadas para unir a la cubierta, bien porque son solubles o sus dominios transmembrana no llegan a la cara citosólica, o si lo hace, carecen de las señales adecuadas. Para estas moléculas existen proteínas que actúan como receptores o adaptadores de cubierta, tradicionalmente llamados receptores de carga. Estos se presentarán en el **Apartado 1.3.4**.

1.3.2.3. Regulación de las cubiertas COPII

La actividad GTPasa de Sar1 es el mecanismo primario de regulación de la polimerización de la cubierta COPII. Ésta, a su vez, está regulada por la actuación complementaria de su GEF y su GAP, desarrolladas por Sec12 y Sec23 respectivamente. No obstante, esta actividad también contribuye a otras funciones como discriminar entre las proteínas cargas relevantes y las que no (Sato & Nakano, 2005) , así como la escisión de la vesícula naciente (Bielli *et al*, 2005).

Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que la actividad GAP también se encuentra modulada por la proteína Sec16 (Kung *et al*, 2011; Yorimitsu & Sato, 2012). Ésta es una proteína de gran tamaño, que se asocia a las membranas del retículo por la cara citosólica y actúa como andamiaje para constituir los sitios de salida del retículo endoplásmico (ERES), quedando posteriormente excluida de las vesículas nacientes (Gimeno *et al*, 1996; Shaywitz *et al*, 1997). Sec16 presenta dominios de unión con todas las subunidades COPII. Es más, está propuesto que Sec16 previene del efecto potenciador de la actividad GAP que ejerce Sec31 sobre Sec23, consiguiéndose así que la actividad GAP se incremente junto con el tamaño de la vesícula (Kung *et al*, 2012).

1.3.2.4. Concentración en los sitios de salida del RE, ERES

Aunque en condiciones *in vitro* se puedan formar vesículas COPII simplemente con la adición de Sar1 y las cubiertas, presumiblemente, en las células este proceso está mucho más controlado y localizado. En primer lugar, la formación de vesículas COPII tiene lugar en dominios especializados del retículo, como ya se ha citado previamente, los ERES. Estas regiones están definidas por las proteínas Sec16 y Sec12 (Rossanese *et al*, 1999; Watson *et al*, 2006). Los ERES aparecen a lo largo del retículo, en regiones localmente curvadas gracias a las proteínas Rtn1p, Rtn2p y Yop1p (Okamoto *et al*, 2012). En levaduras, son altamente dinámicos, pudiéndose formar *de novo*, fusionarse y dividirse (Bevis *et al*, 2002).

El segundo punto de regulación *in vivo* de la formación de vesículas COPII es la concentración de las moléculas carga en estos ERES. Los mecanismos precisos que posibilitan esta concentración están pobremente descritos y representan uno de los mayores focos de interés del campo actualmente. Se ha descrito el papel esencial de las proteínas Sec12 y Sec16 en la concentración de las cargas, así como la importancia de la composición lipídica (Connerly *et al*, 2005; Shindiapina & Barlowe, 2010). Por último, deben existir mecanismos que prevengan la concentración de proteínas inmaduras o mal plegadas, ya que se ha descrito tanto en levaduras como en mamíferos que éstas son activamente excluidas de los ERES (Castillon *et al*, 2009; Mezzacasa & Helenius, 2002).

1.3.3. Llegada de las vesículas COPII al aparato de Golgi

Tras la liberación de las vesículas COPII, éstas se desplazan bien por difusión pasiva, bien asociadas al citoesqueleto, hasta las inmediaciones del aparato de Golgi.

Los microtúbulos parecen esenciales, al menos en células de mamíferos, para el desplazamiento de las vesículas derivadas del RE (Watson *et al*, 2005). Del mismo modo, se ha implicado al complejo dineína/dinactina en esta fase del transporte, ya que está funcionalmente relacionado con las cubiertas COPII y el complejo TRAPPI (*Transport Protein Particle I*) (Zong *et al*, 2012).

Tras su llegada al aparato de Golgi, las vesículas son ancladas a través de sus proteínas de cubierta gracias a la acción de la GTPasa Rab1/Ypt1p, el factor 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 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.

1.3.3.1. Anclaje de las vesículas COPII

Los estudios iniciales acerca de este proceso definieron a la Rab Ypt1p como la proteína responsable de dirigir a las vesículas COPII hacia el aparato de Golgi (Jones *et al*, 1998; Richardson *et al*, 1998). A continuación se describió cómo actuaba junto a la proteína *coiled-coil* Usolp (Barlowe, 1997), siendo éstas dos proteínas suficientes para reproducir *in vitro* la interacción entre vesículas COPII y membranas de Golgi (Cao *et al*, 1998). No obstante, la longitud de la proteína Usolp, de alrededor de 180nm (Yamakawa *et al*, 1996), era insuficiente para explicar el anclaje *in vivo* de las vesículas. Esto fue complementado con la descripción del complejo multiproteico TRAPPI, de dimensiones similares a 18nm x 6nm x 5nm (Kim *et al*, 2006), el cual es necesario para el transporte RE-Golgi (Sacher *et al*, 1998) y que *in vitro* puede promover la unión directa entre las vesículas COPII y las membranas de Golgi (Sacher *et al*, 2001; Sacher & Ferro-Novick, 2001). Además, se ha demostrado la interacción directa entre la subunidad Bet3p del complejo TRAPPI y la subunidad Sec23p de la cubierta COPII. Recientemente, se ha descrito un nuevo elemento regulador de este proceso, que es la fosforilación de las cubiertas COPII por la quinasa Hrr25p (Lord *et al*, 2011), que regula la interacción entre la cubierta y el complejo TRAPPI (Figura 12). Más aún, este año se ha propuesto que la fosfatasa Sit4p sea la responsable de reciclar las cubiertas COPII mediante desfosforilación (Bhandari *et al*, 2013).

El complejo TRAPPI promueve la activación de la Rab Ypt1p al presentar actividad GEF (Jones *et al*, 2000). Esto implica que constituiría el centro de control del proceso de anclaje, promoviendo la interacción entre Usolp y la forma activa de Ypt1p, desencadenando así la conexión entre las SNAREs (Barlowe & Miller, 2013).

No obstante, se han descrito otros factores de anclaje implicados en este evento de transporte. La proteína Grh1p (GRASP65 en mamíferos) forma un complejo con la proteína *coiled-coil* Bug1p (GM130). Ambas proteínas no son esenciales para la viabilidad celular, pero la combinación de la mutación nula para sus genes con mutantes termosensibles de *ypt1* y *uso1* genera una fuerte interacción genética negativa. Además, el complejo formado por ambas es necesario para los ensayos *in vitro* de anclaje de las vesículas COPII a membranas de Golgi, así como en ensayos de transporte (Behnia *et al*, 2007).

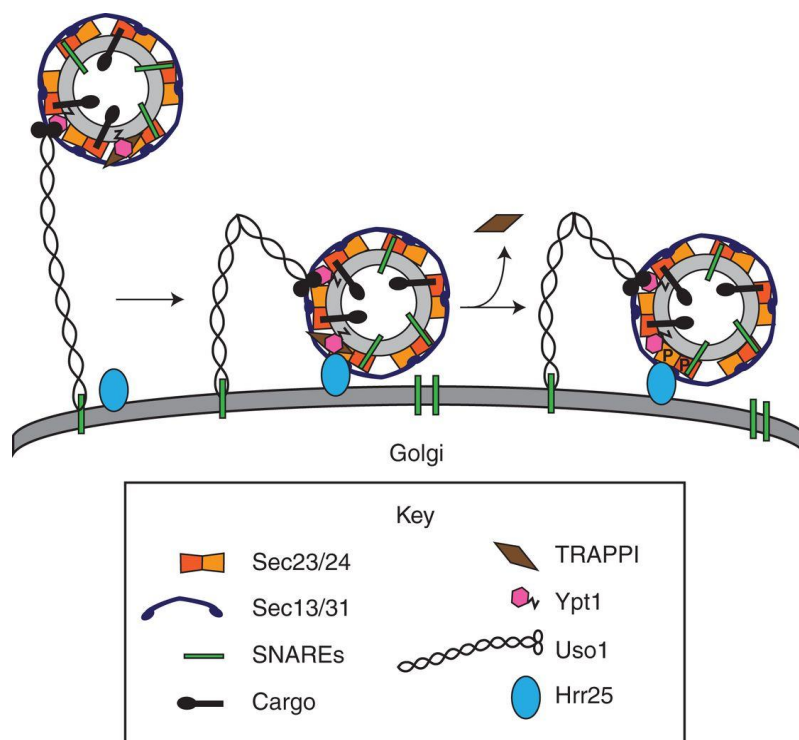


Figura 12. Anclaje de las vesículas COPII al aparato de Golgi.

El complejo TRAPPI es reclutado a las vesículas COPII a través de la subunidad Sec23p, junto a la forma activa de Ypt1p. A su vez, Ypt1p-GTP interactúa con su efector Uso1p, promoviendo el anclaje de la vesícula, aproximándola a la membrana del Golgi. A continuación la quinasa Hrr25p fosforila las cubiertas, promoviendo la salida del complejo TRAPPI. Después, se produciría la despolimerización de la cubierta, lo que liberaría a la v-SNARE y promovería la fusión. Este mecanismo garantizaría la fidelidad de la ruta de transporte, fusionándose sólo aquellas vesículas que presentan al cubierta adecuada (Lord *et al*, 2013).

Estos hallazgos, así como la presencia de otras muchas golginas (proteínas *coiled-coil* asociadas al Golgi en células de mamífero), de las cuales al menos dos están conservadas en levaduras, Coy1p (CASP) y Rud3p (GMA120), implicadas en la organización del aparato de Golgi y la interacción con vesículas COPII (Gillingham *et al*, 2004; VanRheenen *et al*, 1999); ponen de manifiesto una red de proteínas *coiled-coil* redundante que garantiza la correcta organización de la cara *cis* del Golgi preservando el anclaje de las vesículas COPII (Barlowe & Miller, 2013).

1.3.3.2. Fusión de las membranas

Tras la despolimerización de la cubierta, la v-SNARE Bet1p, interacciona con las t-SNAREs Sed5p, Sec22p y Bos1p, formando un tetrámero al interaccionar sus dominios α -hélice, que se enrollan entre sí, proporcionando la energía necesaria para la fusión de las membranas (Cao & Barlowe, 2000). Además de las SNAREs, la proteína Sly1p/SCFD1, miembro de la familia de proteínas SM (Sec1/Munch18-1), es necesaria para la fusión de las vesículas COPII. Esta proteína se une a la SNARE Sed5p/Syntaxina-5, aumentando la fidelidad en la formación del tetrámero de SNAREs y dotándolo de mayor estabilidad (Furgason *et al*, 2009).

Una vez completada la fusión, el complejo de SNAREs debe ser reciclado para próximas rondas de fusión. Para esto es necesaria la actuación del complejo NSF/SNAP, que en la levadura *S. cerevisiae* está formado por las proteínas Sec17p y Sec18p. Sec17p es el responsable de reclutar sobre el tetrámero de SNAREs a la proteína Sec18p, una chaperona con actividad ATPasa de la familia AAA, que promueve la disociación de las SNAREs (Bonifacino & Glick, 2004).

1.3.4. Transporte a través del Aparato de Golgi

Una vez liberadas en el aparato de Golgi, las nuevas proteínas de secreción continúan su proceso de maduración. Estos procesos madurativos, en *S. cerevisiae*, tienen dos naturalezas, modificar y/o ampliar la N-glicosilación que adquirieron en el RE, y sufrir procesamientos proteolíticos. Las glicoproteínas incrementan su glicosilación mediante la adición de residuos α -

1,6-manosa en el *cis*-Golgi, α -1,2-manosa en el *medial*-Golgi y α -1,3-manosa en el *trans*-Golgi. Los procesamientos proteolíticos tienen lugar en el *trans*-Golgi y son llevados a cabo por la proteasa Kex2p (Glick & Nakano, 2009).

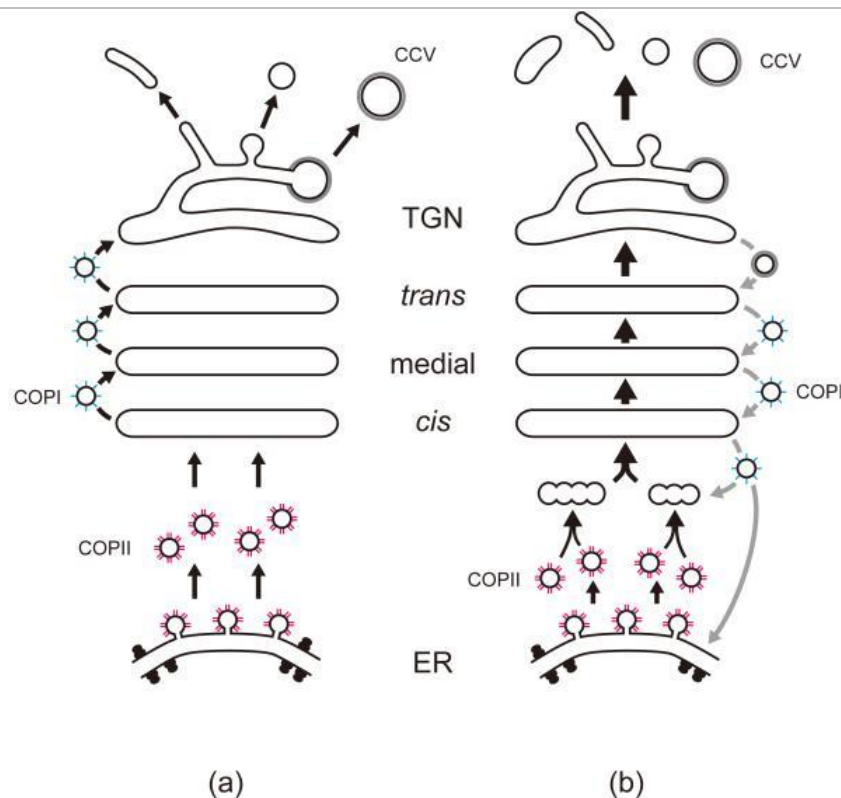


Figura 13. Principales modelos de maduración del Aparato de Golgi.

(A) Maduración por transporte vesicular: las cisternas constituyen compartimentos fijos conectados a través de vesículas COPI que transportan hacia el *trans*-Golgi las proteínas de secreción. **(B)** Maduración cisternal: la nueva cisterna *cis* se forma por la fusión de las vesículas COPII y las vesículas retrógradas COPI procedentes de las antiguas cisternas *cis*. La maduración de ésta cisterna se produce al excluir la maquinaria enzimática de *cis*-Golgi gracias a su transporte retrógrado y la recepción de los componentes *medial* y así sucesivamente (Glick & Nakano, 2009).

Durante muchos años se han propuesto y discutido diferentes modelos que expliquen la progresión de las proteínas de secreción a través del aparato de Golgi, los dos más conocidos son el de modelo de transporte vesicular a través de las cisternas y el modelo de maduración cisternal (Figura 13). El

primero 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 de un tráfico vesicular en sentido anterógrado y retrógrado respectivamente. A pesar de los grandes avances genéticos, bioquímicos y morfológicos, no se ha podido detectar una evidencia firme de transporte vesicular anterógrado entre las distintas cisternas del Golgi (Barlowe & Miller, 2013). El segundo modelo de maduración cisternal, propone que las nuevas cisternas de Golgi que contienen las nuevas proteínas de secreción se forman en la cara *cis* del Golgi y maduran progresivamente a *medial*- y *trans*-Golgi a medida que reciben las diferentes enzimas residentes de cisternas superiores mediante transporte retrógrado. 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) (Figura 13). 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 este mismo año (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* respectivamente. Este transporte es desarrollado por las proteínas de cubierta COPI, así como entre el *cis*-Golgi y el RE (Bonifacino & Glick, 2004). El direccionamiento de estas vesículas parece depender de complejos de anclaje como el complejo COG (Conserved Oligomeric Golgi) (Miller *et al*, 2013). En este transporte *intra*-Golgi el complejo COG reconocería las vesículas a través de la subunidad γ -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).

No obstante, además de la maquinaria de transporte vesicular, el entorno lipídico donde estos eventos de transporte se inician parece ser esencial. Las proteínas esenciales Sec14p (proteína de transferencia fosfatidilinositol/fisfatidilcolina (PI/PC)) y Pik1p (PI4 quinasa) tienen papeles

esenciales y coordinados en el transporte a través del Golgi (Audhya *et al*, 2000; Schaaf *et al*, 2008). El gradiente del fosfoinosítido PI4, creciente a lo largo del Golgi, es crítico para la acción de la proteína Vps74p, la cual promueve el reciclaje desde las cisternas *trans* hacia cisternas inferiores de las manosil-transferasas (Graham & Burd, 2011).

1.3.5. Transporte retrógrado desde el Golgi al Retículo Endoplásmico

Mientras el papel del transporte mediado por las cubiertas COPI a través del aparato del Golgi sigue siendo objeto de debate, su función en el transporte vesicular retrógrado desde el Golgi al RE está bien establecida. Esta etapa de transporte es esencial para mantener 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 de la maquinaria transmembrana que parte del RE incorporada en la vesículas COPII para nuevas rondas de transporte 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 mediado por COPII (Gaynor & Emr, 1997).

1.3.5.1. Composición y estructura de la cubierta COPI

Las cubiertas COPI están constituidas por el coatómero, un complejo proteico formado por siete subunidades α , β , β' , γ , δ , ϵ y ζ -COP, que en levaduras corresponden con las proteínas Cop1/Ret1/Sec33, Sec26, Sec27, Sec21, Ret2, Sec28 y Ret3, respectivamente. Aunque a diferencia de las proteínas COPII, el coatómero es un único complejo proteico estable, si se diferencian dos regiones especializadas en el mismo, una capa interna que se une a las moléculas carga formada por las subunidades β , γ , δ , y ζ -COP; y una capa externa formada por α , β' , y ϵ (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, pero también rasgos intermedios con las cubiertas de clatrina. La capa interna de las COPI es similar a la del adaptador de clatrina

AP2 (Yu *et al*, 2012). Sin embargo, la capa externa es similar tanto a las cubiertas COPII como a las clatrininas (Lee & Goldberg, 2010) (Figura 14).

1.3.5.2. 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 la GTPasa pequeña Arf1p, la cual al activarse despliega una α -hélice que también contiene un grupo miristoilo que facilita la inserción en la membrana (Antonny *et al*, 1997). A diferencia de Sar1, Arf1 no sólo está implicada en la formación de vesículas COPI, sino que también actúa en la formación de vesículas de clatrina. Esta multifuncionalidad se logra gracias a que Arf1 presenta diferentes elementos reguladores en cada etapa de transporte 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, GBF1, BIG1 y BIG2 en mamíferos; y Gea1p, Gea2p y Sec7p en *S. cerevisiae* (Sata *et al*, 1999). La GEF Sec7p/BIG1/BIG2 actúa en el *trans*-Golgi facilitando el papel de Arf1p en la formación de vesículas de clatrininas, mientras que las proteínas Gea1/2p/GBF1 presentan funciones parcialmente redundantes en la formación de vesículas COPI (Park *et al*, 2005; Peyroche *et al*, 1996; Spang *et al*, 2001). A diferencia de la maquinaria COPII, la actividad GAP no es ostentada por un componente de la cubierta, sino que depende de 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). Aunque se han propuesto varias proteínas transmembrana como candidatos, 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), aunque queda por definir el papel concreto de estas interacciones. Por tanto, aún queda por resolver cómo se regula el inicio de la formación de las vesículas COPI, ya que se desconoce cómo las proteínas con actividad GEF son reclutadas a las membranas y como este proceso promueve la activación de Arf1. Igualmente, es necesario encontrar el mecanismo por el que las diferentes Arf1 GEFs son reclutadas diferencialmente a las caras del Golgi donde ejercen su función específica.

Respecto a las Arf-GAPs, Gcs1p sería el homólogo de ARFGAP1 y Glo3p se correspondería estructuralmente 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, ARFGAP1/Gcs1p no presenta interacciones físicas con el coatómero, por lo que sería insuficiente para la polimerización de la cubierta. 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 del dominio 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. 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 despegue 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).

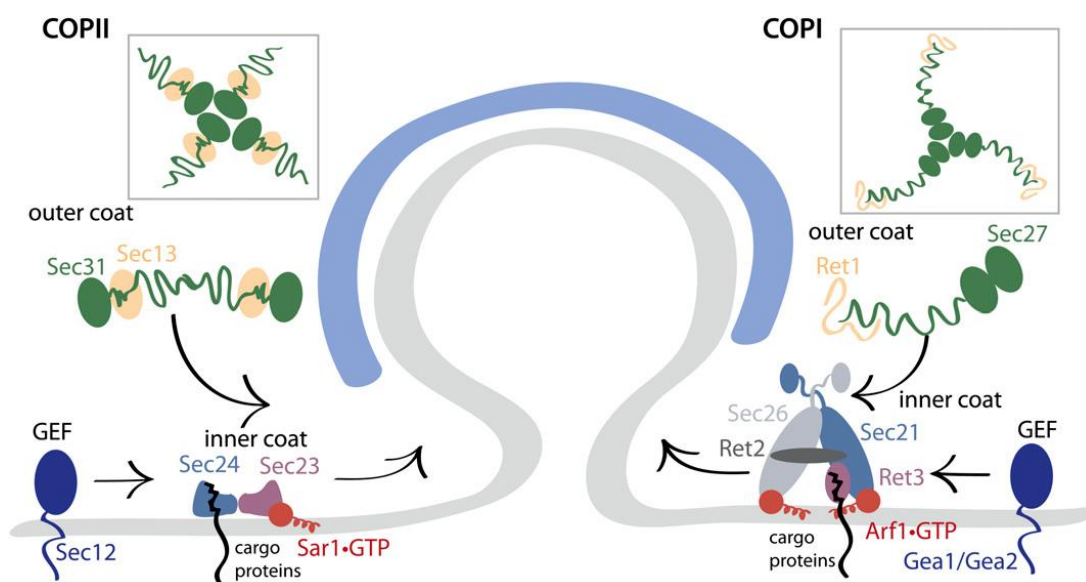


Figura 14. Ensamblaje comparado de las cubiertas COPII y COPI.

Ambas cubiertas, COPII (izquierda) y COPI (derecha), comienzan su polimerización por la activación de la 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 cada cuatro subunidades de Sec13/31 formando una estructura de molinillo β en el extremo de la vesícula naciente. En el caso de las cubiertas COPI las subunidades α y β' (Ret1 y Sec27), conforman una estructura en trísquela en el vértice (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).

1.3.5.3. Reconocimiento por la cubierta COPI de la carga

Se han descrito dos señales diferentes que rigen la incorporación de las proteínas carga a las vesículas COPI, la señal K(X)KXX para las proteínas transmembrana y la señal K/HDEL para las proteínas solubles. Estas proteínas solubles emplean a la proteína Erd2 como receptor/adaptador de la cubierta, que reconoce por su cara luminal el motivo K/HDEL y presenta en su fracción citosólica la di-lisina. Del mismo modo, el coatómero también puede reconocer otros motivos di-básicos como RXR. Estos dominios son reconocidos por la subunidad α -COP (Cosson *et al*, 1998) (Michelsen *et al*, 2007). Además, la subunidad γ -COP puede interactuar con motivos di-aromáticos, similares a los reconocidos por las proteínas COPII, como en el caso del complejo p24 (Bethune *et al*, 2006).

Junto con Erd2, el receptor de carga Rer1 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 (Sato *et al*, 1997). Este paso de transporte también juega 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. Estas proteínas, al tener unidas chaperonas, son detectadas por Erd2 y serían recuperadas. También se ha propuesto que existan receptores específicos para

las proteínas mal plegadas como VIP36 (Reiterer *et al*, 2010). Del mismo modo, las formas monoméricas de subunidades de complejos que escapan sin oligomerizar, son devueltas al RE, ya 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. 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). Del mismo modo, se ha descrito que la ausencia de la familia de proteínas p24 compromete la formación de las vesículas COPI en *S. cerevisiae* (Aguilera-Romero *et al*, 2008), así como que estas proteínas tienen la capacidad de ralentizar la actividad GTPasa de Arf1 y estabilizar la cubierta a la membrana en células de mamífero (Goldberg, 2000).

1.3.5.4. 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 de larga distancia, que estabilizar las vesículas sobre la membrana del RE, permitiendo la interacción entre las SNAREs. En este caso, dicha función es ejercida por el complejo Dsl1. Éste está constituido por tres subunidades: Dsl1p, Tip20p y Dsl3p (Figura 15). Las tres subunidades del complejo Dsl1 permiten el reconocimiento de la cubierta COPI (a través de Dsl1p) y el anclaje del mismo a las membranas del RE a través de la unión de las restantes subunidades con las SNAREs Use1p y Sec20p (Spang, 2012). Las tres subunidades son proteínas esenciales, y mutantes termosensibles de los genes que las codifican presentan defectos en la fusión de las vesículas COPI (Kamena & Spang 2004), así como interacción genética por los mutantes condicionales de las SNAREs (Kraynack *et al*, 2005).

Los estudios más recientes han permitido concluir que el complejo Dsl1 desarrolla tres funciones consecutivas gracias a su capacidad de interactuar tanto con las cubiertas como con las SNAREs. La primera de ellas es la captura de las vesículas gracias al lazo flexible que presenta la subunidad Dsl1p que reconoce a las subunidades α - y ϵ -COP. La siguiente es promover el reconocimiento y la interacción con las SNAREs al aproximar a Sec22p, presente en la vesícula, a las t-SNAREs, las cuales son reclutadas por las

subunidades Dsl3p y Tip20p. Además de servir de plataforma para la interacción de las SNAREs y el reconocimiento individual de ellas, este complejo previene y mantiene en estado receptivo a las t-SNAREs. Finalmente, se ha propuesto una tercera función que es la de promover la despolimerización de las cubiertas, ya que en ausencia del complejo Dsl1 se acumulan vesículas cubiertas de proteínas COPI en las inmediaciones del RE (Ren *et al*, 2009; Tripathi *et al*, 2009; Zink *et al*, 2009).

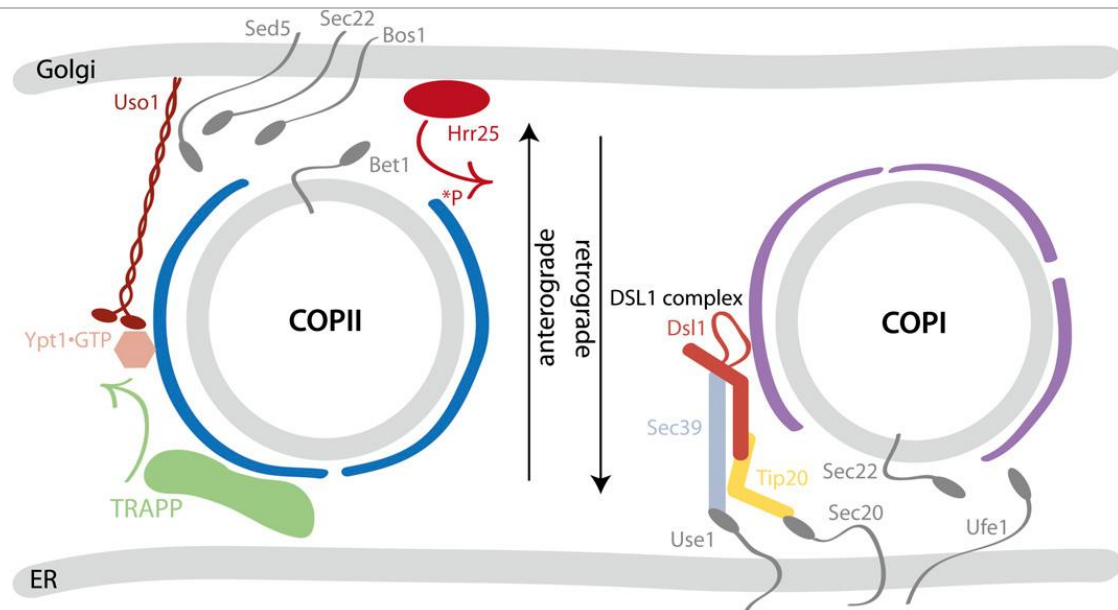


Figura 15. Anclaje comparado de las vesículas COPII y COPI.

El anclaje de las vesículas COPII es mediado por la acción coordinada del complejo TRAPPI, que se carga en las vesículas gracias a la interacción con la subunidad Sec23p de la cubierta, y la Rab Ypt1p, que es activada por el propio complejo TRAPPI. Tras la activación, ésta promueve la acción de la proteína *coiled-coil* Uso1p que ancla la vesícula a la membrana del Golgi. Posteriormente, la acción de la quinasa Hrr25p es necesaria para la disociación del complejo TRAPPI y la despolimerización de la cubierta, dejando desnudas las membranas y permitiendo la actividad de las SNAREs Bet1p, Sed5p, Sec22p y Bos1p. Las vesículas retrógradas son ancladas por el complejo Dsl1, el cual promueve la despolimerización de la cubierta y favorece el reconocimiento entre las SNAREs Sec22p, Use1p, Sec20p y Ufe1p (Barlowe & Miller, 2013).

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).

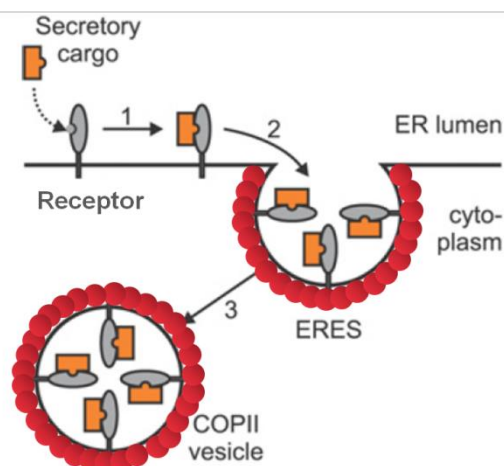
1.4. Adaptadores de cubierta – receptores de carga

Anteriormente se han expuesto las señales reconocidas en las proteínas carga por las proteínas de cubierta que actúan en la ruta secretora temprana para incorporarlas en las vesículas nacientes. Para las proteínas COPII, la señal consiste en un motivo di-aromático o di-hidrofóbico, siendo el más extendido la di-fenilalanina. Las proteínas COPI unen proteínas con señales dibásicas, como el motivo KKXX, KXK o RXR. Sin embargo, muchas de las proteínas de secreción son solubles, o sus dominios de inserción a la membrana no atraviesan la bicapa lipídica, o bien, a pesar de ser transmembrana, sus dominios citosólicos carecen de estas señales. Todas estas proteínas necesitan la acción de una proteína que actúe como adaptadora de cubierta y permita así su interacción con la misma. Estas proteínas son las denominadas receptores de carga (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 su ciclación entre el RE y el Golgi; y un dominio luminal que reconozca 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 posterior formación de la vesícula (Figura 16). Hasta la fecha se han podido identificar sólo algunos de los motivos reconocidos por los diferentes receptores en las proteínas carga luminales, como carbohidratos específicos (reconocidos por dominios de lectinas) y determinadas secuencias de aminoácidos (Dancourt & Barlowe, 2010).

Figura 16. Modelo de actuación de un receptor de transporte en el RE.

Los receptores de carga unen la forma madura de su carga y promueven su concentración en los ERES y la posterior incorporación eficiente en las vesículas COPII (Strating & Martens, 2009).



Así, los receptores de transporte se incorporan con sus ligandos en la mismas vesículas de transporte, viajando así hasta el 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. 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, 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).

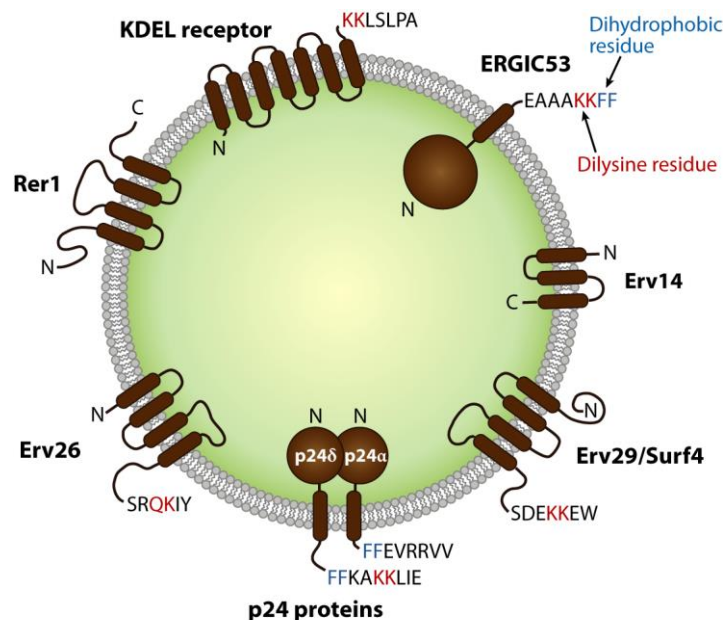


Figura 17. Receptores de carga mejor caracterizados en la ruta secretora temprana.

Los receptores de carga unen la forma madura de su carga y promueven su concentración en los ERES y la posterior incorporación eficiente en las vesículas COPII. En sus dominios citosólicos presentan las señales para unir las cubiertas COPII (señal en azul) y las cubiertas COPI (señal en rojo) (Dancourt & Barlowe, 2010).

Hasta la fecha se han identificado varios receptores de transporte, aunque cabe 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 (Figura 17). Además, la carencia de 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 conocidos oligomerizan entre sí, con lo que aumentan considerablemente su eficiencia de transporte (Dancourt & Barlowe, 2010). En la Tabla III se resumen los receptores de carga descritos hasta la fecha en la ruta secretora temprana.

Tabla III. Receptores de carga que actúan en la interfase RE-Golgi y sus ligandos (Dancourt & Barlowe, 2010; Herzig *et al*, 2012).

Receptor	Homólogo (Sc / Hs)	Ligando	Señal reconocida	Sentido
ERGIC-53	Sc Emp47p Sc Emp46p	Factores de coagulación V y VIII, catepsinas C y Z, α 1-antitripsina. Ssp120p (Sc).	N-glicanos.	RE-Golgi
Complejo p24	Complejo p24	Proteínas ancladas a GPI, invertasa (Suc2p).	A determinar, propuesto el motivo GPI.	RE-Golgi
Erv29p	Hs SURF4	Profactor alfa, CPY y proteinasa A.	I-L-V, α -hélice	RE-Golgi
Erv26p	Hs TEX261	Proteínas transmembrana tipo II como las manosil-transferasas del Golgi y ALP.	Secuencia luminal.	RE-Golgi
Erv14p	Hs Chornicon (CNIH4)	Proteínas con varios dominios transmembrana como Axl2p.	Secuencia luminal.	RE-Golgi

Tabla III. Continuación.

Receptor	Homólogo (Sc / Hs)	Ligando	Señal reconocida	Sentido
Erv41-46p	Hs ERGIC-32	No descrito.	Desconocido	RE-Golgi
Rer1p	Hs RER1	Proteínas transmembranas del RE como Sec63p o Sec12p.	Residuos polares zonas hidrofóbicas.	Golgi-RE
KDEL-receptor	Sc Erd2p	Proteínas solubles endógenas del RE.	Hs KDEL Sc HDEL	Golgi-RE

Junto a los receptores de transporte enumerados en la Tabla III, existen una serie de factores necesarios para la exportación selectiva de determinadas proteínas. Recientemente, se ha descrito la función de la proteína integral TANGO1, que promueve la inclusión en las vesículas de las moléculas de colágeno interactuando con la cubierta COPII pero sin incorporarse ella misma en la propia vesícula. TANGO1 es capaz de ejercer la fuerza mecánica necesaria para que la vesícula aumente su tamaño permitiendo la inclusión del colágeno (Saito *et al*, 2009).

También se han descrito otras proteínas necesarias para la exportación eficiente de sus ligandos, pero que a diferencia de los receptores de carga, no suelen incorporarse en la vesícula conjuntamente con su ligando o proteína carga. En muchos casos se trata de 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 (Herzig *et al*, 2012). En otros casos, la chaperona se carga en la vesícula de secreción escoltando al ligando durante su transporte ya que lo mantiene durante el trayecto en un estado de plegamiento óptimo para ello, habiéndose caracterizado en el transporte de la rodopsina Rh1 y su chaperona NinaA en *Drosophila melanogaster* (Baker *et al*, 1994).

1.4.1. El complejo p24

La familia de proteínas p24, objeto de estudio de este trabajo, forman el conocido como complejo p24. Éste es uno de los receptores de carga más conocidos. 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. Se trata de proteínas transmembrana tipo I de aproximadamente 24 KDa, con un dominio luminal que contiene motivos de unión a proteínas y un tallo citosólico que muestra una gran afinidad para interactuar con los complejos de cubierta COPII y COPI. Las proteínas p24 forman un complejo heterotetramérico que cicla constantemente entre el RE y el Golgi. Debido 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). Sin embargo, todavía no se conocen los mecanismos precisos por los que el complejo p24 opera al comienzo de la ruta secretora. Esencialmente se ha descrito dos funciones para el mismo, la ya citada actividad específica como receptor de carga en sentido RE-Golgi (Muniz *et al*, 2000) y una función general en la formación de vesículas COPI (Aguilera-Romero *et al*, 2008).

Los análisis filogenéticos dividen a la familia p24 en cuatro subfamilias: p24 α , β , γ y δ (Carney & Bowen, 2004). El número de representantes de cada subfamilia varía entre los diferentes organismos (Tabla IV). Así, animales y hongos poseen representantes de cada subfamilia, mientras que las plantas, sólo tienen miembros de las subfamilias p24 β y p24 δ . En los principales organismos modelo, la familia p24 presenta ocho miembros en la levadura, *Saccharomyces cerevisiae* (Marzioch *et al*, 1999), nueve en *Drosophila melanogaster* (Boltz *et al*, 2007), once en *Arabidopsis thaliana* (Carney & Bowen, 2004), diez en *Xenopus laevis* (Strating *et al*, 2009) y diez en mamíferos (Dominguez *et al*, 1998). En la tabla IV se muestra la nomenclatura que reciben las proteínas p24 en diferentes organismos. El análisis filogenético también pone de manifiesto la existencia de dos ramas evolutivas diferentes que agrupan a las subfamilias p24 α y p24 δ por un lado, y a las subfamilias p24 β y p24 γ 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 (Carney & Bowen, 2004; Strating *et al*, 2009).

Tabla IV. Proteínas p24 en diferentes organismos modelo (Strating & Martens, 2009).

Familia	Vertebrados ²			<i>Drosophila</i> ²	<i>S.cerevisiae</i> ²
	Nombre sistemático	Nombre indexado ¹	Otros		
α	p24α1 p24α2 p24α3	TMED11 TMED9 TMED4	gp25L p25, GMP25, p24d GMP25iso	Eclair	Erp1p Erp5p Erp6p
β	p24β1	TMED2	p24, p24a	CG3564 CG9308	Emp24p
γ	p24γ1 p24γ2 p24γ3 p24γ4 p24γ5	TMED1 TMED5 TMED7 TMED3 TMED6	tp24, T1/ST2 ³ p28, T1/ST2iso (g)p27 p26, p24b	CG1967 CG31787 CG9053 Logjam	Erp2p Erp3p Erp4p
δ	p24δ1 p24δ2	TMED10	p23, tmp21(-I), p24c p23iso	Baiser	Erv25p

¹ El nombre TMED proviene de *transmembrane emp24 protein transport domain containing*. El origen del nombre se debe a que Emp24p fue la primera proteína p24 descrita.

² Las subfamilias en cada organismo han divergido independientemente, por tanto no se consideran individualmente cada proteína como ortóloga.

³ El nombre completo de esta proteína es *T1/ST2 receptor binding protein*.

1.4.1.1. Estructura del complejo p24

Los complejos formados por las proteínas p24 tienen una estructura originada por la topología tipo I de las subunidades que lo componen. Cada una contiene un único dominio transmembrana que conecta una larga región luminal N-terminal con una secuencia citosólica C-terminal relativamente corta de 12 a 20 aminoácidos.

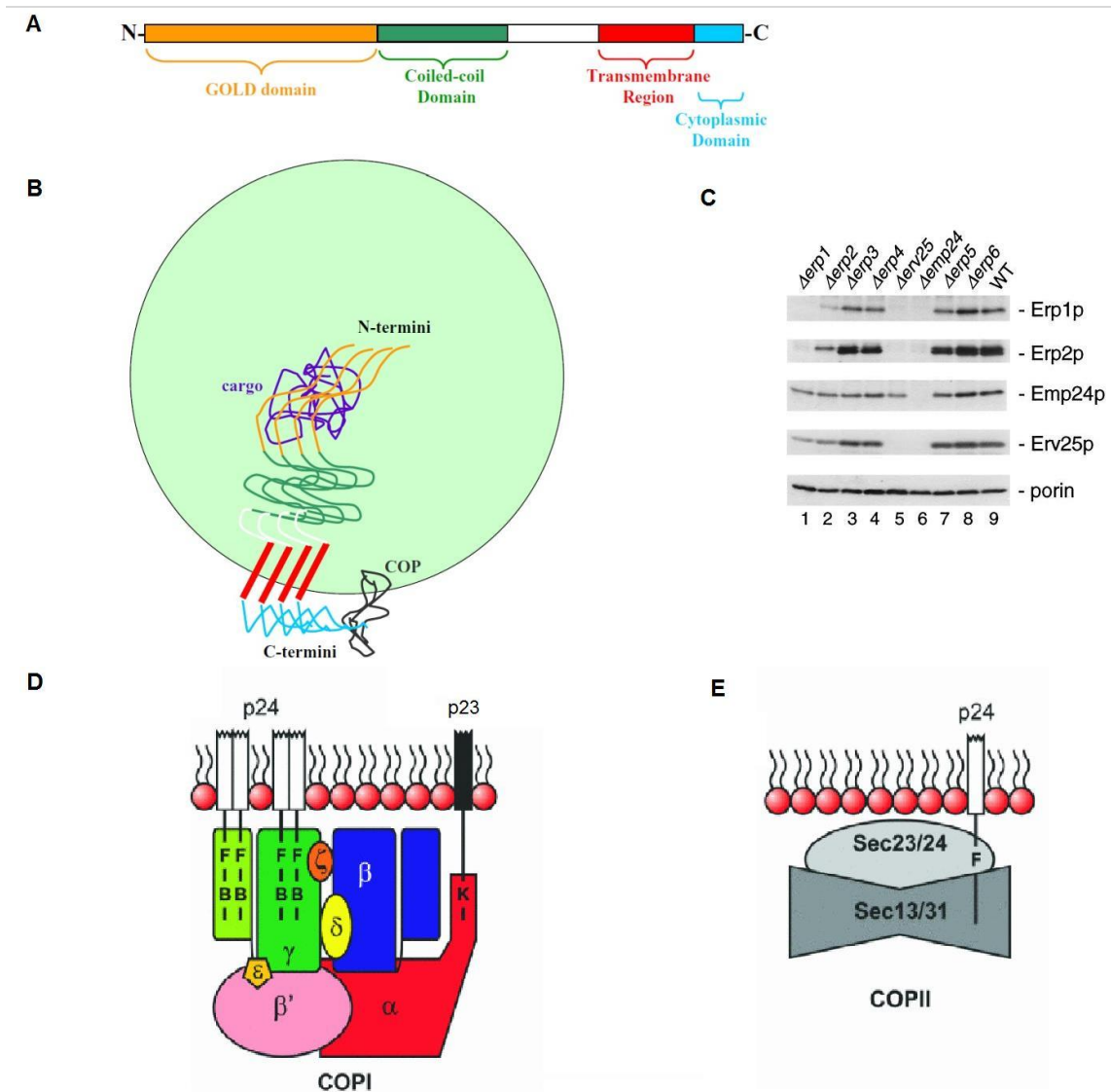


Figura 18. La organización estructural de las proteínas de la familia p24 depende de la oligomerización de sus subunidades.

(A) Estructura de las proteínas p24, destacándose el dominio GOLD, la región *coiled-coiled*, el dominio transmembrana y el tallo citosólico. (B) Representación esquemática del complejo p24 en el RE (Carney & Bowen, 2004). (C) En los mutantes nulos *erv25Δ* y *emp24Δ*, los niveles de proteínas de los otros miembros de la familia disminuyen drásticamente (Marzioch *et al*, 1999). (D y E) Los tallos citosólicos de las proteínas p24 unen específicamente las cubiertas COPI y COPII (Strating & Martens, 2009).

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 18A). El dominio GOLD, llamado así por haberse encontrado en proteínas que funcionan en la dinámica

del Golgi, posee dos cisteínas altamente conservadas que potencialmente generan un puente disulfuro. Se postula que forma una estructura compacta donde dos láminas β se apilan una sobre otra a modo de sándwich. Las asas que conectan las hebras α de la estructura son muy variables lo que podría favorecer la creación de dominios específicos involucrados en procesos de interacción con otras moléculas (Anantharaman & Aravind, 2002). La región *coiled-coil*, que precede a la región transmembrana, es un dominio necesario para la formación del complejo: heterotetrámeros (p24 α +p24 β +p24 δ +p24 δ) o heterodímeros (p24 β +p24 δ) (Figura 18B).

La oligomerización del complejo p24 es esencial para la estabilidad de las propias proteínas p24 en la célula así como para su ciclación 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 uno de los miembros de la familia tiene como consecuencia la disminución de los niveles proteicos del resto de la familia como se aprecia en la Figura 18C. Un proceso similar ha sido descrito en mamíferos, donde el descenso de la expresión de uno de los genes de la subfamilia p24 δ disminuye los niveles proteicos de otros miembros de la subfamilia p24 α (Denzel *et al*, 2000).

Tabla V. Secuencias de las regiones citosólicas de cuatro miembros de la familia p24 en ratón y en *S. cerevisiae*. En naranja, los motivos de carácter hidrofóbico de unión a COPII, en violeta los motivos básicos de unión a COPI (Belden & Barlowe, 2001b; Dominguez *et al*, 1998).

Mamíferos				Levadura			
p25 p24 α_2	p24 p24 β_1	p28 p24 γ_2	p23 p24 δ_1	Erp1 p24 α_1	Emp24 p24 β_1	Erp2 p24 γ_1	Erv25 p24 δ_1
F	F	L	-	F	F	L	Y
F	F	F	F	F	F	F	F
E	E	E	K	V	E	T	K
A	V	D	A	K	V	G	T
K	R	K	K	Q	T	R	K
K	R	R	K	K	S	Q	H
L	V	K	L	I	L	K	I

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 (Figura 18D y E). En la Tabla V se han representado las regiones C-terminales de cada subfamilia de proteínas p24, resaltándose los motivos implicados en los procesos de interacción.

1.4.1.2. Funciones del complejo p24

El complejo p24, 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). La segunda, de carácter general, está relacionada con el transporte retrógrado, ya que participa en la formación de vesículas COPI derivadas del Golgi (Aguilera-Romero *et al*, 2008). No obstante, la regulación de los procesos regidos por el complejo p24 sigue sin estar totalmente descrita. Por esta razón, el objetivo de este trabajo ha sido realizar un análisis funcional en profundidad en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que permita diseccionar molecularmente los mecanismos de actuación del complejo p24 al comienzo de la ruta secretora.

A) Función como receptor de carga

Al igual que las proteínas carga solubles, las proteínas ancladas a GPI son completamente lumbinales, por lo que no pueden interaccionar directamente con la cubierta citosólica COPII para salir eficientemente del RE. Así, necesitan de un receptor de transporte que las capture y acople a las cubiertas. En este sentido, el complejo p24 ha sido descrito como dicho receptor. Inicialmente se observó que las proteínas p24 eran necesarias para el transporte desde el RE de las proteínas ancladas a GPI (Belden & Barlowe, 1996; Schimmoller *et al*, 1995). Posteriormente se demostró que el complejo p24 es necesario para la incorporación de proteínas ancladas a GPI en las vesículas COPII (Muniz *et al*,

2000). Finalmente se demostró que el complejo p24 reconoce a las proteínas ancladas a GPI a través del motivo GPI (Castillon *et al*, 2011). Esta función del complejo p24 como receptor está conservada además en células de mamífero, ya que el silenciamiento de varios genes de la familia p24 retrasa específicamente el transporte RE-Golgi de las proteínas ancladas a GPI (Takida *et al*, 2008), así como diferentes subunidades del complejo son capaces de interactuar *in vivo* en el RE con proteínas ancladas a GPI (Fujita *et al*, 2011). No obstante, aún no se conoce cuál es la señal reconocida por el complejo p24 dentro de la estructura del glicolípido, siendo ésta una cuestión estudiada en este trabajo.

Junto a las proteínas ancladas a GPI, cabe resaltar que la familia de proteínas p24 parecen estar relacionadas con el transporte de otros tipos de proteínas, como la invertasa en levaduras, el receptor acoplado a proteínas G (PAR) (Luo *et al*, 2007) y el receptor T1/ST2 (Gayle *et al*, 1996) en mamíferos; y la proteínas Wnt en *D. melanogaster* (Buechling *et al*, 2011). Finalmente, la proteína p24 TMP21 (p23) se ha relacionado con la regulación de la actividad del complejo presenilina (Chen *et al*, 2006; Dolcini *et al*, 2008), responsable del procesamiento de moléculas como el precursor del β -amiloide (Hasegawa *et al*, 2010; Vetrivel *et al*, 2007). Más recientemente, también ha sido relacionada con el complejo MHC-I (Jun & Ahn, 2011).

B) Papel del complejo p24 en la formación de vesículas COPI

Los modelos actuales que explican la formación de vesículas COPI contemplan que las proteínas carga no son simples pasajeros, sino que tienen un papel activo en la estabilización de las cubiertas al formar parte de los complejos cebadores. En este sentido, el complejo p24 puede desarrollar esta función gracias a que es componente mayoritario de las vesículas COPI y presenta una gran afinidad de unión al coatómero (Fiedler *et al*, 1996; Sohn *et al*, 1996). La principal evidencia que apoya este papel activo proviene de un estudio *in vitro* en el que se comprobó cómo los tallos citosólicos de las proteínas p24 de mamífero dispuestos sobre la superficie de liposomas sintéticos son capaces de estimular la formación de vesículas COPI (Bremser *et al*, 1999). Además, los datos obtenidos por varios estudios estructurales realizados también sobre las proteínas p24 de mamífero, sugieren que el complejo p24 podría promover el ensamblaje de la cubierta COPI en la membrana del Golgi a través de diferentes mecanismos: induciendo cambios

conformacionales en los componentes del coatómero que favorecerían la oligomeración del mismo, regulando la actividad de la Arf-GAP para estabilizar al complejo cebador, y atrayendo específicamente a Arf1-GDP a la membrana del Golgi (Gommel *et al*, 2001; Langer *et al*, 2008; Reinhard *et al*, 1999). Finalmente, se demostró el papel esencial del complejo p24 en la formación de vesículas COPI derivadas de Golgi purificados en condiciones nativas, sin adición de componentes purificados, así como la relación funcional con la ARFGAP Glo3p (Aguilera-Romero *et al*, 2008). A pesar de esta participación clave en el proceso de formación de las vesículas COPI, los mutantes nulos del complejo p24 son viables, gracias a la activación de la UPR (Aguilera-Romero *et al*, 2008; Belden & Barlowe, 2001a). No obstante, aún queda por esclarecer el papel del p24 en la regulación de la actividad Arf1 y cómo ésta se integra en el contexto de la formación de las vesículas COPI.

Por otro lado, el complejo p24 parece estar implicado activamente en el mantenimiento de la organización estructural del aparato de Golgi gracias a su capacidad para interactuar con determinadas proteínas de la matriz de Golgi (Barr *et al*, 2001) y de reclutar a la cubierta COPI (Koepler *et al*, 2010). Dado que en mamíferos se ha estimado que las proteínas p24 representan casi el 30% de las proteínas transmembrana presentes en el Golgi (Rojo *et al*, 1997) es esperable que desarrollen una importante función morfofuncional en el Golgi. En este sentido, el silenciamiento del complejo p24 en mamíferos promueve la hipertrofia del aparato de Golgi (Denzel *et al*, 2000) y la sobreexpresión genera la dispersión del Golgi y la acumulación de membranas del RE (Rojo *et al*, 2000). En este trabajo se ha profundizado en la comprensión de la relevancia del complejo p24 en la homeostasis de la ruta secretora temprana.

Por todo lo anteriormente expuesto, comprender a nivel molecular cómo se regulan las funciones del complejo p24 no sólo aportará el conocimiento específico de éstas sino que contribuirá a comprender mejor de una forma integrada la intensa dinámica de la ruta secretora temprana.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2. Objetivos

La secreción es un proceso esencial y evolutivamente conservado en todas las células eucarióticas. La transferencia de proteínas y lípidos entre los orgánulos membranosos de la ruta secretora está mediada por vesículas que se evaginan de un compartimiento donador y fusionan con el compartimiento receptor adecuado. Este tráfico vesicular depende de una serie de complejos proteicos citosólicos de cubierta, los cuales se encargan de generar las vesículas de transporte, seleccionar las moléculas carga que se han de incorporar en las vesículas y dirigir las vesículas hacia su destino intracelular. Dos tipos de cubierta operan al comienzo de la ruta secretora: COPII en la exportación del retículo endoplásmico (RE), mientras que COPI está implicada en el transporte retrógrado desde el Golgi al RE y entre las cisternas del Golgi. Los mecanismos que coordinan espacio-temporalmente la actividad de estas cubiertas y que son responsables de la homeostasis funcional de los orgánulos secretores no han sido aún dilucidados.

En los últimos años se han obtenido evidencias de la participación de una serie de proteínas integrales de membrana, conocidas como proteínas p24, en el control de la actividad de las cubiertas COPII y COPI. Estas proteínas se asocian entre sí para constituir un complejo heteromérico que cicla constantemente entre el RE y el Golgi. Los estudios previos sugieren que el complejo p24 podría regular múltiples pasos de transporte vesicular mediante el reclutamiento y la estabilización de las cubiertas COPII y COPI en las membranas del RE y Golgi respectivamente.

La finalidad de esta tesis es descifrar los mecanismos moleculares por los que el complejo p24 opera durante el transporte bidireccional que tiene lugar al comienzo de la ruta secretora, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo. Para ello se propone analizar:

1. Los mecanismos reguladores que acoplan el reconocimiento por parte del complejo p24 sus proteínas carga específicas con la biogénesis de vesículas COPII

El complejo p24 actúa como un receptor de carga para la exportación selectiva del RE reconociendo a las proteínas ancladas a GPI y conectándolas con la cubierta citosólica COPII. En este trabajo, se analizará los dominios

implicados en este reconocimiento específico así como los mecanismos que lo regulan y lo acoplan con la formación de vesículas COPII.

2. El papel colectivo de los receptores de carga del RE en el ensamblaje del compartimento *cis* del Golgi

Estudios proteómicos y genéticos sugieren que el complejo p24 juega un papel general cooperando con otros receptores de carga del RE en el mantenimiento de la estructura y función de la ruta secretora temprana. Aquí, se examinará cómo los receptores de carga regulan conjuntamente los procesos de transporte vesicular que conducen a la formación del *cis* Golgi.

3. La regulación ejercida por complejo p24 en la generación de vesículas de transporte retrógrado COPI a partir de la membrana del Golgi

Se analizarán los mecanismos por los que el complejo p24 podría potencialmente regular y coordinar la actividad de diferentes componentes de la maquinaria molecular responsable de la formación de vesículas COPI a partir de la membrana del Golgi.

En definitiva, estudiando el modo de acción del complejo p24 y otros receptores se pretende revelar principios básicos del tráfico vesicular que determinan la integridad estructural y la homeostasis funcional de los orgánulos secretores.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Papel del complejo p24 en la exportación desde el RE de las proteínas ancladas a GPI

3. Resultados y discusión

3.1. Papel del complejo p24 en la exportación selectiva desde el RE de las proteínas ancladas a GPI

Resumen

Las proteínas de secreción, una vez plegadas y ensambladas correctamente, son exportadas desde el RE hasta el Golgi en vesículas de cubierta COPII. La formación de estas vesículas tiene lugar en unas regiones especializadas del RE conocidas como sitios de salida o ERES. La mayor parte de las proteínas de secreción son concentradas previamente en estas regiones antes de incorporarse en las vesículas a través de su interacción con las proteínas de cubierta COPII (Sato & Nakano, 2007). De este modo, las proteínas de secreción que no pueden interactuar con la cubierta directamente, necesitan de un receptor de carga, o adaptador de cubierta, que actúe como puente entre éstas y las proteínas COPII (Dancourt & Barlowe, 2010). Sin embargo, se desconoce actualmente el mecanismo regulador por el que los receptores de carga seleccionan sólo aquellas proteínas que están bien ensambladas y las conectan a la cubierta. Para responder a esta cuestión fundamental y básica se ha estudiado en el presente trabajo la función que desempeña el complejo p24 como receptor de carga específico de las proteínas ancladas a GPI durante su exportación del RE. En primer lugar se determinó que el complejo p24 se comporta como una lectina reconociendo eficientemente a las proteínas ancladas a GPI a través del esqueleto de glicano del propio GPI. Además se ha descrito que dicha interacción ligando-receptor ocurre sólo cuando el glicano ha sido remodelado. Este hecho sugiere que la remodelación del GPI es un mecanismo de control de calidad que asegura la exportación de proteínas ancladas a GPI correctamente ensambladas. Por otro lado, se han obtenido evidencias directas de que el complejo p24 conecta la carga ya pre-concentrada en los ERES con Lst1p, una subunidad específica de la cubierta COPII especializada en la exportación selectiva del RE de las proteínas ancladas a GPI. Es más, este estudio pone de manifiesto que la unión del complejo p24 con las proteínas ancladas a GPI remodeladas estimula el reclutamiento de Lst1p, lo que indica la existencia de un novedoso sistema de control que regularía la tasa de formación de vesículas COPII en base a la cantidad disponible de proteínas ancladas a GPI presentes en sus ERES específicos.

3.1.1. Antecedentes

Como se ha expuesto previamente (**Apartado 1.3.2**) las proteínas ancladas a GPI constituyen una familia dentro de las proteínas de secreción, formada por proteínas solubles asociadas a la cara externa de la membrana plasmática a través del glicolípido GPI donde desempeñan diversas y relevantes funciones fisiológicas (Orlean & Menon, 2007). El GPI, constituido inicialmente por un acil-fosfatidilinositol y un esqueleto de glicano (Man₄-(EtNP)Man₃-(EtNP)Man₂-(EtNP)Man₁-GlcN, siendo Man manosa, EtNP fosfo-etanolamina y GlcN glucosamina (Figura 9, p24); se añade en bloque a las proteínas como una modificación postraducciona en el lumen del RE. Las proteínas ancladas a GPI son posteriormente incorporadas en vesículas COPII y transportadas al complejo de Golgi desde donde alcanzan finalmente la membrana plasmática.

La presencia del glicolípido dota a las proteínas ancladas a GPI de unas características y propiedades bioquímicas únicas que hacen que su transporte intracelular tenga requerimientos diferenciales. De hecho, estas son separadas del resto de proteínas de secreción durante su tránsito por la ruta secretora (Mayor & Riezman, 2004). En levaduras, esta separación tiene lugar antes de la salida del RE, concentrándose en ERES específicos (Castillon *et al*, 2009) y por tanto, viajando hacia el Golgi en vesículas diferentes (Muniz *et al*, 2001). Además, la concentración de las proteínas ancladas a GPI en sus propios ERES no depende de la maquinaria COPII, como sucede para las otras proteínas de secreción, sino que depende exclusivamente de la remodelación que sufre la porción lipídica del GPI (Castillon *et al*, 2009) (Figura 19). Este proceso de remodelación consiste en la deacilación del inositol y la sustitución posterior de los ácidos grasos originales por otros de mayor longitud y más insaturados de tipo diacil-glicerol o ceramida. La enzima Bst1p es la responsable de deacilar al inositol del GPI y su actividad enzimática permite la actuación subsecuente de las enzimas responsables de la remodelación de los ácidos grasos del GPI. Así, Per1p y Gup1p se encargan de sustituir las moléculas iniciales de diacil-glicerol cortas (C: 18) por otras muy largas (C: 26). Posteriormente Cwh43p cambia los ácidos grasos largos del tipo diacil-glicerol largos por ceramidas de la misma longitud (C: 26) (Fujita & Jigami, 2008; Maeda *et al*, 2007) (Figura 20). Se ha propuesto que la adquisición por parte del GPI de un lípido tan largo e hidrofóbico durante su remodelación hace que las proteínas ancladas a GPI muestren afinidad por un entorno lipídico diferencial, lo que conllevaría su concentración en microdominios o balsas

lipídicas enriquecidas en ceramidas. Este hipotético autoensamblaje de las proteínas ancladas a GPI las segregaría de otras proteínas de membrana con mayor afinidad por fosfolípidos dando lugar a la formación de ERES específicos (Castillon *et al*, 2009). En mamíferos el mecanismo de concentración de las proteínas ancladas a GPI en los ERES debe ser diferente al que tiene lugar en levaduras ya que, debido a que la remodelación de los ácidos grasos tiene lugar en el Golgi, sólo se requiere la deacilación del GPI por parte del homólogo de Bst1p, PGAP1.

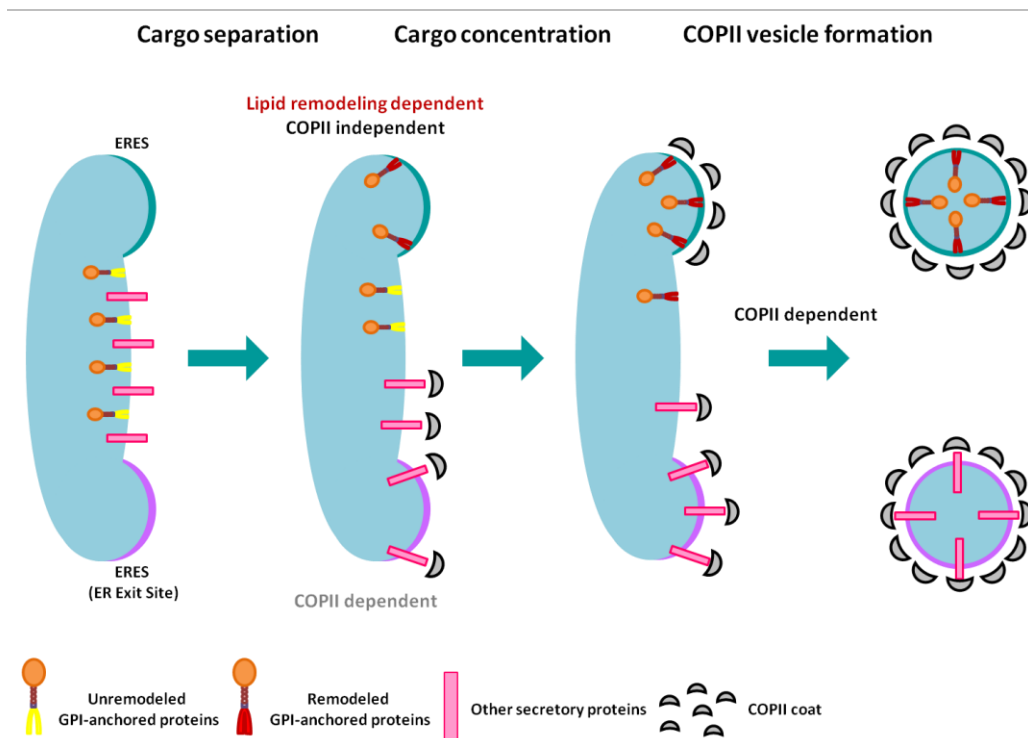


Figura 19. Separación y concentración en ERES específicos de las proteínas ancladas a GPI tras su remodelación lipídica.

Las proteínas ancladas a GPI se separan del resto de proteínas de secreción gracias a la remodelación de la fracción lipídica del propio GPI. Esta remodelación también permite la concentración en ERES específicos de las proteínas ancladas a GPI. El resto de las proteínas de secreción se concentran gracias a su interacción con las cubiertas COPII. Tras la concentración, se produce la incorporación en las vesículas, siendo necesaria la interacción con las proteínas de cubierta COPII. En el caso de las proteínas ancladas a GPI, al ser luminales, emplean el complejo p24 como adaptador.

Una vez que las proteínas ancladas a GPI se encuentran concentradas en sus ERES como consecuencia de la remodelación del lípido del GPI, éstas

deben de incorporarse en vesículas COPII para ser transferidas al aparato de Golgi. Se ha demostrado que la biogénesis de vesículas lipídicas enriquecidas en proteínas ancladas a GPI requiere una maquinaria molecular especializada debido probablemente a las particularidades fisicoquímicas de estas proteínas de secreción. En este sentido, ensayos *in vitro* han puesto de manifiesto que la formación de estas vesículas requiere subunidades específicas de la cubierta COPII, como Lst1p, una isoforma de Sec24p que es la subunidad COPII encargada de capturar la carga (Peng *et al*, 2000). Del mismo modo, se ha propuesto que Sec24C/D, los homólogos en mamíferos de Lst1p, también serían requeridos para este proceso (Bonnon *et al*, 2010). Sin embargo, las proteínas ancladas a GPI, al ser completamente luminales, no pueden interactuar directamente con la cubierta COPII en el citosol, necesitando de un adaptador transmembrana que medie dicha conexión. El receptor de carga descrito para éstas proteínas es el complejo p24, constituido por proteínas transmembrana muy abundantes de tipo I que forman heterotetrámeros, los cuales ciclan constantemente entre el RE y el Golgi (Véase Apartado 1.4.1 p47). En la levadura *S. cerevisiae*, el complejo p24 está formado por las subunidades Emp24p, Erv25p, Erp1p y Erp2p (Marzioch *et al*, 1999). Son múltiples las evidencias que han asentado dicho papel del complejo p24 en *S. cerevisiae*. En primer lugar, la ausencia del mismo provoca la retención selectiva en el RE de las proteínas ancladas a GPI (Belden & Barlowe, 1996; Castillon *et al*, 2009; Schimmoller *et al*, 1995). En segundo lugar, ensayos *in vitro* han probado de forma directa que el complejo p24 es necesario para la incorporación eficiente de las proteínas ancladas a GPI a vesículas derivadas del RE (Muniz *et al*, 2000). Además, el complejo p24 interactúa físicamente de forma directa y específica con las proteínas ancladas a GPI (Castillon *et al*, 2011; Muniz *et al*, 2000).

Este papel del complejo p24 como receptor de carga se encuentra conservado evolutivamente ya que se ha observado en células de mamíferos que el silenciamiento de las diferentes subunidades del complejo p24 produce retrasos en el transporte RE-Golgi de las proteínas ancladas a GPI (Bonnon *et al*, 2010; Takida *et al*, 2008), y que estas proteínas p24 son capaces de interactuar *in vivo* con las proteínas ancladas a GPI (Fujita *et al*, 2011).

Por definición, los receptores de carga son capaces de conectar sus ligandos con la cubierta COPII. En este sentido, estudios previos realizados en levaduras muestran que los tallos citosólicos de las proteínas p24 tienen la capacidad de unir específicamente a las subunidades COPII especializadas en

el reconocimiento de la carga como son Sec24p y su parálogo o isoforma Lst1p (Miller *et al*, 2003). Dado que Lst1p ha sido implicada en la formación de vesículas enriquecidas en proteínas ancladas a GPI, se ha propuesto que el complejo p24 podría conectar Lst1p en el citosol con las proteínas ancladas a GPI en el lumen del RE. Sin embargo, hasta la fecha no hay ninguna evidencia directa que pruebe este modelo. Además, tampoco se conoce el mecanismo que regularía el reclutamiento específico de Lst1p a los ERES enriquecidos en proteínas ancladas a GPI.

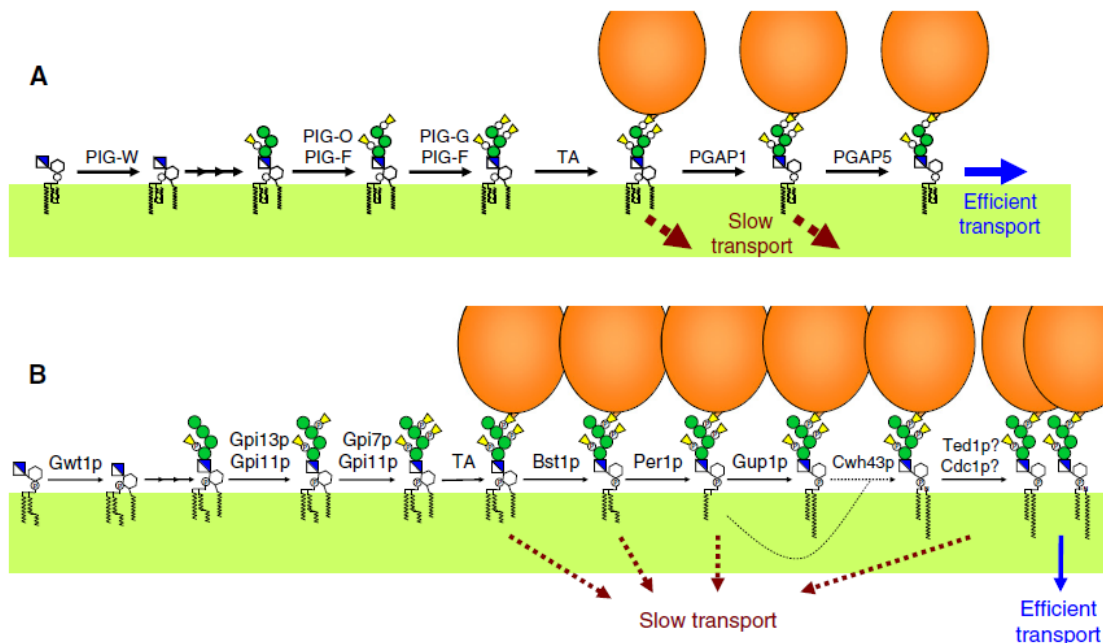


Figura 20. Remodelación del GPI tras el anclaje y transporte de las proteínas ancladas a GPI.

El motivo GPI comienza su síntesis en la cara citosólica del RE, donde se une una GlcN al fosfoinositol. A continuación el GPI es transferido a la cara luminal del RE, donde continúa su biosíntesis. **(A)** En mamíferos, PIG-W añade el grupo acilo al inositol, PIG-O/PIG-F añaden la EtNP a la tercera manosa y PIG-G/PIG-F a la segunda. Después, el complejo GPI-transamidasa (TA) ancla la proteína al GPI. La remodelación posterior del lípido y del glicano del GPI es desarrollada por la deacilasa PGAP1 y la fosfoesterasa PGAP5 respectivamente. La remodelación es necesaria para la salida eficiente. **(B)** En levaduras, Gwt1p añade el grupo acilo, Gpi13p/Gpi11p añaden la EtNP a la tercera manosa, y Gpi7p/Gpi11p a la segunda. Posteriormente se produce el anclaje al GPI de la proteína por el complejo TA. A continuación se produce la remodelación del lípido, que es desarrollada por la deacilasa Bst1p, Per1p, Gup1 (y Cwh43p si la proteína se asocia a ceramida). Se ha propuesto que al igual que en mamíferos, los homólogos de PGAP5, Ted1p y Cdc1p podrían actuar tras la remodelación lipídica del RE (Kinoshita *et al*, 2013).

Nota: el orden de actuación de PGAP5 y sus homólogos es especulativo.

Otra cuestión esencial también por resolver es cómo el complejo p24 reconoce de forma selectiva a las proteínas ancladas a GPI que están preparadas para su exportación del RE. Las evidencias descritas sugieren que el complejo p24 podría interactuar con las proteínas ancladas a GPI a través del glicolípido remodelado, ya que se ha observado una mayor afinidad del complejo p24 por aquellas proteínas que han sufrido la remodelación del lípido en su GPI (Castillon *et al*, 2011). Por otro lado, se ha descrito recientemente en mamíferos que además del lípido, también el esqueleto de glicano del GPI se remodela. Este proceso de remodelación consiste en la eliminación de la etanolamina-fosfato presente en la segunda manosa del esqueleto de glicano del GPI (EtNP-2) y es llevada a cabo por la fosfodiesterasa PGAP5 (Fujita *et al*, 2009). Dicha modificación del GPI ocurre en el RE y también es necesaria para la salida eficiente de las proteínas ancladas a GPI de este orgánulo.

La reacción de remodelación del glicano del GPI descubierta en mamíferos no ha sido descrita hasta el momento en *S. cerevisiae*, aunque la existencia en el genoma de la levadura de dos genes homólogos a PGAP5, *CDC1* y *TED1*, sugiere que se trata de un proceso conservado. En este sentido, Ted1p ha sido relacionado con el transporte de las proteínas ancladas a GPI (Haass *et al*, 2007). Al igual que ocurre con la remodelación del lípido, se ha observado en mamíferos que el complejo p24 interactúa con mayor afinidad con las proteínas ancladas a GPI que han remodelado el glicano (Fujita *et al*, 2011). Por tanto, los datos actuales sugieren que el reconocimiento de las proteínas ancladas a GPI por parte del complejo p24 depende de los procesos de remodelación que sufre el GPI. No obstante, se desconocen todavía los determinantes estructurales que reconoce específicamente el complejo p24 en las proteínas ancladas a GPI remodeladas. También queda por estudiar cómo estos procesos de remodelación del GPI se coordinan entre sí para regular la actividad de receptor del complejo p24 y así poder garantizar la conexión de las proteínas ancladas a GPI con la cubierta COPII.

3.1.2. Resultados

3.1.2.1. Ted1p y no Cdc1p es el ortólogo de PGAP5

Recientemente se ha descrito en mamíferos un proceso de remodelación del esqueleto de glicano del GPI adicional al que sufre la porción

lipídica tras el anclaje del glicolípido a la proteína (Fujita *et al*, 2009). Este proceso es llevado a cabo por la fosfoesterasa PGAP5 y consiste, como se ha expuesto previamente, en la eliminación de etanolamina-fosfato presente en la segunda manosa del esqueleto de glicano del GPI (EtNP-2). En la levadura *S. cerevisiae*, existen dos homólogos de la fosfoesterasa PGAP5, Ted1p y Cdc1p, que contienen el dominio fosfoesterasa y además se localizan también en el RE (Haass *et al*, 2007; Losev *et al*, 2008). De este modo, se quiso analizar si estas proteínas realizan en levaduras el mismo proceso de remodelación del glicano que PGAP5 desarrolla en mamíferos.

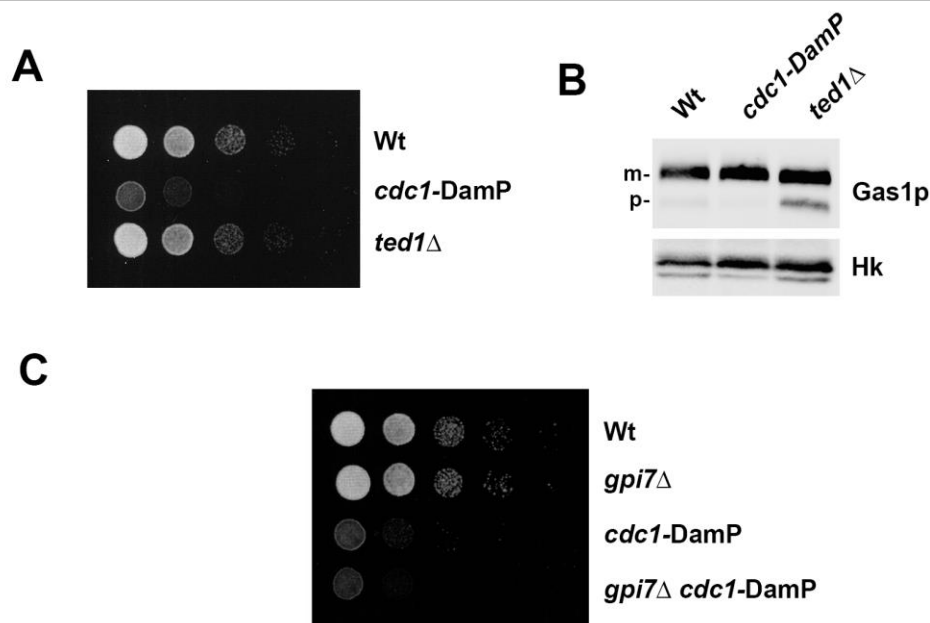


Figura 21. Cdc1p no es el ortólogo en levaduras de PGAP5.

(A) *DamP-cdc1* presenta un defecto de crecimiento, mientras que *ted1Δ* crece como la cepa silvestre (Wt) a 24°C en medio SC. (B) La proteína anclada a GPI Gas1p presenta una forma precursora (*p*) presente en el RE y su forma madura (*m*) glicosilada en la membrana plasmática tras pasar por el Golgi. De este modo, se puede analizar su transporte mediante el análisis por Western Blot de extractos totales, valorando la abundancia de la forma *p* respecto a la *m*. El mutante *DamP-cdc1*, parece no estar afectado, al no acumular la forma de RE (*p*) de Gas1p. Como control de carga se usó la enzima hexoquinasa. (C) La mutación *gpi7Δ* no alivia el defecto de crecimiento que presenta *DamP-cdc1*. La estirpe con ambas mutaciones se obtuvo por cruce y disección de tétradas.

CDC1 es un gen esencial para el crecimiento celular que ha sido relacionado con el metabolismo de fosfolípidos, la organización del

citoesqueleto de actina, la morfología y herencia de los orgánulos a las células hijas (Losev *et al*, 2008; Rossanese *et al*, 2001). Dado que PGAP5 es necesario en mamíferos para el transporte RE-Golgi de las proteínas ancladas a GPI, en primer lugar se comprobó si Cdc1p es también importante para dicho proceso en levaduras. Al tratarse *CDC1* de un gen esencial, no se trabajó con la mutación nula sino que se empleó el alelo *DAmP-cdc1* (*D*ecreased *A*bundance by *m*RNA *P*erturbation-*cdc1*), el cual reduce enormemente la cantidad de Cdc1p presente en las células. Como se puede observar en la Figura 21, la disminución de la cantidad de Cdc1p en el mutante *DAmP-cdc1* es lo suficiente fuerte como para retrasar el crecimiento celular. Sin embargo la proteína Gas1p no muestra una variación significativa en su dinámica de transporte RE-Golgi, lo que sugiere que *CDC1* no es el ortólogo de PGAP5 (Figura 21B). EtNP-2, la etanolamina-fosfato que PGAP5 elimina en mamíferos, es añadida al GPI por la enzima PIG-G. El homólogo de PIG-G en levaduras es la proteína Gpi7p. Por tanto si Cdc1p realizara la misma función que PGAP5 eliminando la EtNP-2, la mutación nula *gpi7Δ* debería ser epistática sobre el alelo mutante *DAmP-cdc1* y recuperar el defecto de crecimiento de éste. En cambio al combinar las dos mutaciones, *gpi7Δ* y *DAmP-cdc1*, no se observó esa posible mejora en el crecimiento (Figura 21C), lo que confirma que Cdc1p no remodela al glicano del GPI eliminando la EtNP-2 como si hace PGAP5 en células de mamíferos.

Tras comprobar que *CDC1* no es un ortólogo funcional en levadura de PGAP5, examinamos la posibilidad de que *TED1* si lo fuera. Estudios previos han puesto de manifiesto que la presencia de Ted1p es necesaria para el transporte eficiente de las proteínas ancladas a GPI (Haass *et al*, 2007). Dado que en mamíferos, dicho requerimiento de transporte depende de la actividad fosfoesterasa de PGAP5, se comprobó si la posible actividad fosfoesterasa de Ted1p también jugaba un papel similar. Con este fin, se introdujeron dos mutaciones puntuales en el dominio catalítico conservado de Ted1p (N2333A, H234A) y se observó que dicha mutación generaba el mismo retraso en la exportación desde el RE de las proteínas ancladas a GPI que el mutante nulo (Figura 22A). A continuación, se quiso valorar si la actividad fosfoesterasa de Ted1p tenía exactamente la misma función que la de PGAP5, es decir, la eliminación de la EtNP-2 del glicano del GPI. Para ello se combinaron las mutaciones *ted1Δ* y *gpi7Δ*. Como se ha explicado en el párrafo anterior, Gpi7p es la enzima que añade la EtNP-2 durante la biosíntesis del GPI. Si realmente Ted1p elimina esa misma EtNP-2 la mutación nula *gpi7Δ* debería ser epistática sobre la mutación *ted1Δ*. Efectivamente, como se muestra en la Figura 22B,

hay una clara epistasia ya que el defecto de transporte de la proteína anclada a GPI Gas1p generado por la mutación *ted1Δ* es revertido completamente por la mutación *gpi7Δ*. Del mismo modo, la localización de la proteína anclada a GPI Cwp2-Venus, que en condiciones silvestres aparece en la membrana plasmática, normalmente enriquecida en el cuello de la célula, se ve alterada en *ted1Δ*, apareciendo retenida en el RE, el cual en *S. cerevisiae* se visualiza como dos anillos, uno perinuclear y otro periplasmático conectados entre sí. De nuevo, la mutación nula *gpi7Δ* es capaz de suprimir la retención en el RE provocada por *ted1Δ* (Figura 22C y D).

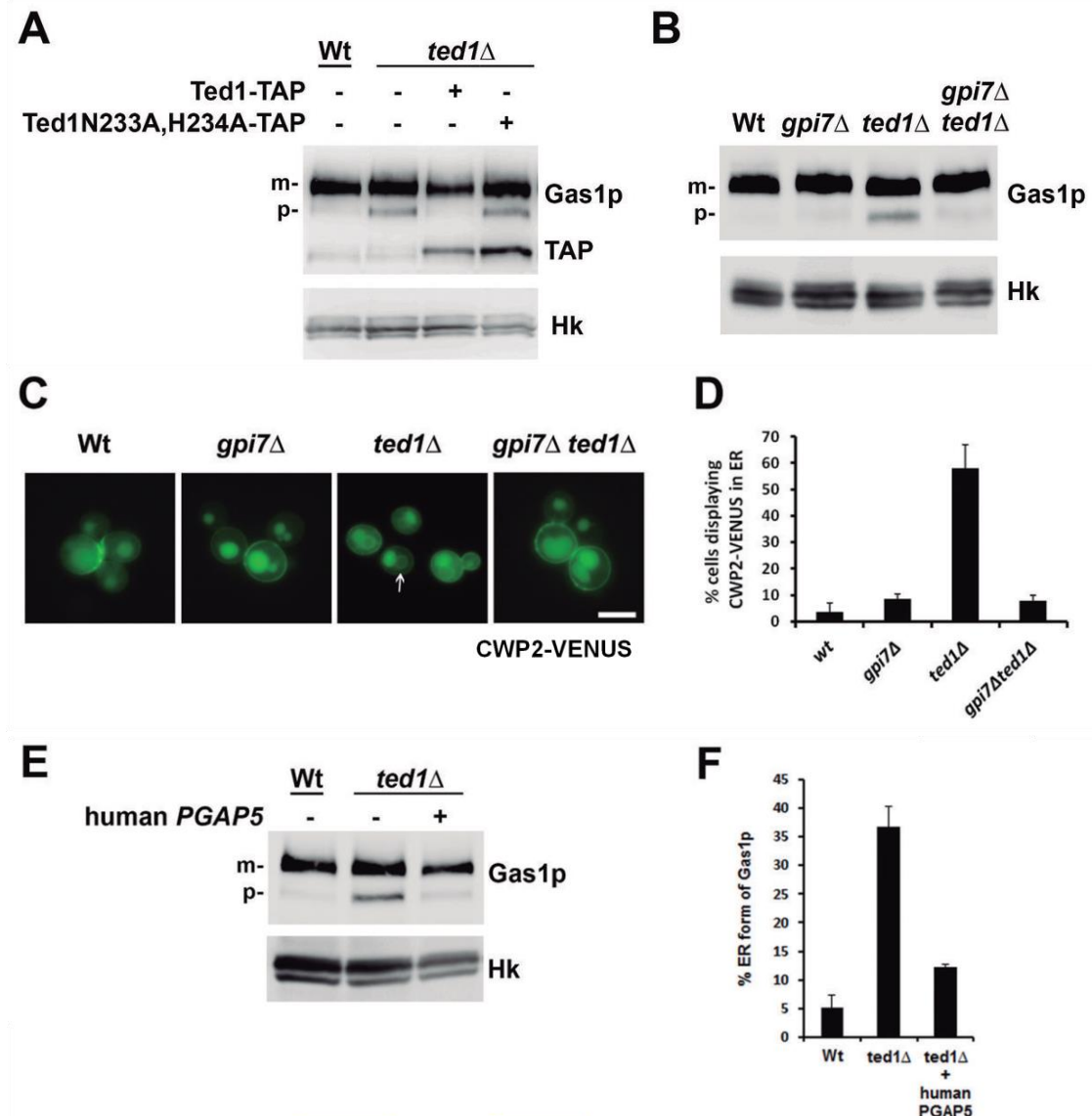


Figura 22. Ted1p es el ortólogo en *S. cerevisiae* de la GPI-remodelasa PGAP5 de mamíferos.

(A) Extractos celulares obtenidos a partir de la estirpe silvestre (Wt) y la mutante *ted1Δ*, transformada con el vector vacío, la copia silvestre de TED1 etiquetada con TAP y la versión mutada *ted1N233A,H234A* etiquetada con TAP respectivamente. Se muestra la forma de RE (p) y madura (m) de Gas1p y la hexoquinasa como control de carga. Las mutaciones puntuales en el sitio catalítico teórico de TED1 retrasan el transporte de la proteína Gas1p como si del mutante nulo *ted1Δ* se tratase. **(B)** La mutación *gpi7Δ* suprime el defecto de transporte de Gas1p presente en *ted1Δ*. **(C)** Imágenes tomadas *in vivo* a 24°C de la localización de la proteína Cwp2p-VENUS ponen de manifiesto que *ted1Δ* acumula la proteína en el RE (anillo perinuclear) y *gpi7Δ* suprime dicho defecto. La barra de escala corresponde a 5μm. **(D)** Análisis estadístico de cuatro repeticiones independientes de las micrografías, cuantificando $n \geq 100$. **(E)** Expresión del ADNc de MPPE1, el homólogo humano de PGAP5, en *ted1Δ*. Se suprime parcialmente el defecto presente. **(F)** Cuantificación por densitometría de cuatro experimentos independientes mostrados en (E).

Además, para demostrar que Ted1p es el homólogo funcional de PGAP5, se probó si la expresión del ADNc del homólogo humano de PGAP5, MPPE1, complementaba funcionalmente al mutante nulo *ted1Δ*. Como se ve en la Figura 22E y F, la expresión de este ADNc reduce drásticamente la acumulación de la forma precursora de Gas1p en el RE presente en dicho mutante. Por tanto, todos estos datos en conjunto permiten proponer que Ted1p, y no Cdc1p, es el ortólogo real de PGAP5, siendo capaz de eliminar del esqueleto de glicano del GPI la EtNP-2 que añade Gpi7p durante la biosíntesis del GPI antes de su anclaje a la proteína.

Una vez comprobado que Ted1p actúa como una remodelasa del glicano del GPI, se investigó su capacidad de reconocer a las propias proteínas ancladas a GPI sobre las que actúa. Para ello se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación en condiciones nativas, disolviendo las membranas con 1% de digitonina. Se observó que mientras Cwp2p-Venus co-precipitaba con Ted1p-TAP no hacía lo mismo con Cdc1p-TAP (Figura 23A), lo que sugiere que Ted1p reconoce específicamente a las proteínas ancladas a GPI y confirma que Cdc1p no posee ninguna función directa en el transporte de dichas proteínas. A continuación, se analizó si la presencia de la EtNP-2 es necesaria para el reconocimiento entre Ted1p y Cwp2p (Figura 23B). Puesto que en la cepa mutante *gpi7Δ* no se observó coprecipitación entre Ted1p-TAP y Cwp2p-Venus, se deduce que Ted1p reconoce a las proteínas ancladas a GPI a través de su sustrato, la EtNP-2, y del mismo modo, que tras cortar la EtNP, Ted1p se disocia de las proteínas ancladas a GPI. Por tanto, se puede utilizar la unión de Ted1p a las proteínas ancladas a GPI como una forma de

medir su actividad fosfoesterasa. Así, a mayor unión más inactiva estará Ted1p y por el contrario, a menor unión más activa se encontrará.

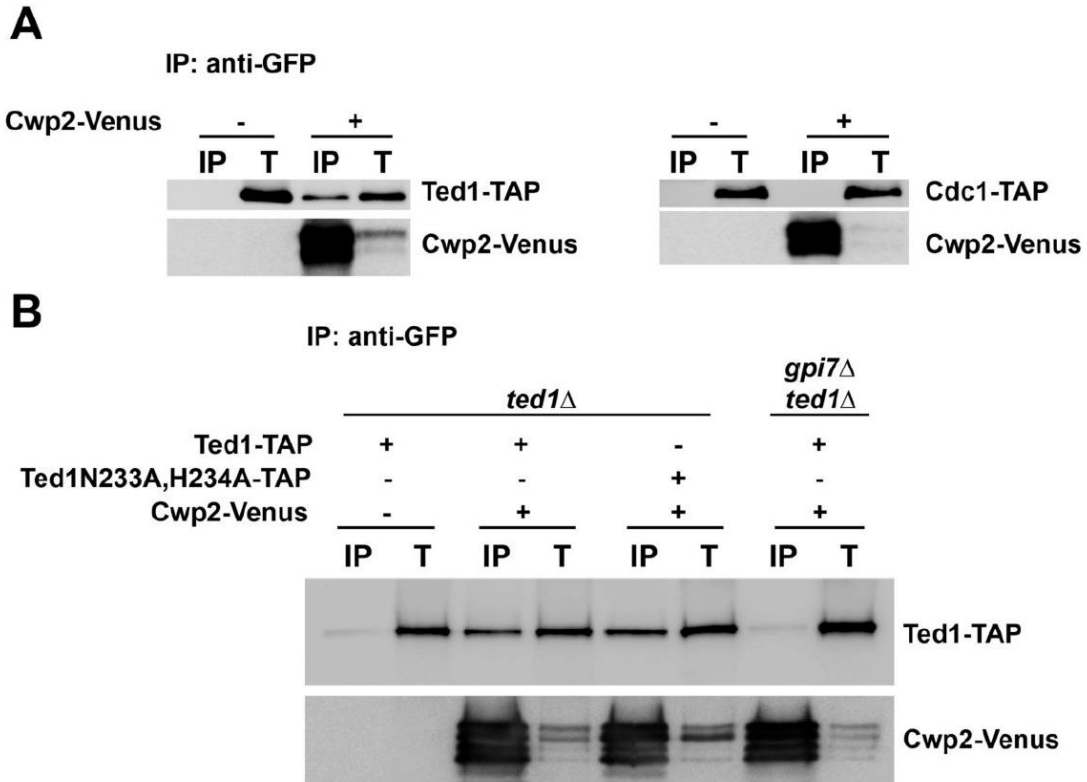


Figura 23. Ted1p une a las proteínas ancladas a GPI a través de la EtNP presente en la segunda manosa del GPI.

(A) Ted1p y no Cdc1p interacciona físicamente con la proteína anclada a GPI en ensayos de co-inmunoprecipitación en condiciones nativas. **(B)** La actividad de Gpi7p es necesaria para el reconocimiento entre Ted1p y Cwp2p. **(A y B)** A partir de extractos celulares se obtuvieron fracciones enriquecidas en RE de cada cepa. Éstas fueron solubilizadas con 1% de digitonina durante una hora. Posteriormente se inmunoprecipitó con anti-GFP y se analizó por Western Blot la presencia de TAP en las eluciones de la inmunoprecipitación (IP). T representa un 1% de la muestra inicial tras la solubilización.

3.1.2.2. La actividad de Ted1p está regulada por Bst1p y es independiente de la remodelación de los ácidos grasos del GPI

Tras la caracterización del proceso de remodelación del esqueleto de glicano del GPI por Ted1p en *S. cerevesiae*, se abordó la cuestión aún sin resolver, tanto en levaduras como en mamíferos, relativa a una posible conexión o coordinación de los procesos de remodelación del lípido y del glicano para garantizar una salida eficiente de las proteínas ancladas a GPI del RE. Para investigar esta posible relación funcional, se analizó en qué momento de la remodelación lipídica ejerce Ted1p su actividad. Con este fin se analizó la co-inmunoprecipitación de Ted1-TAP con Cwp2p-Venus en los diferentes mutantes nulos tanto para el proceso de deacilación del GPI, *bst1Δ*, como para el proceso de remodelación de los ácidos grasos, *per1Δ*, *gup1Δ* y *cwh43Δ*. Así, como muestra la Figura 24A, sólo en el mutante *bst1Δ* se incrementa sustancialmente la eficiencia de coprecipitación respecto a la cepa silvestre. Ya que se demostró previamente que Ted1p se une al GPI a través de la EtNP-2 y se libera tras eliminarla, este resultado parece indicar que en ausencia de Bst1p, Ted1p permanece unida a la EtNP-2 del GPI y por tanto inactiva. Si esta hipótesis fuera cierta, se esperaría que Ted1p se despegara y liberara del GPI al combinar la mutación *bst1Δ* con la mutación *gpi7Δ*, la cual, como se explico anteriormente, hace que el GPI no adquiera la EtNP-2 durante su biosíntesis. Dado que en el doble mutante *bst1Δ gpi7Δ* la unión de Ted1p se pierde (Figura 24B), se puede concluir que la deacilación llevada a cabo por Bst1p regula de manera estricta la actividad fosfoesterasa de Ted1p. Es decir, sólo cuando Bst1p haya actuado deacilando al inositol del GPI, Ted1p es activado, para eliminar subsecuentemente la EtNP-2. Del mismo modo, la eficiencia de unión de Ted1p en los mutantes necesarios para la sustitución de los ácidos grasos (*per1Δ*, *gup1Δ* y *cwh43Δ*) respecto a la cepa silvestre, ponen de manifiesto que la actividad de Ted1p es independiente de la remodelación de los ácidos grasos del GPI. Este último punto fue constatado determinando que *ted1Δ* no afecta a la remodelación de los ácidos grasos. Con este fin, se analizó mediante TLC el estado de maduración del GPI, en colaboración con el Dr. Kouichi Funato de la Universidad de Hiroshima. Como cabía esperar se detectó la presencia de fosfatidil-inositol de 26C en la posición sn-2 (pG1) y de inositol-fosfoceramida (IPC-B), las cuales sólo se forman si Gup1p y Cwh43p actúan respectivamente. Esto confirma que Ted1p no es requerido para la remodelación lipídica (Figura 24C).

El hecho de que Ted1p sea independiente de la remodelación de los ácidos grasos del GPI y este regulado por Bst1p, es interesante ya que en mamíferos las proteínas ancladas a GPI sólo son remodeladas en el RE por las enzimas PGAP1 y PGAP5, homólogos de Bst1p y Ted1p respectivamente. Por

tanto podría estar conservada evolutivamente la regulación que ejerce la deacilación del inositol sobre la remodelación del glicano.

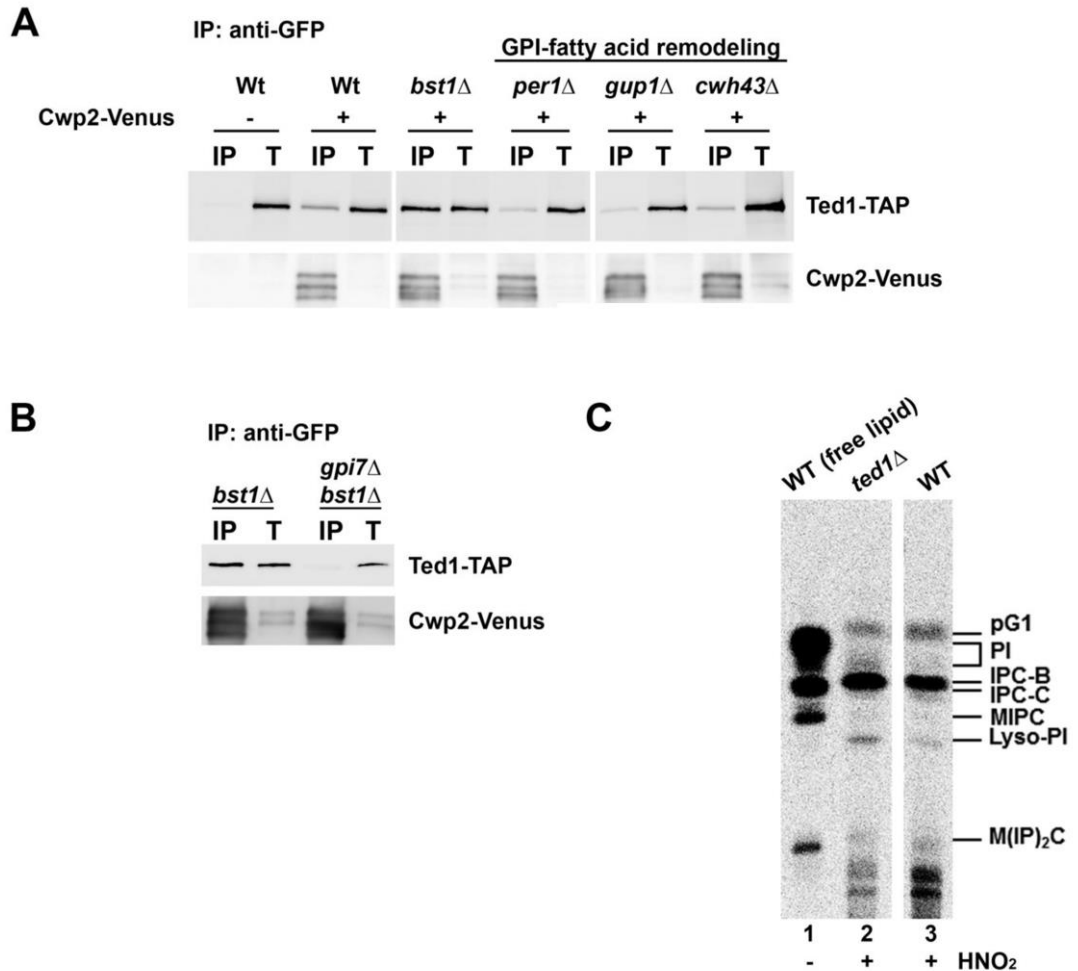


Figura 24. Ted1p es regulado por la GPI-deacilasa Bst1p pero es independiente de la remodelación del ácido graso.

(A) Ted1p está fuertemente asociado a las proteínas ancladas a GPI en *bst1Δ* pero no en los mutantes de remodelación del ácido graso. (B) La EtNP añadida por Gpi7p es necesaria para la unión de Ted1p *bst1Δ*, por tanto, Ted1p no corta la EtNP hasta que Bst1p actúa. (A y B) Ensayos de co-inmunoprecipitación como se han descrito en Figura 23. (C) La mutación *ted1Δ* no afecta a la maduración del GPI. Las estirpes silvestre y *ted1Δ* fueron marcadas con [³H]-mioinositol durante 2 horas a 25°C. Se aislaron las proteínas ancladas a GPI y se separaron los grupos fosfatidil-inositol (PI) usando como solvente (55:45:10 cloroformo-metanol-0,25%KCl). El extracto lipídico total del wt fue usado como control (línea 1). pG1 corresponde con el fosfatidil-inositol de 26C en la posición sn-2; PI con el fosfatidil-inositol; IPC-B e IPC-C inositol-fosforil-ceramida; MIPC manosil-inositol-fosforil-ceramida; lyso-PI liso-fosfatil-inositol; y M(IP)₂C manosil-di(inositolfosforil)-ceramida (Fujita *et al*, 2006a; Ghugtyal *et al*,

2007).

3.1.2.3. El complejo p24 reconoce a las proteínas ancladas a GPI como una lectina gracias a la actividad de Ted1p

Los datos anteriormente expuestos sugieren que en levaduras tras el anclaje de la proteína al GPI, la deacilación de este por Bst1p permite la subsecuente remodelación de los ácidos grasos por un lado y del glicano por otro. Dado que la remodelación de los ácidos grasos conduce a la concentración de las proteínas ancladas a GPI en los ERES, se analizó si la actividad de Ted1p también contribuye a este proceso. Para ello se evaluó la capacidad del mutante nulo *ted1* Δ de formar ERES específicos enriquecidos en proteínas ancladas a GPI utilizando el alelo mutante termosensible de la cubierta COPII *sec31-1*. Sec31p es un componente de la capa externa de dicha cubierta y su pérdida de función permite la concentración de la carga en los ERES pero bloquea la formación de las vesículas COPII a partir de esos mismos ERES.

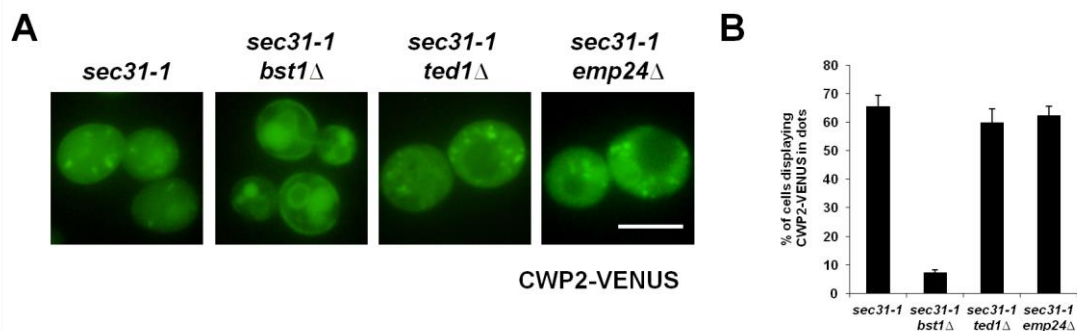
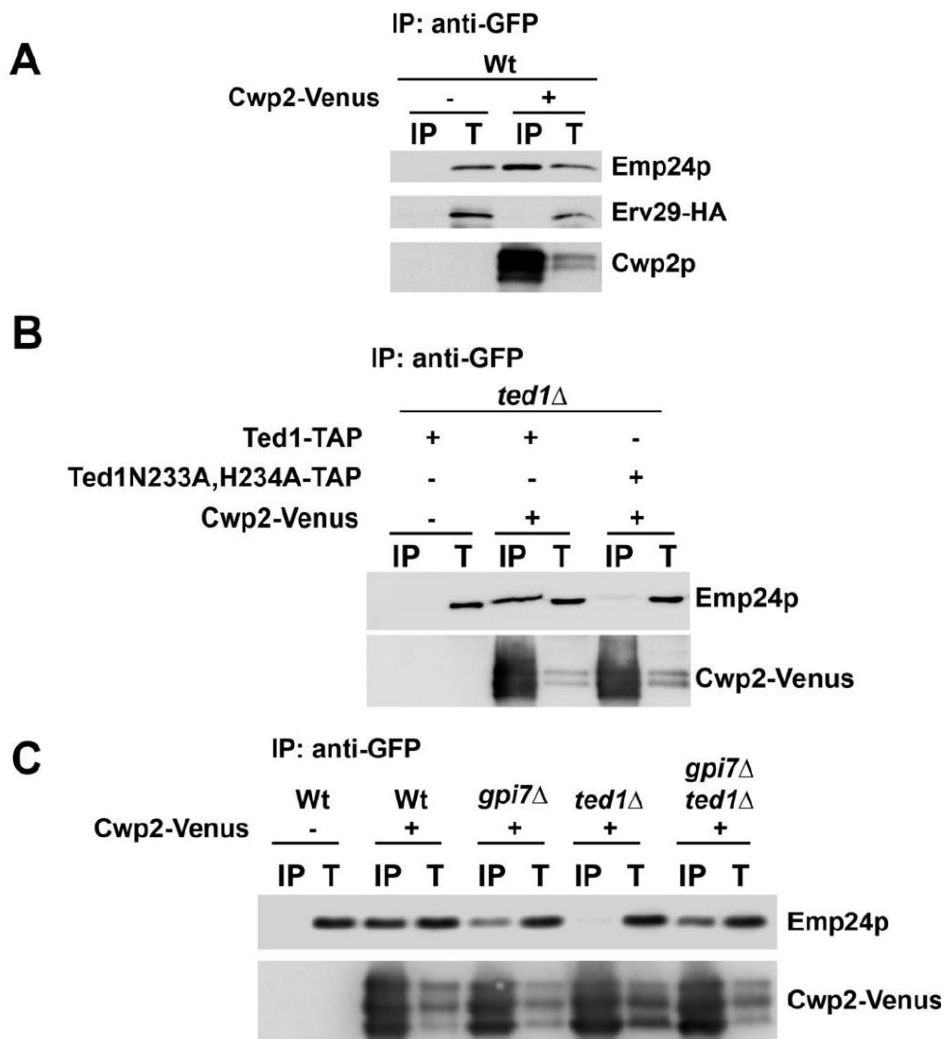


Figura 25. Ted1p no afecta a la concentración en los ERES de las proteínas ancladas a GPI.

(A) La mutación *sec31-1* evita la formación de vesículas COPII, permitiendo así que las proteínas carga se acumulen en los ERES permitiendo su visualización en estos sitios. En el mutante simple *sec31-1* tras incubación a 37°C durante 45 minutos, CWP2-VENUS se acumula en puntos que corresponden a los ERES, mientras que estos puntos no se detectan en *sec31-1 bst1* Δ (Castillon *et al*, 2009). La mutación *sec31-1 ted1* Δ no afecta a la concentración en los ERES, ya que se pueden observar. (B) Recuento y desviación estándar del porcentaje de células que muestran CWP2-VENUS acumulada en ERES, en tres repeticiones independientes con $n \geq 100$. Barra de escala 5 μ m.

Así, tras incubación a temperatura restrictiva células con el alelo mutante *sec31-1* se observa que la proteína anclada a GPI Cwp2p etiquetada con GFP

se localiza en puntos (Figura 25A), los cuales estudios previos ya han demostrado que se corresponden con los ERES específicos de proteínas ancladas a GPI (Castillon *et al*, 2009). Como se puede observar en la Figura 25, mientras que la mutación *bst1Δ* al afectar a la remodelación de los ácidos grasos impide la acumulación de Cwp2-VENUS en los ERES, la mutación *ted1Δ* no interfiere en el proceso de formación de ERES. Este resultado pone de manifiesto que la actividad de Ted1p debe ser necesaria en alguna etapa posterior a la entrada de las proteínas ancladas a GPI en los ERES.



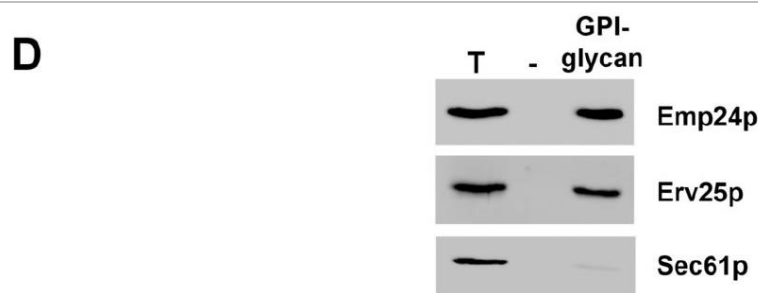


Figura 26. El complejo p24 reconoce a las proteínas ancladas a GPI que han terminado de remodelar el glicano del GPI.

(A) Co-IP entre Cwp2p y Emp24p o Erv29p. La unión entre el complejo p24 y las proteínas ancladas a GPI es específica ya que otros receptores como Erv29p no co-inmunoprecipitan. (B) La actividad de Ted1p regula el reconocimiento entre el complejo p24 y las proteínas ancladas a GPI. (C) La EtNP de la segunda manosa añadida por Gpi7p previene la unión del complejo p24 a las proteínas ancladas a GPI. Las co-inmunoprecipitaciones se hicieron como se explica en la Figura 25. (D) Las proteínas p24 y no otras proteínas enriquecidas en el RE, como Sec61p, reconocen e interaccionan *in vitro* con GPI-glicanos remodelados. Los glicanos sintéticos mimetizan la estructura del glicano del GPI tras la actividad de PGAP5/Ted1p. Estos glicanos fueron conjugados a bolas de agarosa. Tras incubar el extracto celular enriquecido en RE con la matriz, se analizó por Western Blot la presencia de las diferentes proteínas. T representa un 1% de la proteína presente en el extracto.

La proteína Ted1p fue inicialmente identificada en estudios de análisis genético que la relacionaron funcionalmente con el complejo p24, de ahí que la designación de TED1 provenga de *Trafficking of Emp24p/Erv25p-dependent cargo Disrupted 1* (Haass *et al*, 2007). El complejo p24, como ya se ha expuesto anteriormente, actúa como el receptor de carga de las proteínas ancladas a GPI promoviendo su incorporación en vesículas COPII desde sus ERES específicos (Castillon *et al*, 2011; Muniz *et al*, 2000) Dado que el complejo p24, como Ted1p, tampoco contribuye a la concentración en ERES de las proteínas ancladas a GPI (Figura 25) pero sí es necesario para su incorporación en las vesículas (Muniz *et al*, 2000), se estudió una posible cooperación de Ted1p con el complejo p24 en esta función de receptor posterior a la formación de los ERES. Como receptor de carga, el complejo p24 interacciona específicamente con las proteínas ancladas a GPI (Figura 26A). Por tanto, se analizó si la actividad fosfoesterasa de Ted1p es necesaria para este reconocimiento receptor-ligando. En la Figura 26B se observa como en el mutante del dominio catalítico de Ted1p, la proteína p24 Emp24p no co-inmunoprecipita con Cwp2-VENUS. Este resultado concuerda con la

observación previa en mamíferos de que el mutante atenuado de PGAP5 reduce la interacción entre p23 y p24 con las proteínas ancladas a GPI (Fujita *et al*, 2011). Además, este dato sugiere que la presencia de la EtNP-2 previene la unión del complejo p24. Si esto fuera cierto, la mutación *gpi7Δ* debería recuperar la unión entre Emp24p y Cwp2p en la cepa mutante *ted1Δ*. Como se muestra en la Figura 26C, esta hipótesis resultó ser correcta, ya que la co-inmunoprecipitación en *gpi7Δ ted1Δ* es similar a la de *gpi7Δ* y por tanto el complejo p24 sólo reconoce eficientemente a las proteínas ancladas a GPI una vez que se ha eliminado la EtNP-2 por Ted1p.

Los datos anteriormente presentados sugieren la posibilidad de que Ted1p elimine la EtNP-2 para promover la interacción física directa entre el glicano del GPI y el complejo p24. De acuerdo con esta idea, el dominio luminal GOLD de las proteínas p24 parece adquirir una conformación tridimensional de barril- β similar al de proteínas que unen glicolípidos bien caracterizadas como la sialidasa bacteriana o el factor de coagulación Va (Fujita *et al*, 2011). Así, existe la posibilidad de que el complejo p24 se unía a las proteínas ancladas a GPI como una lectina reconociendo directamente al esqueleto de glicano del GPI sin la EtNP-2. Para probar esta hipótesis de forma directa se realizaron ensayos de unión *in vitro* utilizando una matriz de agarosa a la que se conjugó un glicano que mimetiza al esqueleto de glicano del GPI sin la EtNP-2 (en adelante llamado glicano sintético) (Azzouz *et al*, 2010). Como se muestra en la Figura 28D, las subunidades Emp24p y Erv25p presentes en un extracto celular son capaces de unirse a este glicano sintético que tiene la misma estructura que el glicano presente en el GPI tras la remodelación por Ted1p. Además, esta asociación resultó ser muy específica ya que proteínas altamente abundantes en fracciones enriquecidas de RE, como la subunidad del translocón Sec61p, no se unen a la matriz con el glicano sintético. Por tanto, este resultado proporciona una evidencia directa de que el complejo p24 actúa como una lectina reconociendo el glicano maduro de las proteínas ancladas a GPI.

3.1.2.4. Ted1p regula la conexión mediada por el complejo p24 entre las proteínas ancladas a GPI y la subunidad COPII especializada Lst1p

Durante su exportación del RE, las proteínas ancladas a GPI en *S. cerevisiae* son separadas de otras proteínas de secreción a la vez que se concentran en ERES específicos, todo ello como consecuencia de la remodelación de los ácidos grasos del GPI (Castillon *et al*, 2009).

Posteriormente, las proteínas ancladas a GPI ya concentradas son incorporadas en vesículas COPII que las transportan hasta el Golgi. La formación de estas vesículas requiere de una maquinaria COPII especializada, la cual incluye a Lst1p, una isoforma de la subunidad encargada de capturar la carga Sec24p (Miller *et al*, 2003; Peng *et al*, 2000). Así, Lst1p debe de ser atraída de alguna manera selectiva a los ERES específicos que contienen a las proteínas ancladas a GPI. Dado que los tallos citosólicos de las proteínas p24 son capaces de unir a Lst1p además de a Sec24p, se ha propuesto un modelo según el cual el complejo p24 actuando como receptor de carga conectaría a las proteínas ancladas a GPI ya concentradas en los ERES con Lst1p promoviendo por tanto su inclusión en las vesículas COPII que se generen a partir de esos ERES específicos.

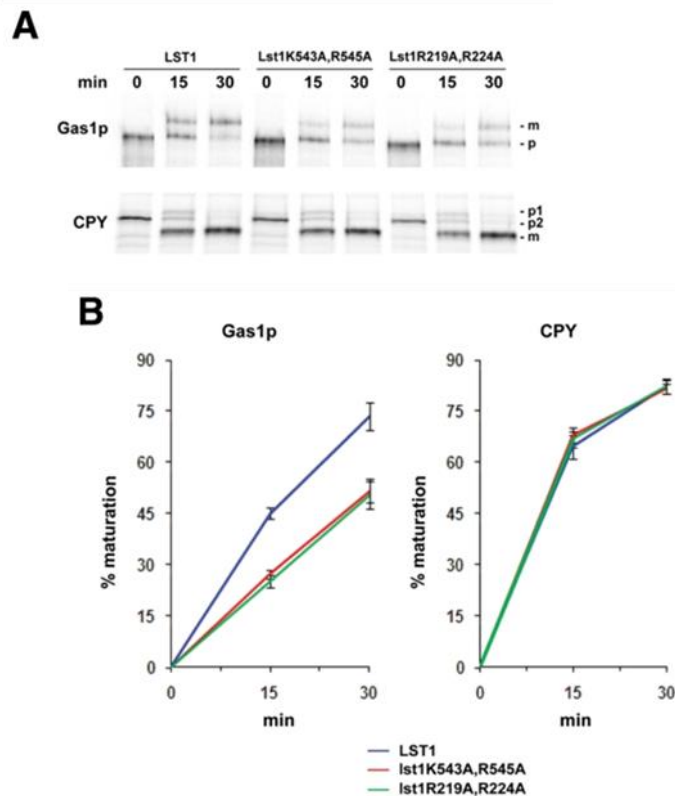


Figura 27. La interacción entre la subunidad COPII Lst1p y el complejo p24 es necesaria para el transporte de las proteínas ancladas a GPI (Castillon *et al*, 2011).

(A) El transporte de la proteína anclada a GPI Gas1p se ralentiza al mutar el bolsillo de unión al complejo p24 de la proteína Lst1p, mientras que el de la proteína CPY no se ve alterado. **(B)** Cuantificación de tres experimentos independientes del porcentaje de forma madura de la proteína respecto a la forma

precursora. **(A y B)** La estirpe *lst1Δ* expresando la forma silvestre o las formas mutantes K543A,R545A y R219,224A. Las células en fase exponencial fueron marcadas durante 5 minutos y recogidas a los tiempos indicados. Tras su lisis se inmunoprecipitaron las proteínas Gas1p y CPY para su posterior análisis. Gas1p muestra dos formas, p, forma precursora del RE; y m, forma glicosilada de Golgi y membrana. CPY presenta tres formas, p1, forma precursora del RE, p2, forma glicosilada del Golgi y m, forma protelizada madura de la vacuola.

Para testar ésta hipótesis, se analizó la influencia en el transporte RE-Golgi de la proteína anclada a GPI Gas1p de dos versiones mutantes de *Lst1p*, incapaces de interactuar con el complejo p24 al tener inutilizados los sitios de unión a los tallos citosólicos de las proteínas p24: K543A, R545A y R219,224A (Miller *et al*, 2003). Como se muestra en la Figura 27, estas mutaciones retrasan específicamente el transporte de Gas1p, mientras que el transporte de otras proteínas de secreción no ancladas a GPI, como CPY, no se afecta. Este resultado apoya claramente la idea de que la función del complejo p24 en el transporte de las proteínas ancladas a GPI consiste en promover la conexión entre éstas y la cubierta COPII a través de la subunidad *Lst1p*.

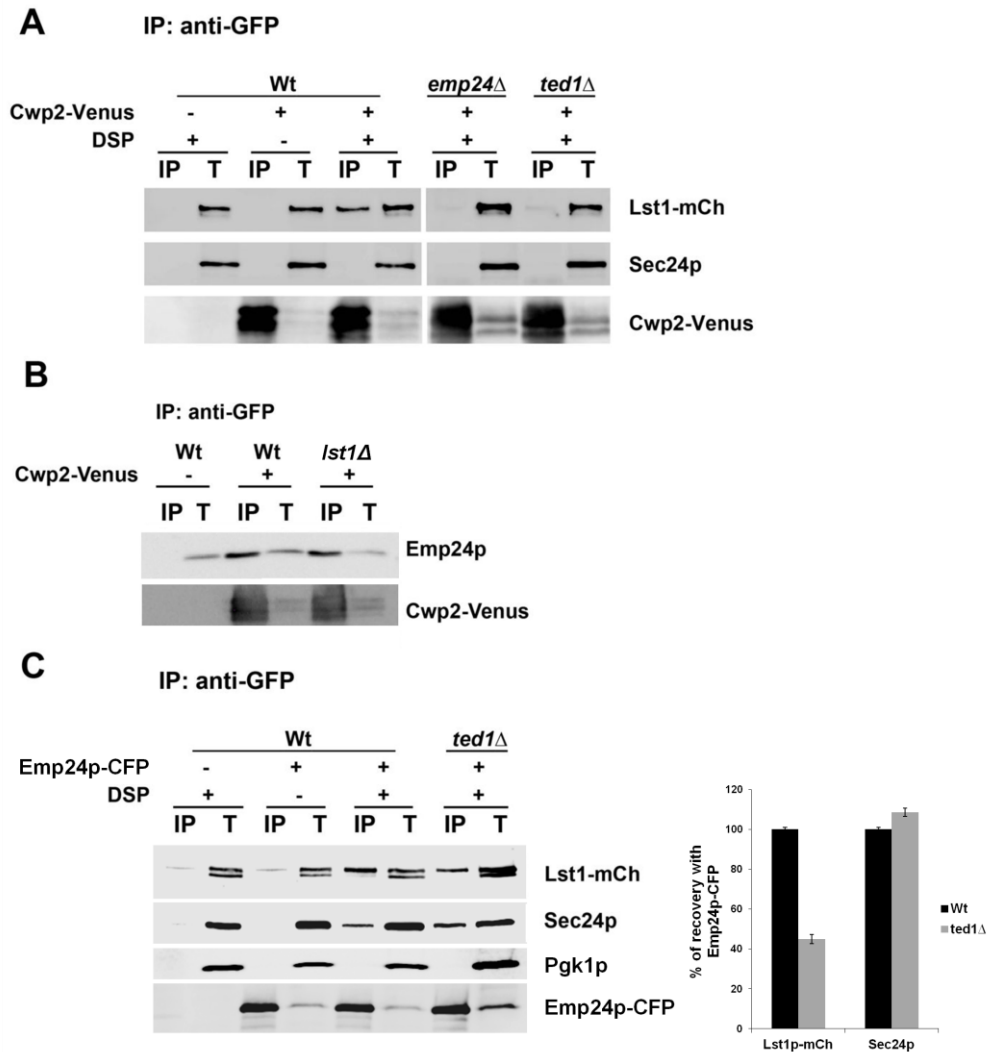


Figura 28. Ted1p regula la función de receptor de carga del complejo p24 que conecta a las proteínas ancladas a GPI con la subunidad de COPII Lst1p.

(A) Cwp2p puede ser unida a la cubierta COPII en presencia del complejo p24 si Ted1p ha eliminado la EtNP. (B) Ensayos de co-inmunoprecipitación en condiciones nativas muestran que la ausencia de *Ist1Δ* no afecta a la interacción entre el complejo p24 y las proteínas ancladas a GPI. (C) Emp24p sólo puede ser unido a Lst1p si Ted1p actúa. (A y C) Fracciones enriquecidas en RE de la estirpe silvestre (wt) y de los mutantes nulos fueron tratadas (+) o no (-) con DSP, solubilizadas e inmunoprecipitadas con anti-GFP. Se analizaron por WB con anti-RFP, anti-Sec24p y anti-GFP. T representa el 1% de la muestra de partida antes de añadir el DSP.

A continuación, se trató de obtener una evidencia más directa de que el complejo p24 funciona como un adaptador que conecta Lst1p con las proteínas

ancladas a GPI utilizando la técnica de *crosslinking*. Para ello se comprobó en primer lugar que Cwp2p es capaz de coinmunoprecipitar con Lst1p pero no con Sec24p tras aplicar el agente DSP a un extracto celular procedente de una cepa silvestre. Como se muestra en la figura Figura 28A, las proteínas ancladas a GPI interaccionan exclusivamente con la subunidad de COPII específica Lst1p y no con la subunidad general Sec24p. Esto justifica el requerimiento de Lst1p para el transporte vesicular de éstas. Posteriormente se observó que Cwp2p no puede ser co-inmunoprecipitado con Lst1p en ausencia del complejo p24, lo que finalmente confirma que éste media la conexión de las proteínas ancladas a GPI con la cubierta COPII y en particular con Lst1p. Además, este papel de receptor o adaptador del complejo p24 resultó estar regido por Ted1p, ya que Lst1p no puede ser co-inmunoprecipitado con Cwp2p en un mutante *ted1Δ*. Consecuentemente, la presencia de la EtNP-2 en el GPI previene la interacción de las proteínas ancladas a GPI con el complejo p24 y por tanto impide su conexión con Lst1p.

Aunque estos experimentos demuestran claramente el papel del complejo p24 como receptor conectando su carga luminal con una subunidad especializada de la cubierta citosólica COPII, no aclaran mecánicamente como se sucede la secuencia de interacciones entre carga, receptor y cubierta. De hecho, estos aspectos básicos también se desconocen para el resto de receptores que operan durante la exportación del RE. Con objeto de abordarlos se analizó en primer lugar si la presencia de Lst1p es necesaria para que el complejo p24 pueda reconocer a las proteínas ancladas a GPI. Como se observa en la Figura 28B, Cwp2p pudo ser co-inmunoprecipitada con las proteínas p24 en un mutante nulo *lst1Δ*. Por tanto, el reconocimiento de las proteínas ancladas a GPI por parte del complejo p24 no depende de la cubierta COPII. Este resultado también podría sugerir que primero interacciona el ligando con el receptor y después se recluta a la cubierta COPII. Para indagar en esta posibilidad se analizó si el reclutamiento de la cubierta COPII por el receptor se ve influenciado por la interacción de este con su carga. Para ello se desconectó al complejo p24 de las proteínas ancladas a GPI utilizando la mutación *ted1Δ* y se evaluó su capacidad para unir Lst1p en esas condiciones. Sorprendentemente se observó que la cantidad de Lst1p unida por el complejo p24 pero no la de Sec24p se reduce considerablemente en una cepa *ted1Δ* respecto a la cepa silvestre mientras Este resultado implica que la interacción del complejo p24 con las proteínas ancladas a GPI estimula el reclutamiento de su maquinaria de COPII específica como Lst1p, lo que podría ser la primera evidencia de que la disponibilidad de carga correctamente ensamblada puede regular la tasa de formación de las mismas vesículas que la exportarían del RE.

3.1.3. Discusión

En este trabajo se describe en levaduras de manera precisa el mecanismo regulador por el que el complejo p24 reconoce selectivamente a las proteínas ancladas a GPI maduras y las conecta con la maquinaria especializada de cubierta COPII necesaria para su exportación selectiva del RE. Los datos obtenidos permiten proponer el siguiente modelo: El anclaje de las proteínas ancladas a GPI sería monitorizado por la deacilasa Bst1p, que eliminaría el grupo acilo del GPI cuando este proceso finalice correctamente. Esta deacilación del GPI induce a su vez los procesos de remodelación de los ácidos grasos y del esqueleto de glicano del GPI. Por un lado, la remodelación de los ácidos grasos realizada por las enzimas Per1p, Gup1p y Cwh43p conlleva la concentración de las proteínas ancladas a GPI en sus propios ERES. Por otro lado, la eliminación de la EtNP-2 del esqueleto de glicano del GPI llevada a cabo por Ted1p permite el reconocimiento directo del glicano remodelado por parte del complejo p24 que actuaría como una lectina. Una vez reclutado el complejo p24 a los ERES específicos de las proteínas ancladas a GPI, este captura a través de los tallos citosólicos de las proteínas p24 la subunidad COPII especializada Lst1p que junto con el resto de subunidades del complejo COPII formará la vesícula lipídica encargada de transportar eficientemente a las proteínas ancladas a GPI hasta el Golgi.

Según este modelo el proceso de remodelación que sufre el GPI podría actuar como un sofisticado sistema de control de calidad que garantiza la exportación del RE de solo aquellas proteínas que han completado correctamente su anclaje. Dado que el complejo p24 reconoce al GPI y no a la parte proteica, la regulación de la actividad de Ted1p por parte de Bst1p puede haber surgido para asegurar que el complejo p24 reconozca al GPI solo cuando este haya sido correctamente anclado a una proteína y no antes. Con este sistema se evitaría que se exportasen prematuramente las moléculas de GPI libres aumentando así la eficiencia del proceso de anclaje. Probablemente este mecanismo de control de calidad se encuentre conservado en mamíferos ya que PGAP1 y PGAP5, los homólogos de Bst1p y Ted1p respectivamente, son las únicas remodelasas del GPI que actúan en el RE. En levaduras, además de promover la remodelación del glicano, Bst1p desencadena en paralelo la remodelación de los ácidos grasos del GPI permitiendo acoplar así

eficientemente los procesos de concentración de las proteínas ancladas a GPI en los ERES y su reconocimiento por la maquinaria de exportación específica.

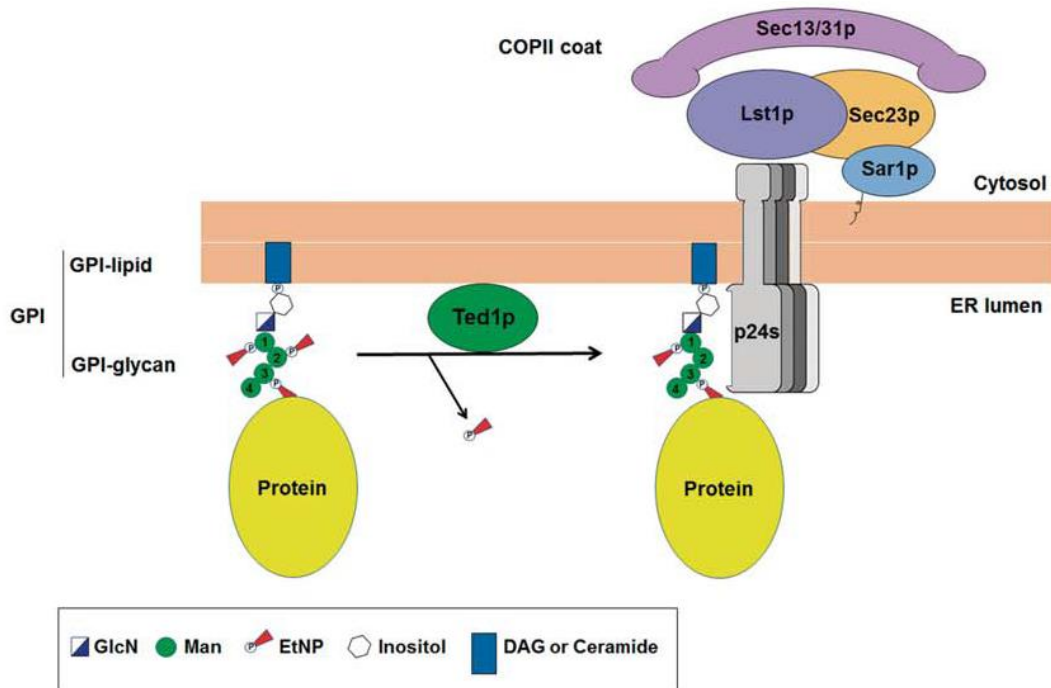


Figura 29. Modelo de actuación del complejo p24 en la exportación de las proteínas ancladas a GPI.

Una vez que la deacilasa Bst1p/PGAP1 ha actuado, la fosfoesterasa Ted1p/PGAP5 elimina la EtNP del glicano del GPI, permitiendo así la unión del complejo p24. Este receptor de carga tras reconocer a su ligando, lo conectaría con las cubiertas COPII para promover su incorporación eficiente en las vesículas. Además, las características especiales de las proteínas ancladas a GPI, requieren de la subunidad específica Lst1p/Sec24C/D, siendo esta reclutada por el complejo p24.

Además los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el papel específico del complejo p24 en la exportación de las proteínas ancladas a GPI es el de conectarlas exclusivamente con la subunidad COPII especializada Lst1p. En este sentido, la mutación nula *lst1Δ* fue originalmente identificada por presentar una letalidad sintética con el alelo mutante *sec13-1* (*Lethal with Sec-Thirteen 1*), lo que implica una estrecha conexión funcional entre Lst1p y Sec13p, una de las dos subunidades que conforman la capa externa de la cubierta COPII (Roberg *et al*, 1999). La función básica de la capa externa al polimerizar es la de constituir el armazón que deforme físicamente la membrana del RE para generar la vesícula COPII. Un estudio reciente propone que Sec13p proporcionaría la suficiente rigidez a la cubierta para generar una

curvatura positiva de la membrana que compense la curvatura negativa creada por la concentración en los ERES de las moléculas carga que son predominantemente luminales como las proteínas ancladas a GPI y las proteínas p24 (Copic *et al*, 2012). De este modo, la presencia de Lst1p en la cara interna de la cubierta COPII podría contribuir a incrementar la rigidez de la cubierta proporcionada por Sec13p en los ERES enriquecidos en proteínas ancladas a GPI mediante el aumento del diámetro de la vesícula naciente (D'Arcangelo *et al*, 2013). De hecho, se ha observado que las vesículas COPII producidas mediante un ensayo in vitro son estadísticamente más grandes si Lst1p está presente durante la reacción de evaginación (Miller *et al*, 2002). Por lo tanto el propósito de reclutar exclusivamente Lst1p por el complejo p24 podría deberse a la necesidad de adaptar la composición de la cubierta COPII a los requerimientos estructurales propios de las proteínas ancladas a GPI y así posibilitar su eficiente incorporación en las vesículas.

Otro aspecto conceptualmente nuevo de los resultados presentados es que el reconocimiento de las proteínas ancladas a GPI por el complejo p24 estimula el reclutamiento de Lst1p. Aunque se desconoce cómo la interacción del ligando con el receptor controla la afinidad de este por la cubierta específica, una posible explicación podría ser la inducción de cambios conformacionales en el propio receptor al igual que ocurre en determinados procesos endocíticos (Goldstein *et al*, 1985). No obstante, este mecanismo permitiría regular la tasa de formación de vesículas COPII en base a la cantidad disponible de proteínas ancladas a GPI presentes en sus ERES específicos. El hecho de que Ted1p regule la unión del complejo p24 a las proteínas ancladas a GPI sugiere es su correcto procesamiento y ensamblaje el que determina en última instancia la formación de vesículas COPII responsables de su transporte al Golgi.

Finalmente, este estudio muestra que la célula posee mecanismos para garantizar que la formación de vesículas COPII sólo se produzca al alcanzarse un valor umbral de proteínas de secreción correctamente ensambladas, mediante la regulación de la afinidad de sus receptores por las proteínas de cubierta.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2. Cooperación del complejo p24 con otros receptores de carga en el ensamblaje del *cis*-Golgi

3.2. Resultados - Cooperación del complejo p24 con otros receptores de carga en el ensamblaje del *cis*-Golgi

Resumen

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 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. Este estudio muestra que el complejo p24 se asocia físicamente con otros receptores de carga del RE contribuyendo colectivamente al ensamblaje del compartimento *cis* del Golgi. Los datos obtenidos sugieren que la plataforma de receptores formada en los sitios de salida del RE facilitaría los eventos de anclaje que promueven la fusión de las vesículas COPII para formar las cisternas *cis* del Golgi *de novo*. De este modo, además de ejercer su función individual exportando del RE sus cargas específicas, los receptores podrían cooperar activamente en el mantenimiento de la estructura funcional de la ruta secretora temprana mediante la creación de una supraestructura que estabilice la cubierta COPII en la membrana de las vesículas promoviendo la incorporación de los factores de anclaje.

3.2.1. Antecedentes

La ruta secretora temprana comprende distintos eventos de transporte vesicular que tienen lugar entre el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi. En las células de mamífero aparece un compartimento membranoso adicional situado entre estos dos orgánulos denominado compartimento intermedio o ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*) (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006; Bonifacino & Glick, 2004). El mantenimiento de la organización estructural y funcional de estos orgánulos requiere del balance entre los flujos de transporte vesicular anterógrado y retrógrado mediados por las proteínas de cubierta COPII y COPI respectivamente (Bonifacino & Glick, 2004). Los mecanismos que coordinan espacio-temporalmente la actividad de estas cubiertas y que son responsables de la homeostasis en la interfase RE-Golgi no han sido aún descritos.

Entre los componentes mayoritarios de las vesículas de transporte COPII se encuentran los receptores de carga del RE. La función primaria de estas proteínas transmembrana, muy conservadas en la escala evolutiva, es precisamente la de conectar la carga con la cubierta COPII para facilitar su transporte vesicular hasta el Golgi. Una vez allí, el receptor debe separarse de la carga y volver rápidamente al RE en vesículas COPI para iniciar una nueva ronda de exportación. Por este motivo, los receptores de carga del RE están continuamente ciclando entre el RE y el Golgi. A pesar de tener una estructura topológica muy diferente entre sí, todos ellos tienen en común su alta capacidad de unión a las proteínas de cubierta así como la necesidad de oligomerizar para salir eficientemente del RE (Dancourt & Barlowe, 2010).

Hasta la fecha se han caracterizado pocos receptores en relación con la gran diversidad de proteínas de secreción que deben ser exportadas del RE. En levaduras los receptores identificados son fundamentalmente las proteínas p24, la proteína Emp47p, así como varias proteínas Erv (*ER vesicle protein*): Erv29p, Erv14p y Erv26p.

- Las proteínas p24 se asocian entre sí para formar el denominado complejo p24, el cual actúa como receptor de carga del RE para las proteínas ancladas a GPI. Su función de receptor está conservada en mamífero. El complejo p24 es el objeto de estudio de este trabajo habiendo sido ya ampliamente descrito tanto en el **Apartado 1.4.1.** como en **Apartado 3.1.**

- 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 además es necesaria para el transporte al Golgi de la proteína Emp46p (Sato & Nakano, 2003), y más recientemente, se ha propuesto a la proteína Ssp120p como un ligando específico (Herzig *et al*, 2012). Esta proteína es homóloga a la ERGIC-53, el receptor de carga del RE mejor caracterizado de mamíferos. ERGIC-53 también se comporta como una lectina que cicla transportando desde el RE al ERGIC proteínas lisosomales como la catepsina C y Z, y los factores de coagulación V y VIII (Mitrovic *et al*, 2008).

- 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, 2001c; Caldwell

et al, 2001). El homólogo de Erv29p en mamíferos es Surf4, aunque aún no se conocen sus proteínas carga (Reeves & Fried, 1995).

- Erv14p es necesario para el transporte de un gran número de proteínas transmembrana multipaso (Castillon *et al*, 2009; Herzig *et al*, 2012; Powers & Barlowe, 2002). Su proteína carga más recientemente descrita es la quitina sintetasa 3, Chs3p, habiéndose colaborado durante esta tesis en el estudio que lo propone con el Dr. Roncero de la Universidad de Salamanca (Sacristan *et al*, 2013). Los homólogos en eucariotas superiores de Erv14p son las proteínas de la familia cornicón, *Cni*. El miembro mejor caracterizado es la proteína *Cni* de *D. melanogaster*, el cual es necesario para la exportación desde el RE del TGF α (Castro *et al*, 2007).

- 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.

Además de estos receptores, existen otras proteínas conservadas en todos los eucariotas, como la pareja Erv41p y Erv46p, que han sido propuestas como receptores de carga, aunque aún no se han encontrado sus posibles ligandos (Orci *et al*, 2003; Otte & Barlowe, 2002).

En la levadura *S. cerevisiae* se ha descrito la existencia de al menos dos vías de transporte diferentes para alcanzar el Golgi desde el RE. Una vía específica que transporta a las proteínas ancladas a GPI y otra general por la que viajan el resto de proteínas de secreción. Estudios previos han puesto de manifiesto que el complejo p24 alcanza al Golgi por las dos vías existentes: por la específica viajando como receptor de las proteínas ancladas a GPI y por la general siendo transportado conjuntamente con el resto de receptores de carga (Castillon *et al*, 2011; Muniz *et al*, 2000). El hecho de que una subpoblación del complejo p24 sea enviada al Golgi por la vía general sin su carga específica sugiere que el complejo p24 podría realizar funciones diferentes o adicionales a la de receptor de carga del RE. En efecto, en levaduras se ha comprobado que el complejo p24 juega un importante papel en el transporte retrógrado Golgi-RE y en células de mamífero se ha propuesto que podría desempeñar diferentes funciones en la organización de la ruta secretora temprana. De hecho, el silenciamiento de una de las subunidades del complejo p24 promueve la hipertrofia del aparato de Golgi (Denzel *et al*, 2000) y la sobreexpresión de la subunidad p23 genera la dispersión del Golgi así como la acumulación de membranas del RE (Rojas *et al*, 2000). Estas funciones adicionales podrían

estar relacionadas con la capacidad del complejo p24 de mamífero de interaccionar, además de con las proteínas de cubierta, con factores de anclaje, como la golgina GRASP-65, necesarios para mantener la estructura del Golgi (Barr *et al*, 2001). En este sentido, otros receptores de carga del RE, como Erv14p en levaduras, también han sido relacionados con factores de anclajes, ya que este receptor es necesario para la localización de la golgina Rud3p (Gillingham *et al*, 2004), así como su homólogo en *D. melanogaster*, cornicón (Cni), interacciona con la golgina GM130 (Castro *et al*, 2007). Por tanto, las evidencias previas sugieren que el complejo p24 y otros receptores de carga del RE como Erv14p, aprovechando su movimiento cíclico entre el RE y el Golgi podrían llevar a cabo múltiples funciones al comienzo de la ruta secretora. Es más un estudio previo realizado en células de mamífero sugiere que los receptores de carga podrían cooperar en la organización estructural del Golgi y del ERGIC potenciando la asociación de la cubierta COPI a la membrana de estos orgánulos (Mitrovic *et al*, 2008).

En este trabajo se ha investigado en levaduras la relación funcional del complejo p24 con los otros receptores de carga y su implicación en el mantenimiento y funcionalidad de la ruta secretora temprana.

3.2.2. Resultados

3.2.2.1. Los receptores de carga forman una plataforma en los ERES

Con objeto de profundizar en el conocimiento de las distintas funciones celulares del complejo p24 en la ruta secretora temprana, se identificaron las proteínas que interaccionan físicamente con la subunidad Emp24p mediante un ensayo de *pull down* (en colaboración con el Dr. Veit Goder, Universidad de Sevilla). Emp24p, etiquetada con el epítipo TAP (*Tandem Affinity Purification*), fue purificada a partir de extractos enriquecidos en membranas del RE y solubilizada 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 30 y en la Tabla VI se muestran las proteínas que se unen con mayor afinidad a Emp24-TAP. Este experimento fue validado por la mayoritaria presencia del resto de componentes del complejo p24 en el eluido. Como se esperaba, las proteínas de cubierta COPII y COPI fueron también co-precipitadas. Además, se detectaron otros receptores de

carga del RE entre las proteínas que interaccionaban, indicando que estos podrían asociarse entre sí a nivel del RE.

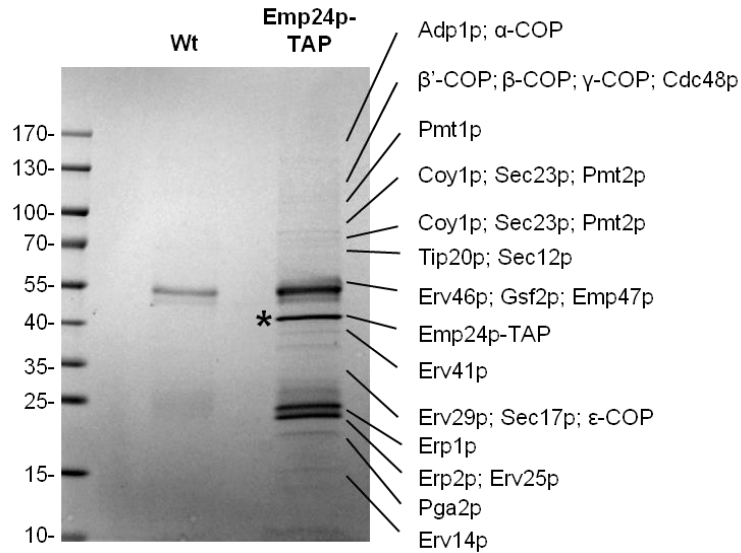


Figura 30. Estudio proteómico de Emp24p-TAP.

La proteína Emp24p etiquetada con el epitopo TAP (*) fue inmunoprecipitada y se analizaron por espectrometría de masas las proteínas co-precipitadas.

Tabla VI. Proteínas que co-precipitan junto a Emp24p-TAP.

Grupo	Proteína	Grupo	Proteína
Proteínas p24	Erp1p	Factores de anclaje	Coy1p
	Erp2p		Dsl3p
	Erv25p		Tip20p
Cubierta COPII	Sec23p	Receptores de carga	Emp47p
	Sec12p		Erv14p
			Erv29p
			Erv41p
Cubierta COPI	α-COP	Proteínas de RE	Adp1p
	β-COP		Cdc48p
	β'-COP		Pmt1p
	γ-COP		Pmt2p
	ε-COP		Gsf2p

Datos obtenidos por Dr. Veit Goder, Departamento de Genética, Universidad de Sevilla.

Para confirmar los datos proteómicos, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación entre los diferentes receptores de carga identificados. Como se puede ver en la Figura 31, al inmunoprecipitar Erv14p-mCi, se coprecipitaron otros receptores de carga como Emp24p, Erv29p y Emp47p, mientras que proteínas muy abundantes en el RE, como la subunidad del translocon Sec61p, prácticamente no se detectaron en el co-precipitado.

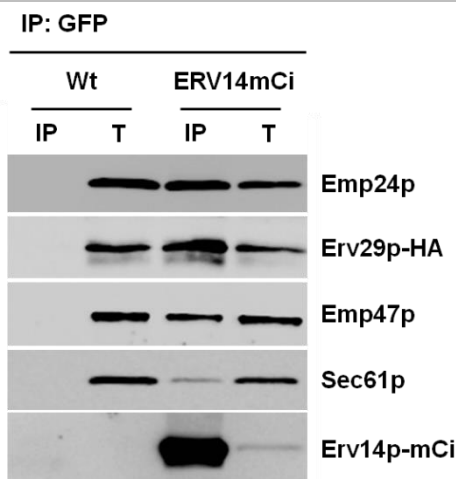


Figura 31. Los receptores de carga interactúan físicamente.

Al inmunoprecipitar Erv14p-mCi a partir de un extracto de proteínas enriquecido en RE, disuelto con 1% digitonina, se observa la coprecipitación de otros receptores de carga, mientras que otras proteínas más abundantes en el RE, como Sec61p, no están enriquecidas. T representa el 1% del extracto antes de la inmunoprecipitación.

Los datos de co-inmunoprecipitación indican que los receptores interactúan entre ellos. Para determinar si forman parte de un mismo complejo se realizó una centrifugación en gradiente de densidad a partir de un extracto solubilizado con digitonina. Las fracciones recogidas fueron examinadas por *Western Blot* (WB). Como se observa en la Figura 32, 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. En cambio, otras proteínas residentes del RE como Sec61p o la subunidad de la transferasa de oligosacáridos, Wbp1p, mostraron un patrón de distribución diferente, indicando que probablemente no forman parte de los mismos complejos de alto peso molecular que los receptores. Como control (Figura 32B), se comprobó que todos los complejos de alto peso molecular se disocian al solubilizar las membranas del RE con Triton-X100, un detergente de mayor fuerza que la digitonina. Finalmente, se confirmó que todos los receptores

analizados forman 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, como se muestra en la Figura 32C.

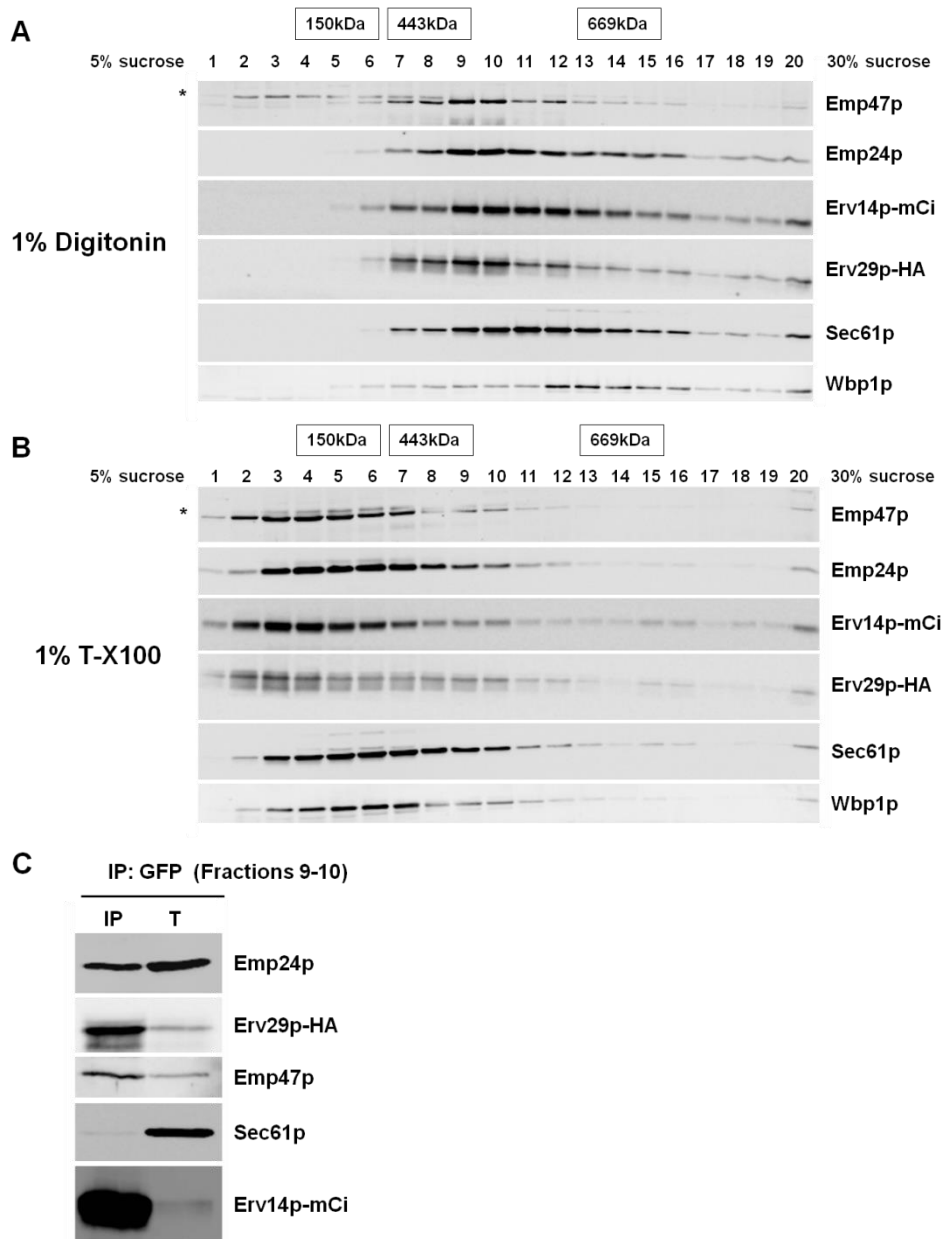


Figura 32. Los receptores de carga forman una plataforma en el RE.

(A) Extractos celulares enriquecidos en 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. **(B)** La presencia en las fracciones 9 y 10 depende del detergente, ya que detergentes con mayor fuerza como el T-X100 eliminan la separación en fracciones. **(A y B)** 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). **(C)** 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.

Los resultados anteriores indican que los receptores de carga se asocian entre sí en el RE formando un complejo mayor de 500kDa. Dado que todos estos receptores deben coincidir en los ERES antes de incorporarse en las vesículas COPII, se analizó si la formación del complejo ocurre en los propios ERES. Para ello, se evaluó si la interacción existente entre los receptores depende de Sec16p, proteína responsable de la organización y formación de los ERES (Connerly *et al*, 2005; Watson *et al*, 2006). Como se aprecia en la Figura 33, la co-inmunoprecipitación de los distintos receptores se reduce drásticamente al incubar la estirpe mutante termosensible *sec16-2* a temperatura restrictiva. Este resultado permite concluir que la asociación de receptores en un gran complejo o plataforma proteica tiene lugar durante su exportación del RE, concretamente a nivel de los ERES.

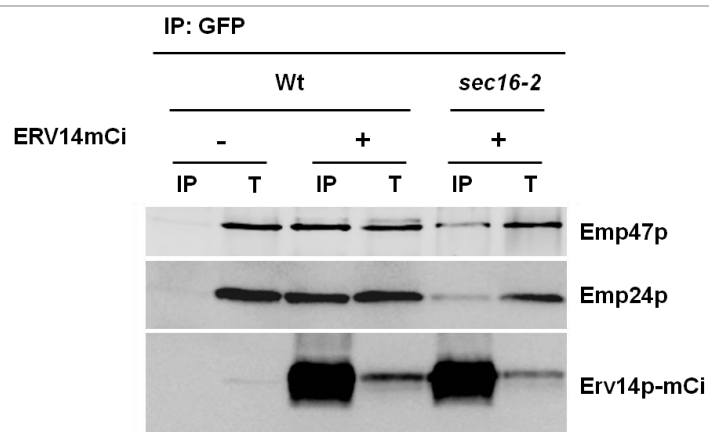


Figura 33. La interacción física entre los receptores de carga depende de Sec16p.

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 31.

3.2.2.2. La plataforma proteica formada en los ERES por los receptores de carga favorece su salida eficiente del RE

Estudios previos han mostrado que cada uno de los receptores de carga oligomeriza normalmente consigo mismo (Emp47p, Erv14p, etc.) o con miembros de la misma familia de proteínas (complejo p24) (Dancourt & Barlowe, 2010). Del mismo modo, se ha puesto de manifiesto que dicha oligomerización es necesaria para salir eficientemente del RE (Sato & Nakano, 2003). En este sentido, la asociación entre los diferentes receptores en los ERES, que les conferiría un estado oligomérico de orden superior al que tendrían individualmente, podría contribuir a mejorar su eficiencia de salida del RE. Si esto es así, la ausencia conjunta de varios receptores debería disminuir el nivel de oligomerización en el complejo, provocando así una salida ineficiente del resto de receptores.

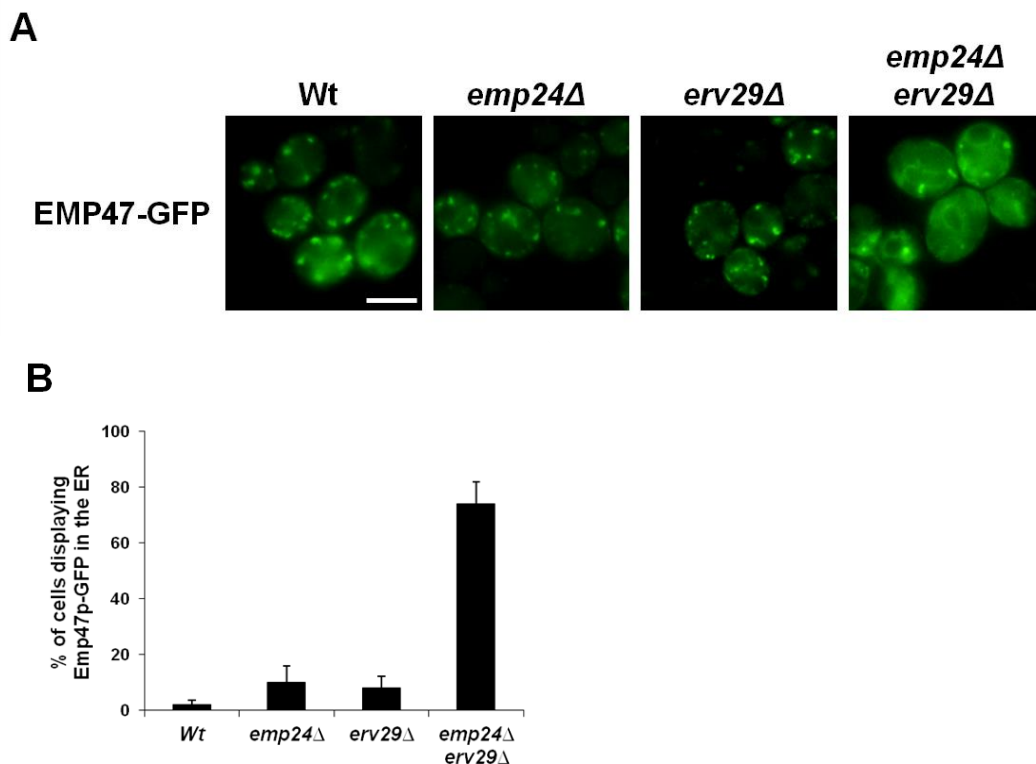


Figura 34. Los receptores de carga favorecen mutuamente su transporte.

(A) Células expresando Emp47p-GFP de los receptores de carga indicados fueron analizadas *in vivo*. En la estirpe *emp24*Δ *erv29*Δ, la localización normal de este receptor se altera, quedando acumulado en el RE y reduciendo su presencia en el Golgi. La barra de escala equivale a 5μm. **(B)** Porcentaje medio de células con la localización alterada de Emp47p en tres experimentos independientes, n≥100.

Esta hipótesis se comprobó analizando la localización de Emp47p en los mutantes simples *emp24Δ* y *erv29Δ* en comparación al mutante doble *emp24Δ erv29Δ*. En la Figura 34, se puede observar como sólo en el doble mutante, el receptor Emp47p-GFP reduce su presencia en el Golgi acumulándose mayoritariamente en el RE. Este resultado sugiere que los receptores favorecen mutuamente su salida del RE al asociarse entre sí en los ERES. Además, el hecho de que sólo en el doble mutante haya retención de los receptores en el RE, apoya la idea de que es necesario alcanzar un determinado nivel umbral de oligomerización para salir eficientemente del RE.

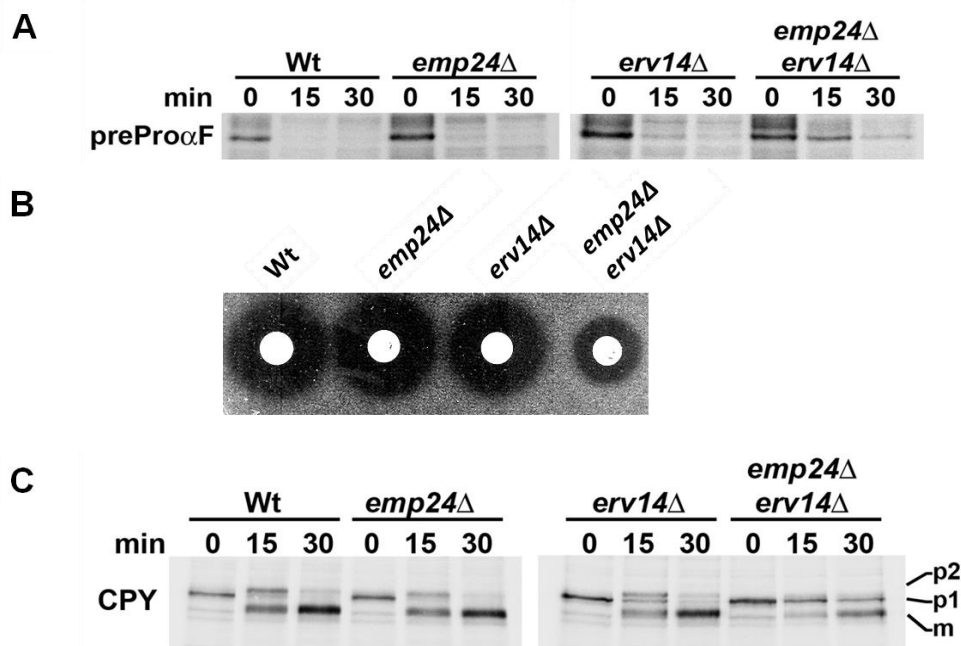


Figura 35. La ausencia combinada de dos receptores de carga afecta al transporte de otras proteínas de secreción diferentes a sus cargas específicas.

(A) La exportación desde el RE del pro-factor alfa se retrasa en ausencia de los receptores de carga mutados. **(B)** La secreción de factor alfa es menor en el doble mutante *emp24Δ erv14Δ*. Sobre un césped de la estirpe hipersensible a factor alfa, RH123, fueron sembradas gotas de 5μl que contenían 10⁷ células y cultivadas a 24°C durante 48 horas. El factor alfa secretado impide el crecimiento del césped generando un halo de inhibición. **(C)** La maduración de la proteína CPY se retrasa en *emp24Δ erv14Δ*. CPY presenta tres formas: p1, precursor en el RE, p2, precursor glicosilado en el Golgi; y m, forma madura proteolizada en la vacuola. **(A y C)** Células en crecimiento exponencial fueron marcadas y seguidas durante los tiempos indicados.

Del mismo modo que un determinado receptor necesita cooperar con el resto de receptores para salir del RE eficientemente, cabría esperar que sus proteínas carga específicas tuvieran también los mismos requerimientos de exportación. Para comprobarlo, se analizó por pulso y caza el transporte RE-Golgi de la CPY y la feromona pro-factor alfa, dos proteínas de secreción solubles exportadas específicamente del RE por Erv29p, ante la ausencia individual y conjunta de otros receptores, el complejo p24 y Erv14p. Así, en la Figura 35A y C, se muestra como el doble mutante *emp24Δ erv14Δ* acumula drásticamente las formas de RE de las proteínas carga de Erv29p. Este estudio se completó analizando mediante un ensayo de halo, la secreción al medio del factor alfa, producto del procesamiento en el Golgi del pro-factor alfa. El diámetro del halo de inhibición del crecimiento generado por *emp24 erv14Δ* es claramente menor que el de los mutantes simples y la cepa silvestre, demostrando que posee un defecto en la secreción de la feromona (Figura 35B). Estos resultados indican por tanto que el receptor de estas proteínas de secreción, Erv29p, depende de la presencia simultánea de los otros dos receptores con los que interacciona para salir eficientemente del RE y así llevar a cabo su función específica de receptor de carga.

Todos estos resultados confirman que los receptores de carga del RE forman una plataforma proteica a nivel de los ERES que facilita el co-transporte de los propios receptores y consecuentemente de sus proteínas carga.

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

Cabe destacar que además de un defecto en el co-transporte de los receptores de carga, los dobles mutantes *emp24Δ erv29Δ* y *emp24Δ erv14Δ* mostraron un claro retraso de crecimiento, en relación a la cepa silvestre y los mutantes simples, lo que implica la existencia de una importante interacción genética entre dichas mutaciones. Es más, el mutante *emp24Δ* también interacciona genéticamente con las mutaciones nulas de otros receptores como Emp47p o Erv41p (Figura 36). Estos datos están en consonancia con los estudios genéticos a escala global donde se detectaron algunas de estas interacciones (Costanzo *et al*, 2010; Jonikas *et al*, 2009; Schuldiner *et al*, 2005).

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, la cual podría estar directamente relacionada con la propia formación de la plataforma de receptores en los ERES o con su salida del RE. Para explorar esta posibilidad se decidió caracterizar fenotípicamente los dobles mutantes, eligiéndose *emp24Δ erv14Δ* ya que es el que muestra mayor grado de interacción genética y por tanto un mayor defecto en el crecimiento.

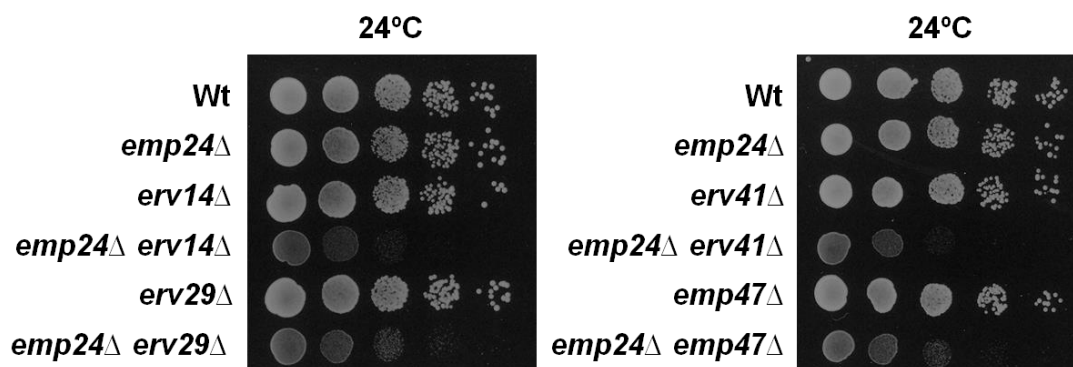


Figura 36. Los receptores de carga interactúan funcionalmente entre sí.

La combinación de dos alelos nulos de receptores de carga reduce fuertemente el crecimiento de las cepas a temperatura permisiva. Las estirpes en crecimiento exponencial en medio SC fueron diluidas de forma seriada a partir de $DO_{600}=0,5$. Gotas de 5 μ l de cada dilución fueron sembradas en placas de medio SC y cultivadas durante 48 horas a la temperatura indicada.

En primer lugar se analizó la influencia de la mutación doble *emp24Δ erv14Δ* en la organización morfológica y estructural de los orgánulos de la ruta secretora temprana (Figura 37 y 38). El RE se detectó mediante el uso de la proteína GFP fusionada al motivo de retención en el RE HDEL (Fujita *et al*, 2006b). Para marcar los ERES se usó la proteína implicada en su propia biogénesis, Sec16p, etiquetada con GFP y como marcador de cubierta COPII se empleó Sec13-mCh (Shindiapina & Barlowe, 2010). Como se muestra en la Figura 37, el RE se encuentra hipertrofiado debido probablemente a un defecto de exportación tal y como se ha descrito para los mutantes de cubierta COPII (Sato *et al*, 1997). Sin embargo, el patrón de puntos típico de Sec16p (Connerly *et al*, 2005) no parece verse afectado, indicando que los ERES se organizan de forma normal en el doble mutante. En cambio, la proteína COPII Sec13p cambia su localización punteada a una más difusa, lo que se podría corresponderse en principio con un defecto de asociación de la cubierta COPII a los ERES, cómo se ha descrito para el mutante *sec23-1* (Shindiapina & Barlowe, 2010).

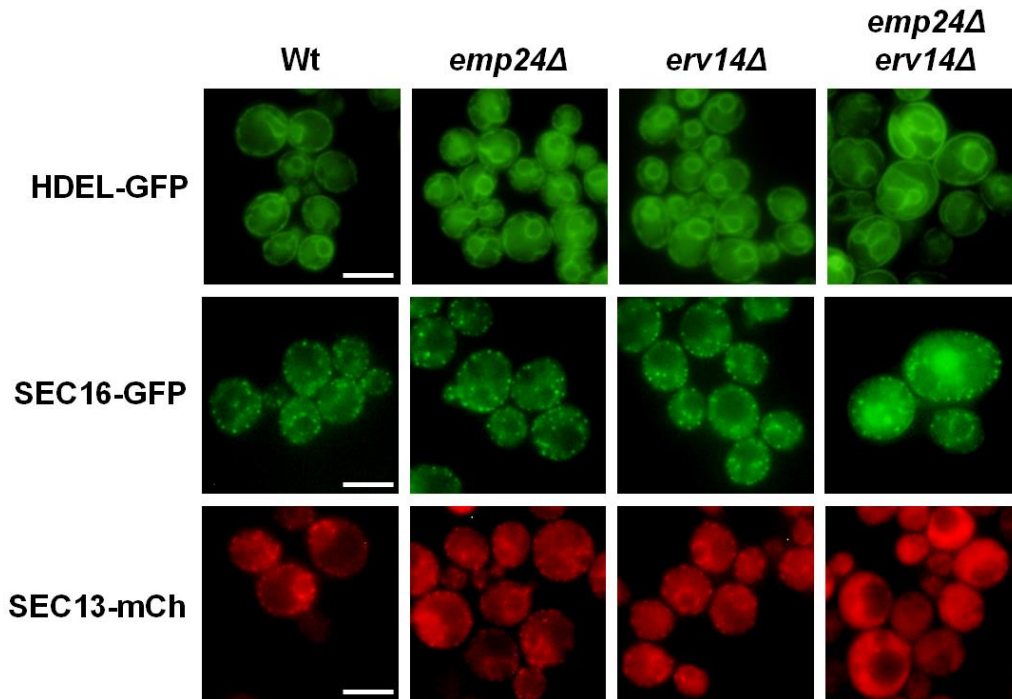


Figura 37. El RE y el *cis*-Golgi aparecen afectados en el doble mutante *emp24Δ erv14Δ*.

Los marcadores del RE HDEL-GFP y Sec13mCh presentan un patrón alterado en el doble mutante. En cambio, la localización de Sec16p no cambia. La acumulación de membranas de RE y la deslocalización en puntos de Sec13p son defectos típicos de mutantes COPII. Células expresando los marcadores fluorescentes creciendo en fase exponencial fueron analizadas *in vivo* al menos en tres ensayos independientes para cada marcador. Al menos el 95% de las células analizadas ($n \geq 100$) presentaban el mismo patrón. La barra de escala equivale a $5\mu\text{m}$.

A continuación se caracterizó morfológicamente al Golgi en el doble mutante *emp24Δ erv14Δ*, utilizándose marcadores etiquetados con GFP o dsRed específicos de cada tipo de cisternas. Para marcar a las cisternas *cis* del Golgi se utilizó Rer1p, proteína que aunque cicla entre el Golgi y el RE se acumula en el *cis*-Golgi, y Anp1p, una enzima glicosiltransferasa del Golgi. Como se muestra en la Figura 38A, ambos marcadores mostraron su localización característica de puntos bien definidos correspondiente a las distintas cisternas *cis* tanto en la cepa silvestre como en el mutante simple *emp24Δ*, volviéndose el patrón levemente más difuso en el mutante simple *erv14Δ*. Sin embargo, este patrón punteado se alteró completamente en el doble mutante, observándose una imagen muy difusa y granulada que podría corresponderse a cisternas de Golgi fragmentadas o vesicularizadas. Este

mismo patrón alterado en el doble mutante se obtuvo para la proteína Sec21p, componente de la cubierta COPI, presente en las membranas del Golgi.

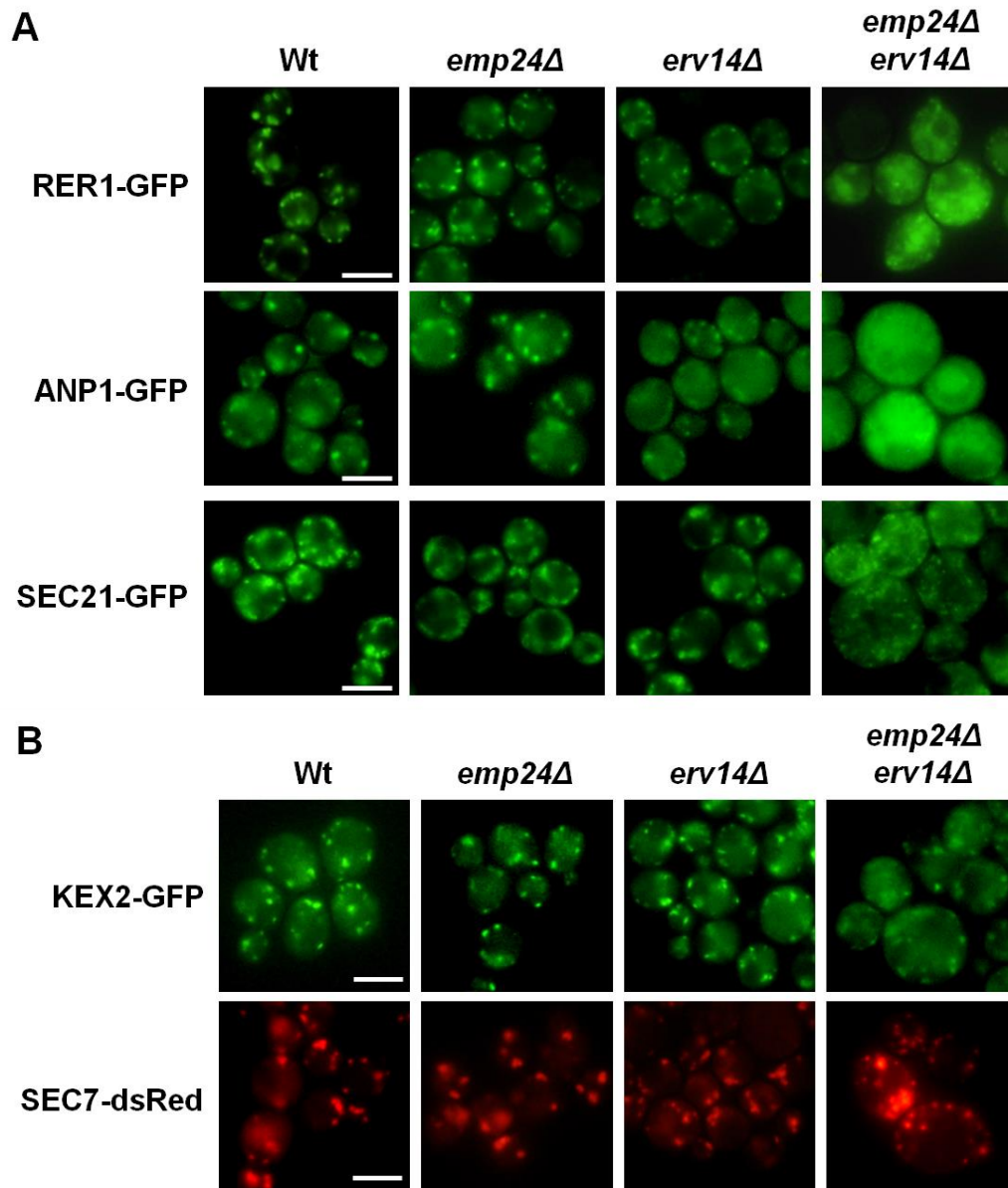


Figura 38. El RE y el *cis*-Golgi aparecen afectados en el doble mutante *emp24Δ erv14Δ*.

(A) En la estirpe doble mutante, los marcadores empleados para analizar el *cis*-Golgi Rer1p y Anp1p, que se muestran en la figura presentan, a diferencia de la estirpe silvestre y los muntantes simples un patrón fragmentado y deslocalizado que podría corresponderse a la fragmentación de las cisternas de Golgi. La proteína COPI SEC21-GFP, que se localiza preferencialmente en *cis*- y *medial*-Golgi también pierde su localización en puntos definidos. (B) Los marcadores de *trans*-

Golgi Kex2p y Sec7p no muestran defectos en el doble mutante. **(A y B)** Células expresando los marcadores fluorescentes creciendo en fase exponencial fueron analizadas *in vivo* al menos en tres ensayos independientes para cada marcador. Al menos el 95% de las células analizadas ($n \geq 100$) presentaban el mismo patrón. La barra de escala equivale a 5 μ m.

Finalmente, se analizó la morfología de las cisternas *trans* del Golgi, empleando para ello los marcadores Sec7p, como proteína que se asocia a las membranas por la cara citosólica y Kex2p, como proteína transmembrana. Sorprendentemente, tanto en los mutantes simples como en el doble, ambos marcadores no mostraron ninguna alteración de la localización punteada propia de las cisternas *trans* del Golgi típicamente observada en la cepa silvestre (Figura 38B). En conclusión, la eliminación simultánea de los receptores provoca la completa disgregación de las cisternas *cis* del Golgi sin afectar aparentemente a las cisternas *trans*.

El análisis morfológico del doble mutante *emp24 Δ erv14 Δ* mostró que la ausencia simultánea de varios receptores de carga altera la ruta secretora temprana, observándose la acumulación de membranas del RE, la deslocalización parcial de la subunidad COPII Sec13p y la disgregación selectiva del *cis*-Golgi (Figura 37 y 38). Con objeto de conocer qué proceso está fallando en el doble mutante, y así poder inferir la función colectiva ejercida por los receptores de carga del RE, comparamos el fenotipo del doble mutante con los fenotipos de otros mutantes bien caracterizados que afectan a etapas concretas de la ruta secretora temprana: el mutante de COPII *sec23-1* bloquea la salida del RE al inhibir la formación de vesículas COPII, los mutantes de los factores de anclaje *bet3-1* y *uso1-1* impiden el reconocimiento y fusión de las vesículas COPII con el *cis*-Golgi y, finalmente, el mutante de coatomero *ret1-1* afecta el transporte retrógrado Golgi-RE e *intra*-Golgi mediado por las vesículas COPI (Sztul & Lupashin, 2009).

Como se observa en la Figura 39, la incubación a temperatura restrictiva de estos mutantes termosensibles produjo en todos ellos la misma acumulación masiva de las membranas del RE observada en el doble mutante *emp24 Δ erv14 Δ* . En cambio, los diferentes alelos termosensibles sí mostraron diferencias respecto a la localización de la proteína residente del *cis*-Golgi Rer1p. Mientras que en el mutante *sec23-1*, Rer1p quedó retenida en el RE debido al fuerte bloqueo que esta mutación ejerce sobre la salida del RE, en el mutante *ret1-1*, Rer1p no se retiene en el Golgi por lo que avanza por la ruta secretora hasta llegar a la vacuola. Estos datos sugieren que el principal

proceso afectado por la ausencia combinada de los receptores no sería la formación de vesículas COPII o COPI. En cambio, en los mutantes de los factores de anclaje *bet3-1* y *uso1-1*, Rer1p se deslocalizó completamente dando lugar a un patrón difuso y granuloso muy parecido al observado en el doble mutante *emp24Δ erv14Δ*. 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 a dicho compartimento.

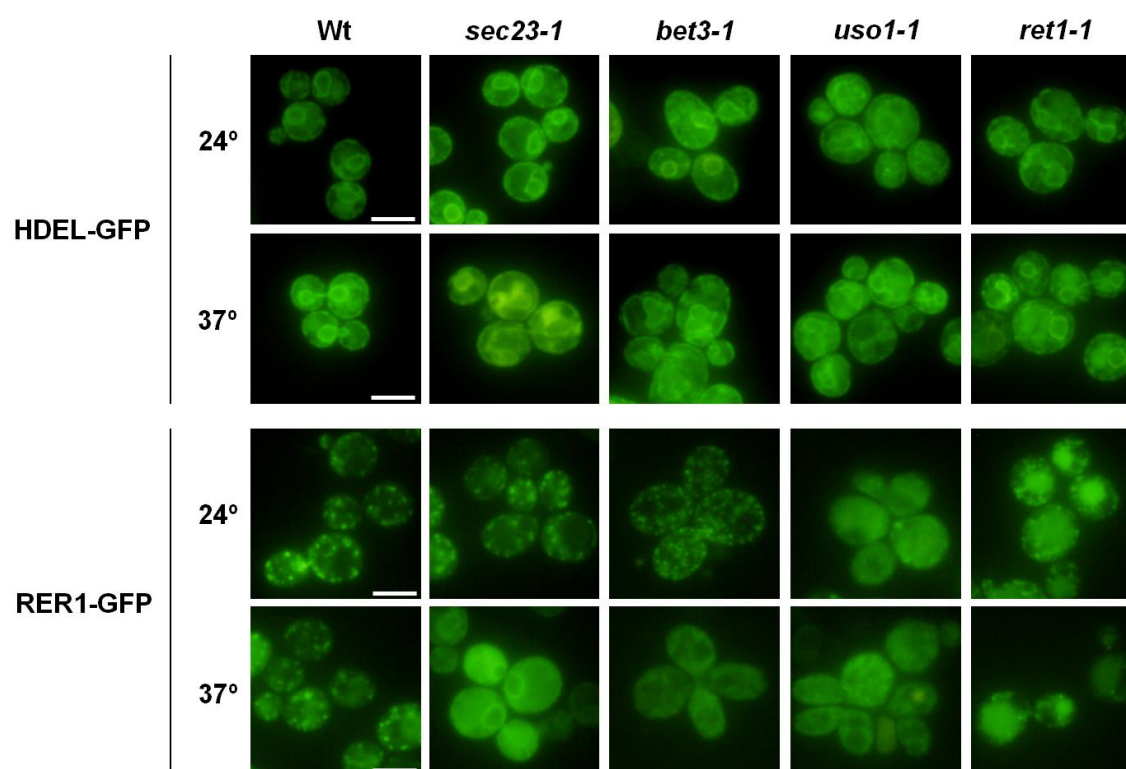


Figura 39. Mutaciones en los factores de anclaje genera defectos similares a la ausencia combinada de varios receptores de carga.

Se estudió la localización del marcador de RE HDEL-GFP y del marcador de *cis*-Golgi RER1-GFP. Las células de la estirpe silvestre muestran la morfología normal del RE en dos anillos y del aparato de Golgi en puntos. El mutante de COPII *sec23-1* presenta hipertrofia del RE y acumulación de las proteínas del Golgi en el RE a temperatura restrictiva. El mutante de COPI *ret1-1* presenta acumulación en la vacuola de las proteínas de Golgi producto del fallo en su reciclaje a 37°C. Los mutantes de la maquinaria de anclaje *bet3-1* y *uso1-1* presentan acumulación de las membranas de RE y fragmentación de los puntos de Golgi. Las células fueron cultivadas durante 36 horas y analizadas *in vivo* a temperatura permisiva o tras 15 minutos 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 5µm.

Para corroborar este aparente defecto de anclaje vesicular con el *cis*-Golgi se analizó a nivel ultraestructural la organización intracelular del doble mutante *emp24Δ erv14Δ*, mediante microscopía electrónica de transmisión.

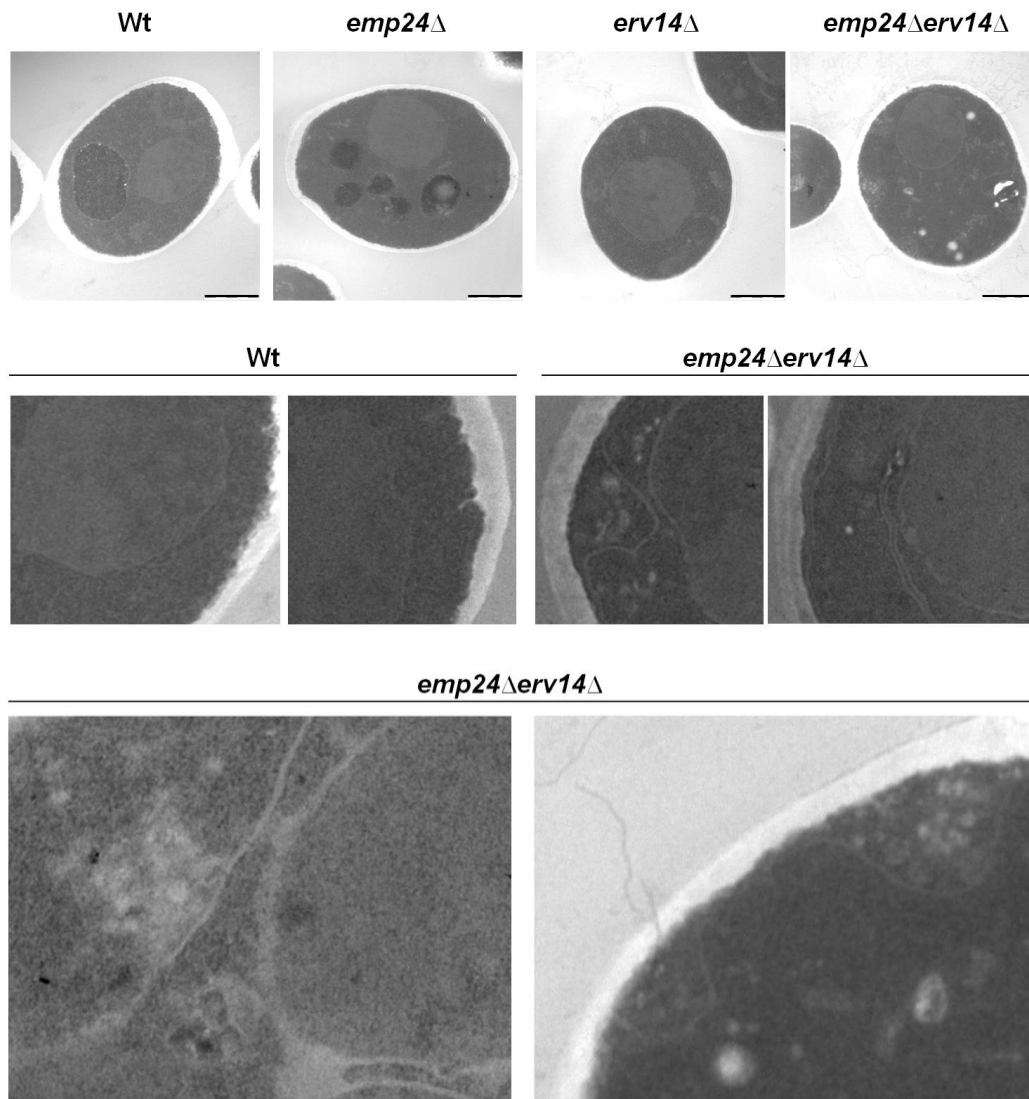


Figura 40. El análisis ultraestructural de *emp24Δ erv14Δ* permite observar vesículas y un engrosamiento del RE.

Células en crecimiento exponencial fueron fijadas e incluidas para su análisis por MET. No se observaron diferencias entre la estirpe silvestre y los mutantes simples, en cambio, en el doble mutante hay un incremento de las endomembranas y mayor abundancia de vesículas. Las imágenes se capturaron 190000 aumentos y se amplió digitalmente para observar mayor detalle.

Como se muestra en la Figura 40, no se aprecian diferencias morfológicas entre la estirpe silvestre y los mutantes simples. En cambio, el doble mutante *emp24Δ erv14Δ* presenta una mayor proliferación de las membranas del RE, así como un claro engrosamiento de las mismas. Además, se observan significativos acúmulos de vesículas, siempre en zonas colindantes con el RE. Estas estructuras vesiculares junto con la acumulación de membranas del RE, son características identificativas de mutaciones que comprometen el anclaje y la fusión de las vesículas COPII con la membrana de la cisterna *cis* del Golgi (Rossi *et al*, 1995).

El proceso de anclaje de la vesícula COPII con la membrana del *cis*-Golgi es un proceso complejo, aun no bien conocido, donde intervienen un gran número de factores proteicos. Entre los factores propuestos se encuentran el complejo multimérico TRAPPI y la pareja de proteínas Grh1p y Bug1p. Estos factores han sido localizados tanto en los ERES como en el Golgi (Behnia *et al*, 2007; Levi *et al*, 2010).

Dado que en el doble mutante *emp24Δ erv14Δ* parece estar afectado seriamente en el proceso de anclaje de las vesículas COPII con el *cis*-Golgi, se evaluó si la localización de los factores de anclaje se veía también comprometida por dichas mutaciones. Para ello se emplearon las versiones etiquetadas con GFP de Grh1p y Bug1p así como de Bet3p, subunidad esencial del complejo TRAPPI. Como se observa en la Figura 41, tanto la estirpe silvestre como los mutantes simples muestran para estos marcadores la típica distribución en puntos que probablemente se corresponda con los ERES y cisternas del *cis*-Golgi. Por su parte, en el doble mutante los distintos marcadores presentan un patrón completamente difuso o citosólico donde los puntos han desaparecido prácticamente en su totalidad. Sin embargo, el complejo COG, que participa exclusivamente en el anclaje de las vesículas COPI de transporte *intra*-Golgi, presenta su distribución típica en puntos tanto en la estirpe silvestre, como en los mutantes simples y en el doble mutante. Por tanto, la ausencia combinada de los receptores de carga del RE provoca la deslocalización generalizada de los factores que anclan las vesículas COPII al *cis*-Golgi, mientras que los factores de anclaje de vesículas COPI, como el complejo COG, aparentemente no se encuentran afectados.

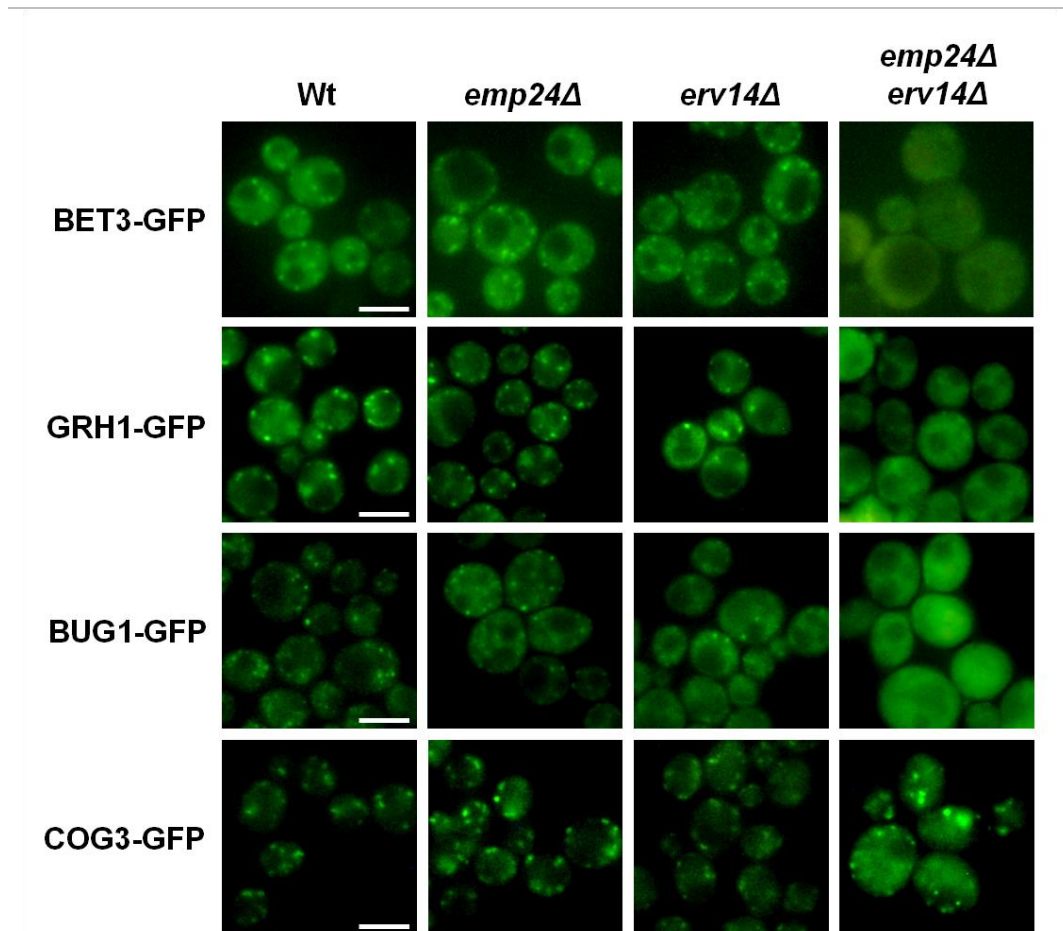


Figura 41. Los receptores de carga son necesarios en su conjunto para la localización de los factores de anclaje de las vesículas COPII al *cis*-Golgi. La localización de los factores de anclaje TRAPPI (BET3-GFP), GRH1-GFP y BUG1-GFP cambia en las células del doble mutante, de la localización en puntos silvestre a un patrón difuso y disperso. En cambio, el complejo COG (Cog3p) no parece estar afectado. Células expresando los marcadores fluorescentes creciendo en fase exponencial fueron analizadas *in vivo* al menos en tres ensayos independientes para cada marcador. Al menos el 95% de las células analizadas ($n \geq 100$) presentaban el mismo patrón. La barra de escala equivale a $5 \mu\text{m}$.

El modelo más aceptado actualmente sobre el mecanismo de anclaje vesicular propone que los diferentes factores de anclaje son inicialmente reclutados a los ERES e incorporados a las vesículas nacientes a través de su interacción específica con la cubierta COPII (Behnia *et al*, 2007; Levi *et al*, 2010; Lord *et al*, 2011). Una vez montados en la vesícula, promueven el anclaje posterior de ésta a las membranas del Golgi. El hecho de que los factores de anclaje Bet3p, Grh1p y Bug1p presenten una aparente distribución citosólica en

el doble mutante *emp24Δ erv14Δ* (Figura 41), podría explicarse si los receptores de carga estuvieran facilitando de forma conjunta el reclutamiento y estabilización de dichos factores en la membrana del RE a nivel de los ERES. Se valoró esta posibilidad utilizando la técnica de subfraccionamiento, mediante la centrifugación diferencial de extractos celulares a 13000g para separar las membranas del RE (P_{13}). A continuación, se comparó la presencia de Grh1p en dicho precipitado respecto a su sobrenadante (S_{13}), observándose un enriquecimiento de dicha proteína en la fracción S_{13} del doble mutante (Figura 42A). Este resultado sugiere que Grh1p requiere la presencia de los receptores para asociarse eficientemente a la membrana del RE

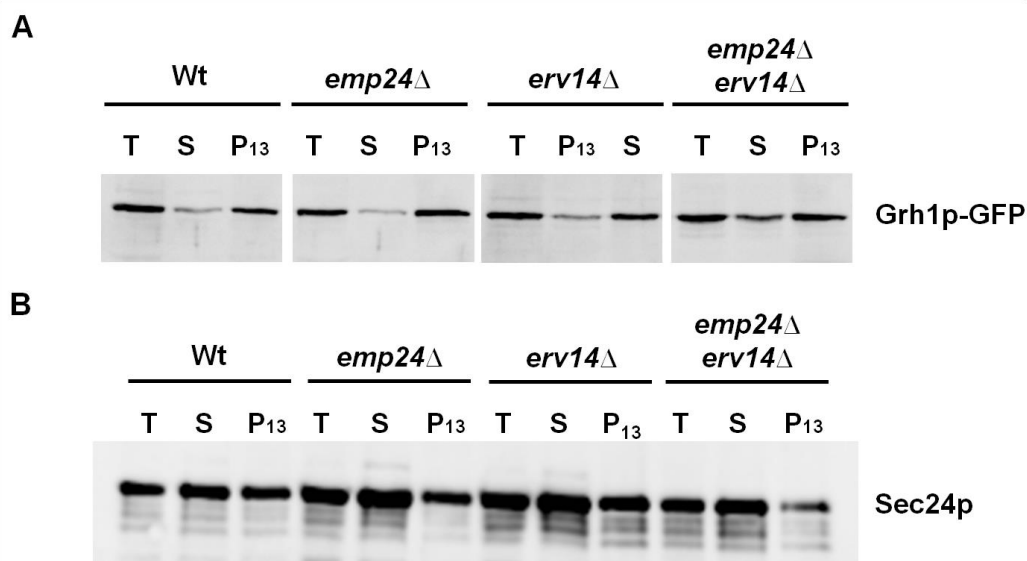


Figura 42. Los receptores de carga son necesarios para la estabilización en RE de los factores de anclaje y las cubiertas COPII.

(A) El factor de anclaje Grh1p se localiza principalmente en las membranas del RE (P_{13}). En cambio, en el doble mutante *emp24Δ erv14Δ* se observa un aumento en el sobrenadante, indicando que hay una reducción en el reclutamiento a las membranas del RE de este factor. **(B)** Del mismo modo, hay una disminución en la cantidad de proteínas COPII asociadas al RE, indicando que los receptores en su conjunto estabilizarían a las cubiertas a las membranas. **(A y B)** A partir de esferoplastos, se realizó un subfraccionamiento por centrifugación diferencial. P_{13} representa las proteínas presentes en membranas del RE. S incluye el citosol y las proteínas presentes en el aparato de Golgi y vesículas de transporte.

Los componentes de los factores de anclaje Grh1p y Bet3p interactúan específicamente con la cubierta COPII, y ésta a su vez es reconocida con gran afinidad por los dominios citosólicos de los receptores de carga (Behnia *et al*,

2007; Lord *et al*, 2011). De esta forma, es posible que los receptores favorezcan la unión de los factores de anclaje a las vesículas nacientes, estabilizando y manteniendo la cubierta COPII sobre estas. Por ello, se analizó mediante subfraccionamiento si la presencia de los receptores, al igual que para Grh1p, también es necesaria para la estabilización de la cubierta COPII en la membrana del RE. Como se aprecia en la Figura 42B, la subunidad COPII responsable de capturar las proteínas carga, Sec24p, está menos representada en la fracción P₁₃ de membranas del RE en el doble mutante que en la estirpe silvestre. Por tanto, los receptores de carga parecen contribuir colectivamente al mantenimiento de la cubierta sobre la membrana de la vesícula naciente, lo que podría facilitar la unión de los factores de anclaje a la misma.

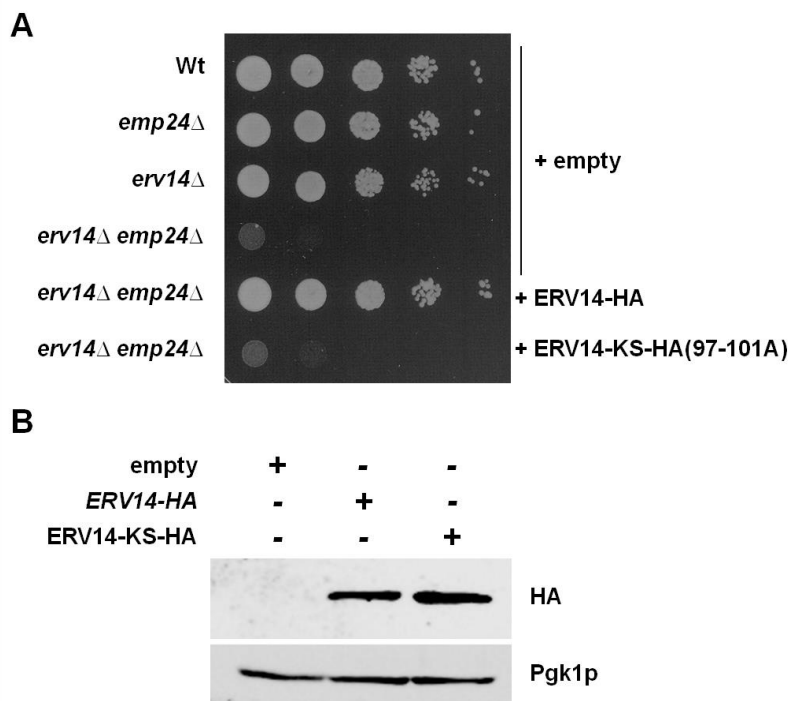


Figura 43. La interacción génica entre los receptores parece estar debida a la deficiencia de unión de las proteínas COPII.

(A) La falta de unión de cubiertas COPII es el origen de la interacción genética entre los receptores de carga. La expresión de la forma silvestre de ERV14 recupera el crecimiento del doble mutante, mientras que sin la señal de unión a COPII (Powers & Barlowe, 2002), el crecimiento está tan ralentizado como en la cepa transformada con el vector vacío. **(B)** Ambas construcciones de ERV14, silvestre y mutada, se expresan a niveles similares en las células.

Si el defecto de anclaje de las vesículas COPII al *cis*-Golgi originado por la ausencia combinada de los receptores de carga, se debería esperar que una versión mutante del receptor de carga Erv14p incapaz de unirse al complejo COPII se comportara a efectos fenotípicos como un mutante nulo (Powers & Barlowe, 2002). Efectivamente, como se aprecia en la Figura 43, la expresión de este mutante específico de Erv14p no pudo complementar el crecimiento del doble mutante *emp24Δ erv14Δ* mientras que si lo hizo la versión silvestre de Erv14p. Este resultado respalda la idea expresada anteriormente de que gracias a la habilidad que tienen los receptores para interactuar con el complejo COPII, los factores de anclaje son retenidos sobre la membrana de la vesícula más eficientemente, favoreciéndose así el subsecuente evento de anclaje y fusión con el *cis*-Golgi.

3.2.3. Discusión

En este trabajo se han aportado evidencias que indican que en levaduras el complejo p24 se asocia selectivamente con otros receptores de carga a nivel de los ERES para formar un complejo o plataforma proteica, la cual promueve la salida conjunta del RE de los propios receptores y por tanto la de sus cargas específicas. Las evidencias recogidas también señalan que esta plataforma de receptores juega un importante papel colectivo en la biogénesis del compartimento *cis* del Golgi, favoreciendo primariamente el proceso de anclaje de las vesículas COPII con el propio *cis*-Golgi. Esta conclusión se basa fundamentalmente en que el defecto generado por la ausencia simultánea de varios receptores es fenotípicamente idéntico al que producen los mutantes de factores específicos encargados de anclar la vesícula COPII al *cis*-Golgi. Precisamente, el hecho de que en el doble mutante la localización característica en Golgi y ERES de algunos componentes de estos factores de anclaje, como Bet3p, Grh1p o Bug1p, esté completamente alterada así como que Grh1p se encuentre menos asociado a la membrana del RE, sugiere que los receptores de carga favorecen el proceso de anclaje vesicular mediante el reclutamiento o estabilización inicial de los factores de anclaje a los ERES y más en concreto a las vesículas COPII nacientes.

Los receptores de carga podrían interactuar directamente con los factores de anclaje y facilitar así su reclutamiento a la membrana. En este sentido se ha observado que las proteínas p24 de mamífero forman un complejo *in vivo* con GRASP65 (Grh1p en levaduras), GRASP55 y GM130

(Bug1p), y que estas proteínas GRASPs purificadas se unen directamente a los tallos citosólicos de la proteínas p24 *in vitro* (Barr *et al*, 2001). Sin embargo, en el estudio proteómico realizado sobre la proteína p24 Emp24p etiquetada con TAP en *S. cerevisiae*, no aparece ninguno de estos factores entre las proteínas que interaccionan físicamente. En cambio, si se detectó la presencia de otro factor de anclaje, Coy1p, homólogo del factor de anclaje de mamíferos CASP. Aunque en levaduras no se sabe todavía si juega algún papel en la recepción de vesículas COPII en el *cis*-Golgi, se ha descrito que CASP interacciona con la subunidad COPII Sec23 (Gillingham *et al*, 2002). Por otro lado, se ha descrito también que Rud3p (GM130) se deslocaliza en ausencia del receptor Erv14p, aunque no hay interacción directa entre ellos.

Los datos presentados en este trabajo apuntan, sin embargo, a que los receptores reclutarían indirectamente a los ERES los distintos factores de anclaje a través de la cubierta COPII. De hecho, se sabe actualmente que la cubierta COPII, en contra de lo que se pensaba no hace mucho tiempo, permanece asociada la vesícula tras la evaginación para poder estabilizar sobre la membrana de esta 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 interaccionan 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 unen eficientemente, a través de potentes señales existentes en sus dominios citosólicos, a Sec24p, la subunidad complementaria de la capa interna de la cubierta COPII, responsable de unir a las proteínas carga (Miller *et al*, 2003). Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que los receptores ayudan colectivamente a estabilizar a la cubierta COPII ya que se observó que Sec24p se asocia con menor eficiencia a la membrana del RE ante la doble ausencia de Erv14p y del complejo p24. Además, Sec13p mostró una localización aparentemente más citosólica en el doble mutante *emp24Δ erv14Δ*. Por tanto, es perfectamente plausible suponer que la cubierta COPII, una vez haya sido estabilizada en la membrana de los ERES por los receptores, contribuye al subsecuente reclutamiento de los factores de anclaje. En efecto, la expresión de una versión mutante de Erv14p incapaz de unir a COPII no consigue rescatar el defecto de anclaje reflejado en la falta de crecimiento del doble mutante *emp24Δ erv14Δ*.

Dado que el ensamblaje del *cis*-Golgi también necesitaría del aporte de vesículas COPI procedentes de cisternas más maduras (Behnia *et al*, 2007), no se puede descartar que la estabilización de la cubierta COPI llevada a cabo por

determinados receptores de carga, como el complejo p24, 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 receptores de carga se debería a la disociación de la cubierta COPI de las membranas de Golgi (Mitrovic *et al*, 2008). Sin embargo, el hecho de que aunque el coatómero esté deslocalizado en el doble mutante *emp24Δ erv14Δ*, las diferencias fenotípicas entre éste y el mutante termosensible de COPI *ret1-1*, sugieren que el origen primario del defecto de ensamblaje del *cis*-Golgi observado se deba a problemas en la recepción de las vesículas COPII, y probablemente como consecuencia se alteraría también el transporte mediado por COPI. Respaldando esta idea, se ha observado que el complejo COG, implicado en el anclaje de las vesículas COPI en el Golgi, no altera drásticamente su localización en el doble mutante.

En cualquier caso, la contribución de los receptores de carga al proceso de anclaje para formar el *cis*-Golgi depende del grado de oligomerización que estos alcanzan al asociarse entre sí a nivel de los ERES. En este sentido, la oligomerización favorecería la incorporación eficiente en las vesículas COPII de los receptores y de sus cargas en conjunto al potenciar el reclutamiento de las proteínas de cubierta COPII. No obstante, la función cooperativa de los receptores en el ensamblaje del *cis*-Golgi no parece implicar la formación de vesículas COPII ya que se observa que proteínas carga como Rer1p o Anp1p no se acumulan en el RE como si sucede en el mutante de cubierta COPII *sec23-1*. Este papel conjunto de los receptores se realizaría tras la formación de la vesícula COPII. La plataforma de receptores garantizaría la estabilidad de la cubierta en las vesículas permitiendo el correcto reconocimiento de estas por la maquinaria de anclaje. El hecho de que sea necesario combinar al menos la ausencia de dos receptores para poder observar un defecto en el ensamblaje del *cis*-Golgi, implica la existencia de un determinado nivel umbral de oligomerización requerido para este proceso. Sin embargo, no todos los receptores contribuirían por igual a la formación de la plataforma. En este sentido el complejo p24 y Erv14p parecen desempeñar un papel principal al presentar la mayor interacción génica.

3. RESULTADOS

3.3. Regulación por el complejo²⁴ de la activación de la GTPasa Arf1p en el Golgi

3.3. Resultados - Regulación por el complejo p24 de la activación de la GTPasa Arf1p en el Golgi

Resumen

El transporte vesicular retrógrado que tiene lugar al comienzo de la ruta secretora, desde las cisternas tardías del aparato de Golgi hasta las cisternas tempranas y desde éstas hasta el RE, depende de las proteínas de cubierta COPI. Éstas son estabilizadas en la membrana del Golgi por determinadas proteínas transmembrana, especialmente las proteínas p24, formando los llamados complejos cebadores. Cuando el número de complejos cebadores supera un determinado umbral, las proteínas de cubierta polimerizan, deformando mecánicamente la membrana y generando la vesícula de transporte COPI. El reclutamiento inicial de las proteínas de cubierta COPI está mediado por la GTPasa pequeña Arf1p en su forma activa de unión a GTP, quien a su vez es activada por las proteínas GEF Gea1p y Gea2p. Actualmente se desconoce el mecanismo que permite a Gea1/2p activar a Arf1p en una región concreta del Golgi donde formar las vesículas COPI. En este estudio se muestra como el complejo p24 es capaz de estabilizar la cubierta COPI en la membrana del Golgi, de interactuar físicamente con Gea1p a través de dicha cubierta y además de favorecer el reconocimiento de Arf1p por parte de Gea1/2p. Estas evidencias indican que el complejo p24 promueve la activación de Arf1p por Gea1/2p estabilizando la cubierta COPI en la membrana del Golgi. Por tanto, los datos obtenidos sugieren que las proteínas carga transmembrana, especialmente las proteínas p24, serían en última instancia las responsables de regular el sitio donde se inicia la formación de las vesículas COPI, garantizando así un transporte retrógrado de la carga efectivo.

3.3.1. Antecedentes

Las vesículas COPI formadas a partir de las membranas del aparato de Golgi median el transporte retrógrado en la ruta secretora temprana. Por un lado, el transporte retrógrado desde el *cis*-Golgi al RE mantiene los niveles requeridos de proteínas endógenas en el RE, evita que proteínas mal plegadas que han alcanzado el Golgi avancen por la ruta secretora y recicla los factores necesarios para futuras rondas de transporte anterógrado. Por otro lado, el transporte retrógrado *intra*-Golgi desde las cisternas tardías hasta las más tempranas permite el reciclaje de la maquinaria de glicosilación garantizando el

procesamiento secuencial de las proteínas carga y su avance mediante la maduración de las propias cisternas del Golgi (Lee *et al*, 2004).

Los mecanismos moleculares precisos que regulan la formación de vesículas COPI no han sido determinados todavía. En este sentido, el modelo más aceptado actualmente propone que la biogénesis de una vesícula COPI se inicia cuando la GTPasa Arf1 (*ADP-ribosylation factor 1*) es atraída a la membrana del Golgi, donde es activada por su proteína GEF específica, que promueve el intercambio de GDP por GTP (Peyroche *et al*, 1996). Posteriormente, Arf1 activada recluta al coatómero, el cual se estabiliza en la membrana al formar un complejo cebador con la proteína GAP Glo3p y una determinada proteína transmembrana. La asociación lateral de muchos complejos cebadores conduce a la polimerización de la cubierta COPI y promueve la formación de la vesícula (Springer *et al*, 1999). Además, la estabilización del coatómero por parte de los complejos cebadores facilitaría que otras proteínas carga sean también capturadas e incorporadas en las vesículas COPI. En este sentido, entre las proteínas transmembrana capaces de unir al coatómero con gran afinidad, las proteínas p24 juegan un papel clave en la formación de los complejos cebadores de la cubierta COPI en la membrana del Golgi, promoviendo la formación de las vesículas a través de la estabilización del coatómero (Aguilera-Romero *et al*, 2008).

Además de participar en la formación de vesículas COPI, la GTPasa Arf1 es también necesaria para el transporte mediado por vesículas de clatrina desde el TGN hasta el sistema endosomal (Gillingham & Munro, 2007). La especificidad para formar un tipo u otro de vesículas depende de la familia de proteínas GEF que la activen. En el caso de las vesículas de clatrina, la GEF responsable es Sec7p en levaduras y sus homólogos BIG1/2 en mamíferos. Las vesículas COPI se forman por la acción de las GEF de la familia Gea1/2p en levaduras y GBF1 en mamíferos (Casanova, 2007; Shin & Nakayama, 2004; Spang *et al*, 2001). La actividad de estas dos subfamilias está completamente diferenciada y no pueden ser sustituidas las unas por las otras (Park *et al*, 2005; Peyroche *et al*, 2001). Los mecanismos que permiten localizar a cada GEF en su región específica del Golgi para activar a Arf1 y generar así los diferentes tipos vesículas, están poco estudiados. Recientemente, se ha propuesto que la GEF Sec7p sea reclutada a las membranas del *trans*-Golgi a través de la propia Arf1-GTP, lo que desencadena un ciclo de retroalimentación positiva que promueve la activación de más Arf1 (Richardson *et al*, 2012). En cambio, el mecanismo que media la localización de Gea1/2p aún no ha sido

descrito, aunque debe ser diferente al de Sec7p, ya que éstas no unen la forma activada de Arf1 (Richardson *et al*, 2012). No obstante, aunque se ha propuesto la existencia de un receptor transmembrana para Gea1/2p, no puede ser la principal vía de reclutamiento porque su ausencia no afecta a la localización en el Golgi de estas GEFs (Chantalat *et al*, 2003). Otro posible mecanismo de reclutamiento sería la interacción enzima-sustrato con Arf1-GDP, la que se asocia al Golgi a través de la unión con proteínas de membrana como las SNAREs (Honda *et al*, 2005). Dado que se ha observado que tanto Gea1/2p, como GBF1, interaccionan directamente con el coatómero, y que esta interacción es independiente de la actividad GEF (Deng *et al*, 2009), los mismos mecanismos responsables de estabilizar a la cubierta COPI en la membrana del Golgi podrían también promover la actividad GEF en la membrana del Golgi (Figura 44).

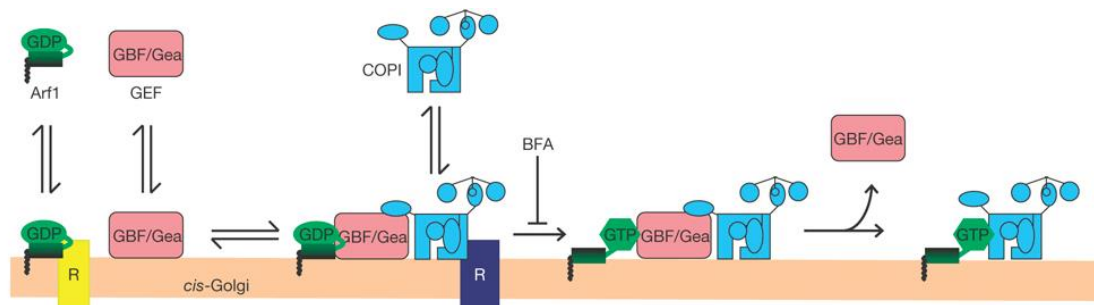


Figura 44. Modelo de la interacción entre la cubierta COPI con las Arf GEFs antes de la activación de Arf1 (Deng *et al*, 2009).

Arf1, sus GEFs y el coatómero ciclan rápidamente entre las membranas y el citosol. Receptores (R) como el complejo p24 podrían estabilizar tanto a las cubiertas como a la forma inactiva de Arf1 (Arf1-GDP) (Bethune *et al*, 2006). Una vez asociadas a las membranas, Arf1-GDP, su GEF y el coatómero forman un complejo. Después del intercambio de nucleótidos que promueve la activación de Arf1, la GEF GBF1/Gea podría abandonar la membrana y la propia Arf1p mantendría ancladas a las cubiertas.

Por tanto, el complejo p24 podría contribuir al funcionamiento de Gea1/2p de dos formas sinérgicas: reclutando a Arf1-GDP, como se ha propuesto que puede hacer en mamíferos (Gommel *et al*, 2001) y estabilizando al coatómero a las membranas del Golgi (Aguilera-Romero *et al*, 2008). En este trabajo se va a investigar el posible papel del complejo p24 en la regulación de la actividad GEF de Gea1/2p.

3.3.2. Resultados

3.3.2.1. El complejo p24 interacciona física y funcionalmente con las proteínas Gea1/2p

Para estudiar si el complejo p24 juega un papel en la regulación de Gea1/2p, se evaluó la sensibilidad del mutante nulo *emp24Δ* al metabolito fúngico brefeldina A (BFA), el cual inhibe específicamente la actividad GEF de las subfamilias Sec7/Gea (Peyroche *et al*, 1996). Como se muestra en la Figura 45, al añadir al medio de cultivo 10μg/ml de BFA, el tiempo de duplicación de la estirpe *emp24Δ* se duplica respecto al tiempo de generación que presenta la estirpe silvestre, poniendo de manifiesto que el complejo p24 participa en la activación de Arf1p mediada por sus GEFs.

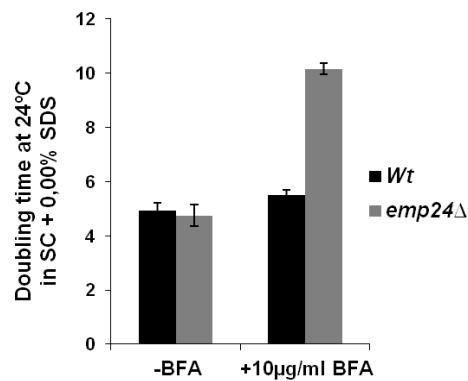


Figura 45. La mutación *emp24Δ* incrementa la sensibilidad a BFA.

La presencia de BFA en el medio de cultivo retrasa el crecimiento del mutante *emp24Δ*. Se siguió el crecimiento de tres cultivos en fase exponencial mediante densidad óptica al añadir 10μg/ml de BFA disuelto en DMSO, o sólo DMSO (-BFA) durante 24 horas. Se empleó medio SC complementado con SDS al 0,001% (Pannunzio *et al*, 2004). Se estimó el tiempo de duplicación de cada estirpe en tres clones diferentes.

A continuación, se quiso probar directamente si el complejo p24 interaccionaba funcionalmente con Gea1/2p, las ArfGEFs específicas del transporte mediado por COPI. Para ello, se analizó si existía interacción génica entre los alelos termosensibles de GEA1 y GEA2 y el mutante nulo *emp24Δ*. Ya que Gea1p y Gea2p tienen funciones parcialmente redundantes entre ellas

3.3. Resultados y discusión

(Park *et al*, 2005), para realizar estos ensayos se trabajó con el mutante nulo de una de las dos proteínas y los alelos termosensibles de la complementaria. Como se muestra en la Figura 46, la ausencia del complejo p24 incrementa la sensibilidad a temperatura de todos los alelos condicionales de GEA1 y GEA2, sugiriendo que existe una relación funcional entre estos.

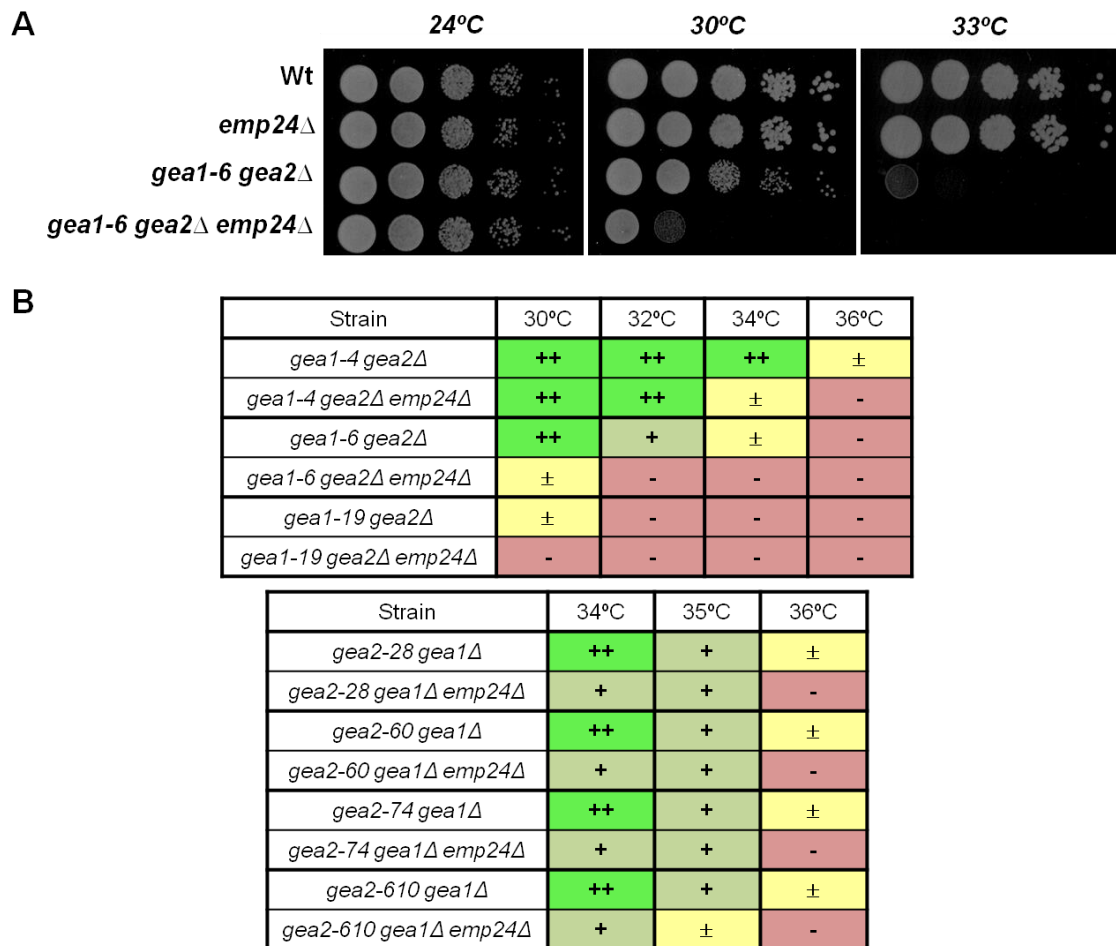


Figura 46. Gea1/2p interaccionan funcionalmente con el complejo p24.

La ausencia del complejo p24 incrementa la termosensibilidad de los alelos de las GEF de Arf1 Gea1/2p. 5µl procedentes de diluciones seriadas a partir de 5×10^6 células fueron sembrados en medio SC y cultivadas a las temperaturas indicadas durante 48 horas. **(A)** Se muestra el resultado para el alelo *gea1-6*. **(B)** Se resumen las temperaturas permisivas y restrictivas para todos los alelos termosensibles de GEA1/2 al combinar con la mutación *emp24Δ*. ++ indica que el crecimiento fue similar al de la estirpe silvestre. + indica que el crecimiento era más lento pero que el de la cepa silvestre. ± indica que sólo se detectó crecimiento en las dos primeras diluciones. - indica que no se observó crecimiento.

Para comprobar que efectivamente el complejo p24 participa en el mismo proceso regulado por Gea1/2p, se analizó si la ausencia de éste exacerba los defectos fenotípicos generados por las mutaciones condicionales en GEA1. Para ello se analizó el estado en el que se encuentra el aparato de Golgi en la estirpe *gea1-6 gea2Δ emp24Δ* (*gea1-6 emp24Δ*), respecto a la estirpe *gea1-6 gea2Δ* (*gea1-6*). Como marcador del *cis*- y *medial*-Golgi se empleó la subunidad de la cubierta COPI SEC21-GFP. Para analizar el *trans*-Golgi se usó SEC7-dsRed, ya que aunque es una Arf GEF, igual que Gea1p, se ha descrito que sus funciones están separadas y no pueden reemplazarse entre ellas (Peyroche *et al*, 1999). En la Figura 47, se muestra como la localización en puntos, característica de ambos marcadores, se pierde en aproximadamente el 50% de las células en la estirpe *gea1-6*. En cambio, en la estirpe *gea1-6 emp24Δ* este porcentaje es claramente mayor. Esto sugiere que la ausencia del complejo p24 potencia los defectos originados por la mutación *gea1-6*, lo que va en consonancia con los datos de interacción genética, donde se pone de manifiesto que el complejo p24 funciona en el mismo proceso que Gea1/2p.

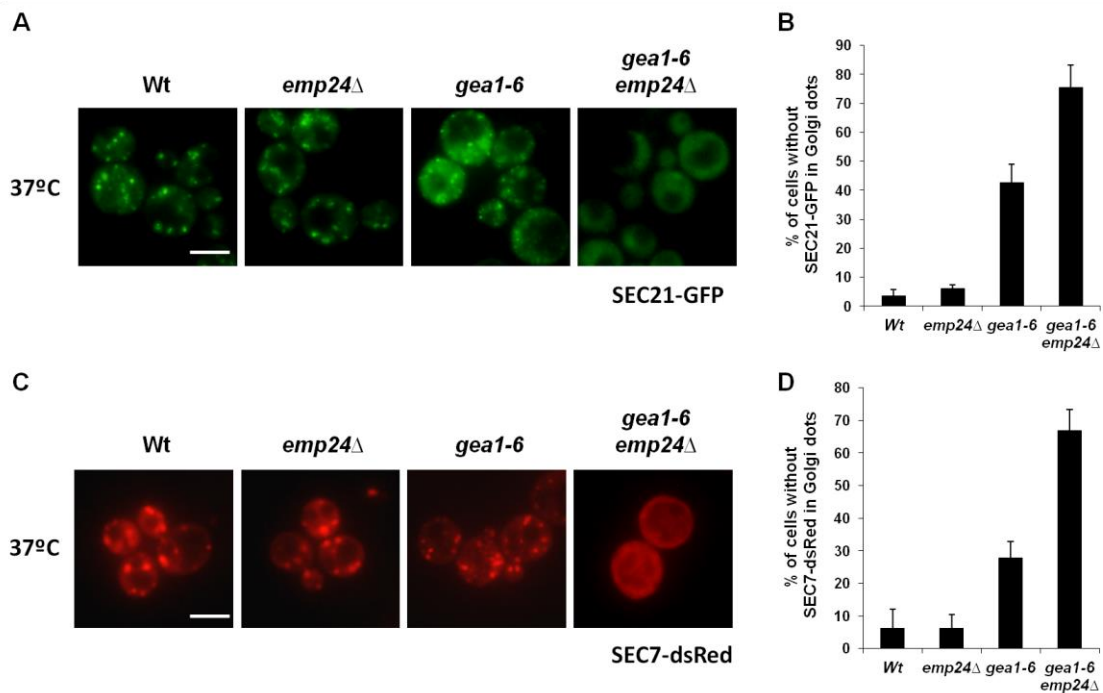


Figura 47. En ausencia del complejo p24 se incrementan los defectos morfológicos del Golgi generados por la mutación *gea1-6*.

La organización funcional del aparato de Golgi se altera en la estirpe *gea1-6 emp24Δ*. (A y B) El patrón punteado característico de Sec21p-GFP se pierde en más del 70% de las células de la estirpe *gea1-6 emp24Δ*. Tras incubar a 37°C durante 15 minutos

(C y D) La localización en puntos de la proteína Sec7p-dsRed cambia a un patrón citosólico en más del 60% de las células de la estirpe *gea1-6 emp24Δ* tras la incubación a 37°C. **(A y B)** Cultivos en fase exponencial de cada estirpe fueron observados a 24°C y no se encontró diferencia entre las cepas. Tras incubar los mismos cultivos a 37°C durante 15 minutos, se analizó la localización de las proteínas en más de 100 células por estirpe. La barra de escala equivale a 5µm. **(C y D)** Se representa el valor medio del porcentaje de células con patrón de localización alterado en tres repeticiones independientes.

Del mismo modo, se quiso analizar si además de alterarse la morfología del aparato de Golgi, también se afectaba la funcionalidad del orgánulo. Para ello, se realizó un ensayo de transporte a través del Golgi empleando la SNARE de membrana plasmática Snc1p etiquetada con GFP. Aunque esta proteína cicla entre la membrana y el Golgi a través de los endosomas, se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática. Cuando se afecta el transporte a través del Golgi, la localización de Snc1p cambia de la membrana, a un patrón punteado que corresponde a endosomas (Lewis *et al*, 2000). Como se muestra en la Figura 48, a temperatura permisiva (24°C) la estirpe *gea1-6 emp24Δ* muestra un claro defecto en el reciclaje de Snc1p. Al incubar a 37°C 15 minutos, el mutante *gea1-6* presenta también este defecto, mientras que la estirpe *gea1-6 emp24Δ* se potencia. Esto sugiere que el complejo p24 coopera activamente con Gea1p en el transporte a través del Golgi.

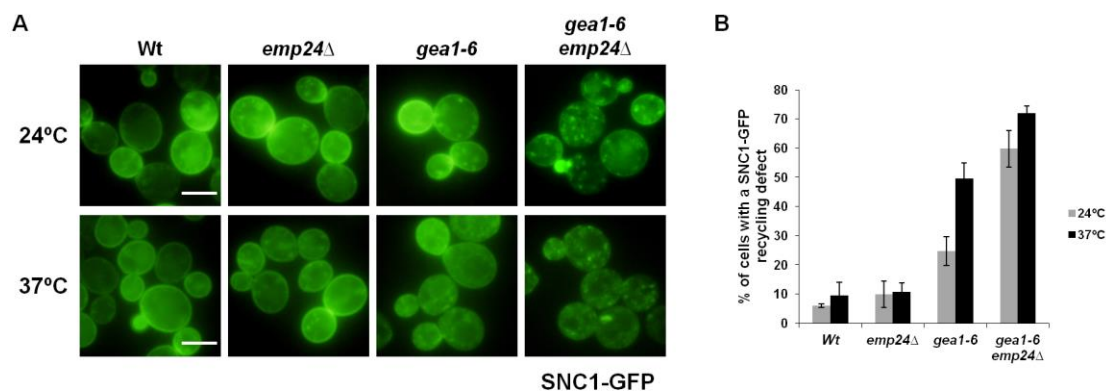


Figura 48. El complejo p24 coopera con Gea1p en el transporte *intra*-Golgi.

(A) La localización mayoritaria en membrana plasmática de la proteína Snc1p se pierde en la estirpe *gea1-6emp24Δ* a 24°C, mostrando una localización punteada que corresponde a endosomas. A 37°C el porcentaje de células con patrón deslocalizado aumenta en *gea1-6* y *gea1-6emp24Δ*, siendo mayor en la segunda estirpe. La barra de escala equivale a 5µm. **(B)** Se representa el porcentaje medio de tres repeticiones independientes.

Finalmente, para concluir si la interacción funcional descrita entre el complejo p24 y las Arf GEFs Gea1/2p se corresponde también con una interacción física, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación y de interacción *in vitro*. Como se muestra en la Figura 49A, el complejo p24 co-inmunoprecipita con la GEF Gea1p, indicando que interaccionan físicamente, si bien, no se puede inferir si esta interacción es directa o no. Para ello, se trató de reproducir esta unión *in vitro*, empleando los tallos citosólicos de las subunidades Erv25p y Emp24p unidos a GST. Estas construcciones se incubaron junto a citosol obtenido a partir de una cepa silvestre y se analizó si se producía la co-precipitación entre la proteína Gea1p y los tallos del complejo p24 fusionados a GST. Como se muestra en la Figura 49B, Gea1p-HA interacciona mayoritariamente con la subunidad Erv25p. Además, al eliminar la señal de unión al coatómero (KKXX), la interacción se reduce drásticamente. Esto sugiere, que la interacción entre el complejo p24 y la GEF Gea1p se establece a través de las proteínas COPI.

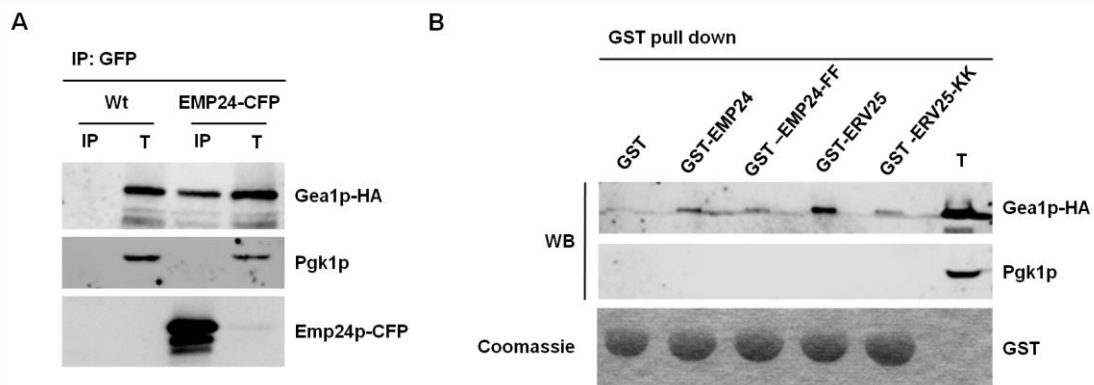


Figura 49. El complejo p24 interacciona físicamente con la Arf GEF Gea1p.

(A) El complejo p24 interacciona físicamente con Gea1p. Se inmunoprecipitó a partir de extractos celulares completos, disueltos con 1% Triton X-100, y se analizó la presencia de las proteínas indicadas por *Western Blot*. IP indica el inmunoprecipitado. T representa el 1% del extracto antes de la inmunoprecipitación.

(B) La proteína Gea1p interacciona mayoritariamente con el tallo citosólico de Erv25p, que contiene la señal KKXX de unión a cubierta COPI. En ausencia de esta señal se pierde dicha unión. Citosol purificado a partir de una cepa expresando Gea1p-HA se incubó con una matriz de glutatión a la que se conjugó GST, GST fusionado a los tallos citosólicos de Emp24p/Erv25p, o estos mismos tallos a los que se les eliminó la señal de unión a cubiertas, FF para COPII en Emp24p, y KK para COPI en Erv25p.

Puesto que las proteínas p24 no son las únicas con señales de unión a COPI presentes en el *cis*-Golgi, se quiso estudiar si la relación funcional entre el complejo p24 y las GEFs era específica de éste o común a otras proteínas que unen COPI. Con este fin, se transformó *gea1-6 emp24Δ* con plásmidos multicopia (2μ) que contenían los genes ERD2 y MST27 para su sobreexpresión. Erd2p es el receptor de carga que en sentido retrógrado reconoce la secuencia HDEL y recicla la maquinaria endógena del RE que escapa por *bulk flow* hasta el Golgi (Lewis *et al*, 1990). Mst27p es una proteína de función desconocida, pero que su sobreexpresión recupera el crecimiento de mutantes condicionales de subunidades del coatomero (Sandmann *et al*, 2003). En la Figura 50 se muestra como la sobreexpresión de estas dos proteínas con señales di-lisina no recuperan el defecto en el crecimiento de la estirpe *gea1-6 emp24Δ*.

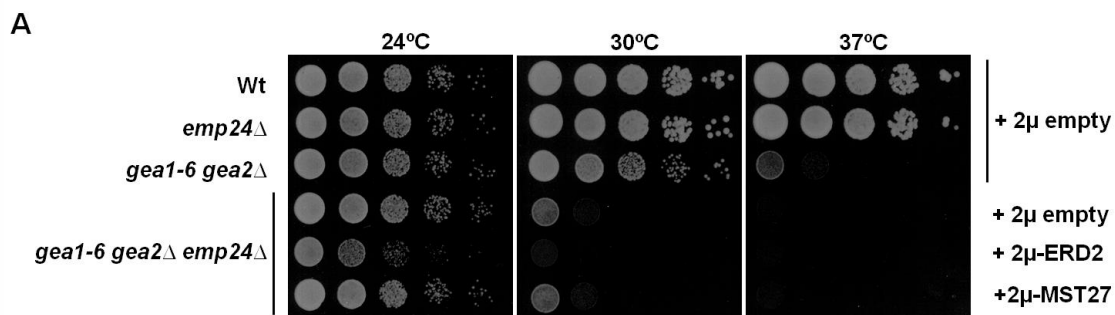


Figura 50. La mutación *emp24Δ* no puede ser revertida por la sobreexpresión de otras proteínas con señales di-lisina.

En ausencia del complejo p24, la sobreexpresión de otras proteínas con señales di-lisina que unen proteínas COPI no puede compensar los defectos de crecimiento del alelo *gea1-6*. 5μl procedentes de diluciones seriadas a partir de 5×10^6 células fueron sembrados en medio SC-ura y cultivadas a las temperaturas indicadas durante 48 horas

En conjunto, los datos mostrados ponen de manifiesto que el complejo p24 coopera funcionalmente con Gea1/2p y que esta relación parece ser específica del complejo p24 y no de otras proteínas capaces de unir a la cubierta COPI.

3.3.2.2. El complejo p24 interacciona física y funcionalmente con Arf1p

El complejo p24, a diferencia de otras proteínas transmembrana presentes en el Golgi que también unen activamente a la cubierta COPI, podría interactuar físicamente con Arf1-GDP, como ha sido sugerido por estudios

previos en células de mamífero (Gommel *et al*, 2001). De este modo, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en condiciones nativas, se quiso comprobar si en *S. cerevisiae* esta interacción también tiene lugar. En la Figura 51A, se muestra cómo al inmunoprecipitar Arf1p-GFP, la subunidad del complejo p24, Emp24p, es arrastrada, mientras que otras proteínas con señales di-lisina como el receptor de carga Erv29p, no lo son. No obstante, no se puede inferir si esta interacción física es directa o no, ni si se establece con la forma activa o inactiva de Arf1.

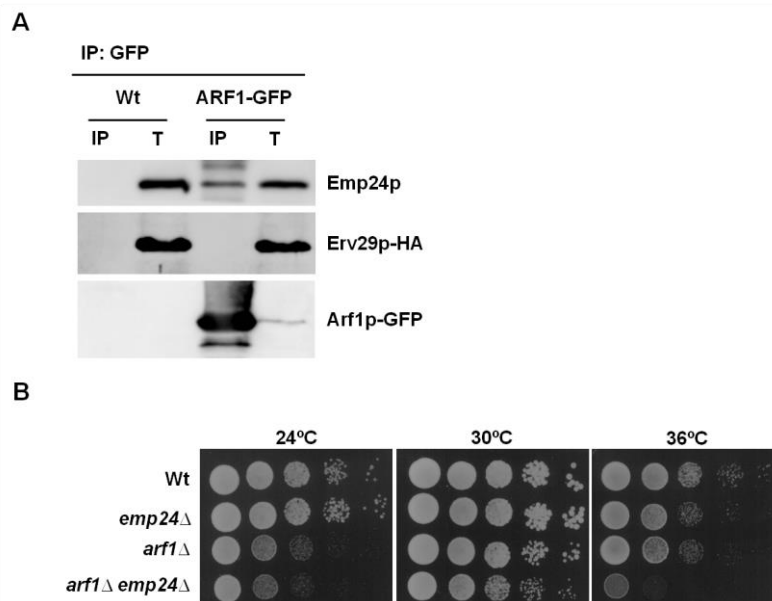


Figura 51. Arf1p y el complejo p24 interacciona física y funcionalmente.

(A) El complejo p24 interacciona físicamente con Arf1p. Se inmunoprecipitó a partir de extractos celulares completos, disueltos con 1% Triton X-100, y se analizó la presencia de las proteínas indicadas por *WB*. IP indica el inmunoprecipitado. T representa el 1% del extracto antes de la inmunoprecipitación. **(B)** Al combinar las mutaciones *emp24*Δ y *arf1*Δ se produce termopsensibilidad de la estirpe. 5μl procedentes de diluciones seriadas a partir de 5×10^6 células fueron sembrados en medio SC y cultivadas a las temperaturas indicadas durante 48 horas.

Igualmente, el complejo p24 coopera funcionalmente con Arf1, ya que existe una fuerte interacción genética entre *arf1*Δ y *emp24*Δ (Figura 51B). Aunque ARF1 es un gen esencial, el mutante nulo de éste es viable gracias a que existe una copia, ARF2 (Stearns *et al*, 1990). Esta copia sólo puede compensar parcialmente la ausencia de Arf1p, permitiendo así realizar el análisis genético.

El hecho de que el complejo p24 interactúe física y funcionalmente con Arf1 no sólo respalda la relación funcional entre éste y las Arf GEFs Gea1/2p, también podría ser una explicación de por qué otras proteínas que unen coatómero no son capaces de sustituir funcionalmente al complejo p24.

3.3.2.3. El complejo p24 promueve la activación de Arf1p mediada por Gea1/2p

Independientemente de la posibilidad de reclutar Arf1p, el complejo p24 también podría promover su activación favoreciendo la presencia de Gea1/2p en la membrana de Golgi mediante la estabilización del coatómero, ya que se ha observado previamente que estas GEF interactúan con la cubierta COPI. Para demostrar esta idea se quiso, en primer lugar, comprobar de forma directa la capacidad del complejo p24 de mantener la cubierta COPI asociada a la membrana del Golgi. Así, mediante subfraccionamiento se analizó la cantidad relativa de cubierta unida al Golgi en el mutante nulo *emp24Δ*. En la figura 52 se aprecia como las subunidades del coatómero están menos representadas en la fracción enriquecida en membranas de Golgi (P₁₀₀) en ausencia del complejo p24. Por tanto, este resultado pone de manifiesto que efectivamente el complejo p24 favorece la asociación del coatómero a las membranas de Golgi.

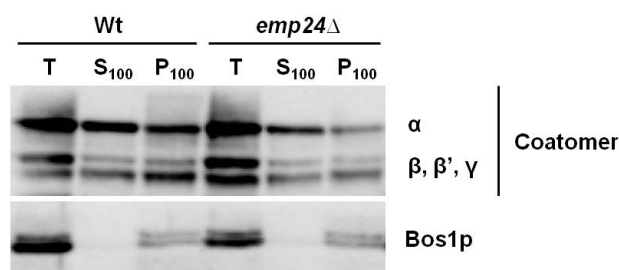


Figura 52. El complejo p24 no puede ser sustituido por la sobreexpresión de otras proteínas que unen activamente cubiertas COPI.

El complejo p24 es necesario para la estabilización de las proteínas COPI en las membranas de Golgi. Extractos celulares fueron sometidos a centrifugación diferencial a 100000g y analizados por WB. T representa un 10% de la muestra inicial antes de la centrifugación. S y P indican la proteína que se localiza en el sobrenadante, citosol, y en el precipitado, Golgi, respectivamente, tras la centrifugación.

Se ha sugerido que Gea1/2pA reconoce al coatómero en la misma membrana del Golgi, lo que ayudaría a dicha GEF a interactuar más eficientemente con su sustrato Arf1-GDP para activarlo (Deng *et al*, 2009). Por tanto el complejo p24 manteniendo asociada la cubierta a la membrana del Golgi podría favorecer tanto la interacción del coatómero con Gea1/2p como la de esta con Arf1p. Se evaluó esta posibilidad mediante co-inmunoprecipitación en condiciones nativas, determinando si la mutación *emp24Δ* afecta a dichas interacciones. Como se puede observar en la Figura 53, la interacción entre Gea1/2p y la cubierta COPI se reduce drásticamente en el mutante *emp24Δ*. Esto sugiere que el reconocimiento entre Gea1/2p y las proteínas de cubierta COPI, tiene lugar realmente en la membrana del Golgi y estaría favorecida por el complejo p24.

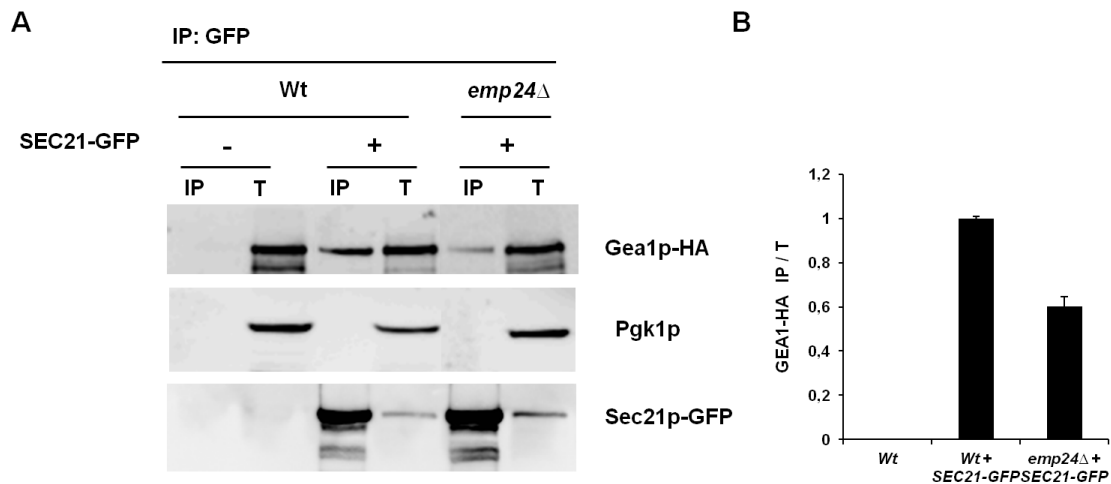


Figura 53. El reconocimiento entre las proteínas de cubierta COPI y la Arf GEF Gea1p está regulado por el complejo p24.

(A) El complejo p24 es necesario para la interacción eficiente *in vivo* entre la Arf GEF Gea1p y el coatómero COPI. **(B)** Se representa el cociente IP/T medio de tres repeticiones independientes de la cuantificación con el programa *Multigauge* (Fujifilm), corregida respecto a la cantidad de GFP. Se considero la unión en la estirpe silvestre como valor estándar y se normalizó respecto a ésta, considerando 1 su valor, y calculando la proporción de la estirpe *emp24Δ*.

Posteriormente, se analizó la influencia del complejo p24 sobre la interacción de Gea1/2p con Arf1p. Como se observa también en la Figura 54, la eficiencia de co-inmunoprecipitación de Arf1-GFP con Gea1/2p decreció hasta un 50% en ausencia del complejo p24. En cambio, la mutación *emp24Δ* no redujo la interacción de Arf1p con otra de sus GEF, Sec7p. Estos resultados

sugieren que el complejo p24 es necesario para el reconocimiento eficiente entre Gea1p y Arf1p, lo que favorece la formación de las vesículas COPI, mientras que no se es requerido para la interacción de Sec7p con Arf1p para formar vesículas de clatrina en el *trans*-Golgi.

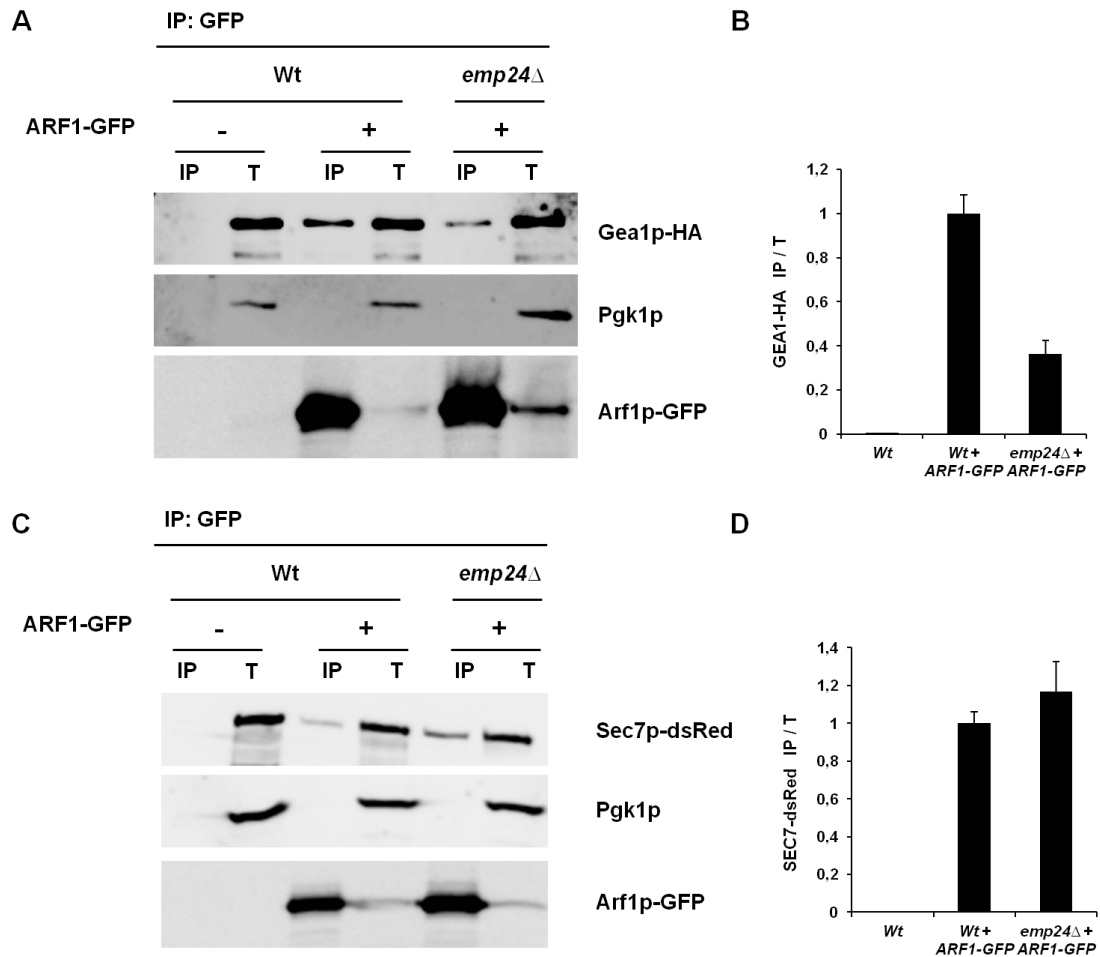


Figura 54. El complejo p24 facilita el reconocimiento entre Arf1p y Gea1p, mientras que no parece intervenir en el reconocimiento con Sec7p.

(A) La ausencia del complejo p24 reduce la interacción *in vivo* entre Arf1p y su GEF Gea1p. **(B)** La interacción entre Arf1p y Sec7p no se reduce en ausencia del complejo p24, parece aumentar levemente. **(A y B)** Extractos celulares completos fueron disueltos con T-X100 y sometidos a inmunoprecipitación. El inmunoprecipitado (IP) y el total (T) del 1% obtenido antes de inmunoprecipitar fueron analizados mediante Western Blot. **(C y D)** Se cuantificó el valor de la unión como se explica en la Figura 49.

Así, los datos presentados sugieren que el complejo p24 ejerce un papel central en la formación de las vesículas COPI favoreciendo tanto la activación de Arf1p por Gea1/2p como la subsecuente polimerización de la cubierta COPI.

3.2.2.4. La interacción entre Gea1/2p y los factores de anclaje es favorecida por el complejo p24

Recientemente se ha propuesto que los procesos de formación y anclaje de las vesículas COPI que median el transporte retrógrado *intra*-Golgi están coordinados y acoplados entre sí, ya que la propia Gea1/2p interacciona físicamente con los factores de anclaje que actúan en dicho transporte, los complejos TRAPPII y COG (Chen *et al*, 2011). Dado que el complejo p24 favorece la interacción de Gea1/2p con Arf1p para formar vesículas COPI, se quiso valorar si este además promueve la interacción de Gea1/2p con los complejos TRAPPII y COG. En primer lugar se analizó una posible interacción funcional del complejo p24 con dichos factores de anclaje. Para ello se combinó la mutación *emp24* Δ con las mutaciones termosensibles de las subunidades Trs130p del complejo TRAPPII y Cog3p/Sec34p del complejo COG. Como se puede ver en la Figura 55, la mutación *emp24* Δ exagera la termosensibilidad de los mutantes condicionales, indicando que el complejo p24 podría favorecer el funcionamiento de estos complejos de anclaje.

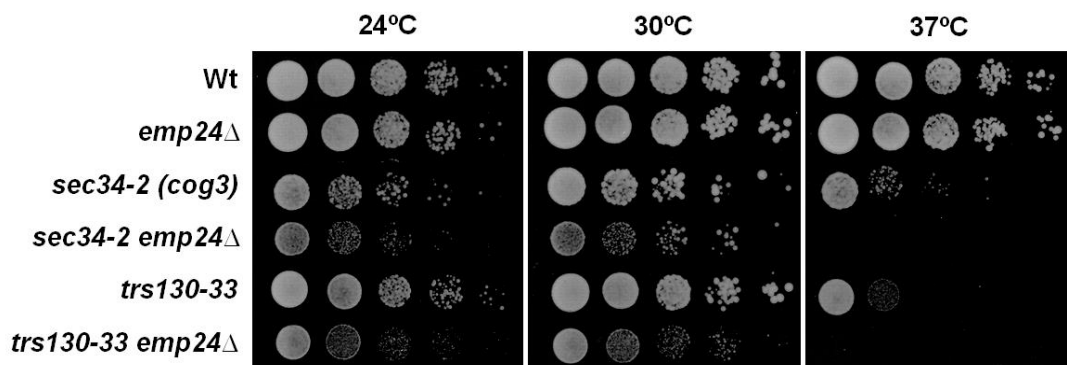


Figura 55. El complejo p24 interacciona genéticamente con los complejos TRAPPII y COG.

La mutación *emp24* Δ aumenta la termosensibilidad de los mutantes condicionales *trs130-33* (complejo TRAPPII) y *sec34-2* (complejo COG). 5 μ l procedentes de diluciones seriadas a partir de 5×10^6 células fueron sembrados en medio SC y cultivadas a las temperaturas indicadas durante 48 horas.

A continuación, se estudió si la ausencia del complejo p24 afecta también a la unión entre Gea1/2p y los complejos de anclaje. En la Figura 56 se muestra como la interacción entre Gea1p y la subunidad Cog3p del complejo COG se reduce claramente en el mutante *emp24Δ*. Este resultado indica que el complejo p24 regularía las distintas funciones que Gea1/2p ejerce tanto en la formación como en el anclaje de las vesículas COPI durante el transporte retrógrado *intra*-Golgi.

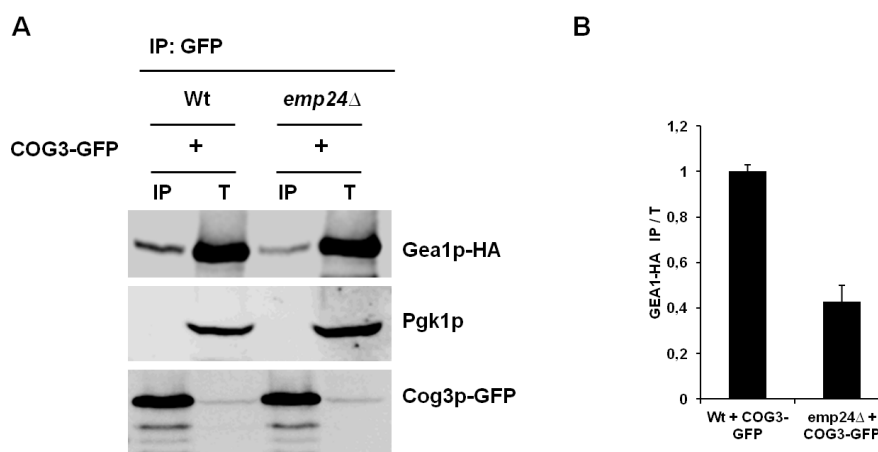


Figura 56. La interacción entre Gea1p y los factores de anclaje se reduce en ausencia del complejo p24.

(A) El análisis por co-immunoprecipitación a partir de extractos totales solubilizados con T-X100 y su posterior *Western Blot*, muestra que Gea1p interacciona en menor proporción con la subunidad Cog3p del complejo COG en ausencia del complejo p24. (B) Se representa el cociente IP/T medio de tres repeticiones independientes de la cuantificación de la cantidad de proteína por densitometría, corregida respecto a la cantidad de GFP. Se considero la unión en la estirpe silvestre como valor estándar y se normalizó respecto a ésta, considerando 1 su valor, y calculando la proporción de la estirpe *emp24Δ*.

3.3.3. Discusión

La formación de vesículas de transporte retrógrado COPI a partir de las membranas de Golgi es un proceso esencial para la fisiología celular pero poco comprendido a nivel molecular. Se ha descrito que determinadas proteínas, como las proteínas p24, con potentes señales de unión al coatómero, contribuyen a la estabilización localizada de la cubierta COPI favoreciendo su polimerización y por consiguiente estimulando la formación de la vesícula

(Aguilera-Romero *et al*, 2008; Sandmann *et al*, 2003). El reclutamiento inicial del coatómero es llevado a cabo por la forma activa de la GTPasa Arf1p quien es a su vez activada por las proteínas GEF Gea1p y Gea2p (Peyroche *et al*, 2001). Sin embargo se cómo se produce el reconocimiento entre estas GEFs y la forma inactiva de Arf1p unida a GDP, en las zonas concretas del Golgi donde deben de formarse las vesículas COPI (Brandizzi & Barlowe, 2013). Los datos presentados en este trabajo indican que el complejo p24 facilita la interacción de Gea1/2p con Arf1p. Este dato, junto a la fuerte interacción funcional observada en el análisis génico entre las proteínas p24 y Gea1/2p, indican que el complejo p24 es capaz de promover la activación de Arf1p por Gea1/2p, regulando así el proceso de iniciación de la formación de vesículas COPI.

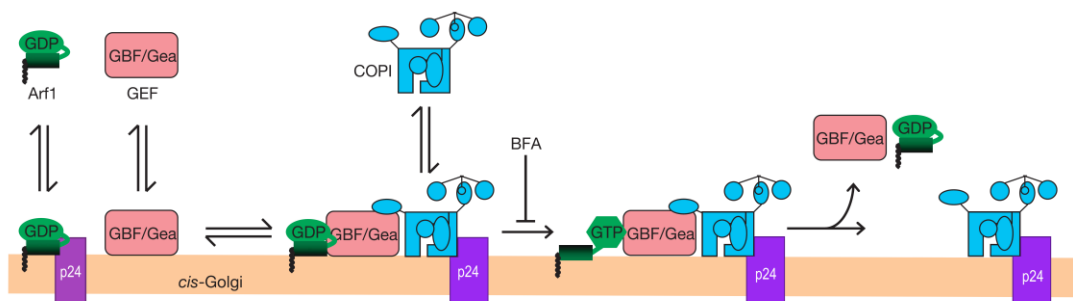


Figura 57. El complejo p24 participa en la activación de Arf1 y coopera en la estabilización de las cubiertas a la membrana del Golgi.

Arf1, sus GEFs y el coatómero ciclan rápidamente entre las membranas y el citosol. El complejo p24 puede estabilizar tanto a las cubiertas como a la forma inactiva de Arf1 (Arf1-GDP). Esto facilita el reclutamiento de la Arf GEF Gea1/2p a través de la cubierta COPI. De este modo, se facilita la activación de Arf1. Posteriormente, la cubierta queda estabilizada por el complejo p24 (Aguilera-Romero *et al*, 2008), permitiendo también el reciclaje de Arf1 y su GEF. (Deng *et al*, 2009).

Se ha descrito que Gea1/2p interacciona con el coatómero independientemente de la activación de Arf1p (Deng *et al*, 2009). Los ensayos de co-inmunoprecipitación presentados sugieren que el complejo p24 favorece esta interacción entre Gea1/2p y el coatómero, probablemente, mediante la estabilización de la propia cubierta COPI en la membrana del Golgi. De esta forma, en presencia del complejo p24, Gea1/2p podría bien permanecer más tiempo en dicha membrana, o bien ser reclutada con más afinidad, lo que le permitiría activar a Arf1p con mayor eficiencia. Por otro lado, además de retener a Gea1/2p en el Golgi a través del coatómero, el complejo p24 podría favorecer más todavía el proceso de activación de Arf1p atrayendo a la

membrana precisamente a Arf1-GDP, el sustrato de Gea1/2p. De hecho, experimentos de *crosslinking* realizados en células de mamífero han puesto de manifiesto la capacidad del complejo p24 para interactuar específicamente con Arf1-GDP (Gommel *et al*, 2001). Respaldo esta observación, se muestra en el presente estudio que el complejo p24 y Arf1p interactúan *in vivo* específicamente. De todas formas, para determinar de manera concluyente que las proteínas p24 son capaces de reclutar a Arf1-GDP sería necesario realizar ensayos de *pull-down* con componentes purificados. En cualquier caso, agrupando estas evidencias, es posible proponer que el complejo p24 facilitaría el reclutamiento conjunto de Gea1/2p y de Arf1-GDP, el mismo punto de la membrana del Golgi, esto atraería a más coatómero a su vez, creándose entonces un ciclo de retroalimentación positiva que conllevaría finalmente a la formación eficiente de vesículas COPI en esa región particular del Golgi (Figura 57).

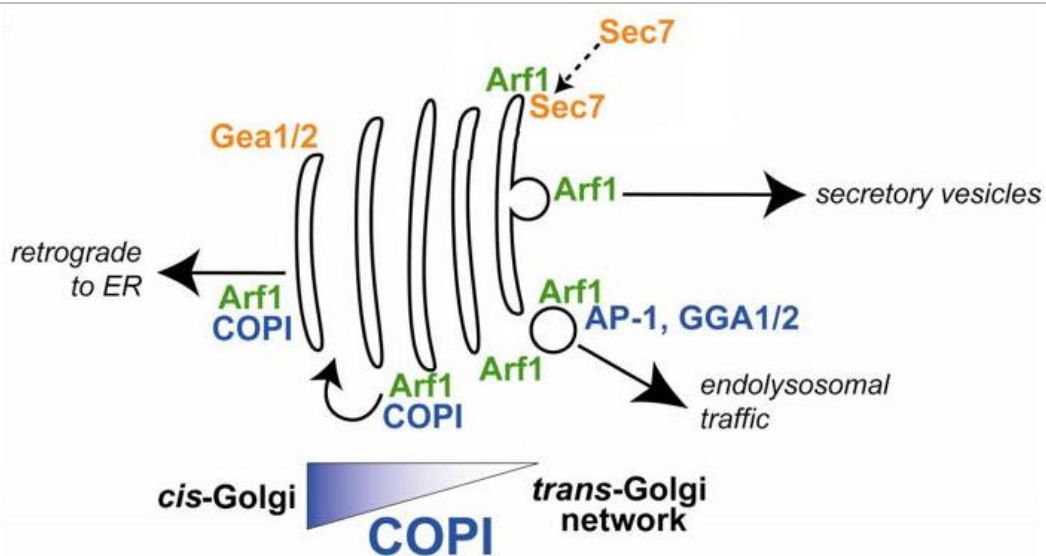


Figura 58. La disminución progresiva de COPI asociadas a las membranas del Golgi permite que Arf1 forme los diferentes tipos de vesículas.

Las Arf GEFs Gea1/2p y Sec7p compiten por Arf1p. En las cisternas tempranas del Golgi, la gran concentración de proteínas COPI asociadas a las membranas, gracias a las proteínas carga transmembrana, promueven un reclutamiento mayoritario de Gea1/2. En cambio, en el trans-Golgi la menor concentración de COPI permite que haya Arf1-GTP libre que promueve el reclutamiento de Sec7 y la formación de las vesículas de clatras que viajan en sentido anterógrado (Richardson *et al*, 2012).

El hecho de que las proteínas p24 puedan controlar la iniciación de la formación de vesículas COPI, atrayendo a Gea1/2p a través del coatómero,

implica que estas vesículas tenderán a formarse allí donde esté presente la carga proteica que debe ser devuelta mediante transporte retrógrado a compartimentos más tempranos (carga retrógrada). Esto concuerda con que la cubierta COPI y Gea1/2p se localicen, mayoritariamente, en las cisternas más tempranas del Golgi, ya que es allí donde más carga retrograda hay. Este sistema asegura por tanto, que las vesículas COPI se formen una vez que contienen la carga retrógrada. A medida que las cisternas van madurando, la carga retrógrada va siendo devuelta, hasta que en las cisternas tardías completamente maduras no quede nada de ella. Así, sin carga retrógrada, no habría coatómero estabilizado, por lo que no se atraería a Gea1/2p y por tanto no se promueve la formación de vesículas COPI. En estas cisternas maduras de *trans*-Golgi, Arf1p es entonces activado por su otra GEF, Sec7p, quien generará vesículas de clatrina y posiblemente también las vesículas que se dirigen hacia la membrana plasmática (Richardson *et al*, 2012). De esta forma, la ausencia de carga retrógrada en el *trans*-Golgi o TGN, podría actuar como un punto de no retorno, que una vez rebasado, sólo daría lugar a la exportación desde el Golgi de la carga secretora hacia el sistema endosomal o la membrana plasmática.

Por último, este estudio muestra también que el complejo p24, además de regular la actividad GEF de Gea1/2p, es capaz de favorecer la interacción de estas con factores de anclaje de las vesículas COPI que median el transporte retrógrado *intra*-Golgi, como el complejo COG (Chen *et al*, 2011). Así, regulando la unión de Gea1/2p con los factores de anclaje, el complejo p24 contribuye a coordinar los procesos de formación y anclaje de las vesículas COPI que viajan entre las cisternas del Golgi. Por tanto, en su conjunto, los datos presentados indican que el complejo p24 juega un papel central en el tráfico vesicular mediado por las cubiertas COPI, ya que mediante la estabilización del coatómero a la membrana del Golgi, favorece las distintas etapas de la formación de las vesículas de transporte retrógrado COPI en las que es un componente mayoritario.

4. CONCLUSIONES

4. Conclusiones

4. Conclusiones

En esta tesis se ha estudiado como los receptores de carga del RE, especialmente el complejo p24, regulan el tráfico vesicular en la ruta secretora temprana tanto en sentido anterógrado desde el RE al Golgi, como en sentido retrógrado entre las cisternas del Golgi y entre éste y el RE. Estos receptores, gracias a su capacidad de estabilizar fuertemente a las proteínas de cubierta a las membranas, garantizan la eficiencia del transporte al asegurar que las vesículas contienen las cargas a transportar y al retener a las cubiertas en las membranas facilitando la formación de las vesículas y el posterior anclaje de las mismas al orgánulo aceptor. En concreto, los resultados obtenidos permiten concluir que:

- 1.1. El complejo p24 actúa como una lectina que reconoce a las proteínas ancladas a GPI remodeladas a través del glicano, tras la remodelación llevada a cabo por la fosfoesterasa Ted1p. Esto permite que sólo las proteínas que han culminado satisfactoriamente su maduración sean exportadas del RE.
- 1.2. La interacción entre el complejo p24 y la cubierta COPII, específicamente a través de la subunidad Lst1p, está regulado por la interacción con las proteínas carga, garantizando que sólo se formen vesículas en presencia de moléculas a transportar.
- 2.1. El complejo p24 forma junto a los otros receptores de carga del RE, una plataforma que promueve la exportación eficiente de estos y sus cargas.
- 2.2. Esta plataforma de receptores es necesaria para la homeostasis de la ruta secretora temprana, ya que gracias a la estabilización masiva que promueve de las cubiertas COPII a las membranas, favoreciendo así el anclaje de las vesículas COPII al aparato de Golgi.
- 3.1. El complejo p24, además, es necesario en el transporte retrógrado mediado por las vesículas COPI, puesto que facilita la activación de Arf1p, al reclutar a través de las cubiertas a las Arf GEFs Gea1/2p.
- 3.2. La capacidad de unir a las proteínas COPI del complejo p24, favorece también las otras funciones de las Arf GEF Gea1/2p, como la interacción con los factores de anclaje del Golgi.

4. Conclusiones

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. Material y métodos

5.1. Organismos y condiciones de cultivo

5.1.1. *Escherichia coli*

5.1.1.1. Estirpes de *E. coli*

Los distintos plásmidos utilizados en este trabajo se amplificaron en la estirpe DH5- α (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*). Para la producción de proteínas de fusión con GST se empleó la estirpe BL21 (*dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) gal*) transformada con el plásmido pRARE (Véase 8.3.3.).

5.1.1.2. 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 (20min, 121°C).

Las células se incubaron en agitadores orbitales a 37°C y 250rpm. Los antibióticos se incorporaron al medio a partir de una disolución concentrada, esterilizada por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ 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 μ g/ml de ampicilina (Ap) y/o 34 μ g/ml de cloranfenicol (Cam).

En todos los casos, las estirpes bacterianas se conservaron a -80°C en medio LB fresco suplementado con glicerol al 25%.

5.1.1.3. Cultivo de *E. coli* en medio sólido

Para cultivo en medio sólido se utilizó medio LB complementado con agar bacteriológico (Aplichem) 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.

5.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

5.1.2.1. Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas

Las estirpes de levaduras son derivadas de dos fondos genéticos principalmente BY4742 y W303-1b. Las estirpes utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla VII, que se muestra a continuación.

Tabla VII. Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> empleadas en este trabajo.*		
*Las estirpes se presentan por orden de aparición.		
Estirpe	Características	Referencia
BY4742	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3</i>	EUROSCARF
BY4741	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3</i>	EUROSCARF
YO1432	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 ted1Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
MMY761	<i>MATa his3 leu2 ura3 ted1Δ::KanMx</i>	Este estudio
YSC5050	<i>MATa/α his3/his3 leu2 /leu2 met15/met15 ura3/ura3 CDC1/DAmP-cdc1:: KanMx</i>	INVITROGEN
MMY1257	<i>MATa his3 leu2met15 ura3 DAmP-cdc1:: KanMx</i>	Este estudio
Y11361	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 gpi7Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
MMY1265	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 DAmP-cdc1:: KanMx gpi7Δ::KanMx</i>	Este estudio
RH5175	<i>MATa his3 leu2 ura3 ade2 gpi7Δ::KanMx</i>	H. Riezman
MMY997	<i>MATa his3 leu2 ura3 ade2 trp1 gpi7Δ::KanMx ted1Δ::KanMx</i>	Este estudio
YSC1178	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 CDC1-TAP::HIS3</i>	INVITROGEN
Y15644	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 bst1Δ::KanMx</i>	EUROSCARF

Tabla VIII. Continuación.		
Y15768	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 per1Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
Y14451	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 gup1Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
Y13497	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 cwh43Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
MMY999	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 gpi7Δ::KanMx bst1Δ::KanMx</i>	Este estudio
RH5877	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 trp1 sec31-1</i>	H. Riezman
MMY779	<i>MATa his3 leu2 ura3 sec31-1 bst1Δ::KanMx</i>	Este estudio
MMY783	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 sec31-1 ted1Δ::KanMx</i>	Este estudio
MMY594	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 trp1 sec31-1 emp24Δ::KanMx</i>	Este estudio
RSY1800	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 lst1Δ::HIS3</i>	R. Schekman
RH7058	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 LST1-mCherry::KanMx</i>	H. Riezman
MMY1163	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 emp24Δ::hph LST1-mCherry::KanMx</i>	Este estudio
MMY1162	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 ted1Δ::hph LST1-mCherry::KanMx</i>	Este estudio
VGY448	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 EMP24-TAP::HIS3</i>	V. Goder
RH7016	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 ERV14-mCitrine::HIS5Sp</i>	H. Riezman
RH1498	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 sec16-2</i>	H. Riezman
MMY1271	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 trp1 sec16-2 ERV14-mCitrine::HIS5Sp</i>	Este estudio
Y04567	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
Y14567	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 emp24Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
Y04421	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 erv14Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
Y14421	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 erv14Δ::KanMx</i>	EUROSCARF

Tabla VIII. Continuación.		
MMY589	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24Δ::KanMx erv14Δ::KanMx</i>	Este estudio
Y15936	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 erv29Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
MMY680	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24Δ::KanMx erv29Δ::KanMx</i>	Este estudio
Y16952	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 erv41Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
MMY737	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24Δ::KanMx erv41Δ::KanMx</i>	Este estudio
Y15669	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp47Δ::KanMx</i>	EUROSCARF
MMY740	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24Δ::KanMx emp47Δ::KanMx</i>	Este estudio
RH1961	<i>MATa his4 leu2 ura3 emp24Δ::LEU2</i>	H. Riezman
RH123	<i>MATa leu1 ade2 trp5 can1 sst1 sst2</i>	H. Riezman
W303-1a	<i>MATa his3 leu2 ura3 ade2 trp1 can1</i>	V. Goder
W303-1B	<i>MATa his3 leu2 ura3 ade2 trp1 can1</i>	V. Goder
MMY925	<i>MATa his3 leu2 ura3 ade2 trp1 can1 emp24Δ::KanMx</i>	Este estudio
RH6153	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 trp1 erv29Δ::KanMx</i>	H. Riezman
MMY996	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 trp1 emp24Δ::hph erv29Δ::KanMx</i>	Este estudio
MMY1009	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 emp24Δ::hph erv14Δ::KanMx</i>	Este estudio
YSC95700	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 SEC16-GFP::HIS3</i>	INVITROGEN
MMY1090	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 SEC16-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1091	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24Δ::hph SEC16-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1092	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 erv14Δ::KanMx SEC16-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1080	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24Δ::hph erv14Δ::KanMx SEC16-GFP::HIS3</i>	Este estudio

Tabla VIII. Continuación.		
YSC95700	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 ANP1-GFP::HIS3</i>	INVITROGEN
MMY1039	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 ANP1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1040	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 emp24Δ::hph ANP1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1041	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 erv14Δ::KanMx ANP1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1042	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1 emp24Δ::hph erv14Δ::KanMx ANP1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
YSC95700	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 SEC21-GFP::HIS3</i>	INVITROGEN
MMY1152	<i>MATa his3 leu2 ura3 SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1153	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24Δ::hph SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1154	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 erv14Δ::KanMx SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1155	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 emp24Δ::hph erv14Δ::KanMx SEC21-GFP::HIS3</i>	Este estudio
YSC95700	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 KEX2-GFP::HIS3</i>	INVITROGEN
MMY1043	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 trp1 KEX2-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1044	<i>MATa his3 leu2 ura3 ade2 trp1 emp24Δ::hph KEX2-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1045	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 trp1 erv14Δ::KanMx KEX2-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1046	<i>MATa his3 leu2 ura3 trp1 emp24Δ::hph erv14Δ::KanMx KEX2-GFP::HIS3</i>	Este estudio
RH1433	<i>MATa leu2 ura3 sec23-1</i>	H. Riezman
MSY1097	<i>MATa leu2 ura3 bet3-1</i>	N. Segev
RH4904	<i>MATa ura3 trp1 uso1-1</i>	H. Riezman
RH2863	<i>MATa his4 leu2 ura3 trp1 ret1-1</i>	H. Riezman
YSC95700	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 GRH1-GFP::HIS3</i>	INVITROGEN

Tabla VIII. Continuación.		
MMY1027	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 GRH1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1028	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 emp24Δ::hph GRH1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1029	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 erv14Δ::KanMx GRH1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1030	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 emp24Δ::hph erv14Δ::KanMx GRH1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
YSC95700	<i>MATα his3 leu2 met15 ura3 BUG1-GFP::HIS3</i>	INVITROGEN
MMY1023	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 BUG1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1024	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 emp24Δ::hph BUG1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1025	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 erv14Δ::KanMx BUG1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
MMY1026	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 emp24Δ::hph erv14Δ::KanMx BUG1-GFP::HIS3</i>	Este estudio
CJY049-2-4	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2</i>	C.L. Jackson
MMY914	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2 emp24Δ::KanMx</i>	Este estudio
RSY1818	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2</i>	A. Spang
APY022	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2 gea1-6 gea2Δ::HIS3</i>	A. Spang
MMY816	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2 gea1-6 gea2Δ::HIS3 emp24Δ::hph</i>	Este estudio
RSY1816	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2 gea1-4 gea2Δ::HIS3</i>	A. Spang
MMY810	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2 gea1-4 gea2Δ::HIS3 emp24Δ::hph</i>	Este estudio
APY026	<i>MATα his3 leu2 ura3 gea1-19 gea2Δ::HIS3</i>	A. Spang
MMY817	<i>MATα his3 leu2 ura3 gea1-19 gea2Δ::HIS3 emp24Δ::hph</i>	Este estudio
CJY52-10-2	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2 gea1Δ::HIS3 gea2Δ::HIS3 + pCLJ92 (URA3-GEA1)</i>	C.L. Jackson
MMY920	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 ade2 gea1Δ::HIS3 gea2Δ::HIS3 emp24Δ::KanMx + pCLJ92 (GEA1)</i>	Este estudio

Tabla VIII. Continuación.		
MMY927	CJY52-10-2 - pCLJ92 + pSKP61 (<i>gea2-28</i>)	Este estudio
MMY928	MMY920 <i>emp24Δ::KanMx</i> - pCLJ92 + pSKP61 (<i>gea2-28</i>)	Este estudio
MMY929	CJY52-10-2 - pCLJ92 + pSKP61 (<i>gea2-60</i>)	Este estudio
MMY930	MMY920 <i>emp24Δ::KanMx</i> - pCLJ92 + pSKP61 (<i>gea2-60</i>)	Este estudio
MMY931	CJY52-10-2 - pCLJ92 + pSKP61 (<i>gea2-74</i>)	Este estudio
MMY932	MMY920 <i>emp24Δ::KanMx</i> - pCLJ92 + pSKP61 (<i>gea2-74</i>)	Este estudio
MMY933	CJY52-10-2 - pCLJ92 + pSKP61 (<i>gea2-610</i>)	Este estudio
MMY934	MMY920 <i>emp24Δ::KanMx</i> - pCLJ92 + pSKP61 (<i>gea2-610</i>)	Este estudio
YSC95700	MATa <i>his3 leu2 met15 ura3</i> ARF1-GFP:: <i>HIS3</i>	INVITROGEN
MMY562	MATa <i>his3 leu2 ura3</i> <i>emp24Δ::KanMx</i> ARF1-GFP	Este estudio
RY	MATa <i>his3 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1</i> <i>arf1Δ::HIS3</i>	A. Spang
MMY1310	MATa <i>his3 leu2 lys2 ura3 ade2</i> <i>arf1Δ::HIS3</i>	H. Riezman
MMY1311	MATa <i>his3 leu2 lys2 ura3 ade2</i> <i>arf1Δ::HIS3 emp24Δ::KanMx</i>	Este estudio
RH5487	MATa <i>his4 leu2 lys2 ura3</i> <i>sec34-2</i>	H. Riezman
MMY955	MATa <i>his4 leu2 lys2 ura3 ade2 trp1</i> <i>sec34-2 emp24Δ::KanMx</i>	Este estudio
RH5003	MATa <i>his4 leu2 ura3</i> <i>trs130-33-HA</i>	N. Segev
MMY711	MATa <i>his3 leu2 ura3 ade2</i> <i>trs130-33-HA</i>	Este estudio
MMY712	MATa <i>his3 leu2 ura3 ade2</i> <i>trs130-33-HA emp24Δ::KanMx</i>	Este estudio
YSC95700	MATa <i>his3 leu2 met15 ura3</i> COG3-GFP:: <i>HIS3</i>	INVITROGEN
MMY1036	MATa <i>his3 leu2 met15 ura3</i> <i>emp24Δ::hph</i> COG3-GFP:: <i>HIS3</i>	Este estudio

5.1.2.2. Cultivo de *S. cerevisiae* en medio líquido

Las levaduras se cultivaron en medio completo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%).

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 matraces Erlenmeyer de volumen variable y se dejaron crecer en las mismas condiciones sin sobrepasar una DO₆₀₀ igual a 1 durante el tiempo necesario para obtener la DO óptima para cada experimento.

Cuando se requirió crecer las células en medios selectivos, se usó medio SC, sintético completo (Base Nitrogenada de levadura (YNB; Difco) 0,67%, como fuente de fósforo, potasio, sulfato, magnesio, calcio, vitaminas y oligoelementos, glucosa 2%). Este medio fue suplementado con 40mg/l de aminoácidos y bases nitrogenadas dependiendo de las auxotrofías de las estirpes a cultivar respectivamente (uracilo, adenina, L-triptofano, L-histidina, L-leucina, L-lisina y/o L-metionina). La esterilización se llevó a cabo mediante autoclavado, excepto el YNB y las soluciones de aminoácidos y nucleótidos que se filtraron y añadieron posteriormente al medio.

En los ensayos de sensibilidad a BFA se empleó medio SC suplementado con 0,001% de SDS, para hacer las células permeables a la droga (Pannunzio *et al*, 2004). Tras la esterilización del medio, se completó añadiendo 10 o 25µg/ml de BFA (LC Laboratories), o el volumen equivalente de DMSO.

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.

5.1.2.3. 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, nucleótidos y agar. Tras dejar enfriar hasta 55 °C, el

medio se suplementó con una solución concentrada de YNB y se extendió en placas de Petri. Cuando fue necesario se añadieron antibióticos al medio sólido a 55°C antes de la polimerización: 200µg/ml G-418 (Sigma) o 150µg/ml Higromicina B (Amresco).

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

En los ensayos 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 a las placas de YPD pH 5,5.

5.2. Técnicas genéticas

5.2.1. Transformación de *Escherichia coli*

Las células cepa de *E.coli* DH5α se hicieron aptas para transformación (competentes) siguiendo el siguiente método. La transformación de células competentes se realizó añadiendo a la suspensión celular, previamente descongelada, el ADN en un volumen máximo de 10µl. 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 sembró 100µl 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 cultivaron las células durante toda la noche y se diluyó a la mañana siguiente el cultivo. Cuando el

cultivo bacteriano estuvo en fase exponencial temprana se tomó 1ml de éste 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%, 100mM MgSO₄ pH 6,5). Tras incubar en hielo otros 5 minutos, se añadieron 5-10µg 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.

5.2.2. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la transformación con plásmidos, se usó el método ONE-STEP (Chen *et al*, 1992). Se partió de células viables de levadura en suspensión a DO 5×10^7 . Se sustituyó mediante dos lavados el medio de cultivo por agua destilada estéril. A continuación se centrifugaron y se resuspendieron en 100ul de One-Step Tampón (0,2M acetato de litio, PEG-4000 40%, 100mM DTT) por transformación. Después se añadió 1µl del plásmido de interés y 2µl de esperma de salmón (Sigma). Se mezcló usando un *vortex* a máxima revolución durante 10 segundos. Posteriormente se incubó a 45°C durante 30-40minutos. Para terminar se sembró en el medio selectivo directamente la suspensión de transformación.

Para la transformación con ADN linearizado o fragmentos de PCR se siguió el siguiente protocolo. Se recogieron entre 100 y 200 x 10⁶ células en fase exponencial de crecimiento y se lavaron dos veces en LiAc-TE (100mM acetato de litio, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA). A continuación se resuspendió el cultivo en LiAc-TE 40% PEG-4000 y se añadió 1µg de ADN plasmídico o 2-5 µg de ADN linearizado para integración genómica; y 25µg de esperma de salmón (Sigma). Se incubó tras mezclar con pipeta 30 min 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 (SC menos el requerimiento cuya prototrofia aporta el plásmido). En el caso de que el plásmido o el fragmento de ADN aportó resistencia a antibióticos, antes de sembrar las células en presencia de éste, se recuperó el cultivo creciendo durante 2 horas en YPD.

5.2.3. Generación de cepas de levadura

5.2.3.1. Cruce, esporulación y disección de tétradas.

Con el objetivo de obtener levaduras diploides, se mezclaron estirpes de sexo (MAT) complementarios, α 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. Tras 1 o 2 días para obtener los diploides, estos se transfirieron a placas de PreSPO para potenciar el gasto de las reservas de nitrógeno, y finalmente se transfirieron a medio SPO. 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, epítomos, etc.)

5.2.3.2. 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 fragmentos se integraron mediante el protocolo de transformación explicado en 2.2.2. Estos fragmentos contienen marcados como prototrofia o resistencia a un antibiótico, pero carecen de origen de replicación, de modo que sólo si se expresen 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.

En el caso de no querer eliminar el gen, si no 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, se realizó un inmunoblot o se comprobó por microscopía de fluorescencia la presencia del epítomo.

5.2.4. Ensayos de crecimiento celular

Se emplearon cultivos de células en fase exponencial temprana de crecimiento ($DO < 1$) para realizar 5 diluciones seriadas desde 1×10^7 o 5×10^6 hasta 1×10^3 o 5×10^2 , respectivamente. De cada dilución se sembraron gotas

de 5µl 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 empleado un escáner HP Scanjet 3770.

5.3. Técnicas de manipulación de ADN

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

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 10µl de tampón SPZ (50µl fosfato sódico 1M pH 7,5, 300µl sorbitol 2M, 87µl zimoliasa 20T (USBiological), 67µl H₂O). Se incubó a 37°C durante 30 minutos, y posteriormente se incubó a 100°C durante 10 minutos. A continuación se

centrifugó a 12100g durante 10 min a 4°C. Finalmente se añadió 1 µl 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 20µl, 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°C. Posteriormente se inactivó ésta añadiendo 5 µl de EDTA 200 mM e incubando durante 10 minutos a 65°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 10µl del tampón comercial de la enzima (40mM Tris-HCl pH7,8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT y 0,5mM ATP). La solución de ligación se incubó a 14 °C durante al menos 2h ó a 4 °C durante 16-24h.

La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon en tampón TAE (40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA). La concentración de agarosa (p/v) en los geles era variable entre el 0,7% (para la separación de bandas de tamaños mayores o iguales a 1 kb) y el 2% (para bandas de peso molecular inferior a 40pb). Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se suplementaron con tampón de carga de ADN (1mM EDTA pH8, 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 (1µg/ml). 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 diluyó 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 260nm como a 280nm. Como criterio de pureza se usó la relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}), 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.

La secuenciación automática del ADN encargó a la empresa StabVida.

5.3.2. 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 células, habiendo crecido toda la noche a 37 °C en agitación, se recogió por centrifugación (5 min a 3000g) en tubos de 1,5 ml y el precipitado celular se resuspendió en 100µl de solución I (25mM Tris-HCl pH8, 50mM glucosa, 10mM EDTA pH8). A continuación, se añadieron 200µl de solución II (0,2N NaOH, SDS 1% (p/v)) y se mezclaron las muestras invirtiendo brevemente hasta diez veces. Para neutralizar, se añadieron 150µl de solución III (5M 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 13.000g, 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 1ml de etanol absoluto y precipitación a -20°C durante 30 minutos. Se concentró el ADN mediante centrifugación a 13000g 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 40µl 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.

5.3.3. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran detallados en la Tabla VIII. Los plásmidos no publicados creados para este estudio se generaron como se explica a continuación.

Tabla VIII. Plásmidos usados en este trabajo*.		
* Los plásmidos se muestran por orden de aparición.		
Plásmidos de expresión en levaduras		
Plásmido	Características	Origen
pRS415	CEN LEU2	A. Aguilera
pVGB152	CEN LEU2; TED1-TAP	V. Goder
pVGB249	CEN LEU2; TED1-N233A,H234A-TAP	V. Goder
pRH3084	CEN URA3; ADH1p-CWP2-VENUS	H. Riezman
pRS426	2 μ URA3	A. Aguilera
pHsPGAP5	2 μ URA3; MPPE1 (<i>Hs</i> PGAP5)	R. Wellinger
pRS416	CEN URA3	R. Wellinger
pAC530	CEN HIS3; ERV29-3xHA	C. Barlowe
pJML01	CEN LEU2; ERV29-3xHA	Este estudio
pKTY12	CEN LEU2; LST1	R. Schekman
pLM218	CEN LEU2; LST1-K543A-R545A	R. Schekman
pLM219	CEN LEU2; LST1-K543A-R545A	R. Schekman
pRS3127	CEN URA3; EMP24-CFP	H. Riezman
pKSY142	CEN TRP1; EMP47-GFP	K. Sato
pMO13	CEN URA3; HDEL-GFP	T. Yoko-o
pRH3128	CEN URA3; SEC13-mCherry	H. Riezman
pSKY5	CEN URA3; RER1-GFP	K. Sato
pRS415SEC7	CEN LEU2; SEC7-dsRed	A. Spang
pPLA5	BET3-GFP	Este estudio
pERV14	CEN URA3; ERV14-HA	C. Barlowe
pERV14-KS	CEN URA3; ERV14-KS-HA (97-101A)	C. Barlowe
pRC4	2 μ URA3; GEA1-5xHA	C.L. Jackson
pRS3125	CEN LEU2; EMP24-CFP	H. Riezman
pPLA6	CEN URA3; SEC21-GFP	Este estudio
pRS315SNC1	CEN LEU2; SNC1-GFP	C. Roncero
pJS109	2 μ URA3; TPIp-ERD2-myc	C. Barlowe
pRSB1866	2 μ URA3; MST27	A. Spang
CEN: plásmido monocopia / 2 μ : plásmido multicopia ADH1p, TPIp: promotores fuertes para sobreexpresión		

pERV29-HA LEU2

Este plásmido se generó a partir del plásmido pAC530 (C. Barlowe). Desde el vector original se obtuvo a partir de la digestión con la enzima XhoI y posterior purificación del fragmento linearizado. A continuación se linearizó el vector pRS315 y se realizó la ligación del gen.

pBET3-GFP, pSEC21-GFP

Estos plásmidos se obtuvieron de la amplificación de la ORF del gen completa, incluyendo el epítipo GFP, a partir de PCR de colonias de las cepas BET3-GFP y SEC21-GFP (Invitrogen) respectivamente, usando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla X. El producto de PCR digerido con XhoI y purificado, se ligó con el vector linearizado con XhoI, defosforilado y purificado.

Tabla IX. Continuación*.		
* Los plásmidos se muestran por orden de aparición.		
Plásmidos de expresión en bacterias		
Plásmido	Características	Origen
pRARE	ARNt característicos de eucariotas	J. de la Cruz
pGEX-4T-1	GST	F. Ramos
pPLA1	GST-CT-EMP24	Este estudio
pPLA2	GST-CT-EMP24-FF	Este estudio
pPLA3	GST-CT-ERV25	Este estudio
pPLA4	GST-CT-ERV25-KK	Este estudio
pFA6a-kanMx6	Empledo para generar fragmentos de PCR para resistencia a G418.	A. Aguilera
pFA6a-hphNT1	Empledo para generar fragmentos de PCR para resistencia a higromicina B.	A. Aguilera

GST-CT-EMP24/ERV25

Estos plásmidos se obtuvieron a partir del vector pGEX-4T-1. Se diseñaron oligonucleótidos (Tabla X) con la secuencia completa del tallo citosólico silvestre o mutado de Emp24p y Erv25p, añadiendo en los extremos la secuencia correspondiente a la digestión con las enzimas BamHI y EcoRI. Cada pareja de oligos complementarios se incubó a 95°C durante 10 minutos, y posteriormente a temperatura ambiente durante 10 minutos, con el fin de obtener los insertos de doble cadena. El vector pGEX-4T-1 se digirió

secuencialmente con las enzimas EcoRI (Takara) y con BamHI (Roche), y posteriormente se purificó desde un gel de agarosa. Inserto y vector se ligaron a 16°C durante toda la noche usando la ligasa T4.

5.3.4. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos usados en este estudio se emplearon como cebadores en reacciones de PCR. En la Tabla IX, que se muestra a continuación se presentan en sentido 5'-3'. Los sitios de restricción añadidos que muestran subrayados. Los codones mutados se muestran en negrita.

Tabla IX. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	
Oligo	Secuencia 5'-3'
SEC21_directo	GGCACAATTGCTACTGACATTA <u>CTCGAG</u> GAAACCTCATGATGCATCCC C
BET3_directo	CATTTTTTTGACTTAAGCATA <u>CTCGAG</u> TTTTGTAGCGAGTTTATTAGCG
GFP_reverso	GCGCACGTCAAGACT <u>CTCGAG</u> GAGGGTATTCTGGGCC
F_emp24CT_wt	<u>GATCCTTGAGAAGATTCTTTGAGGTCACATCTCTAGTCTAAG</u>
R_emp24CT_wt	<u>AATTC</u> TTAGACTAGAGATGTGACCTCAAAGAATCTTCTCAAG
F_emp24CT_mut	<u>GATCCTTGAGAAGAGCGGCGGAGGTCACATCTCTAGTCTAAG</u>
R_emp24CT_mut	<u>AATTC</u> TTAGACTAGAGATGTGACCTC CGCCGCT CTTCTCAAG
F_erv25CT_wt	<u>GATCCTTGAAGAACTACTTCAAACGAAACATATCATTTAAG</u>
R_erv25CT_wt	<u>AATTC</u> TTAAATGATATGTTTCGTTTTGAAGTAGTTCTTCAAG
F_erv25CT_mut	<u>GATCCTTGAAGAACTACTTCGGACGCGCCATATCATTTAAG</u>
R_erv25CT_mut	<u>AATTC</u> TTAAATGATAT CGCCGTCGC GAAGTAGTTCTTCAAG
F_emp24KO	ATAGTATCCCTCCGCACAAAATAACACACGCATAAGGATG CGGATCCC CGGGTTAATTA
R_ted1KO	GCAAAAGTAAATAGATATGAACTACATTTTCCTGCTTTAC GAATTCGAG CTCGTTTAAAC
KO_emp24	GGCTCAATCGTAGTGTCTTC
F_ted1KO	AAAACAACAGCAGCAGCATTGTACCAAGAATCCCAAGATG CGGATCCC CGGGTTAATTAA
R_ted1KO	ATCTCTATACAGGAGTTTTATCTTCTTTACTCTTTTTTGT GAATTCGAGC TCGTTTAAAC
KO_ted1	GGCGCAGATGAAAATGGAAC
R_tef	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT
<u>Subrayado</u> : dianas de corte	
Negrita : mutaciones y zonas de recombinación	

5.4. Técnicas bioquímicas

5.4.1. Geles de acril-amida, inmunoblots y anticuerpos

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), 0,3M Tris-HCl pH 6,8, azul de bromofenol 0,05% (p/v), β -mercaptoetanol 25% (v/v), glicerol 50%). Las muestras, una vez suplementadas, se calentaron a 65-100 °C durante 3-10 min, dependiendo de la proteína de interés del extracto.

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizaron en geles de poliacrilamida que contenían SDS (en adelante SDS/PAGE). El gel separador se preparó en tampón (375mM Tris-HCl pH8,8, SDS 0,1%), al 7,5, 10 ó 12,5% (p/v) de poliacrilamida a partir de acrilamida:bisacrilamida 37,5:1 40% (Amresco). El gel de empaquetamiento de las muestras se preparó al 5,25% (p/v) de poliacrilamida tampón (125mM Tris-HCl pH6,8, SDS 0,1%). Los geles se polimerizaron con APS 0,1% (p/v), usando como agente catalizador TEMED a una concentración final de 6mM.

La electroforesis se llevó a cabo a 200V, voltaje constante. Para el desarrollo de la electroforesis. Como tampón de electroforesis se utilizó 25mM Tris-HCl, 0,32M glicina (pH 8,3) y SDS 0,1% (p/v).

Una vez finalizada la electroforesis, cuando fue necesario, las proteínas se tiñeron 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 *Wathman* y se sometieron a aspiración a 100°C durante 45 minutos.

5.4.2. Westernblots y anticuerpos

Los *Western Blots* (WB) se realizaron como se describe en (Aguilera-Romero *et al*, 2008). La transferencia se realizó en tampón Towbin (25mM Tris

pH8,3, 192mM glicina, metanol 20% (v/v)) a 70V durante 60 minutos a 4°C. El gel de acrilamida con las proteínas de interés se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45µm diámetro de poro previamente mojada en Towbin. La pareja gel-membrana se cubrió a ambos lados con 2 láminas de papel Wathman mojados en Tobwin respectivamente 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-Tween20 (20mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, Tween20 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 2mM Na₃N. 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 eliminó los restos de anticuerpo así como de leche lavando al menos 6 veces con TBS-Tween20.

Para de 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 quimiluminiscencia se realizó con el programa Multigauge (Fujifilm).

Los anticuerpos usados se detallan en la Tabla X a continuación.

Tabla X: Anticuerpos usados en este trabajo*.				
* Los anticuerpos se muestran por orden de aparición.				
Antígeno		Tipo	Origen	Dilución
Gas1p	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:3000

Tabla XI: Continuación				
Antígeno		Tipo	Origen	Dilución
Hexoquinasa	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:10000
TAP	Conejo	Primario - policlonal	Bionova	1:500
GFP	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:3000
Emp24p	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:500
HA	Ratón	Primario - monoclonal	Roche	1:1000
Erv25p	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:500
Sec61p	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:1000
6xHis	Ratón	Primario - monoclonal	Invitrogen	1:1000
CPY	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:5000
RFP	Rata	Primario - monoclonal	Chromotek	1:500
Sec24p	Conejo	Primario - policlonal	A. Spang	1:1000
Pgk1p	Ratón	Primario - monoclonal	J. de la Cruz	1:5000
Emp47p	Conejo	Primario - policlonal	A. Spang	1:500
Wbp1p	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:1000
Factor alfa	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:1000
Invertasa	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:3000
Coatómero	Conejo	Primario - policlonal	A. Spang	1:1000
Bos1p	Conejo	Primario - policlonal	H. Riezman	1:1000
IgG de conejo	Cabra	Secundario + HRP	Pierce	1:3000
IgG de ratón	Cabra	Secundario + HRP	Pierce	1:3000
IgG de rata	Cabra	Secundario + HRP	Pierce	1:3000

5.4.3. 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 0,15M NaOH. A continuación se centrifugaron a baja revolución, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2X Tampón de carga Laemli (SDS 2%, 200mM β -mercaptoetanol, glicerol 20%, 120mM Tris-HCl pH6,8, 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.

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 siguió el siguiente método. Partiendo de $20\text{-}100 \times 10^7$, se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en $250\mu\text{l}$ de TE (50mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM EDTA) complementado con 0,5mM PMSF y $1\mu\text{g/ml}$ de coctel de inhibidores de proteasas (antipapaina, 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 *vortex* a 4°C o bien a 3 pulsos en FastPrep-24 (MPBio) a 50m/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 vidrios se añadió el mismo volumen de tampón fresco, para recuperar así el material. El volumen final se sometió a dos centrifugaciones sucesivas a 5 minutos a $1000g$ a 4°C para precipitar los restos celulares de gran tamaño y células no rotas. Estos extractos se analizaron por inmunoblot o bien se emplearon para ensayos posteriores como se detallan a continuación.

5.4.4. Purificación de proteínas recombinantes de fusión con GST

Las proteínas fusionadas a glutatión-S-transferasa (GST) se purificaron a partir de células de la estirpe BL21 de *E. coli* que contenían el plásmido pRARE. Las células que contenían los plásmidos crecieron en medio selectivo (LB + ampicilina+ cloranfenicol) hasta $\text{DO}=0,4$ a 37°C , para posteriormente inducir la expresión de las proteínas de fusión añadiendo 0,3mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 24°C durante 3-4 horas.

Tras la inducción, las células fueron recogidas por centrifugación a $3000g$ durante 30 minutos a 4°C . El pellet se congeló a -80°C durante al menos 20 minutos. A continuación, los pellets se resuspendieron en 10 ml de buffer PBS complementado con TX-100 0,1% en presencia de inhibidores de proteasas y 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). Los restos celulares no rotos se eliminaron por centrifugación a $28000g$ durante 30 minutos a 4°C .

El sobrenadante obtenido se incubó en rotación durante 3 horas a 4°C con bolas de glutatión-agarosa (Thermo Scientific), equilibradas al 30% en PBS con TX-100 0,1%. Las bolas se equilibraron mediante centrifugaciones y

lavados sucesivos el mismo tampón. Tras el último lavado, se resuspendieron en el tampón complementado con 2mM Na₃N para su almacenaje. De este stock se tomaron 30µl por ensayo, equilibrándose de nuevo las bolas en el tampón de interés.

El contenido en proteína de los diferentes extractos 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 10min a temperatura ambiente. A continuación, se midió la absorbancia de las mismas a 595nm. Como patrón, se utilizaron cantidades conocidas de ovoalbúmina.

5.4.5. 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 (véase apartado 8.4.3).

Con el fin de enriquecer en interacciones presentes en el retículo endoplasmático, el extracto se sometió a centrifugación diferencial para RE (13000xg 15min 4°C). Tras este enriquecimiento en membranas del retículo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el tampón TNE1%D (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 17000g 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 50.000rpm (rotor TLS-55 (Beckman Coulter)) durante 4 horas a 4°C. A continuación, se recogieron muestras de 105 ul y 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.

5.4.6. Análisis de interacción proteína-proteína

5.4.6.1. Ensayos de *pull-down*

Para los ensayos de *pull-down* se partió de citosol purificado. Dicho citosol se obtuvo a partir de un cultivo celular en DO 1-2. Se recogieron las células por centrifugación en frío y se resuspendió el pellet en 3 ml de B88 (20mM HEPES pH6,8, 150mM KOAc, 250mM sorbitol, 5mM MgOAc) por cada 11g de pellet. Esta suspensión se fraccionó en gotas sobre nitrógeno líquido, y éstas se rompieron en mortero manteniendo la temperatura a -80°C durante todo el proceso.

El polvo celular obtenido se dejó descongelar a 4°C, tras lo cual se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 3200g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar, tras lo cual se cambió de tubo y se le añadieron inhibidores de proteasas y 0,2 µM DTT. Se centrifugó a 13000g durante 30 minutos a 4°C, y el sobrenadante se centrifugó dos veces a 100000g durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante final se alicuotó y se congeló en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80°C.

Para los ensayos de *pull-down* se incubaron 30 µl de bolas con 45 µl de citosol, en tubos de 0.5 ml durante 2.5 horas a 4°C. Tras esto se lavaron las bolas 8 veces 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 desnaturalizó el inmunoprecipitado durante 10 minutos a 65°C.

5.4.6.2. 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 (véase apartado 2.4.3).

Para estudiar la interacción física entre proteínas transmembrana se empleó el tampón TNE1%D. Todos los pasos se realizaron en hielo. Tras incubación 1 hora el extracto celular en presencia del detergente, se eliminaron los contenidos insolubles se centrifugó a 17000g durante 1 hora a 4°C. A

continuación se realizó la inmunoprecipitación. Se incubó durante 1 hora en TNE1%D la matriz de bolas vacías (sin anticuerpos) para eliminar uniones inespecíficas. 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 se empleó la matriz GFP-Trap (Chromotek), mientras que para proteínas detectas con anticuerpos policlonales de conejo se usó una matriz de sefarosa conjugada a proteína A (GE Healthcare), y finalmente para anticuerpos monoclonales de ratón se empleó la misma matriz de sefarosa conjugada en este caso a proteína G (GE Healthcare). 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 desnaturalizó el inmunoprecipitado durante 10 minutos a 65°C.

Para analizar la interacción entre proteínas solubles o entre proteínas transmembranas con proteínas solubles se empleó tampón HEPES (20mM HEPES pH7,2, 100mM KCl, 5mM MgCl₂) 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 (13000g 15min 4°C). Tras el enriquecimiento en membranas del retículo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el tampón de interés.

5.4.6.3. *Crosslinking*

Con el objetivo de detectar uniones proteína-proteína transitorias se empleó la aproximación del enlazado químico cruzado (*crosslinking*). Concretamente, se empleó el agente DSP (Di-tiobis[succinimidil propionato](Pierce)), que se caracteriza por ser un agente reactivo que enlaza grupos amina entre sí, a una distancia de 12Å que equivale a 8 átomos de carbono.

El DSP se empleó a una concentración de 1mM (solución de partida 1M en DMSO 99,9% recién abierto). El tratamiento se realizó a 20°C durante 20 minutos. Posteriormente la reacción se paró mediante la adición de glicina 50mM y la incubación a 20°C durante 5 minutos más (Castillon *et al*, 2011). La aplicación del DSP se realizó sobre extractos celulares antes de comenzar la inmunoprecipitación (véase 2.4.8.2).

5.5. Subfraccionamiento celular

Las células se cultivaron durante dos días en el medio de cultivo de interés sin rebasar $DO=1$. Se recogieron 20×10^7 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 1ml de 50mM tampón fosfato complementado con 1,4M de sorbitol. Después se añadió 3,5 μ l de β -mercaptoetanol y 33 μ 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 (100mM HEPES pH7,2, 1,7M de sorbitol).

El precipitado de esferoplastos se rompió mecánicamente en 250 μ l de tampón de lisis (100mM HEPES pH7,2, 1mM EGTA) complementado con 2mM DTT, 1X inhibidores de proteasas y 1X PMSF). Se añadieron 100 μ l de bolas de vidrio y se sometió a agitación en *vortex* durante 3 minutos. El extracto fue diluido en 750 μ l de tampón fresco y se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a 1000g durante 5 minutos. Se tomaron 150 μ l de total.

El extracto aclarado fue sometido a centrifugación diferencial, 13000g 15 minutos para enriquecer en retículo endoplasmático, o bien 100000g para el aparato de Golgi. Tras esta centrifugación, el sobrenadante y el precipitado resuspendido en el mismo volumen de buffer, fueron sometidos de nuevo a la centrifugación diferencial. Tras esta se tomaron 150 μ l de pellet y sobrenadante y se desnaturalizaron añadiendo 50 μ l tampón de carga Laemli, al igual que los totales, que se conservaron a -80°C durante el transcurso del ensayo, a 95°C durante 5 minutos.

5.6. Ensayos de transporte de proteínas in vivo – pulso y caza

El transporte in vivo de proteínas se desarrollo siguiendo el protocolo de pulso y caza descrito previamente (Sutterlin *et al*, 1998).

Las células se cultivaron durante toda la noche en el medio SC-met sin sobrepasar $DO_{600} = 1$. Se recogieron células suficientes a razón de 3×10^7 células por punto de tiempo. A continuación se lavaron en medio fresco dos veces, y finalmente se resuspendieron las células en un volumen de 0,5ml por punto de tiempo. Se incubó a la temperatura de interés durante 15 minutos.

A continuación se dio el pulso con el isótopo radiactivo a incorporar. En este caso, $100 \mu\text{Ci}$ que equivalen a $9 \mu\text{l}$ de coctel de metionina y cisteína con azufre³⁵ (NEG772002MC – Perkin Elmer). La duración del pulso varió entre 3 y 5 minutos según la cinética de transporte previamente descrita para cada proteína de interés.

El pulso se paró y comenzó la caza mediante la adición de una mezcla al 0,003% (p/v) 1:1:1 de metionina, cisteína y sulfato amónico. Se tomaron alícuotas de 0,5ml para cada tiempo a partir del punto 0. El transporte se detuvo mediante la adición de $15 \mu\text{l}$ de azida sódica 2M a 4°C .

Posteriormente se lisaron las células mediante agitación en vórtex a 4°C con perlas de vidrio de 0,4-0,6 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) en tampón TEPI ((50mM Tris-HCl pH7,5, 5mM EDTA) complementado con inhibidores de proteasas y PMSF). Se eliminaron las células no rotas mediante centrifugación. A continuación el extracto de proteínas se desnaturizó mediante la adición de 1% SDS y la incubación durante 3 minutos a 95°C . Los restos insolubles se eliminaron mediante centrifugación a temperatura ambiente a $12100g$ durante 5 minutos.

Para la inmunoprecipitación de las proteínas de interés, el extracto de proteínas fue llevado a 5 ml de tampón TNET (100mM Tris-HCl pH8, 100mM NaCl, 5mM EDTA, TritonX-100 1%, 1mM Na_3N) y se añadieron $1 \mu\text{l}$ del anticuerpo de interés, así como $100 \mu\text{l}$ de una preparación de bolas al 30% de sefarosa conjugadas a proteína A o proteína G, según si el anticuerpo provenía de conejo o ratón respectivamente (GE-Healthcare). La inmunoprecipitación tuvo lugar toda la noche a 4°C o durante 2 horas a temperatura ambiente. Los

inmunoprecipitados se lavaron seis veces con tampón TNE. Tras el último lavado, se secó el tampón y se resuspendió en tampón de carga Laemmli. Se desnaturalizó la muestra a 95°C durante 3 minutos y se analizó mediante electroforesis.

El gel adecuadamente secado se expuso en una pantalla sensible a radiación y se digitalizó empleando el dispositivo PhosphorImager Fujifilm FLA-5100. La cuantificación se realizó con el software Multigauge de Fujifilm.

5.7. Técnicas de Microscopía

Todas las células analizadas mediante microscopía se obtuvieron de cultivos que habían crecido durante dos días sin sobrepasar $DO=1$, preservando así la fase exponencial de crecimiento de los cultivos.

Antes de la observación por microscopía, las células fueron recogidas por centrifugación y lavadas dos veces en medio de cultivo fresco, para eliminar así los restos celulares.

5.7.1. Microscopía de fluorescencia

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

Filtros empleados del microscopio Olympus BX61				
Nombre comercial	Etiqueta	Filtro excitación	Espejo dicróico	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 preparaciones para captar las imágenes de fluorescencia *in vivo* fueron realizadas en el momento, poniendo 2,5µl del cultivo sobre el portaobjetos, previamente limpio con etanol 70%, cubiertos con un cubreobjetos de 20x20mm y presionadas uniformemente para retirar el exceso de líquido.

5.7.2. Microscopía electrónica

Las células analizadas por microscopía electrónica se fijaron directamente sobre el cultivo con 0,5% de glutaraldehído durante 5 minutos a temperatura ambiente. Todos los lavados y cambios de tampón realizados posteriormente se hicieron por centrifugación a 5000g a temperatura ambiente durante 2 minutos. A continuación se sustituyó el medio de cultivo por tampón cacodilato 0,1M suplementado con 0,5% de glutaraldehído. Después, se refrescó el tampón de fijación aumentando la concentración del fijador al 2,5%. Se incubó durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, se lavó 5 veces con tampón cacodilato sin fijador. Las células fijadas se almacenaron en frío.

Para contrastar las muestras, se cambió el tampón por cacodilato 0,2M y se añadió 1% OsO₄ (disuelto en agua didestilada) y se incubó a 4°C en oscuridad. A continuación se hicieron 4 lavados consecutivos con cacodilato 0,1M, y 2 lavados en agua didestilada. Se resuspendió el precipitado en 1% de acetato de uranilo. Se incubó 2 horas a 4°C. Durante este tiempo se preparó la resina mediante rotación a temperatura ambiente (25g EPON (Fluka 45345), 14,70g DDSA (Fluka 45346), 11,50g MNA (Fluka 45347), 0,77g DMP-30 (Fluka 45348)). La inclusión en resina se inició con la deshidratación de las muestras en un gradiente de alcoholes incubando 5 minutos cada vez (1x70%, 3x95%, 4x100%). Tras la deshidratación se resuspendió en una mezcla 1:1 de la resina con etanol 100%. Se incubó durante 4 horas, dejando abiertos los moldes. A continuación se centrifugó a 1000g durante 3 minutos y se añadió resina pura. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente, manteniendo abierto los moldes. A la mañana siguiente se cambió de nuevo la resina y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente se cambió la resina de nuevo y se dejó polimerizar a 60°C durante 12 horas.

Tras la polimerización de la resina, se realizaron los cortes empleando el ultramicrotomo modelo UltracutE (Reichert-Jung), de grosor "oro pálido (90nm)", recogidos sobre rejillas de níquel. La contratinción de los cortes se incubando las rejillas en 2% de acetato de uranilo durante 30 minutos, el lavado posterior con agua destilada y la incubación en citrato de plomo durante 5 minutos.

Para la captación de imágenes se empleó el microscopio PHILIPS CM-10 y la cámara EMCCD (4Mpx). La tensión de trabajo fue 80Kw.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

6. 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. *J Cell Biol* **180**: 713-720

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. *EMBO J* **29**: 292-303

Anantharaman V, Aravind L (2002) The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol* **3**: research0023

Anelli T, Sitia R (2008) Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J* **27**: 315-327

Antonin W, Meyer HA, Hartmann E (2000) Interactions between Spc2p and other components of the endoplasmic reticulum translocation sites of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 34068-34072

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. *J Cell Sci* **119**: 2173-2183

Aridor M, Hannan LA (2000) Traffic jam: a compendium of human diseases that affect intracellular transport processes. *Traffic* **1**: 836-851

Aridor M, Hannan LA (2002) Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport. *Traffic* **3**: 781-790

Ast T, Cohen G, Schuldiner M (2013) A network of cytosolic factors targets SRP-independent proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **152**: 1134-1145

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

Azzouz N, Kamena F, Seeberger PH (2010) Synthetic glycosylphosphatidylinositol as tools for glycoparasitology research. *OMICS* **14**: 445-454

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. *EMBO J* **13**: 4886-4895

6. Bibliografía

Barlowe C (1997) Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins. *J Cell Biol* **139**: 1097-1108

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

Barlowe 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. *J Cell Biol* **155**: 885-891

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. *J Cell Biol* **176**: 255-261

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

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

Belden WJ, Barlowe C (2001b) Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *J Biol Chem* **276**: 43040-43048

Belden WJ, Barlowe C (2001c) 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. *Mol Biol Cell* **24**: 2727-2738

Bi X, Corpina RA, Goldberg J (2002) Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* **419**: 271-277

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. *J Cell Biol* **171**: 919-924

- Boltz KA, Ellis LL, Carney GE (2007) *Drosophila melanogaster* p24 genes have developmental, tissue-specific, and sex-specific expression patterns and functions. *Dev Dyn* **236**: 544-555
- Bonifacino JS, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**: 153-166
- Bonnon C, Wendeler MW, Paccaud JP, Hauri HP (2010) Selective export of human GPI-anchored proteins from the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science* **123**: 1705-1715
- Brandizzi F, Barlowe C (2013) Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **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. *Mol Biol Cell* **17**: 4780-4789
- Buechling T, Chaudhary V, Spirohn K, Weiss M, Boutros M (2011) p24 proteins are required for secretion of Wnt ligands. *EMBO Rep* **12**: 1265-1272
- Burda P, Aebi M (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 239-257
- Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S (2007) Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* **12**: 671-682
- Caldwell SR, Hill KJ, Cooper AA (2001) Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J Biol Chem* **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. *EMBO J* **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. *J Cell Biol* **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
- Carvalho P, Goder V, Rapoport TA (2006) Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* **126**: 361-373
- Casanova JE (2007) Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic* **8**: 1476-1485

6. Bibliografía

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. *Mol Biol 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 α -related proteins in metazoan cells. *J Cell Sci* **120**: 2454-2466

Connerly PL, Esaki M, Montegna EA, Strongin DE, Levi S, Soderholm J, Glick BS (2005) Sec16 is a determinant of transitional ER organization. *Curr Biol* **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. *EMBO J* **17**: 6863-6870

Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JL, Toufighi K, Mostafavi S, Prinz J, St Onge RP, VanderSluis B, Makhnevych T, Vizeacoumar FJ, Alizadeh S, Bahr S, Brost RL, Chen Y, Cokol M, Deshpande R, Li Z, Lin ZY, Liang W, Marback M, Paw J, San Luis BJ, Shuteriqi E, Tong AH, van Dyk N, Wallace IM, Whitney JA, Weirauch MT, Zhong G, Zhu H, Houry WA, Brudno M, Ragibizadeh S, Papp B, Pal C, Roth FP, Giaever G, Nislow C, Troyanskaya OG, Bussey H, Bader GD, Gingras AC, Morris QD, Kim PM, Kaiser CA, Myers CL, Andrews BJ, Boone C (2010) The genetic landscape of a cell. *Science* **327**: 425-431

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. *Mol Biol Cell* **14**: 2357-2371

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

Chen F, Hasegawa H, Schmitt-Ulms G, Kawarai T, Bohm C, Katayama T, Gu Y, Sanjo N, Glista M, Rogaeva E, Wakutani Y, Pardossi-Piquard R, Ruan X, Tandon A, Checler F, Marambaud P, Hansen K, Westaway D, St George-Hyslop P, Fraser P (2006) TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature* **440**: 1208-1212

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. *Mol Biol Cell* **22**: 3634-3644

- Chen X, VanValkenburgh C, Liang H, Fang H, Green N (2001) Signal peptidase and oligosaccharyltransferase interact in a sequential and dependent manner within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **276**: 2411-2416
- D'Arcangelo JG, Stahmer KR, Miller EA (2013) Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochim Biophys Acta*
- Dancourt J, Barlowe C (2010) Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem* **79**: 777-802
- Deng Y, Golinelli-Cohen MP, Smirnova E, Jackson CL (2009) A COPI coat subunit interacts directly with an early-Golgi localized Arf exchange factor. *EMBO Rep* **10**: 58-64
- 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. *Curr Biol* **10**: 55-58
- Dolcini V, Dunys J, Sevalle J, Chen F, Guillot-Sestier MV, St George-Hyslop P, Fraser PE, Checler F (2008) TMP21 regulates Abeta production but does not affect caspase-3, p53, and neprilysin. *Biochem Biophys Res Commun* **371**: 69-74
- Dominguez M, Dejgaard K, Fullekrug J, Dahan S, Fazel A, Paccaud JP, Thomas DY, Bergeron JJ, Nilsson T (1998) gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J Cell Biol* **140**: 751-765
- Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* **337**: 243-253
- Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **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. *J Cell Biol* **187**: 449-453
- Fang H, Mullins C, Green N (1997) In addition to SEC11, a newly identified gene, SPC3, is essential for signal peptidase activity in the yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **272**: 13152-13158
- Fath S, Mancias JD, Bi X, Goldberg J (2007) Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell* **129**: 1325-1336
- Fiedler K, Veit M, Stamnes MA, Rothman JE (1996) Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**: 1396-1399

6. Bibliografía

- Fraering P, Imhof I, Meyer U, Strub JM, van Dorsselaer A, Vionnet C, Conzelmann A (2001) The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Mol Biol Cell* **12**: 3295-3306
- Fromme JC, Orci L, Schekman R (2008) Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends Cell Biol* **18**: 330-336
- Fujita M, Jigami Y (2008) Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 410-420
- Fujita M, Kinoshita T (2010) Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins. *FEBS Lett* **584**: 1670-1677
- Fujita M, Maeda Y, Ra M, Yamaguchi Y, Taguchi R, Kinoshita T (2009) GPI glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi. *Cell* **139**: 352-365
- Fujita M, Umemura M, Yoko-o T, Jigami Y (2006a) PER1 is required for GPI-phospholipase A2 activity and involved in lipid remodeling of GPI-anchored proteins. *Mol Biol Cell* **17**: 5253-5264
- Fujita M, Watanabe R, Jaensch N, Romanova-Michaelides M, Satoh T, Kato M, Riezman H, Yamaguchi Y, Maeda Y, Kinoshita T (2011) Sorting of GPI-anchored proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI. *J Cell Biol* **194**: 61-75
- Fujita M, Yoko OT, Jigami Y (2006b) Inositol deacylation by Bst1p is required for the quality control of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Biol Cell* **17**: 834-850
- Fullekrug J, Suganuma T, Tang BL, Hong W, Storrie B, Nilsson T (1999) Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members. *Mol Biol 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14303-14308
- Gauss R, Kanehara K, Carvalho P, Ng DT, Aebi M (2011) A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **42**: 782-793
- Gayle MA, Slack JL, Bonnert TP, Renshaw BR, Sonoda G, Taguchi T, Testa JR, Dower SK, Sims JE (1996) Cloning of a putative ligand for the T1/ST2 receptor. *J Biol Chem* **271**: 5784-5789
- Gaynor EC, Emr SD (1997) COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *J Cell Biol* **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
- Ghugtyal V, Vionnet C, Roubaty C, Conzelmann A (2007) CWH43 is required for the introduction of ceramides into GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **65**: 1493-1502
- Gillingham AK, Munro S (2007) The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 579-611
- 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. *Mol Biol 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. *J Cell Biol* **167**: 281-292
- Gimeno RE, Espenshade P, Kaiser CA (1996) COPII coat subunit interactions: Sec24p and Sec23p bind to adjacent regions of Sec16p. *Mol Biol Cell* **7**: 1815-1823
- Glick BS, Nakano A (2009) Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 113-132
- Goder V, Melero A (2011) Protein O-mannosyltransferases participate in ER protein quality control. *J Cell Sci* **124**: 144-153
- Goldberg J (2000) Decoding of sorting signals by coatamer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell* **100**: 671-679
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* **1**: 1-39
- 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. *EMBO J* **20**: 6751-6760
- Graham TR, Burd CG (2011) Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends Cell Biol* **21**: 113-121
- Gross E, Sevier CS, Heldman N, Vitu E, Bentzur M, Kaiser CA, Thorpe C, Fass D (2006) Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 299-304
- Haass FA, Jonikas M, Walter P, Weissman JS, Jan YN, Jan LY, Schuldiner M (2007) Identification of yeast proteins necessary for cell-surface function of a potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18079-18084

6. Bibliografía

- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-579
- Hasegawa H, Liu L, Nishimura M (2010) Dilysine retrieval signal-containing p24 proteins collaborate in inhibiting gamma-cleavage of amyloid precursor protein. *J Neurochem* **115**: 771-781
- Hehnlly H, Stamnes M (2007) Regulating cytoskeleton-based vesicle motility. *FEBS Lett* **581**: 2112-2118
- Helenius A, Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**: 1019-1049
- 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
- Hetz C, Glimcher LH (2009) Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome. *Mol Cell* **35**: 551-561
- Hirayama H, Fujita M, Yoko-o T, Jigami Y (2008) O-mannosylation is required for degradation of the endoplasmic reticulum-associated degradation substrate Gas1*_p via the ubiquitin/proteasome pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* **143**: 555-567
- Honda A, Al-Awar OS, Hay JC, Donaldson JG (2005) Targeting of Arf-1 to the early Golgi by membrin, an ER-Golgi SNARE. *J Cell Biol* **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. *Nat Rev Mol Cell Biol* **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. *Mol Cell Biol* **25**: 7696-7710
- Johnson AE, van Waes MA (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 799-842
- Jones S, Newman C, Liu F, Segev N (2000) The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol Biol Cell* **11**: 4403-4411
- Jones S, Richardson CJ, Litt RJ, Segev N (1998) Identification of regulators for Ypt1 GTPase nucleotide cycling. *Mol Biol Cell* **9**: 2819-2837

- Jonikas MC, Collins SR, Denic V, Oh E, Quan EM, Schmid V, Weibezahn J, Schwappach B, Walter P, Weissman JS, Schuldiner M (2009) Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* **323**: 1693-1697
- Jun Y, Ahn K (2011) Tmp21, a novel MHC-I interacting protein, preferentially binds to Beta2-microglobulin-free MHC-I heavy chains. *BMB Rep* **44**: 369-374
- 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*. *J Cell Sci* **121**: 1293-1302
- Kelleher DJ, Gilmore R (2006) An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* **16**: 47R-62R
- 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
- Kimura T, Hosoda Y, Sato Y, Kitamura Y, Ikeda T, Horibe T, Kikuchi M (2005) Interactions among yeast protein-disulfide isomerase proteins and endoplasmic reticulum chaperone proteins influence their activities. *J Biol Chem* **280**: 31438-31441
- Kinoshita T, Maeda Y, Fujita M (2013) Transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins from the endoplasmic reticulum. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 2473-2478
- Koehler E, Bonnon C, Waldmeier L, Mitrovic S, Halbeisen R, Hauri HP (2010) p28, a novel ERGIC/cis Golgi protein, required for Golgi ribbon formation. *Traffic* **11**: 70-89
- Kota J, Gilstring CF, Ljungdahl PO (2007) Membrane chaperone Shr3 assists in folding amino acid permeases preventing precocious ERAD. *J Cell Biol* **176**: 617-628
- 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. *Mol Biol 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 (2011) Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *EMBO J*
- 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. *EMBO J* **31**: 1014-1027
- Langer JD, Roth CM, Bethune J, Stoops EH, Brugger B, Herten DP, Wieland FT (2008) A conformational change in the alpha-subunit of coatomer induced by ligand binding to gamma-COP revealed by single-pair FRET. *Traffic* **9**: 597-607

6. Bibliografía

- Langer JD, Stoops EH, Bethune J, Wieland FT (2007) Conformational changes of coat proteins during vesicle formation. *FEBS Lett* **581**: 2083-2088
- Lee C, Goldberg J (2010) Structure of coatomer 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
- Levi SK, Bhattacharyya D, Strack RL, Austin JR, 2nd, Glick BS (2010) The yeast GRASP Grh1 colocalizes with COPII and is dispensable for organizing the secretory pathway. *Traffic* **11**: 1168-1179
- Lewis MJ, Nichols BJ, Prescianotto-Baschong C, Riezman H, Pelham HR (2000) Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* **11**: 23-38
- Lewis MJ, Sweet DJ, Pelham HR (1990) The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* **61**: 1359-1363
- 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
- Lord C, Ferro-Novick S, Miller EA (2013) The highly conserved COPII coat complex sorts cargo from the endoplasmic reticulum and targets it to the golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**
- Losev E, Papanikou E, Rossanese OW, Glick BS (2008) Cdc1p is an endoplasmic reticulum-localized putative lipid phosphatase that affects Golgi inheritance and actin polarization by activating Ca²⁺ signaling. *Molecular and cellular biology* **28**: 3336-3343
- Losev E, Reinke CA, Jellen J, Strongin DE, Bevis BJ, Glick BS (2006) Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* **441**: 1002-1006
- Luo W, Wang Y, Reiser G (2007) p24A, a type I transmembrane protein, controls ARF1-dependent resensitization of protease-activated receptor-2 by influence on receptor trafficking. *J Biol Chem* **282**: 30246-30255
- Lussier M, Sdicu AM, Winnett E, Vo DH, Sheraton J, Dusterhoft A, Storms RK, Bussey H (1997a) Completion of the *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence allows identification of KTR5, KTR6 and KTR7 and definition of the nine-membered KRE2/MNT1 mannosyltransferase gene family in this organism. *Yeast* **13**: 267-274
- Lussier M, White AM, Sheraton J, di Paolo T, Treadwell J, Southard SB, Horenstein CI, Chen-Weiner J, Ram AF, Kapteyn JC, Roemer TW, Vo DH, Bondoc DC, Hall J, Zhong WW, Sdicu AM, Davies J, Klis FM, Robbins PW, Bussey H (1997b) Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 435-450

- Ma Y, Hendershot LM (2004) ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* **28**: 51-65
- Maeda Y, Tashima Y, Houjou T, Fujita M, Yoko-o T, Jigami Y, Taguchi R, Kinoshita T (2007) Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association. *Mol Biol Cell* **18**: 1497-1506
- Malkus P, Jiang F, Schekman R (2002) Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *J Cell Biol* **159**: 915-921
- 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
- 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. *Mol Biol Cell* **10**: 1923-1938
- Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, Yeung T (1998) COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* **93**: 263-275
- Matsuura-Tokita K, Takeuchi M, Ichihara A, Mikuriya K, Nakano A (2006) Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* **441**: 1007-1010
- Mayor S, Riezman H (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 110-120
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**: 766-772
- 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 coatomer. *J Cell Biol* **179**: 209-217
- Miller E, Antony B, Hamamoto S, Schekman R (2002) Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J* **21**: 6105-6113
- Miller EA, Barlowe C (2010) Regulation of coat assembly--sorting things out at the ER. *Curr Opin Cell Biol* **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

6. Bibliografía

Miller VJ, Sharma P, Kudlyk TA, Frost L, Rofe AP, Watson IJ, Duden R, Lowe M, Lupashin VV, Ungar D (2013) Molecular insights into vesicle tethering at the Golgi by the conserved oligomeric Golgi (COG) complex and the golgin TATA element modulatory factor (TMF). *J Biol Chem* **288**: 4229-4240

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. *Mol Biol 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. *Mol Biol Cell* **18**: 2400-2410

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. *J Cell Biol* **148**: 925-930

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

Nuoffer C, Horvath A, Riezman H (1993) Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J Biol Chem* **268**: 10558-10563

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*. *J Cell Sci* **125**: 3412-3420

Orci L, Ravazzola M, Mack GJ, Barlowe C, Otte S (2003) Mammalian Erv46 localizes to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment and to cis-Golgi cisternae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4586-4591

Orlean P, Menon AK (2007) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycosphospholipids. *J Lipid Res* **48**: 993-1011

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

Pannunzio VG, Burgos HI, Alonso M, Mattoon JR, Ramos EH, Stella CA (2004) A Simple Chemical Method for Rendering Wild-Type Yeast Permeable to Brefeldin A That Does Not Require the Presence of an *erg6* Mutation. *J Biomed Biotechnol* **2004**: 150-155

- 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. *Mol Biol Cell* **16**: 3786-3799
- Peng R, De Antoni A, Gallwitz D (2000) Evidence for overlapping and distinct functions in protein transport of coat protein Sec24p family members. *J Biol Chem* **275**: 11521-11528
- Peyroche A, Antonny B, Robineau S, Acker J, Cherfils J, Jackson CL (1999) Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* **3**: 275-285
- Peyroche A, Courbeyrette R, Rambourg A, Jackson CL (2001) The ARF exchange factors Gea1p and Gea2p regulate Golgi structure and function in yeast. *J Cell Sci* **114**: 2241-2253
- Peyroche A, Paris S, Jackson CL (1996) Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* **384**: 479-481
- Pittet M, Conzelmann A (2007) Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 405-420
- 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. *J Cell Biol* **155**: 1239-1250
- Powers J, Barlowe C (2002) Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell* **13**: 880-891
- Pucadyil TJ, Schmid SL (2009) Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science* **325**: 1217-1220
- Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**: 663-669
- 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. *J Cell Biol* **157**: 395-404
- Reinhard C, Harter C, Bremser M, Brugger B, Sohn K, Helms JB, Wieland F (1999) Receptor-induced polymerization of coatomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1224-1228
- 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

6. Bibliografía

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

Richardson BC, McDonold CM, Fromme JC (2012) The Sec7 Arf-GEF is recruited to the trans-Golgi network by positive feedback. *Dev Cell* **22**: 799-810

Richardson CJ, Jones S, Litt RJ, Segev N (1998) GTP hydrolysis is not important for Ypt1 GTPase function in vesicular transport. *Mol Cell Biol* **18**: 827-838

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. *J Cell Biol* **201**: 1027-1036

Roberg KJ, Crotnell M, Espenshade P, Gimeno R, Kaiser CA (1999) LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **145**: 659-672

Rojo M, Emery G, Marjomaki V, McDowall AW, Parton RG, Gruenberg J (2000) The transmembrane protein p23 contributes to the organization of the Golgi apparatus. *J Cell Sci* **113 (Pt 6)**: 1043-1057

Rojo M, Pepperkok R, Emery G, Kellner R, Stang E, Parton RG, Gruenberg J (1997) Involvement of the transmembrane protein p23 in biosynthetic protein transport. *J Cell Biol* **139**: 1119-1135

Rossanese OW, Reinke CA, Bevis BJ, Hammond AT, Sears IB, O'Connor J, Glick BS (2001) A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **153**: 47-62

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*. *J Cell Biol* **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. *Mol Biol Cell* **6**: 1769-1780

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. *Mol Microbiol*

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. *Mol Cell* **7**: 433-442

Sacher M, Ferro-Novick S (2001) Purification of TRAPP from *Saccharomyces cerevisiae* and identification of its mammalian counterpart. *Methods Enzymol* **329**: 234-241

- 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. *EMBO J* **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
- Sambrook J, Russell DW (2006) Purification of PCR products in preparation for cloning. *CSH Protoc* **2006**
- Sandmann T, Herrmann JM, Dengjel J, Schwarz H, Spang A (2003) Suppression of coatamer mutants by a new protein family with COPI and COPII binding motifs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**: 3097-3113
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2752-2757
- Sato K (2004) COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum. *J Biochem* **136**: 755-760
- Sato K, Nakano A (2003) Oligomerization of a cargo receptor directs protein sorting into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell* **14**: 3055-3063
- Sato K, Nakano A (2005) Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol* **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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9693-9698
- Schaaf G, Ortlund EA, Tyeryar KR, Mousley CJ, Ile KE, Garrett TA, Ren J, Woolls MJ, Raetz CR, Redinbo MR, Bankaitis VA (2008) Functional anatomy of phospholipid binding and regulation of phosphoinositide homeostasis by proteins of the sec14 superfamily. *Mol Cell* **29**: 191-206
- Schimmoller F, Singer-Kruger B, Schroder S, Kruger U, Barlowe C, Riezman H (1995) The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J* **14**: 1329-1339
- Schlenstedt G, Harris S, Risse B, Lill R, Silver PA (1995) A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J Cell Biol* **129**: 979-988
- 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

6. Bibliografía

organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* **123**: 507-519

Schuldiner M, Metz J, Schmid V, Denic V, Rakwalska M, Schmitt HD, Schwappach B, Weissman JS (2008) The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* **134**: 634-645

Schwarz F, Aebi M (2011) Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* **21**: 576-582

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

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. *J Cell Biol* **179**: 1179-1192

Shin HW, Nakayama K (2004) Guanine nucleotide-exchange factors for arf GTPases: their diverse functions in membrane traffic. *J Biochem* **136**: 761-767

Shindiapina P, Barlowe C (2010) Requirements for transitional endoplasmic reticulum site structure and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **21**: 1530-1545

Sohn K, Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Bremser M, Lottspeich F, Fiedler K, Helms JB, Wieland FT (1996) A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol* **135**: 1239-1248

Spang A (2012) The DSL1 complex: the smallest but not the least CATCHR. *Traffic* **13**: 908-913

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. *Mol Biol Cell* **12**: 1035-1045

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

Springer S, Spang A, Schekman R (1999) A primer on vesicle budding. *Cell* **97**: 145-148

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. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 428-433

- Stearns T, Kahn RA, Botstein D, Hoyt MA (1990) ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes. *Mol Cell Biol* **10**: 6690-6699
- Stefanovic S, Hegde RS (2007) Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* **128**: 1147-1159
- 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
- Sutterlin C, Escribano MV, Gerold P, Maeda Y, Mazon MJ, Kinoshita T, Schwarz RT, Riezman H (1998) *Saccharomyces cerevisiae* GPI10, the functional homologue of human PIG-B, is required for glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis. *Biochem J* **332 (Pt 1)**: 153-159
- 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. *J Cell Biol* **157**: 631-643
- Sztul E, Lupashin V (2009) Role of vesicle tethering factors in the ER-Golgi membrane traffic. *FEBS Lett* **583**: 3770-3783
- Takida S, Maeda Y, Kinoshita T (2008) Mammalian GPI-anchored proteins require p24 proteins for their efficient transport from the ER to the plasma membrane. *Biochem J* **409**: 555-562
- Tang BL, Wang Y, Ong YS, Hong W (2005) COPII and exit from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1744**: 293-303
- 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
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**: 249-258
- Trilla JA, Duran A, Roncero C (1999) Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **145**: 1153-1163
- Tripathi A, Ren Y, Jeffrey PD, Hughson FM (2009) Structural characterization of Tip20p and Dsl1p, subunits of the Dsl1p vesicle tethering complex. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 114-123

6. Bibliografía

Tu BP, Weissman JS (2002) The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **10**: 983-994

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. *J Cell Biol* **147**: 729-742

Vembar SS, Brodsky JL (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 944-957

Vetrivel KS, Gong P, Bowen JW, Cheng H, Chen Y, Carter M, Nguyen PD, Placanica L, Wieland FT, Li YM, Kounnas MZ, Thinakaran G (2007) Dual roles of the transmembrane protein p23/TMP21 in the modulation of amyloid precursor protein metabolism. *Mol Neurodegener* **2**: 4

Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**: 1081-1086

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. *J Cell Sci* **115**: 2627-2637

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. *Mol Biol 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

Zong M, Satoh A, Yu MK, Siu KY, Ng WY, Chan HC, Tanner JA, Yu S (2012) TRAPPC9 mediates the interaction between p150 and COPII vesicles at the target membrane. *PLoS One* **7**: e29995